

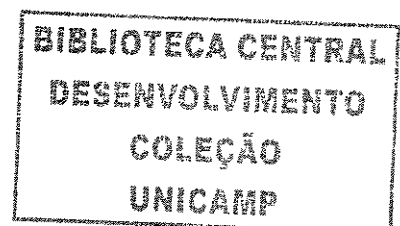
ZORAIDA SACHETTO

**PESQUISA DA PRESENÇA DO DNA DO PARVOVÍRUS B19
EM TECIDOS DE PACIENTES COM POLIARTERITE
NODOSA E POLIANGIÍTE MICROSCÓPICA PELA
REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE**

CAMPINAS

2005

i



ZORAIDA SACHETTO

**PESQUISA DA PRESENÇA DO DNA DO PARVOVÍRUS B19
EM TECIDOS DE PACIENTES COM POLIARTERITE
NODOSA E POLIANGIÍTE MICROSCÓPICA PELA
REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre
em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica*

ORIENTADORA: Profa. Dra. Sandra Regina Muchinechi Fernandes

CO-ORIENTADORES: Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa

Profa. Dra. Eliane Maria Ingrid Amstalden

CAMPINAS

2005

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

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

Sa14p Sachetto, Zoraida
Pesquisa da presença do DNA do parvovírus B19 em tecidos de pacientes com poliarterite nodosa e poliangiíte microscópica pela reação em cadeia da polimerase / Zoraida Sachetto. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador: Sandra Regina Muchinechi Fernandes
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Parvovírus. 2. Vasculite. 3. Reação em cadeia da polimerase.
I. Fernandes, Sandra Regina Muchinechi. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

(slp/fcm)

UNIDADE BC
Nº CHAMADA HVNI/CTIP
Sa14p
V _____ EX _____
TOMBO BC/ 67633
PROC 16.P.00123/06
C _____ D~~X~~ _____
PREÇO 11,00
DATA 22/03/06
Nº CPD _____

BIB ID - 376216

Banca Examinadora da Defesa de Tese de Mestrado

Orientador(a): *Profa Dra. Sandra Regina Muchinechi Fernandes*

Membros:

1. Prof(a). Dr(a). Sandra Regina Muchinechi Fernandes

2. Prof(a). Dr(a). Ibsen Bellini Coimbra

3. Prof(a). Dr(a). José Roberto Provenza

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

Data: 28/01/2005

Aos meus pais, com amor.

Aos meus irmãos, Verona e Cláudio, com carinho.

Aos amigos, com saudade.

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Sandra Regina Muchinechi Fernandes, pela confiança, paciência e competência durante a realização desta tese.

À Prof. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa e à Prof. Dra. Eliane Maria Ingrid Amstalden pela valiosa colaboração como co-orientadores.

Ao Prof. Dr. Edison Durigon (Dept. de Biologia/USP-SP) e Dr. Ronaldo Freitas (Instituto de Virologia/Belém-Pará) pela cooperação científica.

Ao Sr. Sérgio pelo valioso auxílio na preparação do material estudado.

À Dra. Roseneide Conde e à pesquisadora Paula Andrade pela fundamental participação na realização da tese.

À Dra. Adriana de Tommaso pela atenção, sugestões e importante auxílio no desenvolvimento deste estudo.

A todos os pesquisadores e funcionários do laboratório de diagnóstico de doenças infecciosas por técnicas de biologia molecular da FCM/UNICAMP.

Ao corpo docente da Disciplina de Reumatologia da FCM/UNICAMP pelo incentivo e compreensão.

À Sra. Maria Elisa pelo carinho e amizade.

Aos residentes e pós-graduandos da Disciplina de Reumatologia da FCM/UNICAMP pela amizade.

	<i>Pág.</i>
RESUMO	<i>xii</i>
ABSTRACT	<i>xvi</i>
1- INTRODUÇÃO	18
1.1- Generalidades	19
1.2- Etiopatogênese das vasculites	22
1.3- Poliarterite nodosa e poliangiíte microscópica	26
1.3.1- Fatores prognósticos.....	33
1.3.2- Índices de atividade.....	34
1.4- Parvovírus B19	35
1.5- Parvovírus B19 associado a vasculites	37
1.6- Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	38
2- OBJETIVOS	41
3- METODOLOGIA	43
3.1- Seleção dos pacientes	44
3.1.1- Poliarterite nodosa.....	45
3.1.2- Poliangiíte microscópica.....	45

3.2- Métodos.....	46
3.2.1- Extração do DNA.....	46
3.2.2- Amplificação gênica pela PCR.....	49
3.2.2.1- Amplificação gênica pela PCR para o gene da β -globina humana.....	49
3.2.2.2 - Nested PCR para detecção parvovírus B19.....	50
3.2.2.3- Controles.....	51
3.2.2.4- Referências bibliográficas.....	51
4- RESULTADOS.....	52
4.1- Pacientes selecionados.....	53
4.2- PCR para beta-globina humana.....	54
4.3- Achados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais.....	55
4.3.1- Poliarterite nodosa.....	56
4.3.2- Poliangiíte microscópica.....	59
4.4- PCR para parvovírus B19.....	61
5- DISCUSSÃO.....	62
6- CONCLUSÕES.....	72
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
8- ANEXO.....	88

ACR	colégio americano de reumatologia
ANCA	anticorpo anti-citoplasma de neutrófilos
B19	parvovírus B19
β-GLOBINA	betaglobina humana
BVAS	“Birmingham vasculitis active score”
CHCC	consenso - conferência de Chapell-Hill
CMV	citomegalovírus
“ELISA”	“Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay”
FFS	“five factor score”
GCA	arterite de células gigantes
GMRP	glomerulonefrite rapidamente progressiva
GW	granulomatose de wegner
HAS	hipertensão arterial sistêmica
HIV	virus da imunodeficiência humana
IAM	infarto agudo do miocárdio
IFN	interferon
IL	interleucina

LES	lupus eritematoso sistêmico
MPO	mieloperoxidase
PAN	poliarterite nodosa
PR3	proteinase-3
PCR	reação em cadeia de polimerase
SNC	sistema nervoso central
TNF	fator de necrose tumoral
VHS	velocidade de hemossedimentação

LISTA DE TABELAS

	<i>Pág.</i>
Tabela 1 Relação dos órgãos estudados.....	54
Tabela 2 Características demográficas.....	55
Tabela 3 Características clínicas – PAN.....	58
Tabela 4 Características clínicas – Poliangiíte microscópica.....	60

LISTA DE QUADROS

	<i>Pág.</i>
Quadro 1 Classificação das vasculites sistêmicas.....	21
Quadro 2 Nomenclatura de Chapel Hill para as vasculites sistêmicas.....	28
Quadro 3 Critérios Classificatórios para PAN.....	30

	<i>Pág.</i>
Figura 1 Sequência provável dos efeitos pró-inflamatórios do ANCA nas vasculites sistêmicas.....	24
Figura 2 Resposta imunológica à infecção pelo B19.....	36
Figura 3 PCR “simples”.....	39
Figura 4 Nested PCR.....	40
Figura 5 PCR para beta-globina humana.....	55
Figura 6 Nested PCR para parvovirus B19.....	61

RESUMO

Poliarterite nodosa (PAN) é uma vasculite sistêmica necrosante de pequenas e médias artérias e a poliangiíte microscópica de pequenos vasos (arteríolas, vênulas e capilares) caracterizada por glomerulonefrite necrosante pauci-imune rapidamente progressiva e envolvimento pulmonar que estão ausente na PAN. Uma possível relação etiológica entre as vasculites sistêmicas e infecção viral tem sido considerada. O vírus da hepatite B está comprovadamente associado à etiopatogênese em alguns casos de PAN e outros agentes virais são também apontados como prováveis desencadeadores de PAN, tais como os vírus HIV, HTLV1, citomegalovírus e parvovirus B19 (B19). Na PAN existem relatos de casos comprovando a presença concomitante de atividade da doença e testes sorológicos IgM positivos para o B19 e pela presença do DNA do B19 no soro, medula óssea e músculo em um paciente, pesquisado por reação em cadeia de polimerase (PCR). Não há investigação referente à pesquisa de DNA do parvovírus B19 em amostras teciduais de PAN e poliangiíte microscópica. A pesquisa desta associação se torna importante na abordagem terapêutica destas doenças pela necessidade de corticosteróides e imunossupressores podendo agravar as manifestações de uma parvovirose associada.

Nosso objetivo foi pesquisar a presença do DNA viral do B19 em tecidos fixados em parafina e com evidência histopatológica de vasculite em pacientes com PAN e poliangiíte microscópica e se há relação com as manifestações clínicas, índices de atividade (BVAS) e gravidade (FFS) da doença.

Foram investigados todos os pacientes com diagnóstico histopatológico de PAN ou poliangiíte microscópica, com blocos de parafina disponíveis no Departamento de Anatomia Patológica e acompanhados no Ambulatório de Vasculites do Hospital das Clínicas/Disciplina de Reumatologia da FCM/Unicamp no período de 1985 a 2003. A investigação foi feita pela pesquisa da presença de sequência de ácidos nucleicos do B19 por PCR.

Foram encontrados 21 pacientes com amostras teciduais e blocos de parafina disponíveis para estudo. Destas 21 amostras, 17 apresentaram DNA de boa qualidade para realização do PCR para o B19. Dez com diagnóstico de PAN (média da idade $29,3 \pm 15,1$; M:F=1,5:1) e sete de poliangiíte microscópica (média da idade $41,9 \pm 18,5$; M:F=1:1,3). A média do BVAS, no início da doença, foi de $15,7 \pm 7,7$ com mínimo de 5 e máximo de

26 para PAN e de $20,7 \pm 7,1$ com mínimo de 13 e máximo de 31 para poliangiíte microscópica.

Na PAN, FFS=1 em 60% e FFS=0 em 40% dos casos, com média de $0,6 \pm 0,5$.

Na poliangiíte microscópica FFS=2 em 14%, FFS=1 em 43% e FFS=0 também em 43% dos casos, com média de $0,7 \pm 0,8$.

Nenhum dos tecidos avaliados apresentou positividade para o DNA do B19. Este resultado sugere que o B19, provavelmente, não está associado a etiopatogenia da PAN idiopática e da poliangiíte microscópica.

ABSTRACT

Polyarteritis nodosa (PAN) is a well-known form of systemic necrotizing vasculitis. Individualized from PAN, microscopic polyangiitis (MPA) is a systemic vasculitis of small-sized vessels (arterioles, venules or capillaries) characterized by the presence of rapidly progressive glomerulonephritis and pulmonary involvement, absent in PAN. Nowadays, a role of viral infections in primary systemic vasculitis has been considered. The hepatitis B virus is associated with the etiopathogenesis of some cases of PAN. HIV, HTLV1, CMV and parvovirus B19 (B19) may also be found, eventually, in some patients with PAN. Evidence of the B19 involvement in primary systemic vasculitis is based on some anecdotal reports of cases of Wegener's granulomatosis and PAN and studies with giant-cell arteritis. Regarding in PAN, there are few reports showing an active disease and positive serological tests for the B19. B19 DNA in the serum, marrow bone and muscle was found in one patient with PAN. To our knowledge, there is no research related to B19 DNA in tissue samples of patients with PAN and MPA.

Our objective was to identify the presence of B19 DNA in fixed, paraffin-embedded tissue samples obtained from patients with PAN and MPA.

We investigated the patients with histological diagnosis of PAN or MPA who were attended at the university hospital from 1985 to 2003. All fixed, paraffin-embedded tissue samples available, with evidence of vasculitis, were screened for B19 DNA using the polymerase chain reaction (PCR) method.

Among all patients, we found 17 tissue samples available for the study. Ten had PAN (mean age 29.3 ± 15.1 yrs.; M:F sex ratio 1.5:1) and seven had microscopic polyangiitis (mean age 41.9 ± 18.5 yrs.; M:F sex ratio 1:1,3). All of the patients investigated were negative for parvovirus B19 DNA.

These results suggest that the parvovirus B19 is not involved in the pathogenesis of idiopathic PAN and MPA.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Generalidades

As vasculites sistêmicas primárias podem ser definidas como inflamação dos vasos sanguíneos, levando a vários graus de oclusão e isquemia tecidual. O conceito de vasculite baseia-se fundamentalmente em aspectos histopatológicos e/ou arteriográficos. As manifestações clínicas são variadas e dependentes da localização dos fenômenos isquêmicos ou hemorrágicos secundários à lesão vascular (HUNDER *et al.*, 1990).

Também evidencia-se a presença de vasculite como fenômeno secundário a outras doenças do tecido conjuntivo como lupus eritematoso sistêmico (LES), esclerose sistêmica (ES), artrite reumatóide (AR) e síndrome de Sjögren (LIE, 1994). Mixoma atrial, síndrome de Sneddon, neoplasias, hipercolesterolemia, infecção pelo vírus HIV, hepatites B e C e endocardite bacteriana são patologias onde também podemos observar síndrome vasculítica como fenômeno secundário (LIE, 1994; LONGLEY *et al.*, 1986; CALABRESE, 1989; TURAKHIA & KHAN, 1990; BLANCO *et al.*, 1998; GARCIA-PORRUA & GONZALES-GAY, 1999).

Inúmeras tentativas de se agrupar as diversas síndromes de acordo com suas manifestações clínicas, calibre do vaso acometido e tipo histológico foram feitas, mas a classificação atual ainda está distante de ser a ideal, uma vez que não agrupa todas estas características. Várias são as dificuldades encontradas para classificação das vasculites sistêmicas, como a ausência de etiopatogenia bem definida, diferenças na apresentação clínica e no prognóstico da doença, a falta de um substrato laboratorial com especificidade diagnóstica e a resposta variada às medidas terapêuticas. Sendo assim, torna-se necessária a associação de um conjunto de características clínicas, laboratoriais, achados angiográficos e histopatológicos para uma classificação mais segura dos vários tipos de vasculites sistêmicas.

As vasculites podem ser classificadas de acordo com o calibre da artéria acometida (pequeno, médio ou grande), histopatologia da parede vascular, presença de lesões granulomatosas extravasculares, características clínicas e a distinção entre doença primária e secundária (LHOTE *et al.*, 1998; LIE, 1994). (Quadro 1).

Em 1990, o Colégio Americano de Reumatologia (CAR) definiu critérios classificatórios para os diferentes tipos de vasculites sistêmicas primárias (BLOCH *et al.*, 1989), através de um estudo multicêntrico realizado com a finalidade de verificar a sensibilidade e a especificidade dos achados clínicos, laboratoriais, angiográficos e histopatológicos das vasculites sistêmicas primárias. Apesar desses critérios serem ainda amplamente utilizados, o não reconhecimento da poliangiíte microscópica como entidade distinta da PAN clássica tornou essa classificação incompleta. Em 1994 foi elaborada a nomenclatura de Chapel Hill para as vasculites sistêmicas primárias, definindo-se cada uma delas, de acordo com o calibre da artéria comprometida e dados histopatológicos e angiográficos (JENNETTE *et al.*, 1994). Os autores classificaram 10 formas distintas de vasculites em três grupos: vasculite de vasos de grande, médio e pequeno calibre. Os sinais propostos para diferenciação da PAN e poliangiíte microscópica é a ausência versus a presença de vasculite em arteríolas, vênulas ou capilares na PAN, o que permite que a poliangiíte microscópica também possa, eventualmente, comprometer vasos de médio calibre. Esta nomenclatura tem o grande mérito de pela primeira vez reconhecer a poliangiíte microscópica como entidade clínica distinta da PAN. A poliangiíte microscópica passou então a ocupar um lugar de destaque (em incidência) nas vasculites sistêmicas e segundo JENNETTE *et al.*, 1994, tornando a PAN uma entidade mais rara do que se supunha anteriormente. A diferenciação entre PAN e poliangiíte microscópica não pode ser baseada apenas em critérios histológicos. Algumas manifestações clínicas, especialmente o envolvimento pulmonar, presença de glomerulonefrite e lesões cutâneas purpúricas quando presentes sugerem o diagnóstico de poliangiíte microscópica. Além desses elementos, a presença de anticorpos dirigidos contra citoplasma de neutrófilos (ANCA) se configura em um substrato laboratorial auxiliar no diagnóstico da poliangiíte microscópica.

Quadro 1- Classificação das vasculites sistêmicas

VASCULITES PRIMÁRIAS

- De grandes e médios vasos:

Arterite de Takayasu

Arterite de células gigantes/ arterite temporal

Angiíte isolada do SNC

- Predominantemente de médios e pequenos vasos:

Poliarterite nodosa

Granulomatose de Wegener

Síndrome de Churg-Strauss

- Predominantemente de pequenos vasos:

Poliangiíte microscópica

Síndrome de Henoch-Schönlein

Angiíte leucocitoclástica cutânea

- Miscelânea:

Tromboangiíte obliterante

Síndrome de Cogan

Doença de Kawasaki

Doença de Behçet

VASCULITES SECUNDÁRIAS

Infecções

Doenças difusas do tecido conjuntivo (LES, AR, ES, SS)

Uso de drogas

Crioglobulinemia mista essencial

Neoplasias

Vasculite hipocomplementêmica

Pós transplante de órgãos

Pseudovasculites (mixoma, síndrome de Sneddon, endocardite bacteriana)

SNC: sistema nervoso central; LES: lupus eritematoso sistêmico; AR: artrite reumatóide; ES: esclerose sistêmica; SS: síndrome de Sjögren; LIE *et al.* Arthritis Rheum, 37:181-6, 1994.

1.2 - Etiopatogenia das vasculites

Os mecanismos imunopatogênicos que levam a injúria vascular nas vasculites sistêmicas não são completamente entendidos e são, provavelmente, heterogêneos (LHOTE *et al.*, 1998).

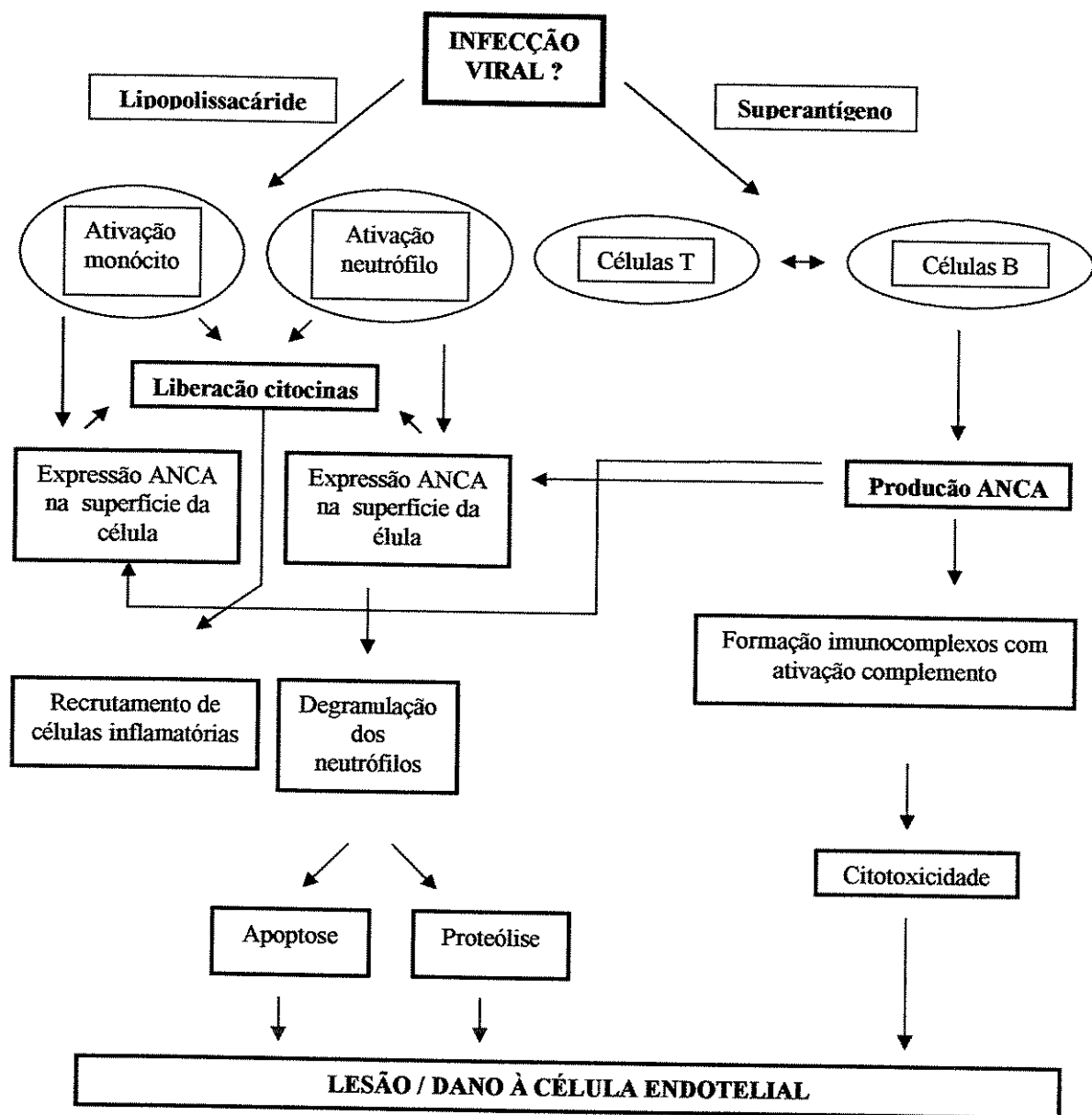
Estudos imunohistoquímicos realizados em artérias de nervos e músculos de pacientes com PAN mostraram que o infiltrado inflamatório consiste predominantemente de macrófagos e linfócitos T, principalmente CD4 (CID *et al.*, 1994). Predomínio de linfócitos T e macrófagos também foram evidenciados em um estudo de 11 casos de arterite necrosante isolada de trato genital feminino (FRANCKE *et al.*, 1998). Estes resultados sugerem que o mecanismo imune mediado por células T exerce importante papel no desenvolvimento e perpetuação das lesões na PAN. Acredita-se que a presença de linfócitos T CD8 exerce também importante função nas vasculites de pequenos vasos (SANDERS *et al.*, 2003).

Anticorpos ANCA parecem ser um possível fator patogênico no desenvolvimento de injúria endotelial em certos tipos de vasculites sistêmicas, principalmente a granulomatose de Wegener e poliangiíte microscópica (KALLENBERG *et al.*, 1992; RUSSEL & SPECKS, 2001; GROSS & CSERNOK, 1995; SCHULTZ & TOZMAN, 1995). Estes anticorpos são dirigidos contra enzimas originalmente localizadas no citoplasma de neutrófilos. Os ANCA são detectados por imunofluorescência indireta ou ensaio imunoenzimático com duas especificidades predominantes: perinuclear (P-ANCA) e citoplasmática (C-ANCA), dirigidas contra as enzimas mieloperoxidase (MPO) e proteinase-3 (PR3), respectivamente. O ANCA pode interagir com os neutrófilos, ativando-os, aumentando sua aderência à parede vascular e induzindo degranulação destas células, o que resultará em dano tecidual. O mecanismo exato pelo qual o ANCA se liga aos neutrófilos ainda não está totalmente esclarecido. Uma das hipóteses propostas é que a presença de infecção pode desencadear a resposta inflamatória levando à ativação de neutrófilos e monócitos mediada por citocinas, particularmente o TNF α , resultando em aumento na expressão dos antígenos de superfície do ANCA (RUSSEL & SPECKS, 2001). Acredita-se também que a produção do ANCA pode ser o resultado da interação entre

células B e T, ativadas por superantígenos microbianos, uma vez que marcadores de ativação das células T estão frequentemente elevados na doença ativa (DAY *et al.*, 2003). O estímulo de monócitos e neutrófilos pelo ANCA resulta em degranulação destas células, com liberação de proteases. O resultado é um dano direto à célula endotelial. Os mecanismos envolvidos incluem citotoxicidade e apoptose, mas também a formação de imunocomplexos localizados com ativação do complemento (SPECKS, 2002). (Figura 1)

MAYET *et al.* (1999) demonstraram que o ANCA promove elevação dos níveis séricos de interleucina 8 (IL-8) nas vasculites associadas a esse anticorpo. A IL-8 é mediador atuante na resposta inflamatória através de suas funções quimiotáticas e de ativação de neutrófilos. As alterações histológicas observadas na fase inicial da PAN sugerem a participação de neutrófilos, sendo demonstrado também aumento sérico de IL-8 nas fases ativas da doença (FREIRE *et al.*, 2004).

Uma outra população distinta de autoanticorpos são descritos como de elevada frequência entre as vasculites sistêmicas, os anticorpos antiendoteliais. Não são considerados específicos de um determinado tipo de vasculite pois podem ser encontrados em casos de vasculite primária, vasculite associada a outros tipos de doenças autoimunes, mas também são observados em outras arteriopatias não inflamatórias (HAYNES, 1992). Os mecanismos propostos pelos quais estes anticorpos podem levar à lesão vascular são os da toxicidade, ativação do complemento, aumento da trombogênese intravascular e o recrutamento de neutrófilos para os locais de inflamação vascular (HAYNES, 1992).



ANCA: Anticorpo anti-citoplasma de neutrófilos; SPECKS U, Cleve Clin J Med, 2002, adaptado.

Figura 1- Sequência provável dos efeitos próinflamatórios do ANCA nas vasculites sistêmicas

O mecanismo provavelmente envolvido nas vasculites granulomatosas consiste na liberação de substâncias proinflamatórias por linfócitos previamente sensibilizados. Há estudos caracterizando o tipo de infiltrado celular nas lesões vasculares. Existem casos com infiltração predominante de macrófagos e linfócitos CD4+; em outros, há também células T CD8+ e células B (SUNDY & HAYNES, 1995). Recentemente, a participação das células dendríticas, localizadas na camada adventícia de artérias de grande e médio calibres tem sido cogitada na reação inflamatória de certos tipos de vasculites primárias tais como arterite de células gigantes, Takayasu e PAN. Acredita-se, nestes casos, que as células dendríticas são as principais desencadeadoras da resposta imune mediada por células T. Embora muitas células funcionem como células apresentadoras de antígenos, somente as células dendríticas maduras podem ativar células T inativas (WEYAND & GORONZY, 2003; KRUPA, *et al.*, 2002).

Algumas drogas também têm sido implicadas na patogênese de vasculites sistêmicas, como o desenvolvimento de vasculite após uso de anfetaminas (FINK, 1991) e alterações angiográficas em usuários de cocaína. (FINK, 1991; SAMUELS, 1996). Ressalta-se que apenas um pequeno número de indivíduos expostos a esses agentes desenvolvem vasculite, sugerindo que outros fatores como os ambientais ou mesmo do hospedeiro, participam no desencadeamento da doença (SUNDY & WAYNES, 1995).

Uma grande contribuição na investigação de uma possível participação viral na etiopatogenia das vasculites sistêmicas primárias foi dado por COMBES (1971), BAKER (1972) e TREPO (1974) através da demonstração do antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HbsAg) e do vírus da hepatite C (HUNDER, 1993) em alguns casos de PAN. Diferentes estratégias de tratamento estão indicadas nesses casos, dentre as quais o uso concomitante de antivirais que levam a soroconversão (DEEREN *et al.*, 2004). O tratamento de escolha para os casos de PAN relacionada ao vírus da hepatite B consiste no uso de lamivudine e plasmaférese após curto período de corticoesteróide (GUILLEVIN, 2004).

Acredita-se na participação de outros vírus como fator desencadeante de lesões vasculares em pacientes com PAN como o vírus da imunodeficiência humana adquirida (HIV) (CALABRESE, 1989) e evidência sorológica de citomegalovirose em paciente com PAN em atividade (FERNANDES *et al.*, 1999). Também evidenciou-se a presença de

parvovirose em pacientes com PAN em atividade. Alguns casos de PAN associados à infecção pelo B19 têm sido descritos (FINKEL *et al.*, 1994; GACHES *et al.*, 1993). Nestes casos a infecção pelo B19 foi confirmada pela presença de anticorpos séricos IgM e IgG contra o B19 por ELISA e também pela presença de partículas do DNA viral (através de PCR) no soro e na medula óssea de dois pacientes (FINKEL *et al.*, 1994). Em relação às vasculites associadas ao ANCA, EDEN A *et al.* (2003) não encontraram associação entre B19 e vasculite em seis pacientes com granulomatose de Wegener, seis com poliangiíte microscópica e em um com síndrome de Churg-Strauss, todos investigados sorologicamente para presença do DNA do B19 por reação em cadeia de polimerase (PCR) (EDEN *et al.*, 2003). Ressaltamos que os estudos virais englobam sorologia e a pesquisa do DNA do B19 na medula óssea e no soro dos pacientes. Não há investigação de partículas do B19 nos tecidos com alterações histológicas de vasculite em pacientes com PAN e poliangiíte microscópica.

1.3- Poliarterite nodosa e poliangiíte microscópica

A PAN é caracterizada como uma vasculite sistêmica necrosante de artérias de médio calibre, primeiro descrita por Kussmaul & Maier (1986) “apud” LHOTE (1998), que pode afetar vários órgãos e sistemas (LHOTE *et al.*, 1998). Individualizada da PAN, a poliangiíte microscópica é uma vasculite de pequenos vasos com manifestações clínicas muito semelhantes às da PAN, às vezes sendo impossível a diferenciação de ambas. A poliangiíte microscópica distingue-se da PAN pela presença (versus ausência) de vasculite em arteríolas, vênulas e capilares. É também caracterizada pela presença de glomerulonefrite necrosante pauci-imune, seja rapidamente progressiva ou de comprometimento segmentar, envolvimento pulmonar, especialmente capilarite pulmonar, e conseqüente hemorragia alveolar, e lesões purpúricas. Todos esses elementos estão ausentes na PAN (LHOTE *et al.*, 1998; GUILLEVIN *et al.*, 1999b). Entretanto, sabe-se que a poliangiíte microscópica apresenta manifestações extra-renais e também há casos sem lesão renal aparente. (Quadro 2)

O início da doença geralmente é insidioso e sintomas constitucionais estão presentes na maioria dos pacientes, como febre, astenia, emagrecimento, mialgia e/ou fraqueza muscular (LHOTE *et al.*, 1998). Esses elementos traduzem a natureza inflamatória e sistêmica da doença. As manifestações articulares são comuns, principalmente artralgia e artrite, e esta quando presente, é transitória, não erosiva e não deformante (JENNETE *et al.*, 2001; GUILLEVIN *et al.*, 1985).

Quadro 2- Nomenclatura de Chapel Hill para as vasculites sistêmicas

Vasculite de vasos de grande calibre (arterite granulomatosa)	
♦ Arterite de células gigantes	-afeta ramos extracranianos da artéria carótida; afeta a artéria temporal; pacientes com mais de 50 anos; polimialgia reumática é freqüente.
♦ Arterite de Takayasu	-afeta aorta e ramos; em pacientes com menos de 50 anos de idade.
Vasculite de vasos de médio calibre	
♦ Poliarterite nodosa	-inflamação necrosante de artérias de pequeno e médio calibres; ausência de GN e de vasculite em arteríolas, vênulas ou capilares.
♦ Doença de Kawasaki	-arterite envolvendo artérias de grande, médio e pequeno calibre; adenomegalia e lesões mucocutâneas; artérias coronárias envolvidas; geralmente em crianças.
Vasculite de vasos de pequeno calibre	
♦ Granulomatose de Wegener	-inflamação granulomatosa; envolve trato respiratório; vasculite necrosante afetando pequenos e médios vasos; GN necrosante é comum.
♦ Síndrome de Churg-Strauss	-inflamação granulomatosa; rica em eosinófilos; envolve trato respiratório; vasculite necrosante afetando vasos de pequeno e médio calibre; associado a asma e eosinofilia.
♦ Poliangiíte microscópica	-vasculite necrosante; pouco ou nenhum depósito imune; afeta pequenos vasos (capilares, vênulas ou arteríolas); arterite necrosante em vasos de pequeno e médio calibre pode estar presente; GN necrosante é comum; capilarite pulmonar freqüente.
♦ Púrpura de Henoch-Schönlein	-vasculite, com depósito IgA; afeta capilares, vênulas e arteríolas ; tipicamente acomete a pele, intestino e glomérulo; associado com artralgia e artrite.
♦ Vasculite por crioglobulinemia essencial	-vasculite, com depósito de crioglobulina; afeta pequenos vasos (arteríolas, vênulas e capilares); associado com crioglobulinas no soro; pele e glomérulo freqüentemente envolvidos.
♦ Angiíte leucocitoclástica cutânea	-angiíte leucocitoclástica cutânea isolada sem vasculite sistêmica ou glomerulonefrite

GN: glomerulonefrite; Adaptada de JENNETTE *et al.*, 1994

As lesões cutâneas são inespecíficas como eritema nodoso, livedo reticular e úlceras necróticas. Fenômeno de Raynaud e necrose digital também podem ser encontrados (GUILLEVIN *et al.*, 1985).

O envolvimento neurológico mais freqüente é a neuropatia periférica, com manifestações parestésicas, sendo a mononeurite múltipla a forma de apresentação mais comum podendo ser encontrada em até 70% dos casos (CONN, 1994, GUILLEVIN *et al.*, 1992). Já a ocorrência de neuropatia de pares cranianos é mais rara, sendo observada em 2% dos casos. O sistema nervoso central (SNC) é mais raramente envolvido podendo ser observado déficit motor, acidente vascular cerebral (AVC) e hemorragia cerebral com etiologias diferentes: secundários a vasculite cerebral ou hipertensão arterial sistêmica (HAS) maligna que afetam esses doentes.

O envolvimento renal pode ser difuso, vascular ou glomerular. De acordo com o tipo de envolvimento, podemos diferenciar em PAN ou poliangiíte microscópica: poliangiíte microscópica quando observamos glomerulonefrite necrosante segmentar pauci-imune e PAN quando há nefropatia vascular. O reconhecimento do comprometimento renal é de grande importância pois pode evoluir para insuficiência renal, uma das principais complicações da doença.

O acometimento do trato digestivo é uma das mais graves manifestações da PAN. Os sintomas são variáveis, com queixas freqüentes de dor abdominal. Pode haver perfuração de alça intestinal e/ou hemorragia digestiva com altas taxas de mortalidade (70 – 100%) (GUILLEVIN *et al.*, 1992). Foram descritos casos de má absorção intestinal, pancreatite, vasculite de apêndice e vesícula biliar isolados (KARP *et al.*, 1988; LÊ THI HUONG *et al.*, 1985). Manifestações clínicas de acometimento hepático são em geral pouco expressivas, mas pode se encontrar esteatose, hepatite crônica e/ou cirrose nos pacientes HbsAg positivos (TREPO *et al.*, 1974; GUILLEVIN *et al.*, 1985; GÉNÉREAU *et al.*, 1997).

Outras manifestações menos comuns são dor testicular e/ou orquite, que estão presentes com maior freqüência nos casos de PAN relacionados à presença do vírus da hepatite B (GUILLEVIN *et al.*, 1991), sintomas de isquemia miocárdica secundários a

vasculite coronariana e alterações oculares como episclerite, iridociclite e oclusão da artéria retiniana central (GUILLEVIN *et al.*, 1985).

Dez tipos de manifestações clínicas ou alterações de exames subsidiários, tais como achados histopatológicos, arteriográficos e laboratoriais foram selecionados, pelo Colégio Americano de Reumatologia (ACR), 1990, como os melhores para a diferenciação da PAN de outros tipos de vasculites sistêmicas (Quadro 3). A presença de três ou mais destes critérios sugere o diagnóstico de PAN, em um paciente acometido por vasculite sistêmica primária. O preenchimento desses critérios apresentam uma sensibilidade de 82,2% e especificidade de 86,6% (LIGHTFOOT *et al.*, 1990).

Quadro 3- Critérios classificatórios para PAN*

- 1- Emagrecimento superior a 4Kg
- 2- Livedo reticular
- 3- Dor ou edema testicular
- 4- Mialgia
- 5- Neuropatia periférica- mononeuropatia ou polineuropatia
- 6- HAS: diastólica superior a 90 mmHg
- 7- Elevação de uréia e creatinina
- 8- Presença de antígeno de superfície para hepatite B (HbsAg) ou anticorpo
- 9- Anormalidade arteriográfica (aneurismas, estenoses ou oclusões)
- 10- Alterações histopatológicas (presença de granulócitos ou granulócitos e mononucleares na parede arterial)

PAN: poliarterite nodosa; HAS: hipertensão arterial sistêmica.

* Para critérios classificatórios, uma vasculite sistêmica primária será classificada como PAN quando preencher no mínimo três dos dez critérios.

LIGHTFOOT JR. *et al.*, 1990.

As manifestações clínicas da poliangiíte microscópica são semelhantes às observadas na PAN. Mialgia, artralgia e artrite estão presentes em 50-72% dos pacientes. Lesão cutânea como púrpura, que é um sinal clínico significativo para diferenciar poliangiíte microscópica da PAN, está presente em 44 a 62% dos pacientes. Os sintomas gastrointestinais são caracterizados por dor abdominal (30-58%) e/ou sangramento do trato digestivo (29%). Neuropatia periférica está presente em 14-56% dos casos, ocorrendo menos freqüentemente que na PAN (LHOTE *et al.*, 1998).

O acometimento renal na poliangiíte microscópica é caracterizado por glomerulonefrite necrosante pauci-imune e rapidamente progressiva ou segmentar. A freqüência de envolvimento renal tem sido relatada de 79 a 100% dos casos (GUILLEVIN *et al.*, 1999a; SAVAGE *et al.*, 1985). Em um estudo com 85 pacientes com poliangiíte microscópica, GUILLEVIN *et al.* (1999b) observaram acometimento renal em 79% dos casos. Proteinúria e hematúria foram encontradas em 81% e 67% dos casos, respectivamente. Aproximadamente 70% dos pacientes evoluíram com insuficiência renal e 20% deles se tornaram dependentes de hemodiálise. HAS esteve presente em 21 a 61% dos casos, provavelmente secundária ao envolvimento renal (GUILLEVIN *et al.*, 1999b).

Apesar da glomerulonefrite rapidamente progressiva ser uma das principais manifestações da poliangiíte microscópica, acredita-se que a sua freqüência real seja inferior à anteriormente descrita, uma vez que as maiores séries provêm de serviços de nefrologia. Já nas séries publicadas por reumatologistas têm sido descritos casos sem acometimento renal aparente (GUILLEVIN *et al.*, 1999b).

A presença de hemorragia pulmonar (12-29%) contribui significativamente para o aumento da morbidade e mortalidade da doença, sendo a hemoptise um sinal de alerta do comprometimento pulmonar. Hemoptise geralmente se associa com dispnéia e anemia, e a hemorragia pulmonar usualmente leva a hipoxemia. Em um estudo de 25 necropsias de pacientes com poliangiíte microscópica, que apresentaram hemorragia pulmonar, foram encontrados 4 casos (16%) sem envolvimento renal (AKIKUSA *et al.*, 1997). Esses achados sugerem que a gravidade da capilarite necrosante pulmonar nem sempre se correlaciona com o grau de envolvimento renal e que o comprometimento renal não está presente em todos os casos como se acreditava anteriormente.

Os exames complementares podem revelar alterações que traduzem a existência de uma atividade inflamatória e/ou outros achados inespecíficos que indicam envolvimento nos diversos órgãos. Para a confirmação diagnóstica seria ideal a presença de achados angiográficos e ou histopatológicos sugestivos da doença (GUILLEVIN *et al.*, 1985; GUILLEVIN *et al.*, 1991). Porém, por vezes o diagnóstico se baseia em elementos clínicos.

A arteriografia pode revelar múltiplos microaneurismas especialmente nas bifurcações arteriais, áreas de estenose, irregularidades no trajeto vascular e locais de sangramento são outros possíveis achados, sendo as artérias intraparenquimatosas renais, hepática e mesentéricas as mais freqüentemente acometidas (GUILLEVIN *et al.*, 1985; GUILLEVIN *et al.*, 1991).

A biópsia dos tecidos acometidos tem como locais preferenciais a pele, nervo sural, músculo e rim, este último nos casos de suspeita clínica de poliangiíte microscópica. Infiltrado inflamatório constituído por polimorfonucleares e mononucleares, necrose fibrinóide, ruptura da lâmina elástica e proliferação endotelial constituem os achados histopatológicos característicos. Lesões em diferentes estágios de evolução podem estar presentes em uma mesma amostra de tecido. Nas lesões agudas, o infiltrado celular é predominantemente constituído por polimorfonucleares; posteriormente, essas células são substituídas por linfócitos e monócitos (GUILLEVIN *et al.*, 1985; GUILLEVIN *et al.*, 1991)

Não existe nenhum subsídio laboratorial definitivo para monitoramento de atividade de doença na PAN e poliangiíte microscópica. A caracterização de atividade ou não de doença, na maioria das vezes, se dá através da observação da presença ou não de manifestações clínicas e/ou alterações laboratoriais inespecíficas, tais como elevação do VHS e anormalidades no sedimento urinário e/ou na função renal. ANCA pode ser detectado em pacientes com poliangiíte microscópica. HAUSCHILD *et al.* (1993) encontraram uma freqüência de 75% de ANCA em 33 pacientes com poliangiíte microscópica, sendo 61% P-ANCA e em 15% C-ANCA. Quando investigado pelo método de ELISA, a maioria dos ANCA observados na poliangiíte microscópica são do tipo anti-MPO, mas anti-PR3 também pode ser encontrado (Wiik, 2001).

No tratamento da PAN e poliangiíte microscópica utiliza-se corticoesteróides, geralmente em altas doses, e imunossupressores como a ciclofosfamida e a azatioprina. Pacientes que têm sorologia positiva para hepatite B e/ou C devem também ser tratados com a administração de drogas antivirais (GUILLEVIN *et al.*, 1985; GUILLEVIN *et al.*, 1991; DEEREN *et al.*, 2004; GUILLEVIN *et al.*, 2004).

Na poliangiíte microscópica cerca de 75% dos pacientes com insuficiência renal, após o tratamento, recobrem a função renal. No entanto, cerca de 20% evoluem para insuficiência renal terminal (NACHMAN *et al.*, 1996).

1.3.1- Fatores prognósticos

A avaliação do prognóstico tanto da PAN quanto da poliangiíte microscópica depende na maioria dos casos da intensidade do envolvimento visceral. GUILLEVIN *et al.* (1996) observaram um aumento nas taxas de mortalidade baseado principalmente na presença do envolvimento renal, do trato gastrointestinal, cardiovascular e SNC. Diante destes dados os autores propuseram a aplicação, em cada caso, de 5 itens para avaliação da gravidade da doença denominados de “five factor score” (FFS), no qual os itens avaliados estão relacionados com o aumento nas taxas de mortalidade (GAYRAUD *et al.*, 2001). São eles: 1- nível de creatinina sérica ($> 1,58\text{mg/dl}$); 2- proteinúria ($> 1\text{g/dia}$); 3- envolvimento de trato gastrointestinal; 4- miocardiopatia e 5- envolvimento do sistema nervoso central (SNC). A presença de cada fator corresponde a 1 ponto.

Três classes de scores foram definidas: 0, quando nenhum dos fatores avaliados está presente; 1, quando apenas 1 fator está presente e 2 quando dois ou mais fatores estão presentes. Nesse estudo as taxas de mortalidade observadas em cinco anos foram de 46%, 26% e 12% para pacientes com $\text{FFS} \geq 2$, $\text{FFS} = 1$ e $\text{FFS} = 0$, respectivamente. Este escore tem orientado o tratamento desses dois tipos de vasculites, para a introdução de ciclofosfamida associada a corticoesteróides nos casos que apresentam $\text{FFS} \geq 1$. Já os pacientes com $\text{FFS} = 0$ seriam tratados somente com corticoesteróides. Entretanto, devemos ser cautelosos quando usamos o FFS para decidir o tratamento de pacientes com $\text{FFS} = 0$, pois muitos deles

necessitam também de citostático para o controle da doença e 12% evoluem a óbito. O mesmo pode-se dizer da hemorragia pulmonar que não faz parte de nenhum dos itens propostos e é uma manifestação grave da poliangiíte microscópica e exige também tratamento mais agressivo (LANGFORD, 2001).

1.3.2- Índices de atividade

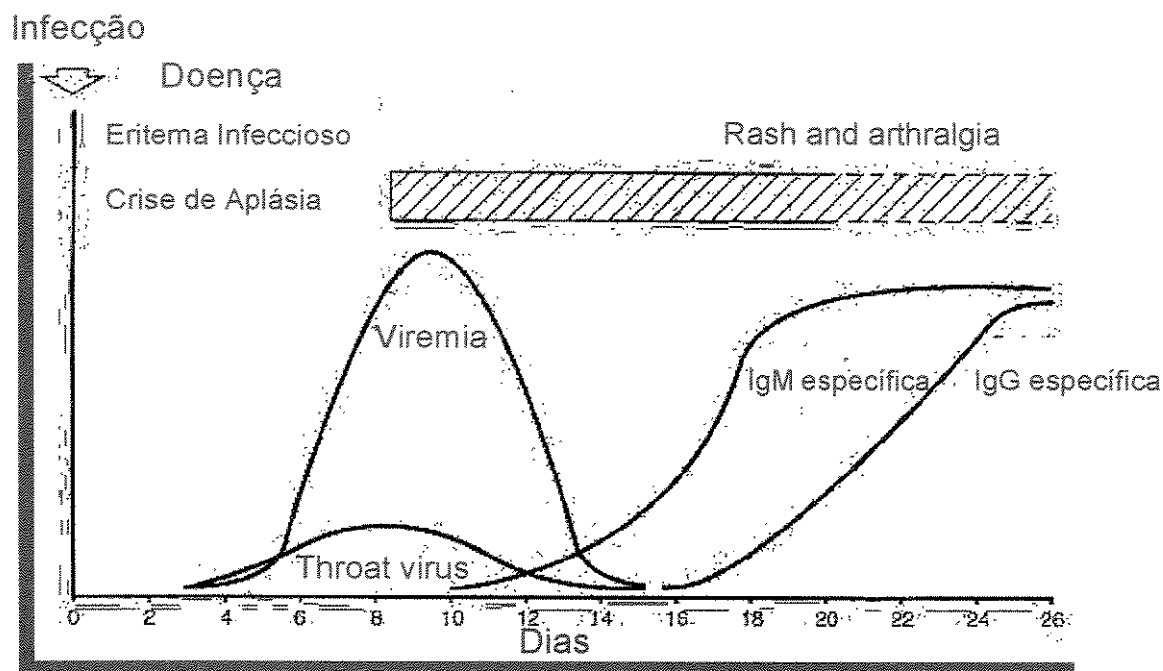
A taxa de sobrevida e a frequência de sequelas nos pacientes com vasculite sistêmica melhoraram consideravelmente após o uso de imunossuppressores conjuntamente aos corticoesteróides. Baseando-se na cronicidade e freqüentes recidivas das síndromes vasculíticas alguns autores vêm utilizando variados métodos para avaliação de atividade de doença durante o tratamento. O *Birmingham Vasculitis Activity Score* (BVAS) tem sido o mais utilizado em estudos clínicos das vasculites sistêmicas (LUQMANI *et al*, 1994). O BVAS é um índice de atividade de doença e consiste na avaliação de vários itens agrupados em nove sistemas orgânicos: sintomas sistêmicos; pele; membranas mucosas e olhos; ouvido, nariz, garganta; tórax; coração e vasos; trato gastrointestinal; rim e sistema nervoso. Um determinado número ou valor é atribuído à presença de cada um dos itens propostos e um valor máximo total é aplicado ao aparelho ou órgão avaliado, decorrente da soma dos itens correspondentes. Os valores possíveis desse índice variam de 0, dado a um paciente sem atividade clínica ou laboratorial, a um máximo de 63. O BVAS está intimamente relacionado às alterações na atividade da doença e evolução da doença (LUQMANI *et al*, 1994, LUQMANI *et al*, 1997). Diferentemente do FFS, o BVAS é útil na monitorização da doença. Em um estudo de 278 pacientes com diagnóstico de PAN, poliangiíte microscópica e síndrome de Chürg-Strauss GAYRAUD *et al.*, 2001 encontraram a média do BVAS de $15,1 \pm 6,4$ entre os pacientes com PAN, não relacionada à hepatite B, e de $23,4 \pm 8,4$ entre os pacientes com poliangiíte microscópica. O BVAS pode ser aplicado para qualquer tipo de vasculite sistêmica primária (LUQMANI *et al*, 1994).

1.4 - Parvovírus B19

B19 é um membro da família Parvoviridae, sendo o único parvovírus que causa infecção em humanos. Ele foi descoberto em 1975 e seu genoma consiste de DNA de fita simples de 5.596 nucleotídeos. O B19 é um vírus pequeno que contém três proteínas de funções conhecidas, sendo duas proteínas estruturais, proteína viral 1 e 2 (VP1 e VP2) e uma não estrutural (NS1). A NS1 apresenta múltiplas funções replicativas e é citotóxica às células hospedeiras. Os precursores eritróides são as células hospedeiras naturais do B19, que se liga precocemente a precursores eritróides, sendo que a anemia é uma manifestação usual. A existência de um receptor viral, receptor antigênico P, está presente nos eritroblastos, megacarioblastos, células miocárdicas fetais e endoteliais, e é responsável pelos tropismo do vírus a estas células. Indivíduos que apresentam ausência genética do receptor do antígeno-P não são susceptíveis a infecção pelo B19 (MAGRO *et al.*, 2002; BROWN *et al.*, 1993; COOLING *et al.*, 1995; YOUNG & BROWN, 2004)

A infecção pelo B19 pode manifestar-se de várias formas clínicas. Em crianças, o eritema infeccioso é a forma mais freqüente, sendo uma doença febril, auto-limitada e com a presença de *rash* cutâneo. A infecção pelo vírus B19 pode se manifestar por sintomas articulares, variando de poliartralgia e artrite até a uma síndrome semelhante a doença do tecido conjuntivo, com *rash*, artralgia/artrite e alterações laboratoriais. Crise aplástica aguda (particularmente em pacientes com desordens hemolíticas), anemia e infecção crônicas, em imunodeficientes, e hidropsia com morte fetal são também manifestações da infecção pelo B19 (YOUNG & BROWN, 2004)

Após a exposição nasal ao B19, a viremia é detectada em 5 a 6 dias, coincidindo com a fase prodrômica da doença. A resposta imune inicial ao B19 é ao antígeno VP2, com anticorpos do tipo IgM e IgG. Estudos revelaram que anticorpos da classe IgM aparecem no sangue 10 a 12 dias após a inoculação do vírus e permanecem por um período de um a três meses. Anticorpos circulantes da classe IgG aparecem vários dias após o surgimento dos da classe IgM e, supostamente, permanecem por toda a vida (Figura 2).



<http://images.google.com.br>, dezembro 2004.

Figura 2- Resposta imunológica à infecção pelo B19

Em casos de imunodeficiência congênita ou iatrogênica e, na presença de determinados quadros infecciosos, pode haver uma ausência de imunidade humoral, ou seja, formação de anticorpos protetores contra o B19, e consequente infecção persistente pelo B19.

A soroprevalência dos anticorpos contra o B19 em populações adultas varia entre 40% e 80% (YOUNG & BROWN, 2004). A infecção pelo B19 ocorre em todo o mundo e em qualquer idade, embora seja mais comum em crianças na idade escolar. Usando-se a reação em cadeia de polimerase (PCR) o DNA viral pode ser detectado no sangue várias semanas após a infecção (FREITAS *et al.*, 1990; YOUNG & BROWN, 2004;)

1.5 - Parvovírus B19 associado a vasculites

Evidências do envolvimento do B19 no desencadeamento das vasculites sistêmicas estão presentes em relatos de casos de granulomatose de Wegener (CORMAN & STAUD, 1995; NIKKARI *et al.*, 1994), púrpura de Henoch-Schönlein, doença de Kawasaki (NIGRO *et al.*, 1994), arterite de células gigantes (SALVARANI *et al.*, 1995) e PAN (FINKEL *et al.*, 1994; GACHES *et al.*, 1993; CORMAN & DOLSON, 1992). Baseados na semelhança dos picos de incidência de arterite de células gigantes e de infecção pelo B19, em Olmsted country (Mineápolis), GABRIEL *et al.* (1999) pesquisaram a presença do B19 nas biópsias de artéria temporal de 50 pacientes com arterite de células gigantes. DNA do B19 no tecido foi observado em 50% dos pacientes com histopatológico de vasculite e em 11% dos pacientes sem confirmação histológica. Estes dados sugerem uma possível participação do B19, entre os variados tipos de agentes virais, no desencadeamento e/ou perpetuação das vasculites sistêmicas, uma vez que o vírus apresenta tropismo preferencial por células endoteliais e eritroblastos (MAGRO *et al.*, 2001; BROWN *et al.*, 1993; COOLING *et al.*, 1995).

O mecanismo pelo qual o vírus eventualmente leva ao aparecimento de fenômenos autoimunes ainda não são amplamente conhecidos. Tem-se demonstrado indução de reações autoimunes através de mimica molecular entre proteínas celulares e virais, por exemplo a atividade fosfolipase A2-like da proteína VP1 do vírus, induzindo a produção de prostaglandinas e leucotrienos. Também observou-se a indução da produção de citocinas pela proteína NS1 do vírus, através da ativação de linfócitos T e B e macrófagos (MAGRO *et al.*, 2002; BROWN *et al.*, 1993; COOLING *et al.*, 1995; SÉVE *et al.*, 2004). Estudos *in vitro* mostraram que NS1 induz a fragmentação do DNA da célula hospedeira com subsequente apoptose celular (SOL *et al.*, 1999).

No caso particular da PAN, há relatos de casos comprovando a presença concomitante de atividade da doença e infecção pelo vírus B19 através de dados sorológicos e por pesquisa de DNA viral, através de PCR em histopatológicos em poucos casos. Estes estudos englobam apenas estudos sorológicos e pesquisa e evidência de DNA do parvovírus B19 na medula óssea de dois pacientes, em um deles também em fragmento de biópsia muscular com presença de vasculite ativa (FINKEL *et al.*, 1994; CORMAN &

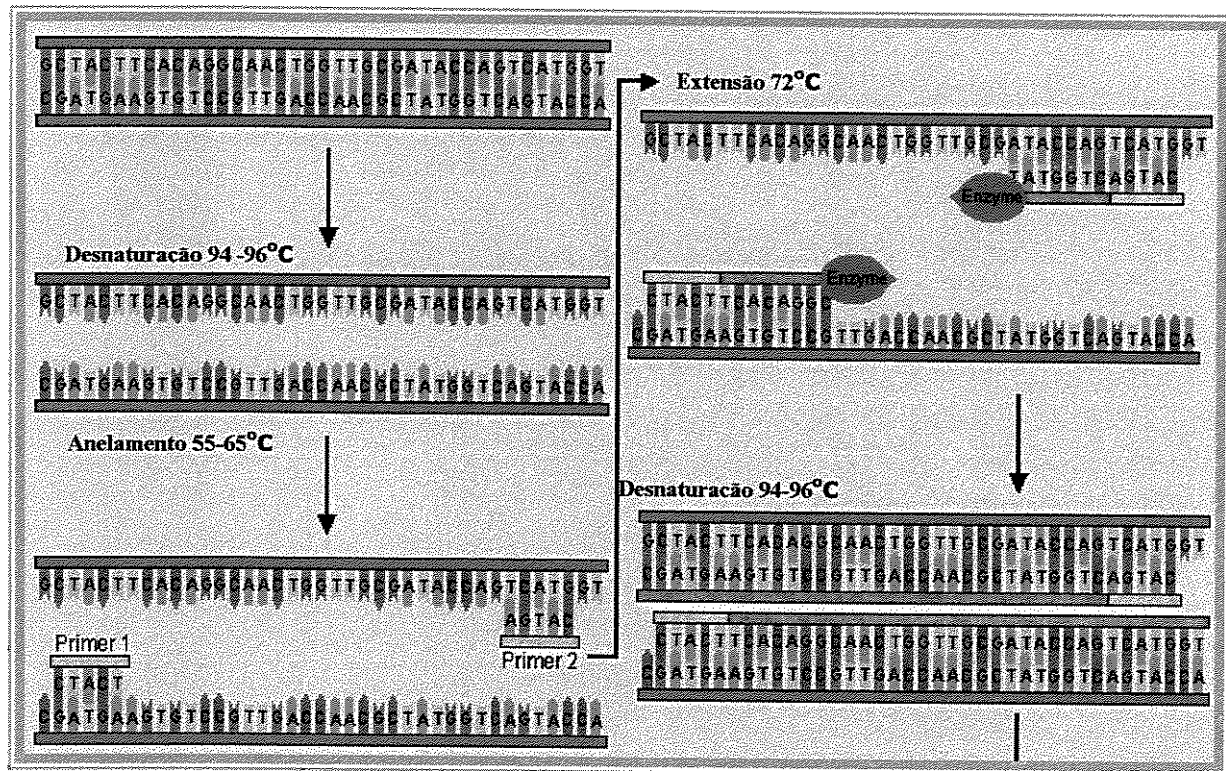
DOLSON, 1992; GACHES *et al.*, 1993). Ressaltamos que não há ainda descrita uma investigação mais ampla referente à pesquisa de DNA do parvovírus B19 em amostras teciduais de pacientes com PAN e poliangiíte microscópica, especialmente no Brasil, o que nos motivou a investigar tal associação.

A importância da pesquisa de fragmentos de DNA do B19 concomitante a atividade da doença pode ter importante implicação na etiopatogênese da PAN e poliangiíte microscópica, uma vez que o B19 tem sido proposto como fator desencadeante em alguns casos de vasculite sistêmica.

1.6- Reação em cadeia da polimerase – PCR

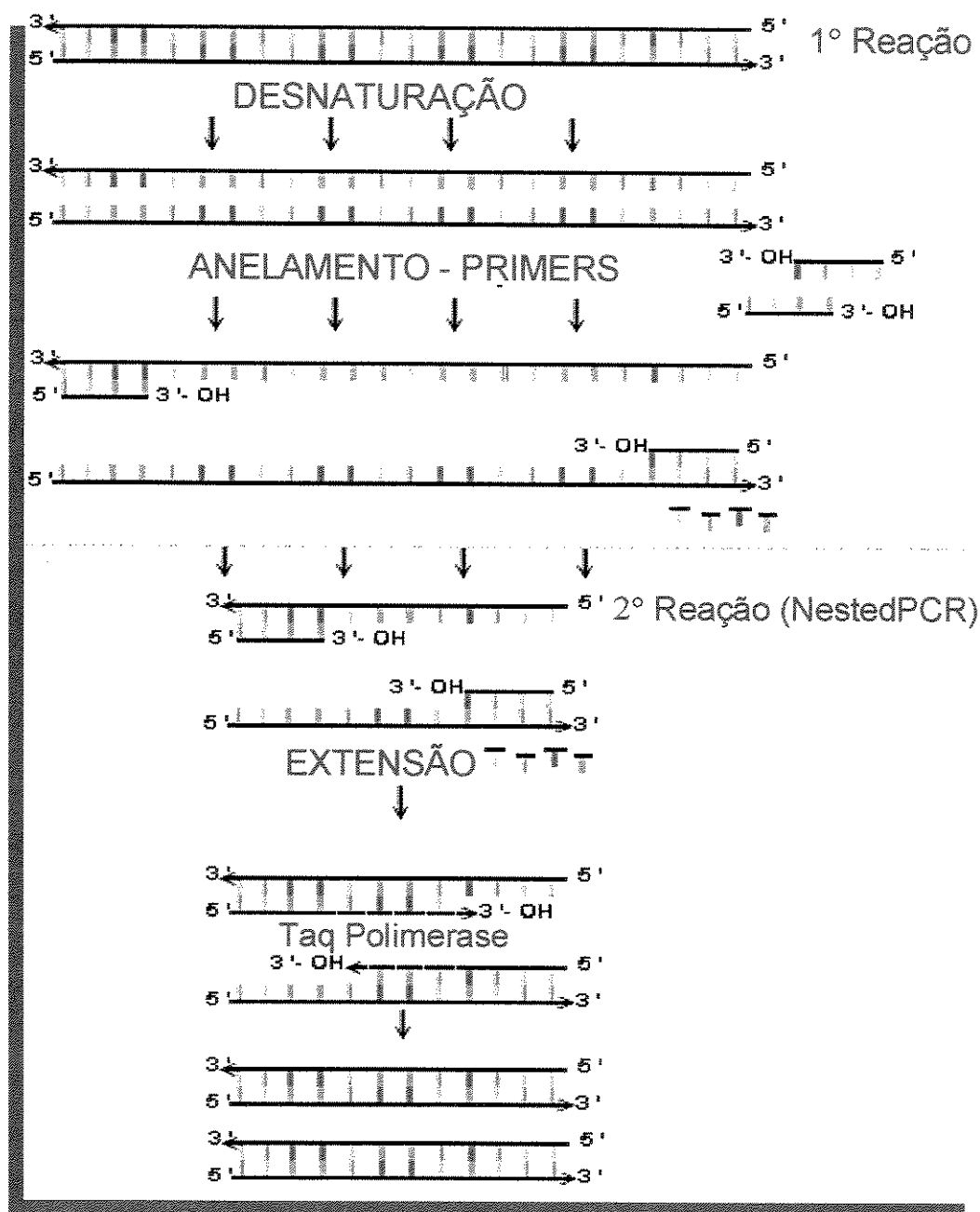
A amplificação gênica pela reação em cadeia catalisada pela polimerase (*polymerase chain reaction –PCR*) é um método de biologia molecular que permite a produção de grande quantidade de fragmentos específicos de DNA a partir de substratos complexos e em concentrações diminutas. Este procedimento permite a amplificação de um fragmento específico de DNA escolhido pelo investigador, cuja concentração final excede em milhares de vezes a do restante do DNA presente na amostra analisada. A reação consiste de três fases: - primeira fase: desnaturação da fita molde, ou seja, a sua separação; - segunda fase: anelamento dos “primers” na fita molde e - terceira fase: síntese da nova sequência do DNA.

Na tentativa de se aumentar a sensibilidade e especificidade da PCR simples, tem sido utilizada a Nested-PCR ou PCR dupla. Nessa técnica ocorre a amplificação de uma sequência alvo em duas etapas: na primeira amplificação utiliza-se um par de primers específicos para um fragmento alvo desejado (primers externos); a partir do produto da primeira amplificação, um novo par de primers é utilizado (primers internos) para uma região interna ao fragmento utilizado.



<http://images.google.com.br>, março 2004.

Figura 3- PCR “simples”



<http://images.google.com.br>, março 2004.

Figura 4- Nested PCR

2- OBJETIVOS

- 1- Verificar a presença de DNA do B19, pela reação em cadeia da polimerase (PCR), em amostras teciduais de pacientes com diagnóstico de PAN e poliangiíte microscópica, confirmados por achados histopatológicos.
- 2- Correlacionar as manifestações clínicas, índices de atividade e gravidade de doença desses pacientes com a presença do DNA viral.

3- METODOLOGIA

3.1- Seleção dos pacientes

Foram selecionados todos os prontuários médicos dos pacientes com diagnóstico de PAN e poliangiite microscópica atendidos no Ambulatório de Vasculites do Hospital das Clínicas/Disciplina de Reumatologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (HC/FCM-UNICAMP) entre os anos 1985 e 2003.

O diagnóstico de cada paciente foi revisado de acordo com os critérios classificatórios estabelecidos pelo Colégio Americano de Reumatologia (1990) (BLOCH *et al.*, 1990) e o Consenso de Chapel-Hill para a nomenclatura das vasculites sistêmicas (JENNETE *et al.*, 1994).

O protocolo clínico laboratorial incluiu dados de identificação, história da doença, uso de medicamentos, antecedentes pessoais e familiares, o exame físico referente aos diversos órgãos e sistemas e a realização dos seguintes exames laboratoriais de rotina: hemograma, determinação do VHS (Wintrobe), urina I, proteinúria de 24 horas quando necessário, dosagem de uréia, creatinina, aminotransferases, pesquisa do fator antinuclear (FAN) por imunofluorescência indireta, ANCA (imunofluorescência indireta) e crioglobulinas e sorologias para hepatite B, C e HIV quando possível. Anemia foi considerada quando hemoglobina menor que 12 g/dl nas mulheres e menor que 14 g/dl em homens. Leucocitose foi considerada quando o valor dos leucócitos globais estavam acima de 10.000 cel/mm³ e plaquetose quando a contagem de plaquetas foi superior a 400.000 plaquetas/mm³. Urinálise foi considerada normal se hemácias e leucócitos até 5/campo ou 10.000/ml.

O protocolo inclui também dados histopatológicos de tecidos dos órgãos acometidos e a realização de o estudo arteriográfico das artérias mesentéricas/renais, quando realizados.

Foram selecionados para o estudo todos os pacientes com amostras de tecidos, fixados em parafina, disponíveis no departamento de patologia. Todas as lâminas com o diagnóstico histopatológico de vasculite foram revisadas. Os vasos foram avaliados de acordo com a sua localização e caracterizado se artéria, vênula ou capilar. As alterações

morfológicas presentes na parede do vaso também foram avaliadas, tais como tumefação endotelial, necrose fibrinóide, extravasamento de eritrócitos, e características do infiltrado inflamatório, bem como a apresentação das fibras elásticas. Os espécimes foram obtidos através de material de biópsia e peças cirúrgicas. Todas as lâminas foram revisadas conjuntamente com um patologista experiente. Somente as amostras com evidência de vasculite foram incluídas no estudo. (Anexo 1)

As informações demográficas, clínicas e laboratoriais foram adquiridas através da revisão dos prontuários. O índice de atividade de doença por ocasião do diagnóstico foi avaliado, retrospectivamente, pelo BVAS (LUQMANI, 1994). Os fatores prognósticos (FFS) foram também avaliados por ocasião do diagnóstico, retrospectivamente (GUILLEVIN *et al*, 1996).

3.1.1- Pacientes com poliarterite nodosa

O diagnóstico de PAN seguiu os critérios classificatórios do Colégio Americano de Reumatologia (1990) (Quadro 3) e o consenso de Chapell-Hill (JENNETTE *et al.*, 1994) (Quadro 2). O diagnóstico de PAN foi considerado quando não havia evidência de envolvimento de pequenos vasos (arteríolas, vênulas e capilares) como lesões purpúreas cutâneas, glomerulonefrite necrosante ou hemorragia pulmonar.

3.1.2- Pacientes com poliangiíte microscópica

O diagnóstico de poliangiíte microscópica seguiu o consenso de Chapell-Hill (JENNETTE *et al.*, 1994) (Quadro 2).

Os critérios de inclusão para o diagnóstico de poliangiíte microscópica foram:

- 1- Comprovação histológica de vasculite de arteríolas/vênulas e/ou glomerulonefrite necrosante pauci-imune.
- 2- Presença de hemorragia pulmonar e/ou glomerulonefrite necrosante segmentar pauci-imune.
- 3- Manifestações que sugerem envolvimento de pequenos vasos como lesões purpúreas cutâneas (GUILLEVIN L *et al.*, 1999b). Foram excluídos os casos que apresentavam granuloma e eósinófilos nos achados histopatológicos.

3.2- Métodos

Os tecidos fixados em parafina foram cortados em 10 cortes de 5 μ e armazenados a - 20°C até a extração do DNA destes tecidos. Após a extração do DNA, para cada amostra estudada foi feita a PCR com "primers" que flanqueiam o gene da β -globina humana, para funcionar como um controle interno da reação e ter-se uma maior confiabilidade nos resultados.

A presença de DNA do B19 foi investigada pela pesquisa da sequência de ácidos nucleicos de uma região do B19, por PCR, nos tecidos com vasculite dos pacientes com PAN e poliangiíte microscópica, incluídos no estudo.

Este estudo foi realizado conjuntamente no laboratório de diagnóstico de doenças infecciosas por técnicas de biologia molecular e no laboratório de reumatologia da Faculdade de Ciência Médicas, dos departamentos de Clínica Médica e Reumatologia-UNICAMP.

3.2.1- Extração do DNA

A extração do DNA dos tecidos fixados em parafina foi feita utilizando-se um Kit comercial (*DNeasy tissue kit, Quiagen*).

A seguir descreveremos a remoção da parafina pela extração com xileno. A amostra foi então processada de acordo com o protocolo para extração de tecidos animais.

Notas importantes antes do início

- O tempo de lise variou de amostra para amostra, dependendo do tipo de tecido processado.
- O rendimento dependeu tanto do tamanho quanto da idade da amostra processada. Rendimentos pequenos se comparados a tecidos frescos ou congelados são esperados. Além disso, é recomendado eluir o DNA em 50-100 μ l de buffer AE.

Passo 1:

- 1- Uma pequena porção de tecido embebido em parafina (não mais do que 25 mg) foi colocada em um tubo de 2 ml para centrifuga.
- 2- 1200 µl de xileno foram adicionados. Agitou-se vigorosamente em vortex.
- 3- A mistura foi centrifugada em velocidade total por 5 minutos em temperatura ambiente.
- 4- O sobrenadante foi removido com pipeta.
- 5- 1200 µl de álcool absoluto foram adicionados ao “pellet” para remoção do xileno residual e agitado delicadamente com auxílio do vortex.
- 6- A mistura foi centrifugada em velocidade total por 5 minutos em temperatura ambiente.
- 7- O etanol foi cuidadosamente removido com a pipeta.
- 8- Os itens 5 a 7 foram repetidos, uma vez.
- 9- A amostra foi incubada em tubo para microcentrifuga aberto a 37° C por 10-15 minutos até a evaporação do etanol.
- 10- O tecido foi ressuscitado em 180 µl de buffer ATL e continuou-se o protocolo para tecidos animais a partir do passo 2.

Protocolo DNeasy para tecidos animais

- Passo 2: 20 µl de proteinase K foram adicionados, misturados em vortex e incubados a 55°C até que o tecido estivesse completamente lisado. Passamos no vórtex ocasionalmente durante a incubação para dispersar a amostra. O tempo de lise variou dependendo do tipo de tecido processado. As amostras foram lisadas durante a noite (“over-night”).

- Passo 3: as amostras foram passadas em vórtex por 15 segundos. Foram adicionados 200 µl de buffer AL à amostra, misturados através do vórtex e incubados a 70°C por 10 minutos. A amostra e o buffer foram misturados imediatamente, através do vórtex ou pipeta.
- Passo 4: foram adicionados 200 µl de etanol (96-100%) à amostra e misturados através do vórtex. É importante que a amostra, o buffer e o etanol fossem misturados.
- Passo 5: a mistura do passo 4 foi pipetada para dentro da mini-coluna a qual estava situada no tubo de 2 ml. Foi centrifugada por 1 minuto à 8000 rpm. O filtrado foi descartado junto com o tubo coletor.
- Passo 6: a mini-coluna foi colocada em um novo tubo e adicionados 500 µl de buffer AW1 e centrifugados por 1 minuto à 8000 rpm. O filtrado foi descartado junto com o tubo coletor.
- Passo 7: a mini-coluna foi colocada em um novo tubo e adicionados 500 µl de buffer AW2 e centrifugados por 3 minutos em velocidade total para secar a membrana do Kit. O filtrado foi descartado junto com o tubo coletor. Este passo de centrifugação garantiu que nenhum etanol residual fosse carregado durante a eluição seguinte. O filtrado foi descartado junto com o tubo coletor. Após a centrifugação, a microcoluna foi cuidadosamente removida de maneira que não entrasse em contato com o filtrado para que não houvesse contato com o etanol.
- Passo 8: a mini-coluna foi colocada em tubo limpo de 1,5 ou 2,0 ml e pipetados 200 µl de buffer AE diretamente na membrana do Kit. Foram incubados à temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugados por 1 minuto a 8000 rpm, para eluir. A eluição com 100 µl (ao invés de 200) aumenta a concentração final de DNA no eluato, mas diminui o DNA total obtido.
- Passo 9: a eluição foi repetida como descrito no passo 8.

3.2.2- Amplificação gênica pela PCR

3.2.2.1- Amplificação gênica pela PCR para o gene da β -globina humana:

Para cada amostra estudada foi feita a PCR e "dupla PCR" (ou nested PCR) com a utilização de "primers" que flanqueiam o gene da β -globina humana, para funcionar como um controle interno da reação e ter-se uma maior confiabilidade nos resultados. O fragmento amplificado resultou em de 110 pb. Foram utilizados os primers externos PCO3+ (5' CTT CTG ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC) e PCO4+ (5' TCA CCA CCA ACT TCA TCC ACG TTC ACC 3'). Cinco a 15 μ l do DNA foram amplificados em 25 μ l e 30 μ l (volume total da reação) usando uma solução de Master Mix contendo como concentrações finais: 20 mM Tris-HCl (pH 8,0); 50 mM KCl; 1,5-2,0 mM $MgCl_2$; 1,5 mM de deoxinucleosídeo trifosfato (dNTP); 0,1-0,2 μ M de PCO3+/PCO4+ e 1-2 U de Taq DNA polymerase. Após cobrir a mistura com 1 gota de óleo mineral, foram realizados 30-38 ciclos com a seguinte ciclagem: 45 segundos à 94°C, 45 segundos à 55°C e 1 minuto à 72°C, após desnaturação inicial por 5 minutos à 94°C e 1 ciclo de extensão final de 7 minutos à 72°C.

Nas amostras em que o DNA não foi detectado através dos primers PCO3+ e PCO4+ a detecção do gene da β -globina ocorreu por Nested PCR. Os seguintes primers internos foram utilizados: P3: 5' AGA CAG AGA AGA CTC TTG 3', P5: 5' TCA TTC GTC TGT TTC CCA TTC 3', 109: 5' CCC TTC CTA TGA CAT GAA CTT AAC CAT 3'. Para a amplificação do DNA utilizamos os primers P3/P5 (primeiro PCR) e P3/109 (nested PCR) e um volume final de reação de 20 e 30 μ l. 10 μ l do DNA extraído foram utilizados na primeira PCR e para o nested PCR 5 μ l do produto de amplificação da primeira reação foram utilizados. A concentração final dos demais reagentes foram mantidas. 30-35 ciclos de amplificação foram realizados com os seguintes tempos e temperaturas de desnaturação, anelamento e extensão: 94°C / 5 minutos (desnaturação inicial), 94°C / 1 minuto, 55°C / 1 minuto, 72°C / 1 minuto e 30 segundos, e extensão final à 72°C por 7 minutos (primeiro PCR).

Na nested PCR as modificações quanto ao ciclo de amplificação foram: 94°C / 40segundos, 57°C / 40segundos e 72°C / 1minuto. Os tempos e temperaturas da desnaturação inicial e extensão final, bem como o número de ciclos da primeira reação foram mantidos.

3.2.2.2- Nested PCR para detecção Parvovírus B19

Para a realização da PCR (*nested* PCR) foi usado um primer previamente descrito, que amplifica um segmento da região de proteína não estrutural do parvovírus B19 (TANAWATTANACHAROEN *et al*, 2000). Na primeira reação, foram utilizados *primers* externos A1 (5' TGT TAC TTT GTC AAA ACT ATG AC 3') sequência de nucleotídeos 1.498 a 1.520 e B1 (5' CTG CAT TAA TTC CAG GGA AAT CA 3') sequência de nucleotídeos 2.088 a 2.066. Na segunda reação, foram utilizados *primers* internos A2 (5' GCC ATT GCT AAA AGT GTT CCA 3') sequência de nucleotídeos 1.632 a 1652 e B2 (5' GCC TCT GTT AGT AAC CCC ATG 3') sequência de nucleotídeos 1.987 a 1967 (TANAWATTANACHAROEN *et al*, 2000). Cinco a 10 µl das amostras foram amplificadas em um volume final de reação de 20-30 µl, utilizando-se uma solução Master Mix contendo como concentrações finais: 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1,5 mM de deoxinucleosídeo trifosfato (DNTP), 0,1 µM de A1/B1 e 2,0-2,5 U de Taq DNA polymerase. Após cobrir a mistura com óleo mineral, 35 ciclos foram realizados: 96°C / 1 minuto, 55°C / 1 minuto, 72°C / 1 minuto e 30 segundos; após a desnaturação inicial de 96°C por 5 minutos e 1 ciclo de extensão final de 7 minutos à 72°C.

1,5 µl a 8,0 µl do produto da primeira amplificação foram utilizados na reação de reamplificação (*nested* PCR) e foram submetidos à 35 ciclos de amplificação à 96°C / 40 segundos, 60°C / 40 segundos e 72°C / 1 minuto e 30 segundos, após desnaturação inicial por 5 minutos à 96°C, seguida de extensão final à 72 /C por 7 minutos.

Os produtos amplificados foram detectados por análise direta em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultra-violeta.

Durante a execução da PCR, vários cuidados foram tomados, a fim de evitar qualquer tipo de contaminação nas amostras manipuladas. Os cuidados utilizados foram:

- As amostras a serem amplificadas foram manipuladas em uma sala diferente (sala pré-PCR) daquela onde a amplificação foi feita (sala pós-PCR), em capela de exaustão.
- Todos os reagentes e materiais pré-PCR e pós-PCR foram preparados e utilizados em ambientes diferentes.
- Antes da abertura de tubos tipo "eppendorf", foi efetuada uma rápida centrifugação em microcentrífuga, para concentrar o líquido, contido no tubo, na região inferior deste e evitar a dispersão do mesmo por aerosol.
- Todo material plástico (ponteiras e tubos do tipo "eppendorf") utilizado foi novo e estéril, e não autoclavado.
- Trocas constantes de luvas foram feitas durante todo o procedimento.
- Jogo de pipetas para cada área.
- Ponteiras com filtro, para se evitar contaminação via aerosol.
- Uso de hipoclorito 10% e etanol 70% antes e após o uso da bancada.

3.2.2.3- Controles

DNA extraído do soro de paciente sabidamente infectado pelo parvovírus B19 foi utilizado como controle positivo da reação.

A mistura da reação na qual o DNA foi omitido foi utilizada como controle negativo da reação.

Os controles positivo e negativo correram juntos com todas as amostras estudadas.

3.2.2.4- Referências bibliográficas

As referências bibliográficas seguiram as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

4- RESULTADOS

4.1- Pacientes selecionados

No total foram avaliados 48 prontuários, sendo que 32 preenchiam os critérios classificatórios para PAN e 16 para poliangiíte microscópica.

Dos 32 pacientes com diagnóstico de PAN, 12 apresentavam blocos de parafina disponíveis para o estudo. Os motivos de exclusão em 20 doentes foram: dez tiveram o diagnóstico baseado em arteriografia, em dois pacientes o diagnóstico baseou-se em achados clínicos, dois casos de infecção associada (CMV e hepatite B) e em outros dois o diagnóstico foi feito através de revisão de lâmina. Em quatro o material para estudo não foi encontrado no arquivo.

Dos 16 pacientes com poliangiíte microscópica, nove apresentavam blocos de parafina disponíveis para estudo. Em dois casos os blocos de parafina não foram encontrados no arquivo, um paciente era portador de *miastenia gravis* e em quatro o diagnóstico foi baseado em revisão de lâminas de biópsias realizadas em outro serviço.

No total, vinte e um pacientes apresentavam blocos de parafina disponíveis para estudo.

Dos 21 pacientes com material disponível para estudo doze preenchiam os critérios classificatórios para PAN e 9 para poliangiíte microscópica. Destes 21 pacientes foram selecionadas 22 amostras teciduais. Dezesete delas obtidas por biópsia e 5 por laparotomia, todas fixadas em parafina.

Dentre os pacientes com PAN obtiveram-se 9 amostras provenientes de lesões cutâneas e 4 de outros tecidos, músculo, intestino, baço e vesícula biliar, cada uma.

As amostras teciduais dos pacientes com poliangiíte microscópica foram obtidas de biópsia cutânea em 5, biópsia renal em 2 e ressecção intestinal em outros 2 (Tabela 4).

Tabela 1- Relação dos órgãos estudados

	PAN N=13	Poliangiíte microscópica N=9
Biópsias		
Pele	9	5
Músculo	1	0
Rim	0	2
Laparotomia		
Intestino	1	2
Baço	1	0
Vesícula biliar	1	0
Total	13	9

PAN: poliarterite nodosa

4.2- PCR para Beta-globina humana

Em 4 amostras de tecido cutâneo (2 PAN e 2 poliangiíte microscópica) o DNA extraído não foi identificado pelos métodos de amplificação da sequência gênica da β -globina humana, o que não pôde nos garantir a qualidade do DNA extraído. Estas 4 amostras foram, então, excluídas do estudo.

O DNA celular esteve presente em 14 amostras amplificadas pelos primers PCO3+ e PCO4+ e em 3 amostras amplificadas por nested PCR, ambos para detecção do gene da β -globina. Na figura 3: M: marcador de peso molecular; C+: controle interno positivo (gene da β -globina); 1,2,3, 4 e 5: amplificação do gene da β -globina e 6: não amplificação do gene da β -globina.

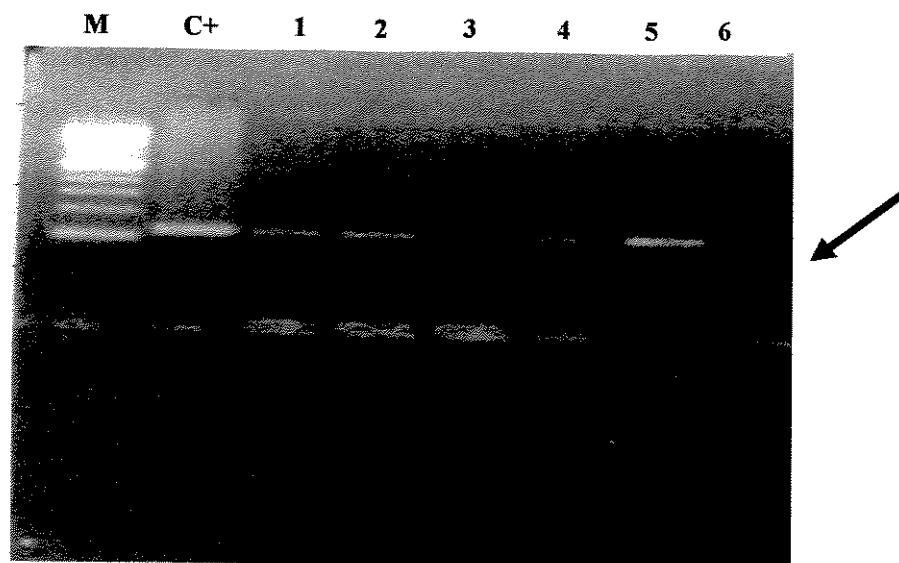


Figura 5- PCR para Beta-globina humana

4.3- Achados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais

Foram avaliados dez pacientes com PAN e sete com poliangiíte microscópica. A idade no início da doença variou de 10 a 49 anos com média de $29,3 \pm 15,1$ anos nos pacientes com PAN e de 21 a 70 anos com média de $41,9 \pm 18,5$ anos nos pacientes com poliangiíte microscópica. A relação entre os sexos M/F foi de 1,5:1 na PAN e de 1:1,3 na poliangiíte microscópica (Tabela 2).

Tabela 2- Características demográficas

	<i>PAN</i>	<i>Poliangiíte microscópica</i>
Número pacientes	10	7
Idade início (média), anos	$29,3 \pm 15,1$	$41,9 \pm 18,5$
Sexo: M/F	1,5/1	1/1,3

PAN: poliarterite nodosa

4.3.1- Poliarterite nodosa

A tabela 3 relaciona os achados clínicos observados por ocasião do diagnóstico.

Sintomas gerais, como febre e emagrecimento, estiveram presente em 80% dos pacientes com PAN.

Artralgia e artrite foi encontrada em 4 (40%) pacientes. A lesão cutânea mais freqüente foram os nódulos subcutâneos (80%). Livedo reticular esteve presente em 40% dos casos.

Quatro (40%) pacientes apresentaram dor abdominal. Dois pacientes (20%) apresentaram acometimento grave de trato gastrointestinal, um com vasculite em sigmóide com sangramento, sendo submetido a ressecção cirúrgica e outro desenvolveu abdome agudo por vasculite em vesícula biliar.

Envolvimento renal manifestado por hematúria e/ou proteinúria esteve presente em 40% dos pacientes, sendo que dois (20%) evoluíram com insuficiência renal reversível após tratamento.

Acometimento de SNC foi observado somente em dois pacientes. Um (10%) paciente apresentou paralisia facial periférica e o outro (10%) desenvolveu psicose.

Neuropatia periférica esteve presente em 50% dos pacientes, sendo a mononeurite múltipla observada em 40%.

HAS foi um achado freqüente, com 40%.

Anemia e plaquetose foram encontradas em 50% dos pacientes e leucocitose em 70%. Em nosso estudo o ANCA foi pesquisado em 7 de 10 pacientes com PAN, todos negativos. FAN foi negativo em todos. Sorologia para hepatite B foi realizada em todos os pacientes e todos apresentaram resultados negativos para HBsAg.

Sorologia para CMV foi investigada em cinco pacientes e dois deles (40%) apresentaram anticorpos da classe IgG positivo. Todos foram negativos para anticorpos da classe IgM. Hepatite C foi investigada em três pacientes, todos negativos. HIV foi pesquisada por ELISA em 5 (50%) pacientes com resultados negativos.

A presença de crioglobulinas foi investigada em 30% dos casos e todos foram negativos.

Arteriografia renal foi realizada em quatro casos e mesentérica em dois. Foram encontrados microaneurismas nas artérias mesentéricas dos dois pacientes investigados. Três pacientes apresentaram arteriografia renal normal e em um foi encontrado estenoses de artérias renais intraparenquimatosas.

Dentre os pacientes com PAN a média do BVAS foi de $15,7 \pm 7,7$, mínimo de 5 e máximo de 26.

Em relação ao FFS, 6 pacientes apresentaram FFS=1 e 4 apresentaram FFS=0.

Dois pacientes estavam em uso de prednisona por ocasião da biópsia de pele. Os demais não haviam utilizado corticoesteróides ou imunossupressores até a ocasião da obtenção do material estudado.

Tabela 3- Características clínicas - PAN

Manifestações clínicas	PAN	
	N=10	%
Sintomas gerais	8	80
Artrite	4	40
Mialgia	6	60
Lesões cutâneas	8	80
Nódulo	8	80
Livedo reticular	4	40
Trato gastrointestinal	4	40
Dor	4	40
Sangramento	1	10
Perfuração intestinal	1	10
Colecistite	1	10
Envolvimento renal	4	40
Proteinúria/Hematúria	4	40
Insuficiência renal	2	20
Sistema nervoso central	2	20
Acometimento de pares cranianos	1	10
Psicose	1	10
Neuropatia periférica	5	50
Mononeurite múltipla	4	40
Polineuropatia	1	10
Envolvimento cardiovascular	4	40
HAS	4	40
Orquite	1	10

PAN: poliarterite nodosa; HAS: hipertensão arterial sistêmica.

4.3.2- Poliangiíte microscópica

A tabela 4 relaciona os achados clínicos observados por ocasião do diagnóstico.

Sintomas gerais como febre e emagrecimento estavam presentes em 71% dos pacientes.

As lesões cutâneas encontradas foram púrpura e livedo reticular, ambas em 29% dos casos, cada uma.

Envolvimento grave de trato gastrointestinal, com perfuração de alça intestinal, foi observado em dois (29%) pacientes. Acometimento renal esteve presente em quatro doentes (57%), evidenciado por hematúria glomerular e proteinúria, sendo que três (43%) evoluíram com insuficiência renal.

A neuropatia periférica foi encontrada em 57% dos casos.

HAS foi observada em 57% dos casos.

Pneumonite foi a manifestação pulmonar mais comum nos pacientes com poliangiíte microscópica (43%). Hemorragia alveolar foi evidenciada em 14% dos pacientes.

Anemia, leucocitose e plaquetose foram encontradas em 29% dos pacientes.

Em nosso estudo o ANCA foi pesquisado em 4 de 7 pacientes com poliangiíte microscópica. Somente 1 paciente apresentou p-ANCA positivo. FAN foi negativo em todos os pacientes.

Sorologia para hepatite B foi realizada em cinco pacientes e todos apresentaram resultados negativos para HBsAg. Sorologia para CMV e hepatite C foi investigada em três pacientes com resultados negativos em todos. Sorologia para HIV foi pesquisada por ELISA em apenas um paciente com resultado negativo.

A presença de crioglobulinas foi investigada em três pacientes e em um deles o resultado foi positivo.

Dentre os pacientes com poliangiíte microscópica a média do BVAS foi de $20,7 \pm 7,1$, mínimo de 13 e máximo de 31.

Em relação ao FFS, um paciente apresentou FFS=2, 3 apresentaram FFS=1 e 3 FFS=0.

Um paciente estava em uso de prednisona por ocasião da biópsia de pele. Os demais não haviam utilizado corticoesteróides ou imunossupressores até a ocasião da obtenção do material estudado.

Tabela 4- Características clínicas - Poliangiíte microscópica

Manifestações clínicas	Poliangiíte microscópica	
	N=7	%
Sintomas gerais	5	71
Artrite	4	57
Mialgia	3	43
Lesões cutâneas	3	43
Nódulo	1	14
Livedo reticular	2	29
Púrpura	2	29
Trato gastrointestinal	3	43
Dor	3	43
Sangramento	1	14
Perfuração intestinal	2	29
Envolvimento renal	4	57
Proteinúria/Hematuria	4	57
Insuficiência renal	3	43
Neuropatia periférica	4	57
Mononeurite múltipla	2	29
Polineuropatia	2	29
Envolvimento cardiovascular	4	57
HAS	4	57
Isquemia digital	1	14
IAM	1	14
Envolvimento pulmonar	4	57
Hemorragia alveolar	1	14
Pleurite	2	29
Pneumonite	3	43

IAM: infarto agudo do miocárdio; HAS: hipertensão arterial sistêmica.

4.4- PCR para parvovirus B19

Para a amplificação de DNA do B19 em amostras teciduais, os DNA extraídos de tecidos fixados em parafina foram submetidos a uma nested PCR.

Nenhuma das amostras estudadas foram positivas para o DNA do parvovirus B19 (Figura 3). Na figura 3: M: marcador de peso molecular; C+: controle positivo (DNA do B19); 1,2,3, 4e 5: amostras dos pacientes em estudo e C-: controle negativo (mistura sem DNA).

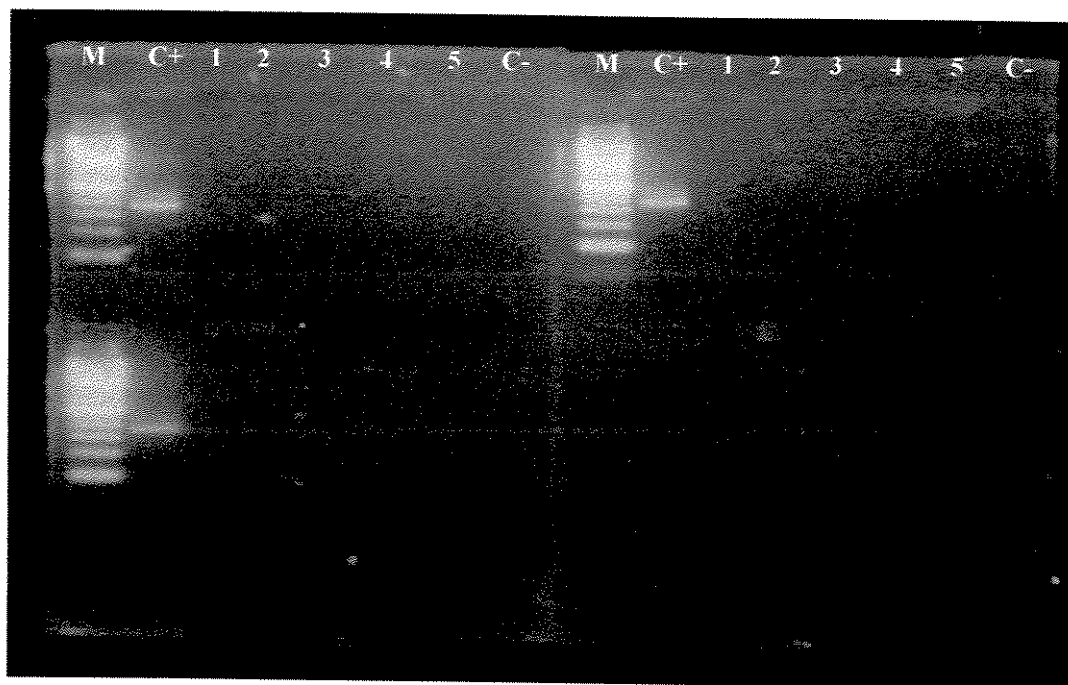


Figura 6- Nested PCR para parvovirus B19

5- DISCUSSÃO

A poliarterite nodosa, primeiro descrita por Küssmaul & Maier 1866 “APUD” BACON (1996), é uma forma bem conhecida de vasculite necrosante sistêmica. Individualizada da PAN, a poliangiíte microscópica é uma vasculite sistêmica que acomete arteríolas, vênulas e capilares, bem como vasos de médio calibre e apresenta quadro clínico semelhante ao da PAN (JENNETTE *et al*, 1994). A poliangiíte microscópica é caracterizada pela presença de glomerulonefrite rapidamente progressiva, envolvimento pulmonar e lesões purpúricas que não são encontrados na PAN. Os mecanismos imunopatogênicos que levam às lesões vasculares nas vasculites sistêmicas não estão ainda totalmente esclarecidos e são, provavelmente, heterogêneos.

Infecções virais são investigadas, já por um longo período, como fatores desencadeantes de algumas vasculites sistêmicas tais como PAN, doença de Kawasaki, granulomatose de Wegener, arterite de células gigantes e a crioglobulinemia mista. Dentre os vírus sugeridos na associação com as vasculites sistêmicas primárias podemos incluir o B19.

A infecção pelo parvovírus B19 ocorre no mundo todo e pode apresentar-se clinicamente inaparente. O B19 pode infectar células endoteliais e induzir inflamação vascular. Uma possível associação entre a infecção pelo B19 e doenças difusas do tecido conjuntivo (DDTC), incluindo as vasculites sistêmicas primárias, tem sido foco de atenção nos últimos anos. Dentre as DDTC destacamos a ES, o LES, a polimiosite e a AR.

Estudos têm demonstrado a presença de partículas do DNA do B19 na medula óssea e também na pele de pacientes com ES. FERRI *et al* pesquisaram a presença de DNA do B19, por PCR, na medula óssea de 21 pacientes com ES. A presença do DNA do B19 foi demonstrada em 57% dos casos e em nenhum dos pacientes do grupo controle. Em nenhum dos casos observou-se a presença de viremia. Anticorpos anti-B19 NS1, que é um possível marcador de infecção persistente, foi mais freqüente nos pacientes com ES (33%) do que no grupo controle (13%) (FERRI *et al*, 1999). Outro estudo investigou a presença do DNA do B19, também por PCR, em biópsias de pele de pacientes com ES, LES, dermatomiosite, morfea, doença do enxerto versus hospedeiro. Foi observado uma freqüência de 75% na presença do DNA do B19 nos pacientes com ES, mostrando-se significativamente elevada quando comparada aos controles normais. Diferenças

significativas entre as outras doenças e os controles normais não foram observadas. Estes achados sugerem uma possibilidade do B19 estar envolvido na formação das lesões cutâneas em pacientes com ES (OHTSUKA & YAMAZAKI, 2004).

Sinais cutâneos como rash, febre, mialgia, adenopatia, artropatia não destrutiva, citopenias, diminuição de complemento e a presença de FAN e anticardiolipina são freqüentemente observadas no LES e também podem estar presente em alguns casos de parvovirose. Esta similaridade sugere a possível participação do B19 na etiopatogênese do LES (SÉVE *et al*, 2004). Porém, outros estudos não comprovam esta participação, podendo apenas sugerir que a presença do DNA viral possa estar associado a uma hipocomplementenemia sugerindo que o B19 possa modular a expressão da doença, já que são pacientes imunossuprimidos não só pela doença como também pela terapêutica (CHOU *et al.*, 2000; BENGTSON *et al.*, 2000; HSU & TSAY, 2001; SÉVE *et al*, 2004). A associação entre o B19 e polimiosite também não se confirmou em um estudo realizado em amostras de tecido muscular em oito pacientes com polimiosite. O DNA do B19 foi também investigado por PCR, e somente uma amostra mostrou-se positiva (CHEVREL *et al*, 2003).

A artrite reumatóide (AR) tem sido um modelo no qual a persistência local do B19 pode contribuir na patogênese da doença (TAKAHASHI *et al*, 1998). TAKAHASHI *et al* (1998) encontraram DNA do B19 em tecidos sinoviais de 30 em um total de 37 pacientes com AR, todos eles com IgM negativa para o B19. Também encontraram um aumento na produção de TNF α e interleucina 6 (IL-6) por macrófagos e células de medula óssea, negativas para o B19, quando cultivadas conjuntamente com células sinoviais dos pacientes com AR e positivos para o B19. MITCHELL A. (2002) também sugere que a NS1 do B19 possa ativar a produção de IL-6 através da ativação de macrófagos, linfócitos B e T em pacientes com patologias auto-imunes associadas à infecção pelo B19 (MITCHELL A., 2002).

Mecanismos patogênicos que possam explicar a possível associação do B19 e DDTC, bem como as vasculites sistêmicas primárias, baseiam-se na deposição de imunocomplexos, alteração da função de linfócitos circulantes com alteração da imunidade e/ou um efeito citotóxico direto do vírus (SÉVE *et al.*, 2004). Este efeito citotóxico direto

pode ser explicado pela existência, na superfície das células endoteliais, de um “receptor” para B19 chamado de antígeno P. O resultado da interação entre células endoteliais e o vírus sugere que a apoptose celular mediada pelo B19 pode ser um importante mecanismo de dano celular e tecidual (SOL *et al.*, 1999). No entanto ainda é desconhecido se o B19 está realmente envolvido no desenvolvimento de inflamação vascular crônica.

Nós não observamos a presença do DNA do parvovírus B19 em uma série significativa de amostras teciduais obtidas de pacientes com PAN e poliangiíte microscópica. Nosso estudo apresentou algumas limitações pela raridade dessas vasculites. No total dos 48 pacientes, 21 pacientes foram estudados. O motivo das exclusões são variados. Em vários pacientes o diagnóstico foi feito baseando-se exclusivamente por arteriografia, outros foram excluídos por processo infeccioso e outros por falta de material para avaliação. Sendo assim um número significativo de pacientes não pôde ser avaliado pelos critérios rigorosos de seleção, o que não invalida o resultado final encontrado.

Nosso estudo foi realizado em tecidos previamente fixados em parafina e a maioria dos blocos selecionados para o estudo eram de biópsias realizadas há vários anos atrás. Embora as seqüências de DNA viral possam ser obtidas, por PCR, de tecidos a fresco, tecidos congelados e tecidos fixados em parafina, sabe-se que a qualidade do DNA extraído é inferior em tecidos fixados em parafina. Geralmente a fixação do tecido é feita em formol a 10% podendo resultar no enovelamento das proteínas nucleares, na formação de ligações entre proteínas e DNA e a fragmentação do DNA, dificultando sua extração posterior (CHEN *et al.*, 1991). O estudo de amostras congeladas foi inviável pela baixa incidência de PAN e poliangiíte microscópica. Não acreditamos que nossos resultados foram prejudicados pela extração em tecidos antigos emblocados em parafina. Uma vez confirmada a presença de DNA viral nas amostras, através de PCR para β -globina humana, a pesquisa do DNA do B19 nestas amostras não estaria prejudicada. Em nosso estudo quatro amostras de tecido cutâneo, dois na PAN e 2 na poliangiíte microscópica, não amplificaram por PCR para o gene da β -globina. Houve uma perda de 19% das amostras a serem avaliadas, mas não acreditamos que tenha interferido no resultado final, uma vez que todas as amostras estudadas (81%) foram negativas.

Nos pacientes estudados com PAN, a frequência das manifestações clínicas encontradas são semelhantes às descritas anteriormente na literatura, exceto em relação à frequência de lesões cutâneas onde encontramos uma frequência de 80%, que foi maior ao previamente relatado 40% a 65% (GUILLEVIN *et al*, 1999b; FORTIN *et al*, 1995; GUILLEVIN *et al*, 1992; TRAVERS *et al*, 1979). Esta diferença é explicável pelas características do estudo, onde foram selecionados histopatológicos. Em alguns casos, o diagnóstico de PAN ou poliangiíte microscópica é baseado nos achados de biópsia de lesões cutâneas, método de alta especificidade. Porém, também investigamos tecidos de biópsia renal, muscular e outros órgãos, provenientes de laparotomia.

O valor do BVAS, por ocasião do diagnóstico, foi variável. Nos pacientes com PAN o valor mínimo encontrado foi de 5 e máximo de 26, e na poliangiíte microscópica o valor mínimo de 13 e máximo de 31. O FFS também foi variado nas duas patologias estudadas. Isto demonstra que os pacientes selecionados para o estudo apresentavam quadro clínico variado, sendo selecionados pacientes com formas leves mas também com formas mais graves da doença. Esses achados sugerem que a parvovirose pode não estar associada ao desencadeamento de PAN ou poliangiíte microscópica tanto em pacientes com formas leves quanto em pacientes com formas graves de doença.

Na PAN quatro pacientes iniciaram a doença antes dos 16 anos, sendo então classificados como PAN na infância. Na literatura são descritas associações entre PAN e parvovirose tanto em adultos como em crianças. Na nossa amostra não encontramos DNA do B19 nos tecidos dos pacientes classificados como PAN na infância. Como foram investigados adultos e crianças, nossos resultados sugerem que o B19 pode não estar associado a etiopatogenia da PAN em adultos e crianças.

Em relação às manifestações clínicas dos pacientes com poliangiíte microscópica, encontramos uma menor frequência de envolvimento renal (57%) e uma maior frequência de acometimento pulmonar (57%) quando comparados ao anteriormente descrito pela literatura, 79%-100% e 25%-34%, respectivamente (GUILLEVIN *et al*, 1999; SAVAGE *et al*, 1985). Estes achados podem ser explicados considerando-se que muitos pacientes com evidência clínica de glomerulonefrite são encaminhados diretamente à nefrologia e que como nosso estudo foi realizado em um hospital de referência, casos

graves com manifestação pulmonar podem ser mais comumente encontrados. Porém, não podemos descartar que o perfil dos pacientes deste estudo seja diferente do dos outros casos existentes e essa diferença ter, eventualmente, influenciado no resultado negativo.

Apenas uma paciente apresentou crioglobulina positiva e o diagnóstico de crioglobulinemia mista foi descartado pela imunofluorescência e negatividade para o vírus da hepatite C. A associação de infecção pelo vírus da hepatite C e crioglobulinemia é bem definida. Nenhum dos casos estudados apresentou envolvimento hepático. Nos casos de poliangiíte microscópica, crioglobulinemia foi excluída pela ausência de acometimento hepático, sorologia negativa para hepatite C e também por serem pacientes acompanhados por longa data sem qualquer evidência clínica ou laboratorial de hepatite associada.

Ainda é duvidoso se o parvovírus B19 exerce alguma função na etiopatogênese de algum tipo de vasculite sistêmica primária. Estudos epidemiológicos mostraram uma flutuação cíclica coincidente entre a incidência de infecção pelo B19 e casos de arterite de células gigantes (SALVARANI *et al.*, 1995; ELLING *et al.*, 2000). Além disso, GABRIEL *et al* (1999) encontraram uma associação significativa entre a presença do DNA do B19, por PCR, em amostras teciduais fixadas em parafina de artéria temporal, com evidência histopatológica de vasculite, em pacientes com arterite de células gigantes (54%) comparados a 11% dos pacientes com biópsia de artéria temporal normal. Porém, estudos posteriores, usando a mesma metodologia, não suportam tais achados (HELWEG-LARSEN *et al.*, 2002; SALVARANI *et al.*, 2002; RODRIGUEZ-PLA *et al.*, 2004).

VIGUIER *et al* (2001) descreveram um caso de PAN em adulto associado a infecção aguda pelo B19 e tratado com imunoglobulina endovenosa que apresentou remissão completa em um mês após o tratamento. O paciente apresentou mialgia, neuropatia periférica e poliartrite com sorologia IgM para B19, comprovado por PCR no sangue, constatando, portanto, a viremia. Neste caso, tanto a biópsia de pele quanto de músculo revelaram vasculite necrosante sugestiva de PAN, porém sem evidência do DNA do B19 nas amostras teciduais. A importância do reconhecimento da infecção pelo B19 em pacientes com PAN é suportada por relatos anteriores de PAN associada a B19 onde um paciente apresentou remissão completa quando tratado com prednisona e ciclofosfamida (CORMAN & DOLSON, 1992) mas, em outro relato, evoluiu a óbito com o mesmo

esquema de tratamento (GACHES *et al*, 1993). Em outros dois pacientes tratados com imunossuppressores e imunoglobulina intravenosa observou-se remissão completa da PAN em ambos, mas somente após a introdução de imunoglobulina (FINKEL *et al*, 1994). ZULLIAN *et al* (1998) relataram um caso de PAN em criança tratada com corticoesteróides e imunoglobulina endovenosa que evoluiu com necrose digital apresentando remissão após uso de iloprost endovenoso. Em três casos anteriormente descritos a remissão clínica da doença só ocorreu após o uso da imunoglobulina, ou seja, provavelmente coincidiu com o clearance da viremia. Mesmo diante da evidência da eficácia da imunoglobulina endovenosa nos três casos descritos não se pode afastar a suspeita de que uma regressão espontânea ou que algum efeito imunossupressor não específico da imunoglobulina possa ter contribuído para essa evolução favorável (VIGUIER *et al*, 2001). DURST *et al*, (2002) descreveram um caso de infecção por B19 associado com mielossupressão e PAN cutânea. Neste caso a parvovirose foi confirmada por aumento sorológico de IgM. A presença do DNA viral não foi investigado em tecido. O paciente evoluiu a óbito apesar do tratamento com imunoglobulina endovenosa. Os autores especulam que a apresentação clínica de mielossupressão e vasculite estariam relacionadas à infecção persistente pelo B19 (DURST *et al*, 2002).

O termo PAN associada ao B19 tem sido utilizado em analogia à já conhecida PAN associada ao vírus da hepatite B. TREPO *et al*. (1974) foram os primeiros a demonstrar a associação da PAN com infecção pelo vírus da hepatite B pelo achado do antígeno da hepatite B (HBsAg) em 54% de 55 pacientes com diagnóstico de PAN histologicamente confirmado e um melhor prognóstico nos pacientes com apenas anticorpo positivo (Anti-HBsAg) e naqueles após soroconversão. Anteriormente, foram encontrados depósitos do antígeno Austrália, por estudos imunohistoquímicos, em artérias de grande e pequeno calibre provenientes do rim, baço e ramos intramusculares de coronárias, obtidas de pacientes sabidamente portadores de hepatite (NOWOSLAWSKI *et al*, 1972). O risco potencial de haver um aumento na replicação viral com o uso de corticoesteróides em pacientes com PAN e hepatite B tem orientado à utilização conjunta de agentes anti-virais (GUILLEVIN *et al*. 1995).

Em analogia ao tratamento da PAN associada à hepatite B, acreditamos que os casos de PAN associada à parvovirose também requer tratamento diferenciado. O uso conjunto da imunoglobulina, corticoesteróides e imunossupressores parecem mudar substancialmente a evolução e prognóstico desses pacientes. Diante disso, a investigação sorológica de parvovirose em pacientes com PAN e sintomas clínicos sugestivos de infecção pelo B19 deve também ser considerada.

Nós não dispúnhamos de amostras de soro desses doentes, coincidente com a ocasião da obtenção das amostras teciduais, para pesquisa de DNA do B19, bem como amostras de medula óssea, porque esse ainda não é um procedimento de rotina na investigação da PAN e poliangiíte microscópica.

Porcentagens elevadas de anticorpos IgG contra o B19 em pacientes com vasculites sistêmicas pode ser um indicativo de falso positivos nestas populações uma vez que a soroprevalência dos anticorpos contra o B19 em populações adultas varia entre 40% e 80% (YOUNG & BROWN, 2004).

A presença de IgM específico para B19 em pacientes com vasculites sistêmicas não é suficiente para associar a infecção como agente desencadeante da doença. A detecção viral diretamente no local (tecido, vaso) se torna necessária. Como a etiopatogênese da PAN e poliangiíte microscópica é ainda pouco conhecida, a contribuição de um agente infeccioso é também difícil de ser estabelecida. O B19 pode iniciar o processo de inflamação vascular, mas desaparecer na fase crônica da doença. Nos nossos casos as amostras teciduais foram obtidas na fase inicial da doença, o que torna pouco provável que o vírus já tivesse desaparecido da amostra. Somente dois pacientes estavam em uso de prednisona na ocasião da obtenção do material, demonstrando que mesmo na vigência de imunossupressão, em fases não tão iniciais da doença, o vírus não foi encontrado nos locais de lesão vascular. A grande maioria dos nossos pacientes não estavam em esquema de imunossupressão na ocasião da obtenção do material avaliado, o que valoriza nosso estudo, porque a imunossupressão poderia facilitar a infecção ou presença do B19 nesses pacientes.

A interação entre as vasculites sistêmicas e as DDTC com o B19 podem não ser etiológica. É possível que a susceptibilidade à infecção pelo B19 ou a replicação viral esteja aumentada nos tecidos afetados primariamente por um processo inflamatório. O B19 pode

permanecer latente nas células inflamatórias, resultando em um aumento na frequência do B19 nas amostras teciduais na arterite de células gigantes, esclerose sistêmica e alguns casos de PAN. A demonstração do tropismo do B19 por linfócitos T e B e macrófagos reforçam esta hipótese (SÉVE *et al*, 2004).

O curso clínico da parvovirose pode simular vasculite sistêmica primária, como a poliangiíte microscópica e PAN, pois pode se manifestar com artrite, anemia, pneumonite, glomerulonefrite e manifestações neurológicas como a neuropatia periférica (DASS *et al*, 2004). A etiopatogenia da lesão pulmonar na parvovirose ainda é desconhecida, especulando-se que pode ser resultado do efeito direto do vírus sobre os pneumócitos, da resposta imune do hospedeiro ou mesmo de uma vasculite como manifestação da parvovirose (DASS *et al*, 2004).

Não existem evidências sorológicas de infecção pelo B19 em pacientes com GW e poliangiíte microscópica, vasculites sistêmicas primárias sabidamente associadas ao ANCA (NIKKARI *et al*, 1995; EDEN *et al*, 2003). Entretanto, não há relatos de pesquisa de DNA viral em tecidos pelo método PCR. Por outro lado, foram encontrados ANCA em pacientes com infecção aguda pelo B19, o que pode sugerir uma correlação entre o B19 e os eventos imunológicos relacionados ao desencadeamento ou perpetuação das vasculites sistêmicas primárias (CHOU *et al*, 2000).

HERMAN *et al* (2004) observaram a presença transitória de C e P-ANCA em 15% numa amostra de 50 indivíduos com infecção aguda pelo B19. Apesar da possibilidade reação falso-positiva para o ANCA, há a possibilidade da infecção pelo B19 estar realmente relacionada a produção destes auto-anticorpos, atuando como desencadeante desse distúrbio imunológico. Somente um dos nossos pacientes com poliangiíte microscópica foi ANCA positivo o que nos impossibilita a qualquer conclusão referente a nossos pacientes com vasculite associada ao ANCA. Ressaltamos também que avaliamos amostras teciduais de pacientes a partir de 1985, quando a pesquisa do ANCA ainda não estava disponível, não sendo realizado em todos pacientes investigados nesse estudo.

Foi avaliado um número satisfatório de pacientes com PAN, vasculite reconhecidamente não associada ao ANCA, o que nos sugere que o B19, provavelmente, não exerce função na etiopatogênese deste tipo de vasculite. Em revisão bibliográfica

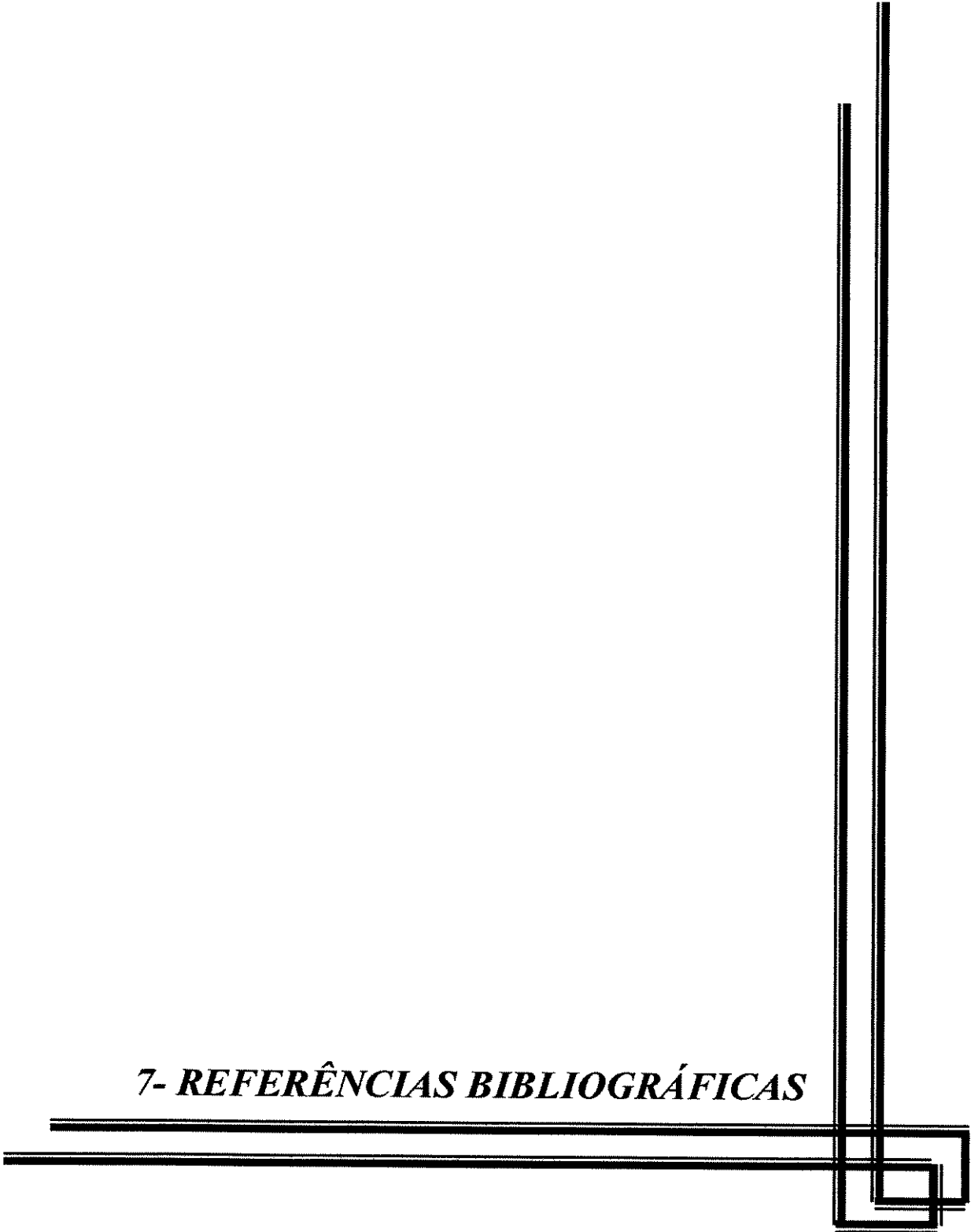
recente não encontramos estudos avaliando a presença de DNA do B19 em amostras teciduais de pacientes com PAN.

Os casos anteriormente relatados e com os achados do nosso estudo sugerem que o parvovírus B19 não está relacionado com o desencadeamento da PAN idiopática e da poliangiíte microscópica, podendo se tratar apenas de uma associação fortuita entre os dois. Logo, a hipótese de que uma infecção endotelial crônica pelo B19 pode desencadear vasculite é improvável para PAN e poliangiíte microscópica. No entanto, não podemos descartar que a infecção de linfócitos pelo B19 possa alterar a imunidade e desencadear uma série de eventos inesperados.

6- CONCLUSÕES

- Nossos resultados não confirmam a hipótese da possível participação do B19 no desencadeamento da PAN e poliangiíte microscópica.
- Os casos de PAN ou poliangiíte microscópica e parvovirose anteriormente relatados podem ser decorrentes apenas de uma associação fortuita entre as duas doenças.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



AGNELLO, V.; ABEL, G. Localization of hepatitis C virus in cutaneous vasculitic lesions in patients with type II cryoglobulinemia. **Arthritis Rheum**, 97:2007-15, 1997.

AKIKUSA, B.; SATO, T.; OGAWA M.; UEDA, S.; KONDO, Y. Necrotizing alveolar capillaritis in autopsy case of microscopic polyangiitis. Incidence, histopathogenesis and relation with systemic vasculitis. **Arch Pathol Lab Med**, 121: 144-9, 1997.

BACON, P. Vasculitis – then and now. In: ANSELL, B.M.; BACON, P.A.; LIE, J.T.; YAZICI, H. ed – The Vasculitides. First ed. Chapman & Hall, 1996. P. 3 a 20.

BAKER, AL.; KAPLAN, M.M.; BENZ, W.C.; SIDEL, J.S.; WOLFE, H.S. – Polyarteritis associated with Australia antigen positive hepatitis. **Gastroenterology**, 62: 105-10, 1972.

BENGTTSSON, A.; WIDELL, A.; ELMSTAHL, S.; STURFELT, G. No serological indications that systemic lupus erythematosus is linked with exposure to human parvovirus B19. **Ann Rheum Dis**, 59:64-6, 2000.

BLANCO, R.; MARTINEZ-TABOADA, U.M.; RODRIGUEZ-VALVERDE, V.; GARCIA, F. Cutaneous vasculitis in children and adults: associated diseases and etiologic factors in 303 patients. **Medicine**, 77: 403-18, 1998.

BLOCH, D.A.; MICHEL, B.A.; HUNDER, G.G.; McSHANE, D.J., AREND, W.P.; CALABRESE, L.H.; EDWORTHY, S.M.; FAUCI, AS.; FRIES, J.F.; LEAVITT, R.Y.; LIE, J.T.; LIGHTFOOT JR., R.W.; MASL, AT.; MILLS, J.A.; STEVENS, M.B.; WALLACE, S.L.; ZVAIFLER, N.J. – The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of vasculitis: patients and methods. **Arthritis Rheum**, 33:1068-73, 1990.

BROWN, KE; ANDERSON, SM; YOUNG, NS. Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. **Science**, 262: 114-7, 1993.

CALABRESE, L.H. – The rheumatic manifestations of infection with the human immunodeficiency virus. **Sem Arthritis Rheum.**, 18: 225-39, 1989.

CHEN, M.L.; SHIEH, Y.S.; SHIM, K.S.; GERBER, M.A. Comparative studies on the detection of hepatitis B virus DNA in frozen and paraffin sections by the polymerase chain reaction. **Mod Pathol**, 4: 555-8, 1991.

CHEVREL, G.; BORSOTTI, J.P.; MIOSSEC, P. Lack of evidence for a direct involvement of muscle infection by parvovirus B19 in the pathogenesis of inflammatory myopathies: a follow-up study. **Rheumatology**, 42: 349-52, 2003.

CHOU, T.N.; HSU, T.C.; CHEN, R.M.; LIN, L.I.; TSAY, G.J. Parvovirus B19 infection associated with the production of anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) and anticardiolipin antibody (aCL). **Lupus**, 9:551-4, 2000.

CID, M.; GRAU, J.M.; CASADEMONT, J.; CAMPO, E.; COLL-VINENT, B.; LÓPEZ-SOTO, A.; INGELMO, M.; URBANO-MÁRQUES, A. Immunohistochemical c of inflammatory cells and immunologic markers in muscle and nerve biopsy specimens from patients with systemic polyarteritis nodosa. **Arthritis Rheum**, 37:1055-1061, 1994.

COMBES, B.; STASTNY, P.; SHOREY, J; EIGENBRODT, E.H.; BARRERA, A; HULL, AR.; CARTER, N.W. – Glomerulonephritis with deposition of Australia antigen-antibody complexes in glomerular basement membrane. **Lancet**, 11: 234, 1971.

CONN, D.L. – Polyarteritis. In: KLIPPEL, J.H. & DIEPPE, P.A, ed. – **Rheumatology**. London, Mosby, 1994. Section 6, chapter 17, p. 1-10.

COOLING, L.L.; KOERNER, T.A.; NAIDES, S.J. Multiple glycosphingolipids determine the tissue tropism of parvovirus B19. **J Infect Dis**, 172: 1198-205, 1995.

CORMAN, L.C.; STAUD, R. Association of Wegener's Granulomatosis with Parvovirus B19 Infection : comment on the concise communication by Nikkari *et al*. **Arthritis Rheum**, 38:1174-5, 1995.

CORMAN, L.C.; DOLSON, D.J. Polyarteritis nodosa and parvovirus B19 infection. **Lancet**, 339: 491, 1994.

CUPPS, T.R. – Vasculitis: epidemiology, pathology, and pathogenesis. In: SCHUMACHER Jr, H.R., ed. – **Primer on the rheumatic diseases**. 10.ed. Atlanta, Arthritis Foundation, 1993. P. 136-40.

DASS, R.; RAMESH, P.; RATHO, R.K.; SAXENA, A.K.; SINGH S. Parvovirus B19-induced multisystem disease simulating systemic vasculitis in a young child. **Rheumatol Int**, 10.1007/s00296-004-0465-x, 2004.

DAY, CJ; HEWINS, P; SAVAGE, C.O.S. New developments in the pathogenesis of ANCA-associated vasculitis. **Clin Exp Rheumatol**, 21(Suppl. 32): S35-S48, 2003.

DEEREN, D.H.; DE BACKER, A.L.; MALBRAIN, M.L.N.G.; VERBRAEKEN, H.; BLOCKMANS, D. Treatment of hepatitis B virus-related polyarteritis nodosa: two case reports and a review of the literature. **Clin Rheumatol**, 23: 172-6, 2004.

DURST, R.; GOLDSCHMIDT, A.; YEHUDA, A.B. Parvovirus B19 infection associated with myelosuppression and cutaneous polyarteritis nodosa. **Rheumatology**, 41: 1210-1212, 2002.

EDEN, A; MAHR, A; SERVANT, A; RADJEF, N; AMARD, S; MOUTHON, L; GABARG-CHENON, A; GUILLEVIN, L. Lack of Association between B19 or V9 erythrovirus infection and ANCA-positive vasculitides: a case-control study. **Rheumatology**, 42:660-4, 2003.

EDGAR, J.D.M. – The clinical utility of ANCA positivity. **Ann Rheum Dis**, 55: 494-6, 1996.

ELLING, H.; OLSSON, A.T.; ELLING, P. Human parvovirus and giant cell arteritis: a selective arteritic impact? **Clin Exp Rheumatol**, 18(Suppl. 20):S12-S14, 2000.

FERNANDES, S.R.M.;BERTOLO, M.B.; ROSSI, C.L.; SAMARA, AM.; BONON, S.H.A; DURANTE, P; COSTA, S.C.B. – Polyarteritis nodosa and cytomegalovirus: diagnosis by polymerase chain reaction. **Clin Rheumatol**, 18:501-3, 1999.

FERRI, C.; ZAKRZEWSKA, K.; LONGOMBARDO, G.; GIUGGIOLI, D.; STORINO, F.A.; PASERO, G.; AZZI A. Parvovirus B19 infection of bone marrow in systemic sclerosis patients. **Clin Exp Rheumatol**, 17: 718-20, 1999.

FINK, C.W. – The role of the streptococcus in poststreptococcal reactive arthritis and childhood polyarteritis nodosa. **J. Rheumatol**, 18 (supl 29):14-20, 1991.

FINKEL, T.H.; TÖRÖK, T.J.; FERGUSON, P.J.; DURIGON, E.L.; ZAKI, S.R.; LEUNG, D.Y.M.; HARBECK, R.J.; GELFAND, E.W.; SAULSBURY, F.T.; HOLLISTER, J.R.; ANDERSON, L.J. – Chronic parvovirus B19 infection and systemic necrotizing vasculitis: opportunistic infection or aetiological agent? **Lancet**, 343:1255-8, 1994.

FORTIN, P.R.; LARSON, M.G.; WATTERS, K. Prognostic factors in systemic necrotizing vasculitis of the polyarteritis nodosa group – A review of 45 cases. **J Rheumtol**, 22: 78-84, 1995.

FRANCKE, M.L.; MIHAESCU, A.; CHAUBERT, P. Isolated necrotizing arteritis of the female genital tract: A clinicopathologic and immunohistochemical study of 11 cases. **Int J Gynecol Pathol**, 17:193-200, 1998.

FREIRE, A.L.; BERTOLO, M.B.; PINHO JR., A.J.; SAMARA, A.M.; FERNANDES, S.R.M. Increased serum levels of interleukin-8 in polyarteritis nodosa and Behçet's disease. **Clin Rheumatol**, 23:203-5, 2004.

FREITAS,R.B.; WONG, D.; BOSWELL, F.; MIRANDA, M.F.R.; LINHARES, A.C.; SHIRLEY, J.; DESSELBERGER, U. Prevalence of human parvovirus (B19) and rubellavirus Infections in urban and remote rural areas in Northern Brazil. **J Med Virol**, 32: 203-98, 1990.

GABRIEL, S.E.; ESPY, M.; ERDMAN, D.D.; BJORNSSON, J.; SMITH, T.F.; HUNDER, G.G. The role of parvovirus B19 in the pathogenesis of giant cell arteritis. A preliminary evaluation. **Arthritis Rheum**, 6:1255-58, 1999.

GACHES, F.; LOUSTAUD, V.; VIDAL, E.; DELAIRE, L.; GUIARD-SCHMID, J.B.; LAVOINE, E.; NEGRIER, P.; LIOZON, F. Périartérite noueuse et infection par le parvovirus B19. **Rev Med Interne**, 14:323-5, 1993.

GARCIA-PORRUA, C.; GONZALES-GAY, M.A. Bacterial infection presenting as cutaneous vasculitis in adults. **Clin Exp Rheumatol**, 17: 471-3, 1999.

GAYRAUD, M.; GUILLEVIN, L.; LE TOUMELIN, P.; COHEN, P.; LHOTE, F.; CASASSUS, P.; JAROUSSE, B. Long-term follow-up of polyarteritis nodosa, microscopic polyangiitis and Churg-Strauss syndrome. Analysis of four prospective trials including 278 patients. **Arthritis Rheum**, 44: 666-75, 2001.

GÉNÉREAU, T.; LORTHOLARY, O.; ROYER, I.; LHOTE, F.; DARRAS-JOLY, C.; GUILLEVIN, L. Les manifestations digestives de la périartérite noueuse. **Gastroentérol Clin Biol**, 21: 503-10, 1997.

GROSS, W.L.; CSERNOK, E. Immunodiagnostic pathophysiologic aspects of antineutrophil cytoplasmic antibodies in vasculitis. **Curr Opin Rheumatol**, 7:11-9, 1995.

GUILLEVIN, L.; FECHENER, J.; GODEAU, P.; WECHSLER, B.; HERREMAN, G.; HERSON, S. Périartérite noueuse: étude clinique et thérapeutique de 126 malades étudiés en 23 ans. **Ann Med Int**, 136:6-12, 1985

GUILLEVIN, L.; JARROUSSE, B.; LOK, C.; LHOTE, F.; JAIS, J.P.; LE THI HUONG, D.D.; BUSSEL, A. – Longterm follow-up after treatment of polyarteritis nodosa and Churg-Strauss angiitis with comparison of steroids, plasma exchange and cyclophosphamide to steroids and plasma exchange: a prospective randomized trial of 71 patients. **J. Rheumatol**, 18:567-74, 1991.

GUILLEVIN, L.; LHOTE, F.; JARROUSSE, B.; FAIN, O. Treatment of polyarteritis nodosa and Churg-Strauss syndrome. A meta-analysis of a 3 prospective controlled trials including 182 patients over 12 years. **Ann Méd Interne (Paris)**, 143:405-16, 1992.

GUILLEVIN, L.; LHOTE, F.; COHEN, P.; SAUVAGET, F.; JARROUSSE, B.; LORTHOLARY, G.; NOEL, L.H.; TREPO, C. Polyarteritis nodosa related to hepatitis B virus. A prospective study with long-term observation of 41 patients. **Medicine (Baltimore)**74:238-53, 1995.

GUILLEVIN, L.; LHOTE, F.; GAYRAUD, M.; COHEN, P.; JARROUSSE, B.; LORTHOLARY, O.; THIBULT, N.; CASASSUS, P. – Prognostic factors in polyarteritis nodosa and Churg-Strauss syndrome: a prospective study in 342 patients. **Medicine**, 75:17-28, 1996.

GUILLEVIN L. Treatment of classic polyarteritis nodosa in 1999. **Nephrol Dial Transplant**, 14: 2077-9, 1999a.

GUILLEVIN, L.; DURAND-CASSELIN, B.; CEVALLOS, R.; GAYRAUD, M.; LHOTE, F.; CALLARD, P.; AMOROUX, J.; CASASSUS, P.; JARROUSSE, B. Microscopic polyangiitis. Clinical and laboratory findings in eight-five patients. **Arthritis Rheum**, 42: 421-30, 1999b.

GUILLEVIN, L.; COHEN, P.; MAHR, A.; ARENE, J.P.; MOUTHON, L.; PUECHAE, X.; PERTUISET, E.; GILSON, B.; HAMIDON, M.; LANOUX, P.; BRUET, A.; RUIARD, M.; VANHELLE, P.; CORDIER, J.F. Treatment of polyarteritis nodosa and microscopic polyangiitis with poor prognosis factors: A prospective trial comparing glucocorticoids and six or twelve cyclophosphamide pulses in sixty-five patients. **Arthritis Rheum**, 49: 93-100, 2003.

GUILLEVIN, L.; MAHR, A.; COHEN, P.; LARROCHE, C.; QUEYREL, V.; LOUSTAUD-RATTI, V.; IMBERT B., HAUSFATER P., ROUDIER J., BIELEFELD P., PETITJEAN, P., SMADJA, D. Short-term corticosteroids, Lamivudine and plasma exchanges to treat hepatitis B virus related polyarteritis nodosa. **Arthritis Rheum**, 51: 482-7, 2004.

HARPER, L.; SAVAGE, S. Leukocyte-endothelial interactions in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated systemic vasculitis. **Rheum Dis Clin N Am**, 27(4):887-903, 2001.

HAUSCHILD, S.; SCHIMITT, W.H.; CSERMOK, E.; FLESCH, BK; RAUTMANN, A.; GROSS, W.L. ANCA in systemic vasculitis, collagen vascular disorders and inflammatory bowel diseases. **Adv Exp Med Biol** 336:245-51,1993.

HAYNES, B.F. – Vasculitis: pathogenic mechanisms of vessel damage in inflammation. In: GALLIN, J.I.; GOLDSTEIN, I.M.; SNYDERMAN, R., ed. – **Inflammation: basic principles and clinical correlates**. New York, Raven, 1992. p. 921.

HELWEG-LARSEN, J.; TARP, B.; OBEL, N.; BASLUND, B. No evidence of parvovirus B19, *Chlamydia pneumoniae* or human herpes virus infection in temporal artery biopsies in patients with giant cell arteritis. **Rheumatology**, 41:445-9, 2002.

HERMANN, J.; DEMEL, U.; STÜNZNER, M.; DAGHOFER, E.; TILZ, G.; GRANINGER, W. Clinical interpretation of antineutrophil cytoplasmatic antibodies: Parvovirus B19 infection as a pitfall. **Ann Rheum Dis** Published Online First [October 14, 2004]. doi: 10.1136/ard.2004.024877.

HSU, T.C.; TSAY, G.J. Human parvovirus B19 infection in patients with systemic lupus erythematosus. **Rheumatology**, 40: 152-7, 2001.

HUNDER, G.G; AREND, W.P.; BLOCH, D.A ; CALABRESE, L.H.; FAUCI, AS.; FRIES, J.F.; LEAVITT, R.Y.; LIE, J.T.; LIGHTFOOT JR., R.W.; MASI, A.T.; McSHANE, D.J.; MICHEL, B.A; MILLS, J.A; STEVENS, M.B.; WALACE, S.L.; ZVAIFLER, N.J. – The American College of Rheumatology 1990 criteria for classification of vasculitis: introduction. **Arthritis Rheum**, 33: 1065-7, 1990.

HUNDER, GG. Vasculitis: clinical and laboratory features. In: SCHUMACHER JR., HR., ed. **Primer on the rheumatic diseases**. 10.ed. Atlanta, Arthritis Foudnation, 1993. p. 140-6.

JENNETTE, J.C.; FALK, R.J.; ANDRASSY, K.; BACON, P.A; CHURG, J.; GROSS, W.L., HAGEN, E.C.; HOFFMAN, G.S.; HUNDER, G.G.; KALLENBERG, C.G.M.; McCLUSKEY, R.T.; SINICO, R.A; REES, AJ.; VAN ES, L.A; WALDHERR, R.; WILK, A – Nomenclature of systemic vasculitides: proposal of an international consensus conference. **Arthritis Rheum**, 37:187-92, 1994.

JENNETTE, J.C.; THOMAS D.B.; FALK, R.J. Microscopic polyangiitis (microscopic polyarteritis). **Semin Diagn Pathol**, 18(1):3-13, 2001.

KALLENBERG, C.G.; MULDER, A.H.; TERVAERT, J.W. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies: a still-growing class of autoantibodies in inflammatory disorders. **Am J Med**, 93: 675-82, 1992.

KARP, D.R.; KANTOR, O.S.; HALVERSON, J.D.; ATKINSON, J.P. – Successful management of catastrophic gastrointestinal involvement in polyarteritis nodosa. **Arthritis Rheum**, 31:683-7, 1988.

KIRAZ, S; OSTURK, M.A., ERTENLI, I.; CALGUNERI, M. Parvovirus B19 infection in Behçet's disease. **Ann Rheum Dis**, 60: 814-5, 2001.

KOMOCSI, A; LAMPRECHT, P; CSERNOCK, E.; MUELLER, A.; HOLL-ULRICH, K.; SEITZER, U.; MOOSING, F.; SCHING, A.; GROSS, W.L. Peripheral blood and granuloma CD4+CD28- T cells are a major source of Interferon gamma and tumor necrosis factor alpha in Wegener's granulomatosis. **Am J Pathol**, 160:1717-24, 2002.

KRUPA, W.M.; DEWAN, M; JEON, M.S.; KURTIN, P; YOUNGE, B.;R.; GORONZY, J.J.; WEYAND, C.M. Trapping of misdirected dendritic cells in the granulomatous lesions of giant cell arteritis. **Am J Pathol** 161:1815-23, 2002

LAMPRECHT, P; MOOSIG, F; CSERNOCK, E ; SEITZER, U.; SCHNABEL, A.; MIELLER, A.; GROSS, W.L. CD28 negative T cells are enriched in granulomatous lesions of the respiratory tract in Wegener's granulomatosis. **Thorax**, 56:751-7, 2001.

LANGFORD C.A. Treatment of polyarteritis nodosa, microscopic polyangiitis and Churg-Strauss syndrome: where do we stand? **Arthritis Rheum**, 44: 508-12, 2001.

LÊ THI HUONG, D.; WECHSLER, B.; GUILLEVIN, L.; BLETRY, O.; LANGLOIS, P.; BAUMER, R.; GOUDEAU, P. Les manifestations digestives de la périartérite nouese dans une série de 120 case. **Gastroentérol Clin Biol**, 9:697-703, 1985.

LERUEZ-VILLE, M; LAUGE, A; MORINET, F; GUILLEVIN, L; DENY, P. Polyarteritis nodosa and parvovirus B19 infection [French]. **Rev Méd Interne**, 14:323-5, 1993.

LHOTE, F.; COHEN, P.; GUILLEVIN, L. Polyarteritis nodosa, microscopic polyangiitis and Churg-Strauss syndrome. **Lupus**, 7:238-58, 1998.

LIE, J.T. Nomenclature and classification of vasculitis: plus ça change, plus c'est la même chose. **Arthritis Rheum**, 37: 181-6, 1994.

LIGHTFOOT JR., R.W. ; MICHEL, B.A.; BLOCH, D.A.; HUNDER, G.G.; ZVAIFLER, N.J.; McSHANE, D.J.; AREND, W.P.; CALABRESE, L.H.; LEAVIT, R.Y.; LIE, J.T.; MASI, A.T.; MILLS, J.A.; STEVENS, M.B.; WALLACE S.L. The American College of Rheumatology 1990 criteria for the classification of polyarteritis nodosa. **Arthritis Rheum**, 33:1088-93, 1990.

LONGLEY, S.; CALDWELL, J.R.; PANUSH, R.S. - Paraneoplastic vasculitis: unique syndrome of cutaneous angiitis and arthritis associated with myeloproliferative disorders. **Am J. Med**, 80: 1027-30, 1986.

LUQMANI, R.A.; BACON, P.A.; MOOTS, R.J.; JANSSEN, B.A.; PALL, A.; EMERY, P.; SAMUELS, C.; ADU, D. Birmingham Vasculitis Activity Score (BVAS) in systemic necrotizing vasculitis. **QJM**, 87(11): 671-8, 1994.

LUQMANI, R.A.; EXLEY, A.R.; KITAS, G.D.; BACON, P.A. Disease assessment and management of the vasculitides. **Baillières Clin Rheumatol**, 11(2): 423-46, 1997.

MAGRO, C.M.; CROWSON, A.N.; DAWOOD, M.; NUOVO, G. Parvoviral infection of endothelial cells and its possible role in vasculitis and autoimmune diseases. **J Rheumatol**, 29:1227-35, 2002.

MAYET, W.J.; SCHWARTING, A.; BARREIROS, A.P.; SCHLAAK, J.; NEURATH, M. Anti-PR3 antibodies induce endothelial IL-8 release. **Eur J Clin Invest**, 29:973-9, 1999.

MITCHELL A. Parvovirus B19 nonstructural (NS1) protein as a transactivator of interleukine-6 synthesis: common pathway in inflammatory sequelae of human parvovirus infection? **J Med Virol**, 67:267-74, 2002.

MOORE, T.L. Parvovirus-associated arthritis. **Curr Opin Rheumatol**, 12:289-94, 2000.

MOOSIG, F; CSERNOK, E; WANG, G; GROSS, WL. Costimulatory molecules in Wegener's granulomatosis (WG): Lack of expression of CD28 and preferential up-regulation of its ligands B7-1 (CD80) and B7-2(CD86) on T cells. **Clin Exp Immunol**, 114:113-8, 1998.

NACHMAN, P.; HOGAN, S.L.; JENNETTE, J.C.; FALK, R.J. Treatment response and relapse in ANCA-associated microscopic polyangiitis and glomerulonephritis. **J Am Soc Nephrol**, 7: 33-9, 1996.

NIGRO, G.; ZERBINI, M.; KRZYSZTOFIK, A.; GENTILOMI, G.; PORCARO, M.A.; MANGO, T.; MUSIANI, M. Active or recent parvovirus B19 infection in children with Kawasaki disease. **Lancet**, 343: 1260-1, 1994.

NIKKARI, S; MERTSOLA, J; KORVENRANTA, H; VAINIONPÄÄ, R; TOIVANEN, P. Wegener's Granulomatosis and Parvovirus B19 Infection. **Arthritis Rheum**, 37:1707-8, 1994.

NILES, J.L. Value of test for antineutrophil cytoplasmic autoantibodies in the diagnosis and treatment of vasculitis. **Curr Opin Rheumatol**, 5:18-24, 1993.

NOWOSLAWSKI, A.; KRAWCZYNSKI, K.; BRZOSKO, W.J.; MADALINSKI, K. Tissue localization of Australia antigen immune complexes in acute and chronic hepatitis and liver cirrhosis. **Am J Pathol**, 68:31-50, 1972.

OHTSUKA, T.; YAMAZAKI, S. Increased prevalence of human parvovirus B19 DNA in systemic sclerosis skin. **Br J Dermatol**, 150: 1091-5, 2004.

RODRIGUEZ-PLA, A.; BOSCH-GIL, J.A.; ECHEVARRIA-MAYO, J.E.; ROSSELLO-URGELL, J.; SOLANS-LAQUE, R.; HUGUET-REDECILLA, P.; STONE, J.H.; VILARDELL-TARRES, M. No detection of parvovirus B19 or herpesvirus DNA in giant cell arteritis. **J Clin Virol**, 31:11-5, 2004.

RUSSEL, KA; SPECKS, U. Are antineutrophil cytoplasmic antibodies pathogenic? Experimental approaches to understand the antineutrophil cytoplasmic antibody phenomenon. **Rheum Dis Clin N Am**, 7(4): 815-32, 2001.

SALVARANI, C.; GABRIEL, S.E.; O'FALLON, W.M.; HUNDER, G.C. The incidence of giant cell arteritis in Olmsted county, Minnesota: apparent fluctuations in a cyclic pattern. **Ann Intern Med**, 123:192-4, 1995.

SALVARANI, C.; FARNETTI, E.; CASALI, B.; NICOLI, D.; WENLAN, L; BAGOCCHI, G.; MACCHIONI, P.; LO SCOCCO, G.; GRAZIA CATANOSO, M.; BOIARDI, L.; CANTINI, F. Detection of parvovirus B19 DNA by polymerase chain reaction in giant cell arteritis: a case control study. **Arthritis Rheum**, 46:3099-101, 2002.

SAMUELS, N.; SHEMESH, O; YINNON, AM.; FISHER, D.; ABRAHAM, AS. - Polyarteritis nodosa and drug abuse: is there a connection? **Postgrad Med J**, 72:684-5, 1996.

SANDERS, J.S.; STEGEMAN, C.A.; KALLENBERG, C.G.M. The Th1 and Th2 paradigm in ANCA-associated vasculitis. **Kidney Blood Press Res**, 26:215-20, 2003.

SAVAGE, C.O.; WINEARLS, C.G.; EVANS, D.J.; REES, A.T.; LOCKWOOD, C.M. Microscopic polyarteritis presentation, pathology and prognosis. **QJ Med**, 56: 467-83, 1985.

SÉVE, P.; FERRY, T.; CHARHON, A.; CALVET, A.; BROUSSOLLE, C. Systemic manifestations of Parvovirus B19 infections. **Rev Med Interne**, 25:740-51, 2004.

SHULTZ, D.R.; TOZMAN, E.C. Antineutrophil cytoplasmic antibodies: major autoantigens, pathophysiology, and disease associations. **Semin Arthritis Rheum**, 25:143-59, 1995.

SOL, N.; LE JUNTER, J.; VASSIAS, I.; FREYSSINIER, J.M.; THOMAS, A.; PRINGENT, A.F.; RUDKIN, B.B.; FICHELSON, S.; MORINET, F. Possible interactions between the NS-1 protein and tumor necrosis factor alpha pathways in erythroid cell apoptosis induced by human parvovirus B19. **J Virol**, 73:8762-70, 1999.

SPECKS, U. ANCA subsets: Influence on disease phenotype. **Cleve Clin J Med**, 69:SII-56, 2002.

STAUD, R.; CORNAN, L.C. Association of parvovirus B19 with giant cell arteritis. **Clin Infect Dis**, 22:1123, 1996.

SUNDY, J.S.; HAYNES, B.F. – Pathogenic mechanisms of vessel damage in vasculitis syndromes. **Rheum Dis Clin North Am**, 22:861-81, 1995.

TAKAHASHI, Y.; MURAI, C.; SHIBATA, S.; MUNAKATA, Y.; ISHII, T.; ISHII, K.; SATTOH, T.; SAWAI, T.; SUGAMURA, K.; SASAKI, T. Human parvovirus B19 as a causative agent for rheumatoid arthritis. **Proc Natl Acad Sci**, 95:8227-32, 1998

TANAWATTANACHAROEN, S.; FALK, R.J.; JENNETTE, J.C.; KOPP, J.B. Parvovirus B19 DNA in kidney tissue of patients with focal segmental glomerulosclerosis. **Am J. Kidney Dis**, 6:1166-74, 2000.

TRAVERS, R.L.; ALLISON, D.J.; BRETTLE, R.P.; HUGHES, G.R. Polyarteritis nodosa: A clinical and angiographic analysis of 17 cases. **Semin Arthritis Rheum**, 8(3): 184-98, 1979.

TREPO, C.G.; ZUCKERMAN, A.J.; BIRD, R.C.; PRINCE, G.- The role of circulating hepatitis B antigen/antibody immune complexes in the pathogenesis of vascular and hepatic manifestations in polyarteritis nodosa. **J. ClinPathol**, 27: 863-8, 1974.

TURAKHIA, A.K.; KHAN, M.A – Splinter hemorrhages as a possible clinical manifestation of cholesterol crystal embolization. **J. Rheumatol**, 17: 1083-6, 1990.

VIGUIER, M.; GUILLEVIN, L.; LAROCHE, L. Treatment of B19-associated polyarteritis nodosa with intravenous immune globulin. **N Engl J Med**, 344: 1481-3, 2001.

WEYAND, C.; GORONZY, J.J. Mechanisms of Disease: Medium- and Large-Vessels Vasculitis. [Review Article]. **N Engl J Med**, 349: 160-9, 2003.

WIJK, A. S. Clinical Use of Serological Tests for Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies. What do the studies say? **Rheum Dis Clin N Am**, 27(4): 799-813, 2001.

YOUNG, N.S.; BROWN, K.E. Mechanisms of Disease: Parvovirus B19. **N Engl J Med**, 350: 586-97, 2004.

ZULLIAN, F.; COSTANTINI, C.; MONTESCO, M.C.; SCHIAVON, F.; ZACCHELLO, F. Successful treatment of gangrene in systemic necrotizing vasculitis with iloprost. **Br J Rheumatol** 37:228-30,1998.

8- ANEXO

Achados histopatológicos nos tecidos dos pacientes estudados

1- Histopatologia - PELE

Nome:

Nº biópsia:

1- Vasos afetados:

1.1- Localização – derme: ☐ superficial

☐ média

☐ profunda

1.2- Caracterização: ☐ vênula/capilar/arteriolas ☐ artéria

1.3- Tamanho/Calibre: - diâmetro: ☐ médio ☐ pequeno

1.4- Alterações no vaso: ☐ tumefação endotelial

☐ necrose fibrinóide

☐ extravasamento de eritrócitos

☐ infiltrado inflamatório (caracterização em +)

☐ linfócitos

☐ histiócitos/macrófagos

☐ plasmócitos

☐ PMN-neutrófilos

☐ leucocitoclasia

☐ eosinófilos

☐ células epitelióides

☐ células gigantes/granuloma

☐ fibras elásticas ☐ contínuas

☐ descontínuas

☐ replicada

2- Histopatologia - NERVO

Nome:

Nº biópsia:

1- Vasos afetados:

1.1- Localização – derme: ☐ epineural

☐ perineural

☐ endoneural

1.2- Caracterização: ☐ vênula/capilar/arteríolas ☐ artéria

1.3- Tamanho/Calibre: - diâmetro: ☐ médio ☐ pequeno

1.4- Alterações no vaso: ☐ tumefação endotelial

☐ necrose fibrinóide

☐ extravasamento de eritrócitos

☐ infiltrado inflamatório (caracterização em +)

☐ linfócitos

☐ histiócitos/macrófagos

☐ plasmócitos

☐ PMN-neutrófilos

☐ leucocitoclasia

☐ eosinófilos

☐ células epitelióides

☐ células gigantes/granuloma

☐ fibras elásticas ☐ contínuas

☐ descontínuas

☐ replicada

3- Histopatologia - ÓRGÃO VISCERAL

Nome:

Nº biópsia:

ÓRGÃO:

1- Vasos afetados:

1.1- Localização – derme: () córion mucosa

() submucosa

() mucosa

() serosa

1.2- Caracterização: () vênula/capilar/arteríola () artéria

1.3- Tamanho/Calibre: - diâmetro: () médio () pequeno

1.4- Alterações no vaso: () tumefação endotelial

() necrose fibrinóide

() extravasamento de eritrócitos

() infiltrado inflamatório (caracterização em +)

() linfócitos

() histiócitos/macrófagos

() plasmócitos

() PMN-neutrófilos

() leucocitoclasia

() eosinófilos

() células epitelióides

() células gigantes/granuloma

() fibras elásticas

() contínuas

() descontínuas

() replicada

4- Histopatologia - ÓRGÃO PARENQUIMATOSO

Nome:

Nº biópsia:

ÓRGÃO:

1- Vasos afetados:

1.1- Caracterização: () vênula/capilar/arteriola () artéria

1.2-Tamanho/Calibre: - diâmetro: () médio () pequeno

1.3- Alterações no vaso: () tumefação endotelial

() necrose fibrinóide

() extravasamento de eritrócitos

() infiltrado inflamatório (caracterização em +)

() linfócitos

() histiócitos/macrófagos

() plasmócitos

() PMN-neutrófilos

() leucocitoclasia

() eosinófilos

() células epitelióides

() células gigantes/granuloma

() fibras elásticas () contínuas

() descontínuas

() replicada