

JULIANA ANDRÉA MANFRINATO

**CO-INFECÇÃO ENTRE CITOMEGALOVÍRUS
(HCMV) E HERPES VÍRUS TIPO 6 (HHV6) EM
RECEPTORES DE TRANSPLANTE RENAL**

CAMPINAS

2005

JULIANA ANDRÉA MANFRINATO

**CO-INFECÇÃO ENTRE CITOMEGALOVÍRUS
(HCMV) E HERPES VÍRUS TIPO 6 (HHV6) EM
RECEPTORES DE TRANSPLANTE RENAL**

*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 em Ciências
Básicas*

ORIENTADORA: Profa. Dra. Marilda Mazzali

CAMPINAS

2005

MANIADA	7/UNICAMP
	M313c
	EX
BO BCI	67734
..	16.123-06
C	<input type="checkbox"/> D <input checked="" type="checkbox"/>
O	11.00
	29-03/06

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

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

b ID: 376638

M313c Manfrinato, Juliana Andréa
 “Co-infecção entre citomegalovírus (HCMV) e Herpes vírus tipo 6 (HHV6) em receptores de transplante renal”. / Juliana Andréa Manfrinato. Campinas, SP : [s.n.], 2005.

Orientador: Marilda Mazzali
 Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Ciências Médicas.

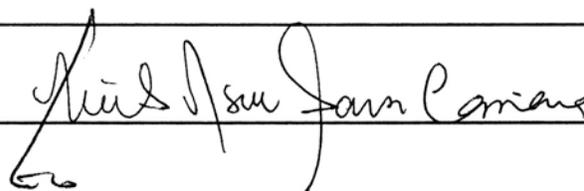
1. Citomegalovirus. 2. Reação em cadeia da polimerase. 3. DNA. 4. Transplante renal. 5. Herpes vírus 6. I. Mazzali, Marilda. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III Título.

(Slm/fcm)

Orientador: Prof^a. Dr^a. Marilda Mazzali

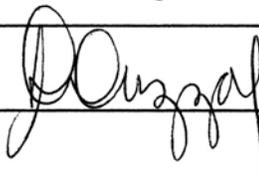
Membros:

1. Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara



2. Prof. Dr. Gentil Alves Filho

3. Prof^a. Dr^a. Marilda Mazzali



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

Data: 29/08/2005

DEDICATÓRIA

À minha mãe, por estar ao meu lado sempre.

*À Prof.a Dra. Marilda Mazzali pela oportunidade
e apoio na realização deste trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus amigos da Graduação, Andrey, Fabiano e Arquimedes que sempre estiveram ao meu lado.

À toda minha família, especialmente meu irmão Sandro pelo apoio.

À Raquel que me trouxe para o Laboratório da Nefrologia e se tornou uma grande amiga.

Aos amigos do Laboratório: Paty, Fernanda, Felipe, Victor, Cristiane, Sohemys, Fabiana, Washington e Adilton pelo apoio e por aceitarem meu jeito mandona.

À enfermagem da Nefrologia: Paulinho, Betinha, Nilvânia e, especialmente a Sandra pela coleta das amostras e apoio em todas as horas deste trabalho.

À Dra. Sandra Costa e à Sandra Bonon que me iniciaram na pesquisa.

À Janaina e à Prof.a. Dra. Laura Ward do Laboratório de Genoma do Câncer que ajudaram a iniciar este trabalho.

À todos os pacientes que aceitaram participar deste estudo.

	<i>Pág.</i>
RESUMO	<i>xxxi</i>
ABSTRACT	<i>xxxv</i>
1 - INTRODUÇÃO	39
1.1 - Histórico	42
1.1.1 - HCMV.....	42
1.1.2 - HHV6.....	44
1.2 - Características Biológicas	45
1.2.1 - HCMV.....	46
1.2.2 - HHV6.....	47
1.3 - Patogênese	47
1.3.1 - HCMV.....	47
1.3.2 - HHV6.....	49
1.4 - Epidemiologia e Transmissão	50
1.4.1 - HCMV.....	50
1.4.2 - HHV6.....	52
1.5 - Manifestações Clínicas	53
1.5.1 - HCMV.....	53
1.5.2 - HHV6.....	55

1.6 - Co-infecção de HCMV e HHV6.....	56
1.7 - Diagnóstico.....	58
1.7.1 - HCMV.....	58
1.7.2 - HHV6.....	59
1.8 - Tratamento.....	60
2 - HIPÓTESE.....	63
3 - OBJETIVOS.....	67
4 - MATERIAL E MÉTODOS.....	71
4.1 - Pacientes.....	73
4.2 - Critérios de Inclusão.....	73
4.3 - Critérios de Exclusão.....	73
4.4 - Correlação Clínica.....	74
4.5 - Imunossupressão Utilizada.....	74
4.6 - Adequação da Terapêutica Imunossupressora.....	75
4.6.1 - Doses dos Medicamentos.....	75
4.6.2 - Ajustes das Doses de Imunossupressores.....	75
4.6.3 - Alterações de Esquema Imunossupressor.....	76
4.7 - Pesquisa de Partículas Virais.....	77
4.7.1 - Amplificação gênica de DNA humano por PCR.....	77
4.7.2 - Amplificação gênica de DNA viral (HCMV) por PCR.....	78
4.7.2.A - Reamplificação do HCMV pela "Nested"-PCR.....	79

4.7.3 - Amplificação gênica de DNA viral (HHV6) por PCR.....	81
4.7.3.A - Região 1 do HHV6.....	81
4.7.3.B - Reamplificação do HHV6-B região 1 pela "Nested"- PCR.....	82
4.7.3.C - Região 2 do HHV6-B.....	83
4.7.3.D - Reamplificação do HHV6-B região 2 -pela "Nested" – PCR.....	84
4.8 - Análise dos Resultados.....	85
5 - RESULTADOS.....	87
5.1 - Características dos Indivíduos Estudados.....	89
5.2 - Status Sorológico para HCMV.....	89
5.3 - PCR para HCMV nos receptores de transplante renal.....	90
5.4 - PCR para HHV6 no pós-transplante renal.....	91
5.5 - Avaliação clínica dos pacientes em relação a PCR para HHV6-B.....	92
5.5.A - Evolução clínica dos pacientes HHV6 positivo.....	93
5.5.B - Evolução clínica nos pacientes HHV6 negativo.....	93
6 - DISCUSSÃO.....	97
7 - CONCLUSÕES.....	105
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
9 - ANEXOS.....	125

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AZA	Azatioprina
β-globina	Beta Globina
°C	Graus Celsius
HCMV	Citomegalovírus Humano
CYA	Ciclosporina
DHPG	Diheroxiproximetil Guanina
DIC	Doença de Inclusão Citomegálica
dl	Decilitros
DNA	Ácido desoxiribonucléico
dNTP	Deoxinucleotídeos trifosfato
EDTA	Ácido Etileno Diaminotetracético
fg	Ficogramas
FK506	Tacrolimus
g	Gramas
gB	Glicoproteína de superfície B
gH	Glicoproteína de superfície H

GNC	Glomerulonefrite Crônica
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HHV1	Herpesvírus Simples 1
HHV2	Herpesvírus Simples 2
HHV3	Herpesvírus Humano tipo 3
HHV4	Herpesvírus Humano tipo 4
HHV6	Herpesvírus Humano tipo 6
HHV6-A	Herpesvírus Humano tipo 6 variante A
HHV6-B	Herpesvírus Humano tipo 6 variante B
HHV7	Herpesvírus Humano tipo 7
HHV8	Herpesvírus Humano tipo 8
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HLA-I	Antígeno Leucocitário Humano de classe I
HLA-II	Antígeno Leucocitário Humano de classe II
IFI	Imunofluorescência Indireta
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
IL-2	Interleucina 2

IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
INF-γ	Interferon gama
IRA	Insuficiência Renal Aguda
IRC	Insuficiência Renal Crônica
IV	Intra Venoso
kb	Kilobase
kg	Kilograma
M	Molar
MHC	Complexo Maior de Histocompatibilidade
MIP-1α	Proteína inflamatória macrófagos 1 alfa
ml	Mililitros
μl	Microlitros
Mm	Milimolar
mM	Micromol
mm³	Milímetro Cúbico
MMF	Micofenolato Mofetil
NESTED-PCR	Dupla Reação em Cadeia da Polimerase
ng	Nanograma

ng/dl	Nanograma por decilitros
NK	Célula Natural Killer
nm	Nanômetro
OKT3	Anticorpo Antilinfocitário T
ORFs	Estrutura de leitura aberta
pb	Pares de Base
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial de Hidrogênio
PNF	Pielonefrite Crônica
RCP	Reatividade Contra Pannel
RIA	Radioimunoensaio - método sorológico
rpm	Rotações por Minuto
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
Tris	Hidroximetil Aminometano

LISTA DE TABELAS

	<i>Pág.</i>
Tabela 1 - Sub famílias de herpes vírus.....	44
Tabela 2 - Características dos indivíduos estudados.....	89
Tabela 3 - Status sorológico (IgG/IgM) para HCMV no pré e pós transplante.	90
Tabela 4 - Distribuição da apresentação clínica dos pacientes com HCMV/PCR positivos.....	90
Tabela 5 - Distribuição da PCR positiva para HHV6 em relação à PCR para HCMV.....	91
Tabela 6 - Distribuição da PCR positiva para HHV6 e HCMV nos pacientes analisados, de acordo com o tempo de coleta da amostra.....	92
Tabela 7 - Comparação entre os pacientes com PCR negativa e positiva para HHV6.....	92
Tabela 8 - Sintomatologia dos pacientes com PCR negativa para HHV6.....	93
Tabela 9 - Manifestações Clínicas nos pacientes com PCR positiva para HHV6-B e HCMV.....	93
Tabela 10 - Necessidade de tratamento para HCMV de acordo com a PCR para HHV6-B.....	94
Tabela 11 - Evolução da creatinina sérica nos diferentes grupos com PCR positiva para HCMV.....	95

LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág.</i>
Figura 1 - Esquema do HCMV.....	46
Figura 2 - Amplificação do fragmento do gene da beta globina humana em gel de agarose 2%.....	78
Figura 3 - Amplificação do fragmento do HCMV em gel de agarose 2%.....	80
Figura 4 - Amplificação do fragmento do HHV6 região 1 em gel de agarose 2%.....	83
Figura 5 - Amplificação do fragmento do HHV6 região 2 em gel de agarose 2%.....	85

LISTA DE GRÁFICOS

	<i>Pág.</i>
Gráfico 1 - PCR positiva para HHV6 e HCMV em relação à amostra.....	91
Gráfico 2 - Evolução da creatinina sérica nos grupos HHV6 positivo e HHV6 negativo.....	95
Gráfico 3 - Evolução da creatinina sérica nos diferentes grupos de acordo com a apresentação clínica do HCMV/HHV6.....	96

RESUMO

Objetivo: Analisar a influência da ocorrência de co-infecção pelo HCMV e HHV6 em receptores de transplante renal. **Metodologia:** Análise retrospectiva de 25 receptores de transplante renal. Os critérios de inclusão foram pacientes com PCR para HCMV negativa por ocasião do transplante e que tornaram-se positivas na evolução (média 44 ± 30 dias pós tx). Foram selecionadas 3 amostras de DNA destes indivíduos (imediatamente pós tx, primeira amostra positiva e uma terceira amostra, em média 30 dias após a amostra positiva), onde foi realizada pesquisa de partículas virais de HHV6, através de “Nested”- PCR. **Resultados:** Por ocasião do transplante (primeira amostra), HHV6 estava presente em 9/30 pacientes (30%), sendo que 11 pacientes apresentaram positividade do HHV6 PCR, persistente ou não. Considerando que alguns autores sugerem que HHV6 ou HHV7 podem agravar o quadro clínico do HCMV, a apresentação clínica da infecção foi avaliada nestes indivíduos. Presença de viremia por HCMV sem sintomatologia clínica ocorreu em 9 indivíduos, leucopenia isolada em 8 e infecção ativa com antigenemia positiva e necessidade de tratamento com Ganciclovir IV em 8. Não houve diferença na incidência de HCMV assintomático ou manifesto apenas através de leucopenia entre os grupos HHV6 positivo e negativo. Entretanto, HCMV com sintomatologia sistêmica, antigenemia positiva e necessidade de tratamento ocorreu apenas nos pacientes que também apresentavam HHV6 positivo (8/20). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nos níveis séricos de creatinina por ocasião da detecção de viremia pelo HCMV. Entretanto, ao final de 1 ano de acompanhamento houve uma tendência à pior função renal no grupo com HHV6+/HCMV+ que naquele HHV6-/HCMV+ , diferença esta que se confirmou após 60 meses de acompanhamento (2.5 ± 0.4 vs. 1.3 ± 0.1 mg/d, HHV6+ vs HHV6 -, $p < 0.05$). Quando os grupos foram divididos de acordo com a necessidade de tratamento para HCMV, não observamos diferença estatística nos níveis séricos de creatinina destes indivíduos. **Conclusão:** Apesar do pequeno número de pacientes avaliados, a ocorrência de co-infecção HHV6 e HCMV esteve associada a uma maior sintomatologia clínica e necessidade de tratamento com Ganciclovir IV. A pior função renal observada no grupo HCMV/HHV6 ao final de 5 anos de acompanhamento pode ser atribuída à maior severidade da infecção viral mas também à redução temporária de imunossupressores pela leucopenia, permitindo a ocorrência de rejeições subclínicas.

ABSTRACT

Aim: To analyze the influence of HCMV - HHV6 co-infection in renal transplant recipients. **Material and Methods:** Retrospective analysis of 25 renal transplant recipients. Inclusion criteria were negative HCMV -PCR at transplantation, that become positive during follow up (mean time, 44 ± 30 days after renal trasnplant). Three samples of DNA from each patient were selected (first post transplant sample, first positive HCMV positive sample and a third one, about 30 days after the positive sample). Viral HHV6 DNA was evaluated by Nested PCR analysis. **Results:** At transplant (first sample) HHV6 DNA was present in 9/30 patients (30%). During follow up, 11 patients presented at least one positive sample for HHV6 PCR, persistent or not. Based on the fact that some reports suggests that both HHV6 and HHV7 can agravate clinical presentation of HCMV infection, medical records from these patients were analyzed. HCMV viremia without symptoms occurred in 9 patients, isolated leukopenia in 8 and simptomatic disease with positive antigenemia and need of antiviral treatment in another 8 patients. There was no difference in the frequence of assymptomatic HCMV or isolated leukopenia between HHV6 positive and negative groups.. However, systemic HCMV with positive antigenemia and IV gancyclovir therapy was observed only in the HHV6 positive group (8/20). No differences in renal function were observed during viremia presentation. However, after 1 year follow up there was a trend to a worse renal function in the HHV6+/HCMV+ group. This worse renal function was confirmed after 60 months follow up, with significant higher creatinine levels in the HHV6 positive group (2.5 ± 0.4 vs. 1.3 ± 0.1 mg/d, HHV6+ vs HHV6 -, $p < 0.05$). When patients were analyzed according to clinical presentation of HCMV/HHV6 viremia, no difference was observed in serum creatinine between non treated and treated patients. **In conclusion,** despite the low number of patients in this series, co infection HHV6/ HCMV was associated with more clinical symptoms, and higher need for anti viral treatment. The worse renal function observed in the HCMV/HHV6 group after 5 years of follow up can be secondary to the more severe HCMV infection, as well as to the temporary adjustment of immunossuppressive treatment, that can be associated to subclinical acute rejection episodes.

1 - INTRODUÇÃO

Infecção é uma das principais causas de morbi-mortalidade após o transplante renal, sendo responsável por cerca de 20% da mortalidade total [FISHMAN et al, 1998]. Infecções por herpes vírus são a causa mais freqüente de infecções virais em transplantados, incluindo o citomegalovirus (HCMV, HHV5), Epstein Barr vírus (HHV4), herpes simplex vírus (HHV1 e HHV2) e varicela zoster (HHV3). Outras infecções virais, como as hepatites B e C, infecções por poliomavirus (cepas JC e BK), adenovirus e papilomavirus também são freqüentes nestas populações [FISHMAN et al, 1998; COLVIN et al, 2001; SMITH et al, 2001]. Com o desenvolvimento de imunossupressores mais potentes, passaram a ocorrer relatos de infecções virais com maior severidade e maior taxa de recorrência [SMITH et al, 2001; SMACK & GREGOR et al, 2003].

Há três formas de infecção viral em receptores de transplantes de órgãos: infecção primária, reativação e reinfeção viral.

- Infecção primária: doadores soropositivos transmitem o vírus para receptores soronegativos, que manifestam a infecção após o transplante, em geral com manifestação sistêmica.
- Reativação da infecção: reativação do vírus latente endógeno, em receptores soropositivos, desencadeada pela imunossupressão.
- Reinfeção: forma de infecção na qual o doador é soropositivo e ocorre contaminação por uma cepa viral diferente, transmitida pelo doador soropositivo. Com a imunossupressão esta nova cepa viral é ativada.

Dentre as infecções virais, o citomegalovirus é o patógeno mais freqüente em transplantados renais. Entretanto, outros beta herpes vírus, como o herpes vírus humano tipo 6 e 7, são menos estudados nesta população.

1.1 - Histórico

1.1.1 - Citomegalovirus Humano (HCMV, HHV5)

O primeiro relato da existência de inclusões citomegálicas ocorreu em 1904, quando Ribbert, a partir dos rins retirados de uma criança natimorta com sífilis congênita, observou a presença de células contendo inclusões intra-nucleares. Posteriormente, Tyzzer (1906) descreveu o mesmo tipo de inclusões celulares em biópsias de lesões cutâneas causadas por varicela. Nesse período houve divergências quanto a origem destas formações celulares incomuns [MURRAY, 1997].

Goodpasture e Talbot, em 1921, descreveram a presença de células citomegálicas em glândulas submaxilares de crianças com infecções diversas, e sugeriram que estas células poderiam ser de origem epitelial, e não causadas por protozoários, como havia sido sugerido anteriormente por Smith & Weidman (1914). Lipschutz, em 1921 suspeitou que a citomegalia seria de etiologia viral, dada a semelhança das alterações histológicas com outras viroses, sendo ele o responsável pela designação do termo Doença de Inclusão Citomegálica (DIC) [ALFORD & BRITT, 1990].

A primeira evidência experimental para dar suporte à etiologia da Doença de Inclusão Citomegálica ocorreu quando Cole e Kutner, em 1926, demonstraram a presença do vírus em células de glândulas submaxilares de cobaias jovens, que adquiriram a infecção após terem recebido uma inoculação de glândulas salivares. Estes pesquisadores sugeriram que o agente infeccioso pertencia ao grupo dos vírus filtráveis, já que o material do inóculo havia sido filtrado, e era espécie-específicos [PLACHTER et al, 1996].

Em 1954, Smith conseguiu isolar o vírus a partir de culturas de tecidos, usando a infecção de glândula salivar de camundongo como modelo experimental. Em 1956/57, o Citomegalovírus humano foi isolado quase que simultaneamente por três pesquisadores: Smith em St. Louis, Rowe em Bethesda e Weller em Boston, todos eles utilizando técnicas de cultura celular em amostras de urina e tecido de crianças com provável infecção causada pelo vírus [COSTA, 1999].

O nome definitivo “Citomegalovirus” foi proposto, em substituição aos termos Doença de Inclusão Citomegálica e Vírus de glândulas salivares, por Weller em 1970, que listou três critérios para a identificação do citomegalovirus:

- a.) Tendência em causar infecção em glândula salivar;
- b.) Crescimento lento, somente em linhagens celulares derivadas de seus hospedeiros naturais e
- c.) Formação de inclusões citoplasmáticas, além das inclusões nucleares

A partir destes estudos, uma linhagem do Citomegalovirus humano (HCMV-cepa AD169), foi adaptada em laboratório por Tamashiro et al. (1982), que realizou sua replicação em culturas de fibroblastos humanos e caracterizou a infecção pela presença de lesões focais constituídas por células gigantes, contendo inclusões intranucleares idênticas àquelas observadas nos materiais precedentes de pacientes [ALFORD & BRITT, 1990].

Tendo como base critérios morfológicos e bioquímicos, o HCMV foi classificado como um herpesvirus. Em 1973, o grupo de Estudos dos Herpesvirus do Comitê Internacional para a Nomenclatura dos Vírus recomendou que fosse dado um número arábico a todos os herpesvirus, e o HCMV ficou classificado como Herpesvirus Humano 5 (HHV5). Em 1979, o mesmo Comitê reabilitou o nome Citomegalovirus.

A família Herpesviridae foi dividida em três sub-famílias: *Alphaherpesvirinae* (herpes simplex tipo 1 e 2, herpes zoster (HHV3)), *Bethaherpesvirinae* (Citomegalovirus, herpes vírus humano 6 e 7) e *Gammaherpesvirinae* (Epstein Barr e Herpesvirus Humano 8) [BROWN & ABERNATHY, 1998; HO, 1991].

Tabela 1 - Sub-famílias dos Herpesvirus

Sub-Famílias	
Alpha herpesvirinae	Herpes simples tipo 1 (HHV 1)
	Herpes simples tipo 2 (HHV2)
	Herpes Zoster (HHV3)
Betha herpesvirinae	Citomegalovirus (HHV 5)
	Herpes vírus humano tipo 6 (HHV6)
	Herpes vírus humano tipo 7 (HHV7)
Gamma herpesvirinae	Epstein Barr (HHV 4)
	Herpes vírus humano tipo 8 (HHV8)

1.1.2 - Herpes Vírus Humano tipo 6 (HHV6)

Em 1910, Zahorsky descreveu a apresentação clínica definitiva do exantema súbito, mas ainda não se conhecia o agente causador da doença. Somente em 1941, em um estudo prospectivo de pacientes com exantema súbito, foi levantada a hipótese de que poderia ser um vírus o agente causador da doença [BREESE, 1941].

Em 1986 o HHV6 foi isolado pela primeira vez a partir de células mononucleares do sangue periférico de adultos com desordens linfoproliferativas, sendo inicialmente chamado de Vírus Humano Linfotrófico B (HBLV) [SALAHUDDIN et al, 1986]. Após análise de microscopia eletrônica e do genoma do HBLV, em 1987, chegou-se a conclusão que este agente pertencia à família dos Herpesvirus, passando a ser denominado de Herpes Vírus Humano Tipo 6 (HHV6) [ABLASHI et al, 1987].

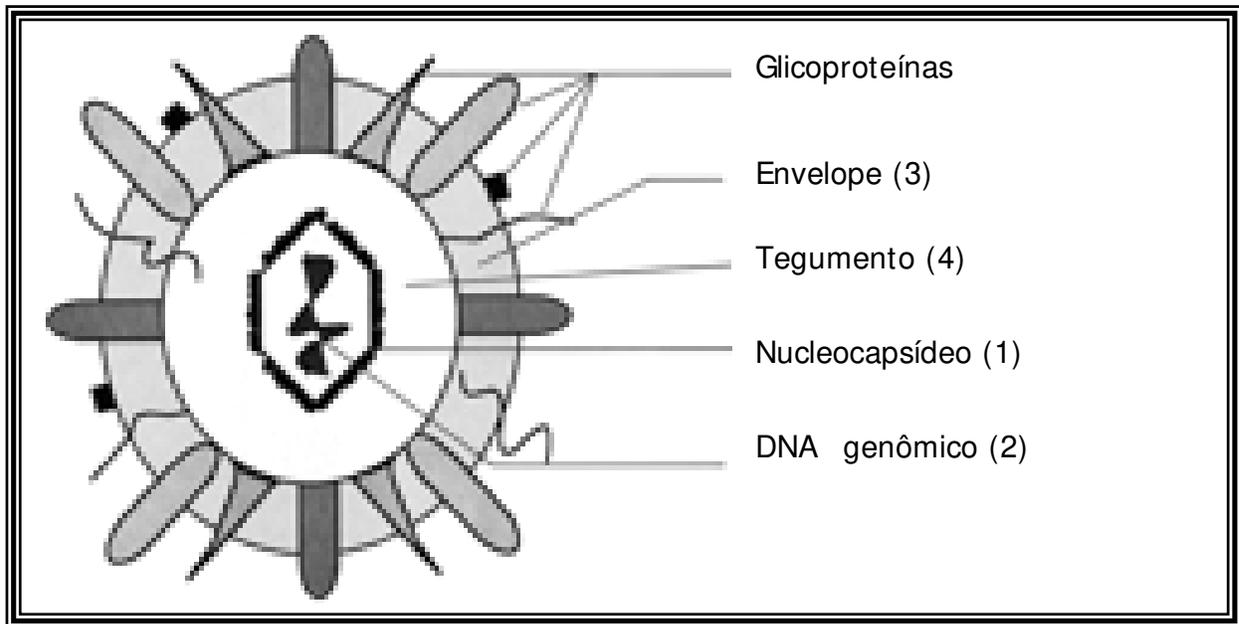
Somente em 1988, Yamanishi et al. isolaram o HHV6 a partir de cultura de células de sangue periférico de crianças com Exantema Súbito, e identificaram o vírus como o agente causador desta doença.

Ablashi et al, em 1993 reconheceram oficialmente duas variantes do HHV6: a variante HHV6-A e HHV6-B, que apresentam características biológicas, imunológicas, epidemiológicas e moleculares bem distintas. O genoma completo das duas variantes só foi determinado em 1995 para a variante A [GOMPLES et al, 1995] e em 1999 para a variante B [DOMINGUES et al, 1999; ISEGAWA et al, 1999].

1.2 - Características Biológicas dos Herpesvirus

O HHV6 e o HCMV são vírus de DNA dupla fita, sendo que o HCMV também possui RNA. O virion do HCMV e do HHV6, assim como o de todos os Herpesvirus, apresenta 4 elementos estruturais principais [BRENNAN, 2001]:

- (1) Um nucleocapsídeo icosaédrico com aproximadamente 100 nm de diâmetro e contendo 162 capsômeros protéicos,
- (2) Uma estrutura proteica eletrodensa contendo o DNA viral, fechada em
- (3) Um envelope derivado da membrana celular e contendo glicoproteínas viral e proteína integral e
- (4) Um tegumento entre o nucleocapsídeo e o envelope (figura 1)



Adaptado de Brenan et al, 2001.

Figura 1 - Esquema do citomegalovírus (HCMV).

1.2.1 - Citomegalovírus (HCMV)

O virion completo do HCMV mede entre 180 e 250nm de diâmetro; possui DNA de dupla hélice com 240 kb [STINSK, 1990; BRENNAN, 2001]. O genoma é extremamente grande, com comprimento estimado de 65-68 nm, e pode ser dividido em dois segmentos, denominados componente longo (L) e curto (S), com possibilidade de sofrerem inversão durante a replicação. Os segmentos estão delimitados por seqüências repetitivas terminais (TR). A junção entre os componentes L e S é composta de seqüências repetitivas internas (IR) e são designadas IR-L e IR-S, quando ligadas aos componentes L e S respectivamente. A seqüência entre as regiões repetidas são únicas (U) e denominadas como U-L e U-S. O HCMV tem maior complexidade genômica do que outros herpesvirus, devido à ocorrência de várias aquisições e duplicações gênicas. Apesar da complexidade do genoma, os bethaherpesvirus mostram dependência pelas células hospedeiras [STINSK, 1990].

1.2.2 - HHV6

O genoma do HHV6 contém 160-162 kb, com uma região central única (U) de 143-144 kb, contendo estruturas de leitura aberta (ORFs) U1-100. O genoma contém 7 regiões de genes conservados em todos os herpesvirus, um grupo de genes descobertos somente nos β -herpesvirus e genes específicos para o gênero Roseolavirus [CLARK, 2000]. Estima-se que o HHV6 possui mais de 100 genes que codificam proteínas [YAMANISHI, 2000].

A transcrição de genes é semelhante ao padrão das herpesviroses, com proteínas expressas imediatamente precoces (IE), precoces (E) e tardias (L) [MIRANDOLA et al, 1998; DOCKRELL, 2003]. O gene U39 está envolvido na replicação do vírus e os genes U39 e U48 contribuem para fusão vírus-célula, através da síntese das glicoproteínas de superfície gB e gH. A gB do HHV6 tem 39% de similaridade com a gB do HCMV, sugerindo uma reatividade imunológica cruzada entre a gB do HHV6 e a gB do HCMV [DOCKRELL, 2003].

O HHV6 possui duas variantes; variante A e B. Apesar das duas variantes possuírem 90% de similaridade em suas seqüências de nucleotídeos, elas apresentam características biológicas, genéticas e imunológicas distintas [ABLASHI et al, 1993; DOCKRELL, 2003].

1.3 - Patogênese

1.3.1 - HCMV

O HCMV pode penetrar em uma variedade de células sem que ocorra a replicação [STINSK, 1990; PLACHTER et al, 1996]. O HCMV compartilha com outros herpesvirus a capacidade de permanecer latente no hospedeiro, disseminar-se célula a célula em presença de anticorpos circulantes, reativar-se em condições de imunossupressão e induzir imunossupressão transitória ao receptor [DRAGO et al, 2000].

Para iniciar a infecção da célula, é necessário que o HCMV seja absorvido pelos receptores de superfície celular da célula hospedeira e haja fusão do envelope viral com a lamela externa da membrana citoplasmática, ou via fagócito. Partículas infecciosas

são detectáveis por microscópio eletrônico no intervalo de 1 a vários dias após a inoculação. Além disto, tanto o DNA viral como proteínas podem ser detectados na célula infectada antes da replicação viral estar completa. As partículas virais são produzidas e reunidas no núcleo e atingem um envelope através da membrana nuclear interna para serem transportadas através da rede do complexo de Golgi, tornando-se patogênicas a partir da clivagem proteolítica do sítio da furina, para formar a glicoproteína B (gB). A furina foi a primeira pro-proteína convertase a ser identificada, está localizada principalmente na rede trans-Golgi e, é capaz de clivar precursores de uma grande variedade de proteínas, incluindo fatores de crescimento, sistema complemento, receptores, exotoxinas bacterianas e glicoproteínas do envelope [BROWN & ABERNATHY, 1998]. A gB é o produto do gene UL55 e é a glicoproteína predominante no envelope do HCMV. No processo de formação do envelope, ocorre a projeção de glicoproteínas virais que constituirão sítios antigênicos para anticorpos neutralizantes, e serão responsáveis pelo estímulo da imunidade humoral e celular do hospedeiro [HO, 1991].

Quando o HCMV entra na célula hospedeira, a imunidade de células T tentam controlar a replicação e, linfócitos T citotóxicos, células T CD4 helper específicas e NK são responsáveis por controlar a infecção [WALTER et al, 1995] . Um complexo e ainda não totalmente elucidado sistema de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão também intervém, sugerindo que, a baixa concentração de proteína inflamatória macrofágos 1- α (MIP-1 α) e a alta concentração de interleucina 8 (IL-8) estão associados ao desenvolvimento de doença pelo HCMV [NORDOY et al, 1999]. A possível importância fisiopatológica dessas descobertas ainda não são claras, visto que a MIP-1 α é quimiotática para monócitos, linfócitos e NK, enquanto que a IL-8 atrai primariamente neutrófilos, além de poder ter um papel atenuante da defesa antiviral, pela redução de interferon [FIEZTE et al, 1994]. O papel de outras citocinas anti-inflamatórias, como interleucina 10 (IL-10) e a pró-inflamatória, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), no desenvolvimento de doença por HCMV ainda não foi definitivamente elucidado [NORDOY et al, 2000].

A infecção por HCMV aumenta a expressão de antígenos MHC na superfície das células do enxerto através da indução de liberação de mediadores como interferon, podendo ativar células T citotóxicas que seriam o "gatilho" para rejeição aguda, em associação com estimulação de aloantígenos concorrentes [CAINELLI & VENTO, 2002].

1.3.2 - HHV6

A replicação do HHV6 ocorre, *in vivo*, em linfócitos T-CD4, e as variantes HHV6-A e HHV6-B diferem na habilidade de se replicar em linfócitos T específicos. O vírus tem tropismo também por células T-CD8, Natural Killer (NK) e células T (gama e delta), podendo também infectar macrófagos, astrócitos e fibroblastos [ABLASHI et al, 1987].

O HHV6 bloqueia a diferenciação de macrófagos dos progenitores de medula óssea e diminuem, *in vitro*, a formação de colônias de granulócitos/macrófagos e progenitores eritróides [ASADA et al, 1999]. Ambas as variantes infectam astrócitos fetais primários *in vitro* [HE et al, 1996]. O CD46 foi identificado, por Santoro et al. (1999), como o receptor celular para o HHV6. O CD46 é uma glicoproteína tipo 1, membro da família de reguladores da ativação do complemento. Algumas linhagens de células T, apesar de expressarem CD46, são incapazes de ajudar na replicação do HHV6-A, sugerindo existência de um co-fator [SANTORO et al, 1999].

O mecanismo patogênico do HHV6 é pouco explorado [GENTILE, 2000]. Sabe-se que infectam células mononucleares e, o aumento de sua replicação induz o aumento da produção de interferon alfa (INF- α) [KIKUTA et al, 1990], interleucina-1B (IL-1B) e TNF- α [FLAMAND et al, 1991]. Em adição, infecção por HHV6 em células mononucleares de sangue periférico resulta em supressão da função de linfócito T, demonstrado pela redução da síntese de Interleucina 2 (IL-2) e de proliferação celular [FLAMAND et al, 1995].

O HHV6 induz um sinal de efeito citopático em células T (CD4 e CD8, e células T gama e delta) e células NK [LUSSO & GALLO, 1995] sugerindo que isto possa causar imunossupressão pela infectividade, destruindo células T ou seus precursores. Recentemente, o HHV6 tem sido associado com imunodeficiência severa e progressiva em HIV [KNOX et al, 1995], além de um potencial co-fator na progressão da AIDS [LUSSO & GALLO, 1995].

1.4 - Epidemiologia e Transmissão

1.4.1 - HCMV

A infecção pelo HCMV é freqüente na maioria da população, infectando 0,5 a 1% de todos os recém-nascidos e cerca de 50% da população adulta de países desenvolvidos. Estudos soro-epidemiológicos demonstraram que a infecção ocorre praticamente em todas as regiões do mundo e, a prevalência de anticorpos aumenta com a idade, atingindo níveis máximos após 25 anos. Estudos correlacionando idade e prevalência da infecção sugerem aumento da infecção no período peri-natal e na maturidade sexual [HO et al., 1990].

Estes estudos também sugerem uma relação entre a prevalência de anticorpos numa determinada população adulta e seu nível sócio-econômico [MUSTAFA, 1994; BROWN & ABERNATH, 1998].

O índice endêmico da infecção pelo HCMV varia conforme a região geográfica, sendo ao redor de 50% na América do Norte e Europa (variação de 40 a 80%), enquanto que no Japão e em alguns países da América do Sul ou África estes índices estão próximos de 100% [HO, 1991]. No Brasil, a soroprevalência atinge mais de 90% na população adulta [SUASSUNA, LEITE & VILELA, 1995; CAMARGO et al., 1996; COSTA et al., 1999; AQUINO & FIGUEIREDO, 2001].

Apesar da alta prevalência, o risco de aumento de infecção pelo HCMV ocorre em presença de quadros de imunossupressão, como por exemplo no transplante de órgãos. O HCMV pode ser transmitido por várias vias, entre as quais se destacam:

- (a) Transfusional, através de sangue ou seus derivados, na maioria dos casos assintomáticos (90%) [BOWDEN, 1991]
- (b) Via materno fetal
 - a) transmissão transplacentária, geralmente em mulheres com primoinfecção durante a gestação (sintomática de 8-10% das crianças)

- b) transmissão pelo canal do parto, que ocorre em gestantes soropositivas para HCMV ,e raramente é sintomática
- c) transmissão pós parto: 27% das mulheres soropositivas para HCMV excretam o vírus no leite materno, porém nem todos os recém-nascidos apresentam manifestações clínicas [MAYA & AZULAY, 2000]
- (c) Via contacto sexual, já que tanto o cérvix uterino quanto o sêmen humano são reservatórios do vírus [BRUGEMMAN, 1993]
- (d) Via órgão transplantado, onde o vírus geralmente encontra-se em fase de latência no órgão transplantado.

Nos receptores de transplantes de órgãos, a infecção pelo HCMV pode apresentar-se sob três formas distintas [HO et al, 1975]

- (a) Infecção primária: doadores soropositivos transmitem o HCMV para receptores soronegativos, que manifestam a infecção após o transplante, geralmente com comprometimento sistêmico.
- (b) Reativação da infecção: reativação do vírus latente endógeno, em receptores soropositivos, desencadeada pela imunossupressão.
- (c) Reinfecção: forma de infecção por HCMV na qual receptor é soropositivo, e ocorre contaminação por uma cepa viral diferente, transmitida pelo doador, também soropositivo. Com a imunossupressão esta nova cepa viral é ativada. [SCHIMIDT et al, 1996].

A incidência de doença sintomática é diferente para as três formas de infecção por HCMV, sendo mais freqüente nas infecções primárias (cerca de 40% a 60% dos casos), seguida pela re-infecção (40% dos casos) e rara nas reativações (20% dos casos) [HIBBERD et al, 1995; COSTA, 1999].

1.4.2 - HHV6

A infecção por HHV6 é onipresente nos primeiros 2 anos de vida. A incidência de "pico" de infecção varia de 6-9 meses [CASERTA et al, 2001]. Estudos soropidemiológicos sugerem que mais de 90% dos adultos são soropositivos para a infecção pelo HHV6 [SAXINGER et al., 1988; LEVY et al., 1990]. A infecção ocorre em todo mundo, sem restrição geográfica [OKUNO et al., 1989; KRUEGER et al., 1998]. Pode ocorrer queda dos títulos de IgG com o passar dos anos, gerando a falsa impressão de infecção primária em grupos de idosos [BROW et al, 1988]. Estudos de soroprevalência proporcionam poucos dados de infecção variante específica [DOCKREL, 2003].

Não se sabe ao certo o modo de transmissão, mas o HHV6 está presente tanto na saliva como nas células epiteliais de cavidade oral, sugerindo que a secreção oral contribui para a transmissão, especialmente do sub grupo HHV6-B [LEVY et al, 1990; CLARK, 2000]. A análise de cepas de HHV6 isolado de mães e filhos sugerem que este tipo de transmissão possa ocorrer [VAN LOON et al, 1995].

Evidências sugerem que possa ocorrer transmissão do HHV6 através do doador. Um estudo realizado no Japão [YOSHIDA et al., 1992] documentou a transmissão do vírus através do órgão transplantado. A latência *in vivo* no rim também pode acontecer [SINGH & CARRIGAN, 1996]. Outras vias de contaminação ainda não apresentam evidências convincentes [DOCKREL, 2003].

A reativação do HHV6 tem sido descrita em presença de estados de imunossupressão, como após transplante de órgãos e em indivíduos com AIDS. Parece também estar associada à ocorrência de esclerose múltipla, síndrome da fadiga crônica e hipersensibilidade a medicamentos [YAMANISHI, 2000], além de apresentar manifestações clínicas em pacientes com desordens neoplásicas e doenças do colágeno [BRAUN et al, 1997].

A incidência de infecção HHV6 pós-transplante varia de acordo com o tipo de transplante, sendo mais freqüente em receptores de medula óssea (48%, variação de 28 a 75%), e incidindo em cerca de 32% (0-82%) dos receptores de órgãos sólidos [DOCKREL et al, 2001].

Em indivíduos imunocompetentes, como no caso de crianças com exantema súbito, a viremia pelo HHV6 é geralmente de curta duração, de aproximadamente quatro dias. Viremia prolongada, persistindo por até 1 mês, tem sido relatada apenas em receptores de transplantes [FRENKEL et al, 1994].

Estudos prospectivos detectaram DNA de HHV6 pelas técnicas de PCR ou de cultura viral em amostras seqüenciais de pacientes após o transplante, demonstrando uma forte evidência de infecção por HHV6 [DOCKREL, 2003], sendo a maioria pelo HHV6-B [GRIFFHTS et al, 2000].

Pacientes com transplante de órgãos recebem altas doses de medicamentos imunossupressores, aumentando o risco de infecções por Herpesvirus. Assim, a associação de HHV6 e a apresentação clínica pós-transplante é complicado por vários fatores, como a alta soroprevalência de HHV6, a presença de outros herpesvirus oportunistas concomitantes e a escassez de estudos com uma amostragem grande [GENTILE, 2000].

1.5 - Manifestações Clínicas

1.5.1 - HCMV

A infecção pelo HCMV em pacientes imunocompetentes costuma ser assintomática ou apresentar quadro clínico discreto. Contudo, em pacientes imunossuprimidos, as manifestações clínicas são graves, podendo levar ao óbito [ZAIA et al, 1995; COSTA, 1999].

A infecção por HCMV é subclínica na grande maioria dos casos. Quando é sintomática, nos adultos imunocompetentes, o quadro clínico assemelha-se à “Síndrome da Mononucleose”, caracterizada pelo aparecimento de febre, anorexia, mialgia e artralgia [SCHULMAN et al, 1991; CAPULONG, MENDONÇA & CHAVEZ, 1998].

Em pacientes imunossuprimidos, o HCMV pode provocar doença grave, e os grupos de maior risco são crianças com infecção congênita, receptores de transplante de órgãos, pacientes com câncer submetidos a quimioterapia e os portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) [COSTA, 1999; MAYA & AZULAY 2000].

Clinicamente a doença causada pelo HCMV se expressa por febre, mal estar, mialgia, leucopenia (contagem de leucócitos inferior a $4.0000/\text{mm}^3$), aumento das transaminases (hepatite), comprometimento pulmonar (pneumonite) e/ou gastrointestinal (colite, gastrite, esofagite) [GRIFFITHS, 1990]. A febre é a manifestação mais freqüente, podendo ocorrer em 100% dos casos e sendo a única manifestação clínica observada em 30% dos casos [LJUNGMAN & PLOTKIN 1995]. Doenças neurológicas com sintomatologia compatível com quadro de encefalite, mielite ou doença difusa no sistema nervoso central, assim como a detecção do HCMV em líquido cefalorraquidiano são manifestações mais raras [LJUNGMAN & PLOTKIN, 1995]. Coriorretinite, com lesões oftálmicas típicas, com ou sem provas virológicas são consideradas manifestações tardias da infecção por HCMV. O acometimento ocular, quando ocorre, é evidenciado por um infiltrado perivascular de caráter granuloso, com vários graus de exudatos e hemorragia retiniana, que pode progredir, acometendo a mácula [LJUNGMAN & PLOTKIN, 1995; HIBBERD & SNYDMAN, 1995].

O uso de medicamentos imunossupressores tem contribuído para o aumento da ocorrência de infecção pelo HCMV, podendo levar ao aumento de morbi-mortalidade em pacientes transplantados. O risco da infecção pode estar relacionado com o estado sorológico do doador e do receptor antes do transplante [JONG et al, 1998].

A doença causada pelo HCMV pode variar conforme seu padrão epidemiológico (infecção primária ou infecção secundária, por reativação ou reinfeção). A infecção primária é geralmente mais grave, e freqüentemente sintomática (cerca de 40-60% dos casos) [HIBBERD & SNYDMAN, 1995 E COSTA, 1999]. Em transplantados renais, 80-90% dos casos de infecção ocorrem a partir do órgão transplantado de doador soropositivo para HCMV; 10-20% a infecção é devido a derivados de sangue de doadores soropositivos para HCMV [RUBIN, 1990]. A incidência de doença sintomática nos casos de reativação é menor que 20% e, na reinfeção, 40% dos pacientes apresentam manifestações clínicas [HIBBERD & SNYDMAN, 1995; Costa, 1999].

Muitas evidências sugerem que o HCMV é um fator de risco para rejeição aguda, correlacionando-o com uma menor sobrevida do enxerto renal em longo prazo, especialmente nos pacientes que fazem uso de imunossupressão com globulinas

anti-linfócitos T [POUTEIL-NOBLE et al, 1993; LOWANCE, et al, 1999]. As citocinas produzidas em resposta à infecção viral favorecem a expressão dos antígenos maiores de histocompatibilidade de classe I e II, nas células infectadas, e conseqüentemente um aumento da resposta citotóxica de linfócitos [SCHROEDER et al, 1999; PELLEGRIN et al, 2000].

O HCMV pode causar uma disfunção reversível do enxerto caracterizada pela elevação dos níveis séricos de creatinina, que geralmente regridem após o controle do processo infeccioso [SANTOS, QUADROS E FILHO, 2000].

1.5.2 - HHV6

A infecção primária pelo HHV6 ocorre exclusivamente em crianças no primeiro ano de vida e estudos sorológicos indicam que, após os 12 meses de vida, mais de 90% das crianças imunocompetentes já foram infectadas com HHV6 [LEACH et al, 1992]. A maioria das infecções é assintomática, mas 20% das crianças apresentam febre, associada a erupções cutânea (*Roseala infantum* ou exantema súbito), abscessos e outras manifestações clínicas [BRAUN et al, 1997].

Em crianças com infecção primária, anticorpos anti-HHV6 são detectados no período de 3-7 dias [DOCKREL et al, 1999]. Ocorre produção de IgM na segunda semana após a infecção e o pico se mantém por 2 meses [DOCKREL, 2003]. Anticorpos IgG aumentam por 2 semanas pós infecção e são detectados por toda a vida em 90% ou mais dos adultos [YAMANISHI et al, 1988, DOCKREL et al, 1999].

A imunidade mediada por células contra o HHV6 é um elemento crítico de defesa do hospedeiro. Análises de resposta proliferativa e produção de IFN- γ pelos clones de linfócito T em resposta ao vírus confirmam que, a maioria dos clones reativados respondem a antígenos de HHV6 específicos e não comuns a todas as β -herperviroses [YASUKAWA et al, 1993]. Indivíduos com alterações em células NK são suscetíveis a infecção por herpesvírus. A infecção por HHV6 de células NK resulta em maior produção de interleucina 15 (IL-15), que tanto aumenta a destruição de HHV6 mediada por células NK quanto estimula a produção de INF- γ de linfócito T CD4 e células NK [FLAMAND et al, 1996; GOSSELIN et al, 1999].

Após a infecção primária, o vírus replica nas glândulas salivares e está presente na saliva. Ele permanece latente nos monócitos/macrófagos [KANDO et al, 1991], persistindo em uma variedade de tecidos como pele, pulmão e cérebro [CAMPADELLI et al, 1999].

O HHV6 é uma causa importante para supressão idiopática da medula após transplante de medula óssea [CARRIGAN & KNOX, 1992; DROBYSKI et al, 1993], e foi isolado em cultura de sangue de 38% dos receptores adultos de transplante de medula óssea [DROBYSKI et al, 1993].

Febres inexplicadas com profunda trombocitopenia após transplante de fígado [SINGH et al, 1995] e leucopenia severa após transplante de rim estão sendo associados a infecção por HHV6 [MORRIS et al, 1989], assim como pneumonites intersticiais em receptores de transplante de medula óssea [CARRIGAN et al, 1991].

Encefalites por HHV6 são bem documentadas em indivíduos não transplantados [MC CULLERS et al, 1996] e o HHV6 tem sido detectado em fluido cerebrospinal de crianças com exantema súbito [YOSHIKAWA et al, 1992]

1.6 - Co-infecção de HCMV e HHV6

Estudos soroepidemiológicos em grupos de doador e receptor soropositivos (D+/R+) para HCMV, tem sugerido que a co-infecção com Herpes vírus humano tipo 6 (HHV6) representa um fator de risco adicional para o desenvolvimento da doença por HCMV, na ausência de outros fatores de risco [JONG et al, 1998].

O Herpes Vírus Humano 6 (HHV6) vem merecendo destaque nos últimos anos, porque alguns estudos têm demonstrado sua interação com o HCMV [GENTILE, 2000; DESJARDIN et al, 1998; RATNAMOHAN et al, 1998 e HERBEIN et al, 1996], sugerindo que o HHV6 potencializaria a infecção por HCMV.

Em 1990, Okumo et al examinaram a relevância clínica de HHV6 em transplante renal. Dos 21 receptores de rim estudados, 8 apresentaram aumento nos títulos de anticorpo para HHV6 e o vírus foi isolado em sangue periférico de 2 pacientes, ambos com rejeição severa. Após o diagnóstico de rejeição, houve aumento das doses de medicamentos imunossupressores, com aumento da virulência do HHV6.

Em 1992, Yoshikawa et al. estudaram prospectivamente 65 receptores de transplante renal e seus doadores, e mostraram que o HHV6 foi ativado em 55% dos pacientes durante os 3 meses pós-transplante, além de demonstrar latência em tecido renal. O estudo não correlacionou infecção por HHV6 e rejeição ou profilaxia anti-rejeição.

Estudos de apresentação temporal demonstraram que o HHV6 geralmente se manifesta de 2 a 4 semanas pós-transplante e precede o HCMV, cuja manifestação ocorre habitualmente entre 6 a 12 semanas pós-transplante [HERBEIN et al, 1996].

O HHV6 pode predispor o receptor de transplante para infecções oportunistas juntamente com o HCMV [DESJARDIN et al, 1998; RATNAMOHAN et al, 1998; DOCKRELL et al, 1997 e HERBEIN et al, 1996] ou outras infecções similares [DOCKRELL et al, 1999]. Uma potencial interação entre HHV6 e HCMV tem sido reportada, e a co-infecção pode ter severas manifestações clínicas como pneumonia, doenças gastrointestinais (incluindo esofagites), hepatites, trombocitopenia, neutropenia e retinite [DESJARDIN et al, 1998; RATNAMOHAN et al, 1998; DOCKRELL et al, 1997 e HERBEIN et al, 1996].

Em 1996, Herbein et al. realizaram um estudo longitudinal baseado no isolamento do HHV6 e HCMV. Trinta e dois pacientes transplantados de rim, fígado e fígado-rim foram acompanhados durante 3 meses. Apesar dos pacientes apresentarem infecção primária ou reativação do HHV6, manifestações clínicas graves só foram observadas em pacientes que tiveram infecção concomitante pelo HCMV. Nenhuma correlação foi observada entre rejeição e infecção pelo HHV6.

Desjardin et al. (1998), estudando de forma retrospectiva amostras de soro de 53 pacientes para anticorpos anti-HHV6, observaram que a reativação de infecção pelo HHV6 foi associada com infecção primária de HCMV e síndromes (febre inexplicada por 3 dias em associação com pneumonites, leucopenia, trombocitopenia, aumento de transaminases ou linfócitose atípicas) em transplantados renais.

A alta frequência de infecção ativa de HHV6 e associação temporal com eventos clínicos após o transplante não são suficientes para estabelecer uma causa, ligando infecção pelo HHV6 e doença. No momento é possível somente dizer que HHV6 é um patógeno oportunista e pode ser considerado como uma causa potencial para doença em pacientes transplantados [GENTILE, 2000].

1.7 - Diagnóstico

1.7.1 - HCMV

A infecção por HCMV é muito difícil de ser diagnosticada pelo exame clínico e depende de confirmação laboratorial, que demonstre o vírus, seus componentes ou a presença de anticorpos específicos. O objetivo das técnicas de diagnóstico é diferenciar a infecção pelo HCMV de outras viroses oportunistas ou de rejeição, monitorar o uso das drogas antivirais e fornecer uma ferramenta para o estudo da interação entre o vírus e o sistema imune. O diagnóstico precoce da infecção ativa pelo HCMV é importante, já que estudos recentes demonstraram que o tratamento precoce reduz efetivamente a morbi-mortalidade deste agente em transplantados renais [GOODRICH et al, 1991; JONG et al, 1998].

Existem diversos métodos para a identificação da infecção causada por HCMV:

1. Citológicos: pesquisa de células esfoliadas no material examinado; método com baixa sensibilidade e especificidade [SUASSUNA & MACHADO, 1992]
2. Histopatológicos: visualização das células com inclusões virais; método com baixa sensibilidade, mas que evidencia a doença tecidual invasiva [SUASSUNA & MACHADO, 1992; MAYA & AZULAY, 2000]
3. Isolamento do vírus: (a) cultura clássica: inoculação do material suspeito em cultura de fibroblastos humanos; método complexo e demorado [CHOU, 1990 E HO, 1991] e (b) cultura com isolamento rápido: após inoculação da amostra na cultura de tecido é realizada uma imunofluorescência direta ou indireta para detectar o antígeno viral; método mais sensível e mais rápido que a cultura clássica [HALSWORTH, 1990]

4. Sorológicos: (a) Imunofluorescência indireta (IFI); (b) Imunoensaio de ligação (Radioimunoensaio RIA e Imunoensaio Enzimático ELISA); (c) teste de avidéz de anticorpos. Os testes sorológicos possuem alta especificidade, mas baixa sensibilidade [LUTZ, WARD & GRAY, 1995]
5. Detecção de antígenos virais: a antigenemia é baseada na detecção imunocitoquímica direta de proteínas da matriz viral (pp65) em leucócitos de sangue periférico. O método facilmente quantificado permite a estimativa da carga viral, mas tem como desvantagem o curto prazo de processamento da amostra (até 8 horas após coleta). Além disso, em indivíduos neutropênicos o exame é dificultado pela baixa contagem de granulócitos [BOECCHK & BOIVIN, 1998]
6. Detecção de ácidos nucléicos: a reação em cadeia da polimerase (PCR) consiste na amplificação de um fragmento específico de DNA viral, é um método rápido (4-6 horas), específico e extremamente sensível [THE et al, 1990], sendo um indicador precoce da infecção por HCMV e considerada mais sensível que a cultura de células [EINSELE et al, 1991]. O principal problema deste método são os falsos positivos resultantes da contaminação do teste e os resultados falso-negativos que podem ser causados pela variabilidade genética das cepas do HCMV ou pela presença de reagentes inibidores da PCR na amostra [THE et al, 1992].

Embora o HCMV possa ser encontrado em diferentes materiais, a presença do vírus no sangue tem a melhor correlação com a infecção clinicamente significativa possibilitando o início da terapia antiviral. [COSTA, 1990 E GOOSENS et al, 2000].

1.7.2 - HHV6

Técnicas para detectar o HHV6 têm sido desenvolvidas através da detecção de antígenos, ácidos nucléicos e também utilizando anticorpos contra o vírus [BRAUN, 1997].

Os títulos sorológicos de HHV6 são úteis somente para detectar infecção latente ou avaliação da soroprevalência da população em geral, mas a interpretação dos resultados é complicada, devido à alta soroprevalência do vírus [DOCKREL et al, 1999; DESJARDIN, 1998; RATNMOHAN, 1998; HERBEIN, 1996; YOSHIKAWA, 1992].

Os antígenos do HHV6 podem ser detectados através de anticorpos monoclonais, com proteínas comum para ambas as variantes, ou proteínas específicas (por exemplo: anticorpo monoclonal contra proteína estrutural p101 para variante B e gp82 para a variante A) que são detectadas em células infectadas pelo HHV6 [GENTILE, 2000]. Culturas de células podem ser usadas para isolar o HHV6, mas este método pode demorar até 3 semanas [GENTILLE, 2000].

A infecção latente pelo HHV6 é freqüente na população e, devido a isso, o valor da PCR realizada a partir de células de sangue ou de tecidos para detectar a infecção ativa é controversa [CARRIGAN, 1995]. Mesmo assim, a detecção da seqüência viral do HHV6 pela PCR também é uma ferramenta para o diagnóstico [GENTILE, 2000].

1.8 - Tratamento

Existem algumas alternativas para se evitar a ocorrência da doença por HCMV em um grupo de risco. A primeira é a terapia profilática, administrando antiviral a todos os pacientes soropositivos. Esta estratégia é baseada na hipótese de que toda a população está em risco substancial de infecção e merece tratamento preventivo. Outra possibilidade é o tratamento profilático apenas dos pacientes de maior risco, como receptores soronegativos e doadores soropositivos ou naqueles receptores positivos submetidos ao uso de globulinas antilinfocitárias para indução de imunossupressão. O tratamento preemptivo baseia-se no acompanhamento destes receptores soropositivos com pesquisa de antígenos virais, sendo o tratamento indicado apenas quando da ocorrência de infecção ativa.

O tratamento preconizado, tanto para o HCMV como para o HHV6 é o Ganciclovir (diheroxiproximetil guanina DHPG) [GRIFFTHS, 1990], primeiro medicamento antiviral efetivo no tratamento da doença por HCMV em humanos

[SCHIMDT, 1991; FLECHNER, 1998]. O Ganciclovir é um análogo da guanina, tem potente atividade contra o HCMV, inibindo competitivamente a DNA polimerase viral ao se incorporar ao DNA do vírus, promovendo término da duplicação do DNA e com isso, o da replicação viral [CRUMPACKER, 1996]. O Ganciclovir inibe apenas a replicação do vírus, mas os vírus latentes não são eliminados. Assim, o HCMV não é removido do organismo, podendo ocorrer reativações mesmo após tratamento [SMITH et al, 1997]. O Ganciclovir é ativo contra ambas as variantes HHV6-A e HHV6-B, embora seja 50% mais efetivo para o HHV6-B [SINGH, 2000]. Outros agentes antivirais, como foscarnet e cidofovir são ativos contra HHV6 *in vitro* [YOSHIDA 1998], sendo que o último apresenta a melhor atividade inibidora. O aciclovir, *in vitro*, é inativo contra o HHV6 [SINGH & CARRIGAN, 1996; YOSHIDA, 1998].

Como em outros tratamentos de agentes infecciosos, existe o risco de selecionar cepas de HCMV resistentes. A resistência para o Ganciclovir foi relatada primariamente em 1990, em pacientes com AIDS, e é nesta população que a resistência têm sido mais freqüente (VAN LOON et al, 1995; DOCKREL, 2003). Muitas das resistências relatadas estão associadas com a mutação específica do gene UL 97 (fototransferase) e UL 54 (DNA polimerase) [VAN LOON et al, 1995]. Não há relatos na literatura sobre resistência e/ou mutações ocorridas com o HHV6 e o tratamento.

2 - HIPÓTESE

A co-infecção pelo HHV6 potencializaria a apresentação clínica da infecção pelo citomegalovírus em receptores de transplante renal.

3 - OBJETIVOS

Geral:

Analisar a prevalência da infecção pelo herpes vírus humano tipo 6 (HHV6) em receptores de transplante renal.

Específicos:

Correlacionar a gravidade da infecção pelo HCMV com:

- (a) Co-infecção pelo HHV6
- (b) Imunossupressão utilizada
- (c) Evolução clínica.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Pacientes

Foram incluídos neste estudo 25 indivíduos adultos submetidos ao transplante renal entre Junho de 1999 e Agosto de 2000, e que participaram originariamente de um estudo prospectivo que diagnosticava e monitorava a infecção por Citomegalovírus em transplantados renais por meio das técnicas de "Nested"-PCR e Antigenemia [FIORAVANTI, 2001]. No estudo original foram avaliados 48 pacientes, dos quais apenas 25 preenchiam os critérios de inclusão do presente estudo. O estudo original e o presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCM/Unicamp.

4.2 - Critérios de inclusão

1. Receptores de transplante renal entre junho de 1999 e agosto de 2000
2. Termo de consentimento assinado
3. Acompanhamento mínimo após o transplante de 4 meses
4. Receptores adultos (> 18 anos)
5. Mínimo de três coletas de sangue passíveis de análise;
6. Primeira amostra negativa para HCMV (PCR).
7. Segunda amostra positiva para HCMV (PCR)

4.3 - Critérios de Exclusão

1. Pacientes submetidos ao transplante renal fora do período estabelecido
2. Pacientes com acompanhamento após o transplante inferior a três meses;
3. Pacientes pediátricos
4. Primeira amostra positiva para HCMV (PCR);
5. Número insuficiente de amostras para análise e/ou material inadequado para análise

4.4 - Correlação Clínica

Através da revisão dos prontuários médicos foram coletadas informações sobre: doença primária, tipo de doador, imunossupressão inicial, indução de imunossupressão, episódios de rejeição aguda e tratamento, parâmetros laboratoriais (creatinina sérica, hemograma, nível sanguíneo de imunossuppressores, enzimas hepáticas e urina I) e parâmetros clínicos (pressão arterial, sintomas clínicos possivelmente associados a infecção viral), que fazem parte da rotina de acompanhamento ambulatorial dos pacientes transplantados renais.

4.5 - Imunossupressão Utilizada

Os pacientes foram incluídos em diferentes protocolos de imunossupressão, a saber:

- Receptores de rim de doador vivo relacionado HLA idêntico (HLA I): Imunossupressão inicial com inibidor da síntese de purinas (micofenolato mofetil ou azatioprina) e corticosteróide (metilprednisolona e/ou prednisona).
- Receptores de rim de doador vivo relacionado haploidênticos (HLA II) ou doador cadáver: Imunossupressão inicial com associação de inibidores de calcineurina (tacrolimus ou ciclosporina), inibidores da síntese de purinas (micofenolato mofetil ou azatioprina) e corticosteróide (metilprednisolona e/ou prednisona).
- Pacientes com reatividade contra painel (RCP) maior que 10% e menor que 30% : Terapia de indução com basiliximab (Simulect).
- Pacientes com RCP maior que 30%: Terapia de indução com OKT3.

4.6 - Adequação da terapêutica imunossupressora

4.6.1 - Doses dos medicamentos

Os imunossupressores foram utilizados nas seguintes dosagens:

- Ciclosporina microemulsão (Neoral): 7 a 10mg/Kg/dia, via oral, dividido em duas doses.
- Tacrolimus: 0,2mg/Kg/dia, via oral, dividido em duas doses.
- Azatioprina: 2mg/Kg/dia, via oral, em dose única diária.
- Micofenolato mofetil (MMF): 2,0g a 3,0g/dia, via oral, dividido em duas doses.
- Metilprednisolona: 500mg IV no dia do transplante, antes da anastomose vascular do enxerto.
- Prednisona: 2mg/Kg/dia a partir do primeiro pós-operatório. A dose foi reduzida gradualmente 10mg/dia, até atingir 30mg/dia, mantendo esta dose até o final do 1º mês após o transplante. Redução gradual ocorreu até obtenção de 10mg/dia no final do 3º mês após o transplante.
- Basiliximab: 20mg IV no dia do transplante, antes da anastomose vascular e uma segunda dose no 4º dia do pós operatório.
- OKT3: 5mg/dia IV, durante 10 dias.

4.6.2 - Ajuste das doses dos imunossupressores

- Inibidores da síntese de purinas: As doses de azatioprina e MMF foram modificadas de acordo com o número de leucócitos no sangue, com redução de 50% da dose quando número de leucócitos menor que 5000/ mm³ e suspensão com contagem inferior a 3.000 leucócitos/mm³. A dose de

azatioprina também foi ajustada em presença de hepatotoxicidade, caracterizada por elevação de transaminases e de gama glutamil transferase. A dose de Micofenolato Mofetil foi ajustada na presença de alterações gastrointestinais (diarréia ou intolerância gástrica).

- Inibidores de calcineurina: A monitorização das doses de ciclosporina e tacrolimus (FK506) foi baseada nos níveis sanguíneos dos medicamentos. Os níveis sanguíneos de ciclosporina foram mantidos entre 100 e 200 ng/dl (radioimunoensaio monoclonal). O nível sanguíneo de FK506 foi mantido entre 10 a 15ng/dl no 1º mês, de 8 a 10ng/dl do 2º ao 3º mês e em torno de 5ng/dl após o 3º mês pós transplante. As coletas foram realizadas em jejum, após 12 horas da última dose do medicamento.

4.6.3 - Alterações de esquema imunossupressor

- Inibidores de síntese de purinas:

Conversão de azatioprina para MMF: Realizada em presença de hepatotoxicidade ou naqueles pacientes onde a associação azatioprina e alopurinol cursou com depleção medular.

Conversão MMF para azatioprina: Em casos de intolerância do trato gastrointestinal severa, mesmo com doses reduzidas de MMF ou em presença de emagrecimento.

- Inibidores de calcineurina:

Conversão de ciclosporina para tacrolimus: Quando na ocorrência de fenômenos estéticos (hirsutismo, hipertricose), metabólicos (dislipidemia severa) ou nefrotoxicidade comprovada.

Conversão de tacrolimus para ciclosporina: Nos casos de diabetes pós-transplante ou fenômenos de toxicidade do SNC.

4.7 - Pesquisa de partículas virais

O método utilizado para detectar a presença de HCMV e de HHV6 variante B (HHV6-B) foi a "Nested"-PCR realizada à partir do DNA de sangue periférico armazenado em freezer -20°C, desde o início do estudo.

4.7.1 - Amplificação Gênica de DNA humano por PCR

Em todas as amostras foi realizada PCR para β -globina humana, para confirmação da presença de DNA humano, seguindo a metodologia descrita por Saiki et al, 1985, com algumas modificações para PCR simples, e o método descrito por Brainard, 1994 para a "Nested" -PCR.

Seqüência de nucleotídeos dos iniciadores "primers" externos para a PCR da β -globina:

Primers	Seqüência
P3	5' AGA CAG AGA AGA CTC TTG 3'
P5	5' TCA TTC GTC TGT TTC CCA TTC 3'

Seqüência de nucleotídeos dos iniciadores "primers" internos para a "Nested" -PCR da β -globina:

Primers	Seqüência
P109	5' CGT CCT AT GCT CTA TTT T 3'
P110	5' CCC TTC TTC CTA TGA CAT GAA CTT AAC CAT 3'

Detecção da β -globina humana

Após as duas reações de amplificação e reamplificação, 7,0 μ l do produto da "Nested" -PCR acrescidos de 2,0 μ l do corante azul de bromofenol foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, contendo brometo de etídio para visualização do fragmento sob luz ultravioleta, e fotografado em sistema Polaroyd. Foi obtido um fragmento de DNA de 257pb correspondente ao gene β -globina humana (figura 2).

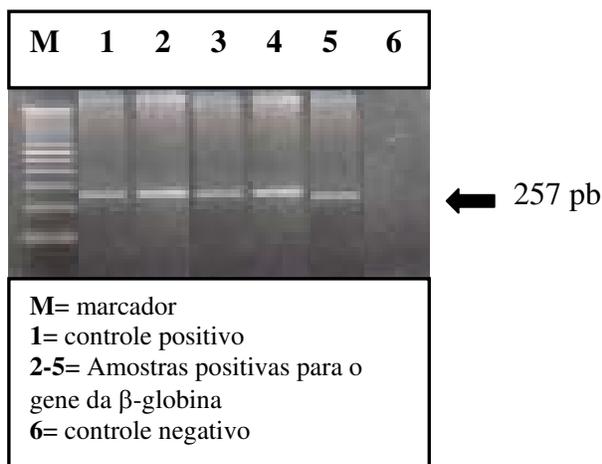


Figura 2 - Amplificação do fragmento do gene da β -globina humana em gel de agarose 2%.

4.7.2 - Amplificação Gênica de DNA viral (HCMV) pela PCR

Para amplificação gênica da região reguladora do HCMV foi seguida a metodologia descrita por Demmler et al, (1998).

Para cada reação de amplificação foi utilizado um volume total de 20 μ l de reação, 50mM de cloreto de potássio, 10mM de Tris HCl (pH 8.4), 2,5mM de cloreto de magnésio, 0,1 μ M de cada primer externo MIE4 e MIE5, 200 μ M de desoxirribonucleotídeos (dNTP), 0,5 unidades de AmpliTaq DNA polimerase (Perkin-Elmer) e 0,5 μ l de DNA a ser analisado.

Foram completados 30 ciclos de amplificação para cada amostra, sendo realizados automaticamente em equipamento apropriado ("DNA Thermal Cycle"- Perkin Elmer Cetus).

Cada ciclo foi constituído de três etapas: a) separação das hélices de DNA (desnaturação) por aquecimento 94°C por 1 minuto; b) ligação complementar entre os primers (anelamento) e o DNA à temperatura de 55°C por 1 minuto; c) síntese do DNA pela Taq polimerase (extensão) à temperatura de 72°C por 1 minuto. Antes do primeiro ciclo, as amostras foram aquecidas inicialmente a 94°C por 5 minutos, para inativação de qualquer atividade de proteases que pudesse interferir na reação enzimática. No último ciclo, o período de extensão (72°C) foi de 7 minutos.

Seqüência de nucleotídeos dos iniciadores "primers" externos para a PCR do HCMV:

Primers	Seqüência
MIE4	5' CCA AGC GGC CTC TAG TAA CCA AGC C 3'
MIE5	5' CAG CAC CAT CCT CCT CTT CCT CTG G 3'

Obs: O primeiro par de "primers" amplifica um fragmento de 435pb.

MIE: Major immediate early antigen of HCMV

4.7.2.A - Re-amplificação do HCMV pela "Nested"- PCR

Utilizando o mesmo método descrito acima, uma alíquota do DNA amplificado na primeira reação de PCR foi re-amplificado com um par de "primers" internos IE1 e IE2 [SHIBATA et al, 1998]. As condições da "Nested" - PCR foram às mesmas utilizadas para a primeira PCR.

Seqüência de nucleotídeos dos iniciadores "primers" internos para a "Nested" - PCR do HCMV:

Primers	Seqüência
IE1	5' CCA CCC GTG GTG CCA GCT CC 3'
IE2	5' CCC GCT CCT CCT GAG CAC CC 3'

Obs: O segundo par de "primers" amplifica um fragmento de 159pb.

IE: Immediate early antigen of HCMV

Detecção do HCMV: As condições de detecção foram às mesmas descritas para o gene da β -globina humana. Em amostras positivas foi obtido um fragmento de DNA de 159pb, correspondente a uma seqüência altamente conservada do HCMV, ao passo que nas amostras negativas não ocorreu amplificação de nenhum fragmento (figura 3).

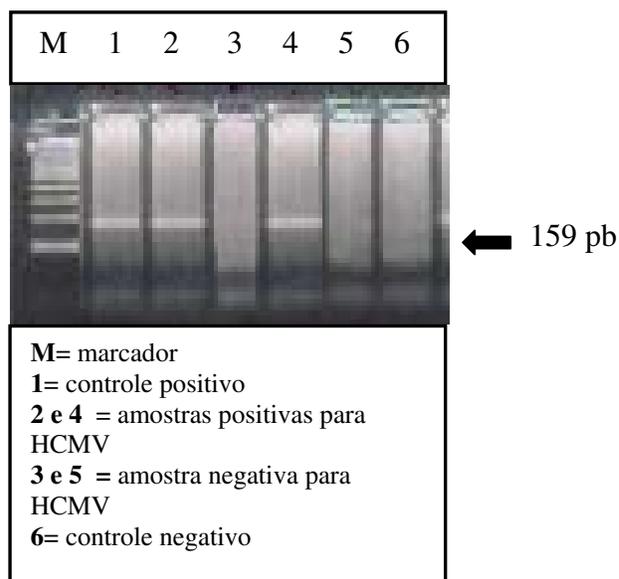


Figura 3 - Amplificação do fragmento do HCMV em gel de agarose 2%.

4.7.3 - Amplificação Gênica de DNA viral (HHV6-B) pela PCR

Para amplificação gênica das regiões 1 e 2 do HHV6 variante B foi seguida a metodologia descrita por Aubin et al, 1991. Para cada reação de amplificação foi utilizado um volume total de 20µl de reação, 50mM de cloreto de potássio, 10mM de Tris HCl (pH 8.4), 2,5mM de cloreto de magnésio, 0,1µM de cada primer externo MIE4 e MIE5, 200µM de desoxirribonucleotídeos (DNTP), 0,5 unidades de AmpliTaq DNA polimerase (Perkin-Elmer) e 0,5µl de DNA a ser analisado.

4.7.3.A - Região 1 do HHV6-B

Foram completados 35 ciclos de amplificação para cada amostra, sendo realizados automaticamente em equipamento apropriado ("DNA Thermal Cycle" - Perkin Elmer Cetus).

Cada ciclo foi constituído de três etapas: a) separação das hélices de DNA (desnaturação) por aquecimento 94°C por 40 segundos; b) ligação complementar entre os primers (anelamento) e o DNA à temperatura de 56°C por 40 segundos; c) síntese do DNA pela Taq polimerase (extensão) à temperatura de 72°C por 40 segundos. Antes do primeiro ciclo, as amostras foram aquecidas inicialmente a 94°C por 7 minutos, para inativação de qualquer atividade de proteases que pudesse interferir na reação enzimática. No ultimo ciclo, o período de extensão (72°C) foi de 10 minutos.

Seqüência de nucleotídeos dos iniciadores "primers" externos para a PCR da Região 1 HHV6-B:

Primers	Seqüência
Ex1	5' GCG TTT TCA GTG TGT AGT TCG GCAG 3'
Ex2	5' TGG CCG CAT TCG TAC AGA TAC GGA GG 3'

Obs: O primeiro par de "primers" amplifica um fragmento de 520pb.

Ex: Externos (proteína capsídeo)

4.7.3.B - Reamplificação do HHV6-B região 1 pela "Nested"- PCR

Utilizando o mesmo método descrito acima, uma alíquota do DNA amplificado na primeira reação de PCR foi reamplificado com um par de "primers" internos IN3 e IN4. As condições da "Nested"- PCR foram as mesmas utilizadas para fazer a primeira PCR (figura 4).

Seqüência de nucleotídeos dos iniciadores "primers" internos para a "Nested"- PCR do HHV6-B:

Primers	Seqüência
IN3	5' GCT AGA ACG TAT TTG CTG CAG AAC CG 3'
IN4	5' ATC CGA AAC TGT CTG ACT GGCA 3'

Obs: O segundo par de "primers" amplifica um fragmento de 258pb.

IN: Internos (proteína capsídeo)

Detecção do HHV6-B Região 1: As condições de detecção foram às mesmas descritas para o gene da β -globina humana. Em amostras positivas foi obtido um fragmento de DNA de 258pb, correspondente a uma seqüência altamente conservada do gene que sintetiza proteína do capsídeo do HHV6-B, ao passo que nas amostras negativas não ocorreu amplificação de nenhum fragmento (figura 4).

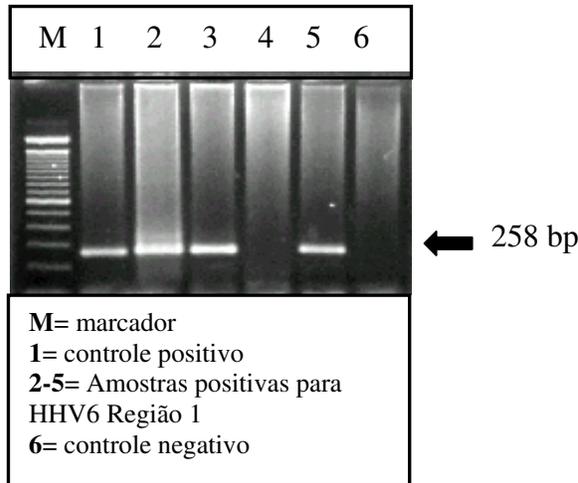


Figura 4 - Amplificação do fragmento do HHV6-B região 1 em gel de agarose 2%.

4.7.3.C - Região 2 do HHV6-B

Foram completados 35 ciclos de amplificação para cada amostra, sendo realizados automaticamente em equipamento apropriado ("DNA Thermal Cycle" - Perkin Elmer Cetus).

Cada ciclo foi constituído de três etapas: a) separação das hélices de DNA (desnaturação) por aquecimento 94°C por 1 minuto; b) ligação complementar entre os primers (anelamento) e o DNA à temperatura de 56°C por 1 minuto; c) síntese do DNA pela Taq polimerase (extensão) à temperatura de 72°C por 1 minuto 30 segundos. Antes do primeiro ciclo, as amostras foram aquecidas inicialmente a 96°C por 7 minutos e, no último ciclo, o período de extensão (72°C) foi de 10 minutos.

Seqüência de nucleotídeos dos iniciadores "primers" externos para a PCR da Região 2 HHV6-B:

Primers	Seqüência
A1	5' GTG GAT CCG ACG TCC TAC AAA CAC 3'
C1	5' CGG TGT CAC ACA GCA TGA ACT CTC 3'

Obs: O primeiro par de "primers" amplifica um fragmento de 834pb.

A1/C1: Externos (proteína tegumento)

4.7.3.D - Reamplificação do HHV6-B região 2 -pela "Nested" – PCR

Utilizando-se do mesmo método descrito acima, uma alíquota do DNA amplificado na primeira reação de PCR foi reamplificado com um par de "primers" internos A2 e C2. As condições da "Nested" - PCR foram as mesmas utilizadas para fazer a primeira PCR.

Seqüência de nucleotídeos dos iniciadores "primers" internos para a "Nested" - PCR da Região 2 HHV6-B:

Primers	Seqüência
A2	5' GGA GAA TCT TGT AAG TAT ATG GTC 3'
C2	5' CTC GGA CTC ATA GAT TTC ATA CTG 3'

Obs: O primeiro par de "primers" amplifica um fragmento de 658pb.

A2/C2: Internos (proteína tegumento)

Detecção do HHV6-B Região 2: As condições de detecção foram às mesmas descritas para o gene da β -globina humana. Em amostras positivas foi obtido um fragmento de DNA de 658pb, correspondente a uma seqüência altamente conservada do gene que sintetiza proteína do tegumento do HHV6, ao passo que nas amostras negativas não ocorreu amplificação de nenhum fragmento (figura 5).

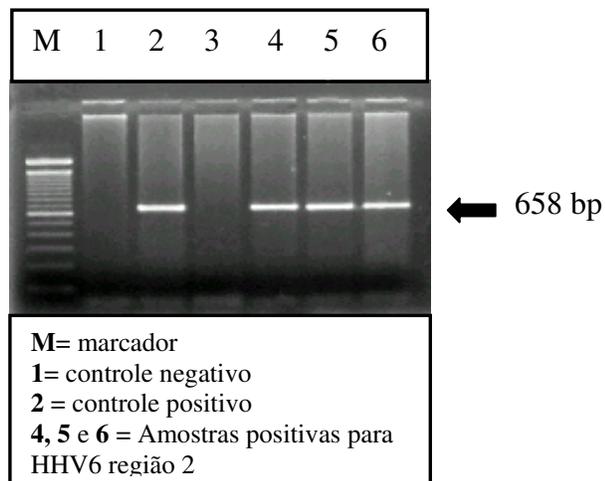


Figura 5 - Amplificação do fragmento do HHV6-B região 2 em gel de agarose 2%.

4.8 - Análise dos Resultados

Os resultados quantitativos foram expressos em média \pm desvio padrão. Comparação entre os grupos foi realizada através de teste T de Student ou análise de variância (ANOVA) com correção pós teste de Bonferroni.

Dados não quantificáveis através de média \pm desvio padrão foram comparados através de teste exato de Fisher, utilizando o programa estatístico STATVIEW versão 2.0. Significância estatística foi considerada se $p < 0.05$.

5 - RESULTADOS

5.1 - Características dos Indivíduos Estudados

Dos 25 pacientes incluídos neste estudo, 15 (60%) receptores eram do sexo masculino e 10 (40%) do sexo feminino. A idade média foi de 38 ± 10 anos (variação de 16 a 60 anos). A etiologia da insuficiência renal crônica (IRC) foi, em sua maioria, de origem Indeterminada (n=13, 52%), seguida de Glomerulonefrite Crônica (GNC, n=7, 28%), Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS, n=3, 12%) e Pielonefrite Crônica (PNC, n=2, 8%).

Em relação ao tipo de doador, 19 pacientes receberam o rim de doador cadáver e 06 o rim de doador vivo relacionado. A maioria dos doadores era do sexo masculino (82,6%, n= 19), com idade média de 38 ± 10 anos (variação de 21 a 49 anos). Dos doadores vivos relacionados, três eram HLA tipo I (idêntico) e 3 HLA tipo II (haploidêntico). (Tabela 2)

Tabela 2 - Características dos indivíduos estudados.

Número de receptores	25
Idade (anos)	38 ± 10
Sexo (Masculino/Feminino)	15/10
Doador (vivo/cadáver)	06/14
Idade do Doador (anos)	38 ± 10

Resultados expressos em média \pm desvio padrão

5.2 - Status Sorológico para HCMV dos receptores de transplante

Em relação à sorologia pré-transplante 23 (92%) receptores apresentavam IgG positivo e 2 IgG negativo para o HCMV. Nenhum receptor apresentava IgM/HCMV positivo. Os dois receptores IgG/IgM negativos receberam profilaxia com Ganciclovir IV por ocasião do transplante. Após 6 meses do transplante renal, todos os 25 receptores apresentavam IgG positivo, havendo portanto 2 casos de infecção primária neste grupo. Positividade transitória para IgM/HCMV pós transplante foi observada em 6 indivíduos, sugerindo reativação viral em 4 (previamente IgG +/IgM -) e infecção primária em 2 (previamente IgG - / IgM -).(Tabela 3)

Tabela 3 - Status Sorológico (IgG/IgM) para HCMV no pré e pós-transplante.

	Pré-Transplante	Pós-Transplante	Atual
IgG +	23	25	25
IgM +	0	06	0

IgG + = imunoglobulina da classe G; IgM = imunoglobulina da classe M

5.3 - PCR para HCMV nos receptores de transplante renal

Dos 25 pacientes incluídos no presente estudo, PCR positivo para HCMV esteve presente na segunda amostra selecionada, coletada 42 ± 30 dias (variação 14 a 113) após o transplante renal. A apresentação clínica associada a esta PCR positiva foi variada, sendo a maioria assintomática. A imunossupressão utilizada por ocasião destas coletas era Azatioprina/Prednisona e Ciclosporina em 25 pacientes. Também não houve diferença estatisticamente significativa no tempo de ocorrência de HCMV/PCR + entre os grupos, divididos de acordo com as diferentes apresentações clínicas. (tabela 4)

Apenas os pacientes com antigenemia positiva e/ou que apresentaram sintomatologia sistêmica receberam tratamento antiviral com ganciclovir IV.

Tabela 4 - Distribuição de apresentação clínica dos pacientes com HCMV/PCR positivas

CLÍNICA	Número	Tempo pós-transplante (dias)
Assintomáticos	9	45 ± 25
Leucopenia	8	56 ± 43
Antigenemia positiva/ sintomatologia sistêmica	8	49 ± 32

p= não significativo

5.4 - PCR para HHV6-B nos receptores de transplante renal

Foi realizada pesquisa de HHV6-B, através da técnica de “Nested-PCR” nas três amostras selecionadas de cada paciente. Foi considerado HHV6-B positivo, os pacientes que apresentaram PCR positiva para Região 1 e/ou Região 2.

Na primeira amostra analisada (21 ± 18 dias), o HHV6-B estava presente em 9/25 pacientes (36%), todos com PCR negativa para HCMV. Na evolução, 11 novos pacientes apresentaram PCR positiva para HHV6-B, resultando num total de 20 (80%) dos receptores com pelo menos uma amostra positiva. Cinco (20%) dos receptores não apresentaram nenhuma amostra positiva para HHV6-B no período analisado. (Gráfico 1, tabela 5 e 6)

Tabela 5 - Distribuição de PCR positiva para HHV6-B em relação a PCR positiva para HCMV.

HHV6-B +	Número de Receptores
Antes do HCMV	09
Junto com o HCMV	09
Após HCMV	02

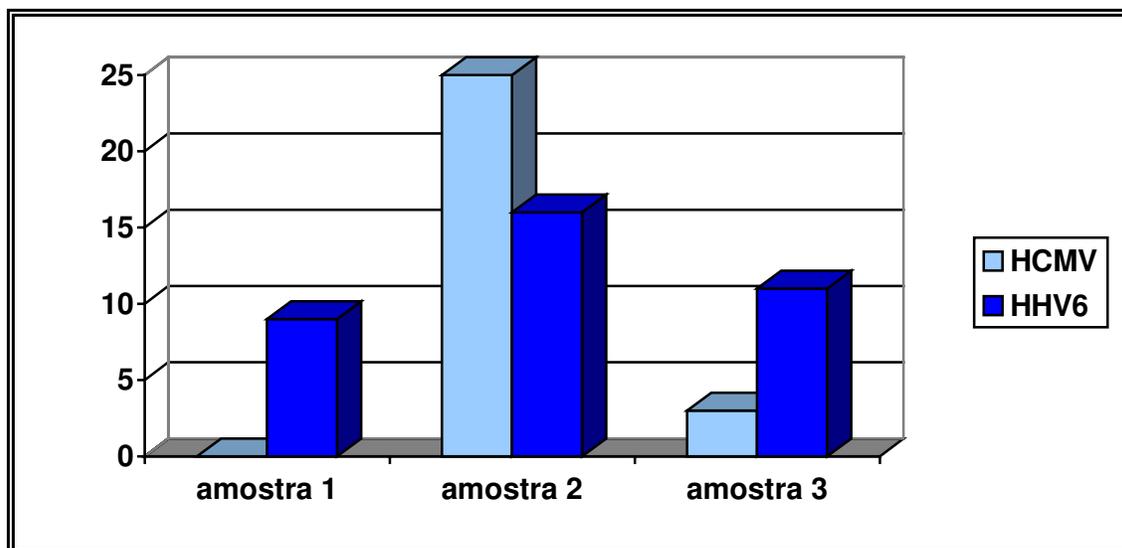


Gráfico 1 - PCR positiva para HHV6-B e HCMV em relação à amostra

Tabela 6 - Distribuição de PCR positiva para HHV6-B e HCMV nos pacientes analisados, de acordo com o tempo de coleta da amostra.

Amostras	HCMV +	HHV6-B +	Tempo pós Tx (dias)
1	0	9	21 ± 18
2	25	16	48 ± 30
3	2	11	85 ± 38

Cinco pacientes analisados apresentaram HHV6-B/PCR positiva em todas as amostras analisadas.

5.5 - Avaliação clínica dos pacientes em relação a PCR para HHV6-B

Uma vez divididos os pacientes de acordo com a presença de infecção ativa por HHV6-B, realizamos a revisão de prontuários médicos com o objetivo de detectar possíveis fatores de risco para co-infecção viral (HCMV/HHV6-B) nestes indivíduos. Para fins de análise, comparamos os pacientes negativos para HHV6-B com os pacientes com pelo menos 1 amostra positiva para HHV6-B.

Não observamos diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos em relação à idade, tipo de doador (vivo relacionado ou cadáver) e doença renal primária (Tabela 7).

Tabela 7 - Comparação entre os pacientes com PCR negativas e positivas para HHV6-B

	HHV6 Negativo	HHV6 Positivo	p
Número de Pacientes	05	20	ns
Idade (anos)	34 ± 7	39 ± 11	ns
Sexo: Masculino/Feminino	04 / 01	11 / 09	p<0,05
Doador: vivo/cadáver	01 / 04	05 / 15	ns
Sorologia para HCMV pré-tx			
- IgG + / IgM -	05	18	
- IgG- / IgM -	0	02	

5.5.A - Evolução Clínica dos HHV6-B negativos

Entre os receptores negativos para HHV6-B, 3/5 (60%) não apresentaram nenhuma manifestação clínica relacionada à infecção pelo HCMV (assintomático) e 2/5 (40%) apresentaram leucopenia isolada como único sintoma de infecção por HCMV. Nenhum paciente apresentou sintomatologia sistêmica nem necessidade de tratamento com Ganciclovir IV (Tabela 8)

Tabela 8 - Sintomatologia dos pacientes com PCR negativa para HHV6-B e positiva para HCMV

Número de Pacientes	Apresentação clínica	Tempo pós-transplante (PCR positiva HCMV: dias)
02	leucopenia	83 ± 49
03	assintomático	67 ± 37

p<0.05

5.5.B - Evolução clínica dos HHV6-B positivos

Dos 20 receptores com pelo menos uma PCR positiva para HHV6-B, presença de viremia sem sintomatologia clínica ocorreu em 6/20 (30%), e leucopenia isolada em 06/20 (30%). Entretanto, HCMV com sintomatologia sistêmica, antigenemia positiva e necessidade de tratamento com Ganciclovir intravenoso ocorreu em 08/20 (40%) pacientes (Tabela 9).

Tabela 9 - Manifestações Clínicas nos pacientes com PCR positiva para HHV6-B e HCMV

Manifestações Clínicas	Tempo pós-Tx X dias	HHV6-B + X dias	HCMV + X dias
Assintomático n=6		27 ± 19	37 ± 37
Leucopenia isolada n=6	36 ± 12	35 ± 33	46 ± 21
Antigenemia positiva n=5	31 ± 14	21 ± 13	47 ± 23
Acometimento sistêmico n=3	38 ± 33	39 ± 22	55 ± 27

P=ns para os parâmetros analisados

Não houve diferença estatisticamente significativa no tempo de positividade da PCR para HCMV e HHV6-B, sendo que em todos os grupos o HHV6-B precedeu HCMV em média 16 ± 5 dias.

Nestes indivíduos, a comparação dos grupos positivos e negativos para PCR para HHV6-B, demonstrou que, apesar de não haver diferença significativa na incidência de leucopenia entre os grupos, HCMV sintomático (febre, antigenemia positiva e/ou aumento das transaminases) com necessidade de tratamento ocorreu apenas no grupo HHV6 positivo (tabela 10).

Tabela 10 - Necessidade de tratamento para HCMV de acordo com a PCR para HHV6-B.

Receptores	Negativos para HHV6-B	Positivos para HHV6-B
Não tratados	05	12
Tratados	0	08

p < 0,05

Quando comparados os grupos tratados ou não para HCMV, não observamos diferença estatisticamente significativa na imunossupressão utilizada nem no tempo de diagnóstico de HCMV pela PCR. Na ocasião do diagnóstico de viremia pelo HCMV, não houve diferença significativa nos níveis séricos de creatinina entre os grupos. Entretanto, ao final de 1 ano de acompanhamento foi observada uma tendência à pior função renal no grupo com HHV6-B positivo. Esta pior evolução da função renal no grupo HHV6-B/HCMV positivo foi confirmada após 60 meses de acompanhamento (creatinina sérica 2.5 ± 0.4 versus 1.3 ± 0.1 mg/dl, HHV6-B + versus HHV6-B -, $p < 0.05$) (Gráfico 2 e Tabela 11).

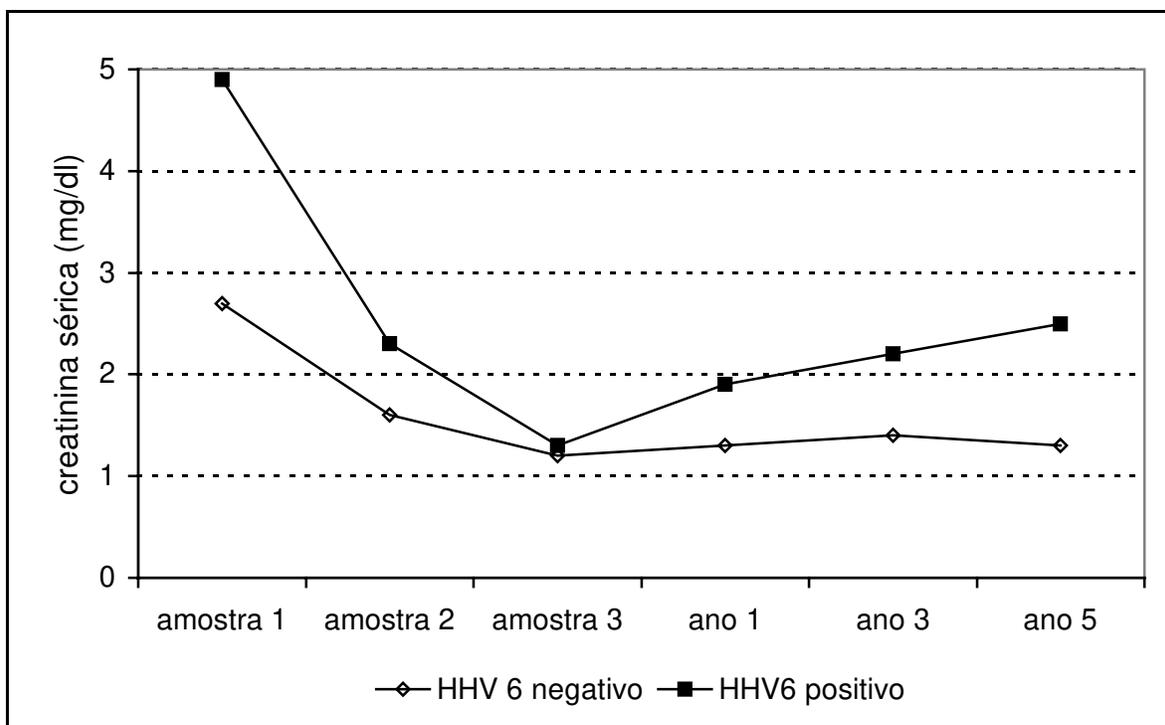


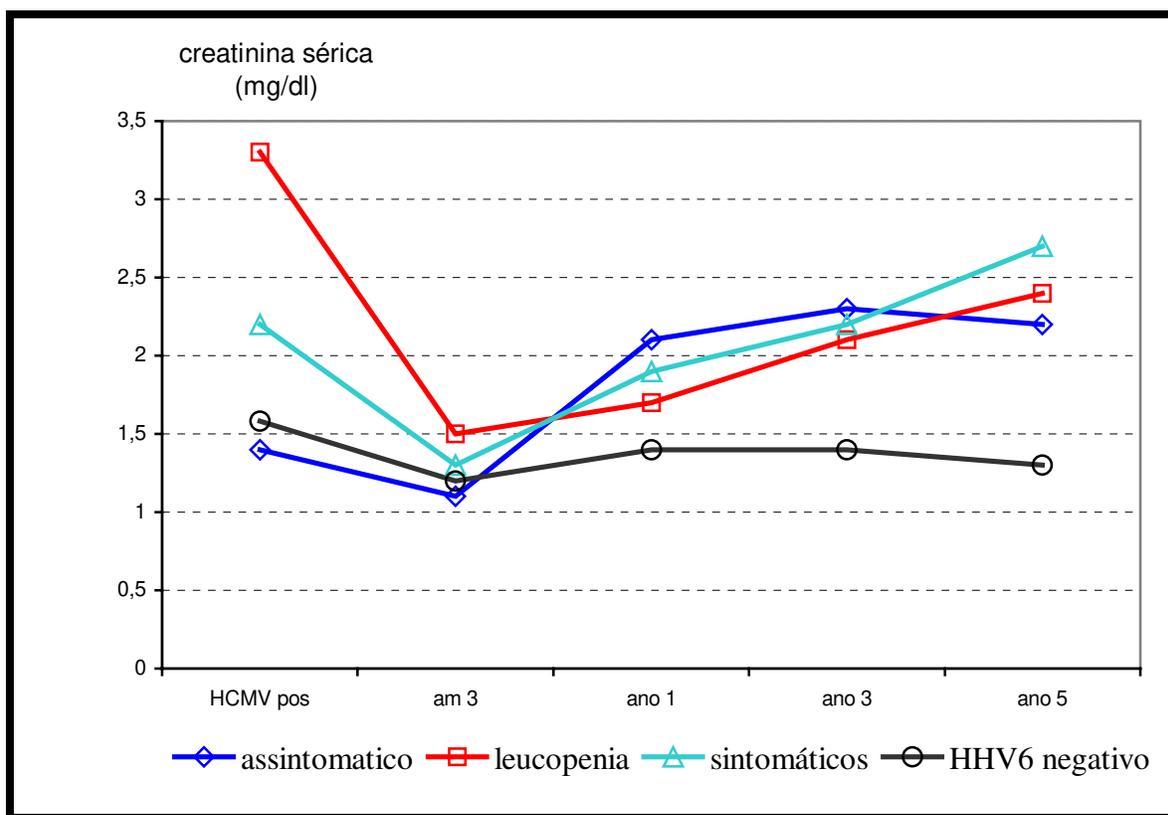
Gráfico 2 - Evolução da creatinina sérica nos diferentes grupos com PCR positiva para HCMV

Tabela 11 - Evolução da creatinina sérica nos diferentes grupos com PCR + para HCMV

	Creatinina sérica (mg/dl)		p
	HHV6-B negativo	HHV6-B positivo	
Amostra 1	2,7 ± 1,5	4,9 ± 0,8	
Amostra 2	1,6 ± 0,5	2,3 ± 0,4	
Amostra 3	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,1	
Ano 1	1,3 ± 0,2	1,9 ± 0,2	
Ano 3	1,4 ± 0,1	2,2 ± 0,3	
Ano 5	1,3 ± 0,1	2,5 ± 0,4	<0,05

* valores expressos em média ± erro padrão.

Quando os grupos com HHV6-B positivo foram divididos de acordo com a necessidade de tratamento para HCMV (assintomáticos, leucopenia isolada e sintomáticos), não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis séricos de creatinina entre as diversas apresentações clínicas (Gráfico 3). A análise de outros fatores de risco para pior função renal do enxerto, como episódios de rejeição aguda, infecções associadas e nefrotoxicidade pelos imunossupressores não apresentou diferença entre os grupos.



Obs: grupos assintomático, leucopenia e sintomáticos apresentavam HHV6 e HCMV positivos em pelo menos uma amostra.

Gráfico 3 - Evolução da creatinina sérica nos diferentes grupos, de acordo com a apresentação clínica do HCMV/HHV6-B

6 - DISCUSSÃO

A maioria da população humana é soropositiva para o HCMV e estudos soroepidemiológicos demonstraram que a infecção ocorre praticamente em todas as regiões do mundo [HO et al, 1990]. Normalmente a infecção em indivíduos imunocompetentes costuma ser assintomática ou apresentar quadro clínico discreto. Contudo, em pacientes imunossuprimidos, as manifestações clínicas são graves, podendo levar ao óbito (COSTA, 1999). Em receptores de transplantes de órgãos, o HCMV é o agente infeccioso mais freqüente, afetando pelo menos 2/3 desses indivíduos [RUBIN et al, 1993].

A apresentação clínica do HCMV pode variar conforme seu padrão epidemiológico (infecção primária e secundária por reativação ou reinfecção). A infecção primária é geralmente mais grave, e freqüentemente sintomática (cerca de 40%-60% dos casos) [LJUNGMAN e PLOTKIN, 1995]. A incidência de doença sintomática nos casos de reativação é menor que 20% e na reinfecção, 40% dos pacientes apresentam manifestações clínicas [LJUNGMAN e PLOTKIN, 1995; COSTA et al, 1999].

Devido a alta freqüência de infecção ativa por HCMV em receptores de transplante renal, cresce o interesse pelo diagnóstico precoce, com a utilização de métodos mais sensíveis, quantitativos e de rápida execução [GRIFFITHS et al, 1990; BOECKH e BOIVIN, 1998]. Estas técnicas diagnósticas tem como objetivos diferenciar a infecção pelo HCMV de outras viroses oportunistas ou de episódios de rejeição aguda, monitorar o uso de medicamentos antivirais, além de fornecer uma ferramenta para o estudo da interação entre o vírus e o sistema imune [JONG et al, 1998]. O diagnóstico precoce da infecção ativa por HCMV é importante, uma vez que estudos recentes mostraram que o tratamento precoce reduz efetivamente a morbi-mortalidade causados pelo HCMV em transplantados renais [GOODRICH et al, 1991; JONG et al, 1998].

O uso da técnica de sorologia, no período pré-transplante, é justificado pela importância da determinação da susceptibilidade à infecção primária (mais freqüentemente sintomática) [CHOU et al, 1990]. Considerando a alta soroprevalência do HCMV em populações de adultos, a realização de sorologia permite a detecção de populações de risco para infecção primária e para reinfecção ou reativação virais [BRUGEMMAN, 1993]. Na população alvo do presente estudo, observamos uma prevalência de 92% de indivíduos soropositivos para HCMV (IgG positiva), achado este

compatível com dados da literatura que apontam prevalência de infecção pelo HCMV entre 80%-100% da população brasileira [SUASSUNA et al, 1995; COSTA et al, 1999].

Tomando como base apenas a variação sorológica destes indivíduos, observamos 2 casos de primo-infecção pelo HCMV nos pacientes previamente IgM/IgG negativos por ocasião do transplante e que receberam rim de doador positivo. No período pós-transplante a análise sorológica, não foi utilizada como ferramenta isolada para diagnóstico de infecção ativa, servindo como adjuvante diagnóstico. Assim, baseados em soroconversão, obtivemos 4 pacientes de risco para reativação viral, com elevação dos títulos de IgM.

Além da sorologia, também foram utilizados para a investigação diagnóstica da infecção ativa pelo HCMV a pesquisa de antígenos virais (antigenemia) e a pesquisa de partículas virais em sangue periférico, através da reação em cadeia de polimerase (PCR). Esta última, introduzida por SAIKI, et al (1988) para amplificação seletiva de seqüência de ácido nucléico, tem sido de grande utilidade em um número cada vez maior de situações clínicas, incluindo o diagnóstico de doenças infecciosas variadas, incluindo o HCMV [DENLER et al, 1988 e SHIBATA et al, 1988].

A PCR é um método rápido (4-6 horas), específico e extremamente sensível [THE et al, 1990], sendo um indicador precoce da infecção por HCMV [EINSELE et al, 1991]. Uma maior sensibilidade do método pode ser obtido através da realização da “Nested”-PCR [PORTER-JORDAN, 1990; XU et al, 1993; BRAINARD et al, 1994; FOX et al; 1995], que é um procedimento confiável e sensível, podendo ser bastante útil na identificação da infecção ativa por HCMV [AQUINO & FIGUEIREDO, 2001]. Entretanto, em razão da alta sensibilidade desta técnica, o HCMV também pode ser detectado em um número substancial de pacientes que não progridem para doença [BOECKH et al, 1997].

Estudo anterior, realizado no Hospital de Clínicas da Unicamp em um grupo de 48 transplantados renais, e que foi utilizado como população base para o presente estudo, a infecção ativa por HCMV foi identificada em 34 (71%) receptores de transplante renal, que foram classificados como apresentando infecção ativa. Destes, PCR positiva para HCMV

ocorreu em mais de 2 dosagens sequenciais, e em 18/34 casos (53%), foi o único teste que resultou positivo para a infecção ativa pelo HCMV. Os 14 receptores restantes (29%), assintomáticos durante todo o acompanhamento, não apresentaram PCR positiva para HCMV [FIORAVANTI, 2001], resultando em sensibilidade e especificidade do método de 100% no grupo analisado, comparável aos dados de literatura [TANABE et al, 1996; THE et al, 1992].

A revisão dos prontuários destes pacientes mostrou que a maioria das infecções por HCMV, tanto nos pacientes com infecção primária, quanto nos pacientes previamente soropositivos, ocorreu nos dois primeiros meses pós-transplante. Estes achados confirmam as observações de outros pesquisadores, que relataram raras as infecções por HCMV a partir do quarto mês pós-transplante [THE et al, 1992; TANABE et al, 1996; BOECK e BOIVIN, 1998].

Estudos recentes tem sugerido que, devido à grande homologia entre os betaherpes vírus, a co-infecção entre HCMV, HHV6 e HHV7 possa ter impacto na apresentação clínica, evolução e resposta terapêutica do HCMV após o transplante de órgãos. Baseado nestas informações, optamos por selecionar, do grupo previamente analisado, aqueles pacientes que desenvolveram infecção ativa pelo HCMV (a partir dos resultados de Nested-PCR HCMV) e pesquisar a prevalência de HHV6 como co-infecção, utilizando a mesma técnica.

A prevalência de HHV6 em populações de transplantados renais é bastante variável. Estudos sorológicos demonstraram presença de IgG para HHV6 em cerca de 89% dos receptores antes do transplante renal e hepático [DEBORSKA et al., 2002; DOCKRELL et al, 1999]. O vírus permanece latente na população geral, habitualmente em tecido linfóide, células gliais e em células de trato respiratório, podendo sofrer reativação em presença de imunossupressão. A reativação da infecção pelo HHV6 tem sido sugerida por alguns autores como um fator de risco adicional ao desenvolvimento de infecção pelo HCMV [JEFFREY et al., 1998]. De forma semelhante, a infecção primária pelo HHV6 caracterizaria pacientes de risco para ocorrência de infecção fúngica, uma vez que a infecção pelo HHV6 reduz a capacidade proliferativa de linfócitos CD4, deprime a secreção de IL-2 e o perfil de citocinas do hospedeiro, deprimindo a resposta imune celular

[DOCKRELL et al, 1999]. A investigação sorológica do HHV6 em receptores de transplantes de órgãos, seria, assim, importante no acompanhamento de pacientes sintomáticos, especialmente na ausência de positividade na pesquisa de outros agentes infecciosos, como o HCMV, Epstein Barr e Herpes simplex vírus.

Além da investigação sorológica, outra forma de avaliar a infecção pelo HHV6 em populações seria a detecção de partículas virais através da PCR em sangue periférico e/ou soro. Estudo preliminar realizado numa população de transplantados renais estáveis mostrou que estes pacientes apresentavam uma prevalência de PCR positiva em sangue 3 vezes superior à da população controle da mesma região (HHV6 positivo, 36% *versus* 11%, tx renais *versus* controle normal, $p < 0.01$) [MAZZALI et al, 2004]. Estudo de PCR para HHV1 na mesma população não demonstrou diferença na prevalência entre normais e transplantados. Entretanto, no presente estudo, a positividade para HHV6 foi da ordem de 80%, com detecção de partículas virais pela Nested PCR em média 45 dias após o transplante renal. Esta alta positividade pode ser explicada pela seleção dos pacientes incluídos, que apresentavam necessariamente PCR positiva para HCMV no período analisado.

Estudos anteriores sugerem que a co-infecção de HHV6 com HCMV aumenta o risco de infecção sintomática pelo HCMV [OSMAN et al., 1996; DESJARDIN et al., 1998]. Herbein et al, (1996), relataram que os sintomas clínicos atribuídos à infecção pelo HCMV são mais severos em receptores de transplante quando ocorre infecção concomitante com HHV6. Chapman et al., relataram que a combinação da infecção HHV6 e HCMV pós transplante esteve associada com síndrome clínica da doença por HCMV. Dockrell et al, (2003) mostram que a soroconversão de HHV6 foi um marcador para doença pelo HCMV pós-transplante de fígado, independente de outros fatores de risco para infecção sintomática de HCMV. Entretanto, Pacsa et al., (2003), analisando 107 receptores de transplante renal, não observaram maior severidade da sintomatologia de HCMV entre os pacientes que também apresentavam PCR positiva para o HHV6.

Na presente série, apesar da baixa frequência de pacientes HHV6 negativos (n=5) em pacientes com HCMV positivos, durante todo o período de estudo, não observamos nenhuma manifestação clínica relacionada à infecção pelo HCMV, sendo que

apenas 2/5 receptores apresentaram leucopenia isolada como único possível sintoma de infecção por HCMV. Nenhum paciente com PCR negativa para HHV6 necessitou de tratamento para a infecção pelo HCMV.

Dos 20 receptores com PCR positiva para HHV6, 30% (6/20) foram assintomáticos e 30% (6/20) apresentaram leucopenia isolada, não configurando infecção clinicamente manifesta. Entretanto, 40% (8/20) dos pacientes apresentaram sintomatologia sistêmica, antigenemia positiva e necessidade de tratamento antiviral (Ganciclovir IV).

Quando os pacientes foram comparados, de acordo com a presença de HHV6-PCR positiva, não observamos diferenças significativas entre os grupos em relação às características da doença renal primária, histórico de tratamento dialítico, características do transplante nem na sorologia prévia para o HCMV. A distribuição da doença pelo HCMV, entretanto, apresentou forma sintomática apenas nos pacientes HHV6 positivos. Viremia pelo HCMV assintomática ou manifesta por leucopenia isolada não diferiu entre os grupos com e sem HHV6.

Também não foi observada diferença no tempo de detecção de viremia pelo HCMV de acordo com as diferentes apresentações clínicas, ocorrendo em média 42 dias após o transplante. Naqueles pacientes onde foi detectado o HHV6, a viremia precedeu o aparecimento do HCMV em cerca de 2 semanas, concordante com relatos anteriores [HERBEIN et al., 1996, DESJARDIN et al., 1998]

Alguns estudos sugerem que a infecção pelo HHV6 possa atuar como fator de risco para desenvolvimento de nefropatia crônica do enxerto, por efeito citopático direto [HOSHINO et al. 1995] ou pelo favorecimento de episódios de rejeição aguda, através do aumento de produção de interferon α [KIKUTA et al., 1990], interleucinas e fator de necrose tumoral α [FLAMAND et al., 1995]. Tendo como base estas hipóteses, avaliamos a função renal destes pacientes durante o quadro de viremia e a evolução a longo prazo (5 anos de acompanhamento).

Por ocasião da viremia pelo HCMV, não observamos diferença estatisticamente significativa nos níveis séricos de creatinina entre os grupos (HHV6 positivo e negativo).

Entretanto, durante a evolução, observamos que o grupo HHV6 negativo manteve função renal preservada durante todo o período de acompanhamento, com creatinina sérica em média de 1.3 mg/dl. Em contraste, o grupo com HHV6 positivo apresentou deterioração progressiva da função renal, com creatinina sérica de 2.5mg/dl ao final de 5 anos de acompanhamento ($p<0.05$). A evolução da função renal não diferiu entre os pacientes com HCMV/HHV6 tratados ou não.

Apesar da pior evolução da função renal nos pacientes HHV6 ao final de 5 anos, não encontramos um fator de risco para esta ocorrência, já que não houve diferença na ocorrência de episódios de rejeição aguda diagnosticados por biopsia entre os grupos. Algumas hipóteses para esta deterioração progressiva da função renal podem ser levantadas, entre as quais a redução da medicação imunossupressora durante a infecção sintomática, pelo HCMV, que poderia facilitar a ocorrência de episódios de rejeição subclínica. Outra hipótese, seria nos casos sem manifestação clínica, a possibilidade de que o HHV6 atuaria apenas como um marcador de “over-imunossupressão”, favorecendo o desenvolvimento de nefrotoxicidade, especialmente pela ciclosporina (HOSHINO et al, 1995). Uma última hipótese, também não demonstrada, seria a sugerida por HOSHINO et al, (1995), de efeito citopático direto do HHV6 em células tubulares, que poderia ser demonstrado apenas através de pesquisa do antígeno viral em fragmentos de biopsia.

Em resumo, na presente série, observamos uma alta prevalência de HHV6 em receptores de transplante renal com viremia pelo HCMV. A co-infecção entre HCMV/HHV6 esteve associada com maior ocorrência de sintomatologia clínica e necessidade de tratamento com antivirais e também com pior função do enxerto a longo prazo. Estudos prospectivos e com casuística maior permitirão determinar se a presença de HHV6 constitui um risco adicional para os receptores de transplante renal ou pode ser considerado apenas como uma consequência do aumento do estado de imunossupressão.

7 - CONCLUSÕES

1. Infecção pelo HHV6, detectada através da Nested PCR, foi de 80% na população estudada. Esta alta frequência pode ter sido influenciada pelo critério de inclusão do presente estudo, que considerava a necessidade de viremia para HCMV durante o acompanhamento.
2. Viremia para HHV6 e HCMV foi observada em 80% dos pacientes analisados. A viremia para HHV6 precedeu a viremia pelo HCMV em cerca de duas semanas, concordante com descrições anteriores.
3. Viremia assintomática pelo HCMV não diferiu entre os pacientes com ou sem viremia para HHV6.
4. Infecção ativa pelo HCMV, com necessidade de terapia anti-viral foi observada apenas nos pacientes com viremia para HHV6, sugerindo que a co-infecção possa agravar a infecção pelo HCMV.
5. Os pacientes que apresentaram co-infecção HCMV/HHV6 evoluíram com pior função renal após 5 anos de acompanhamento que aqueles que não apresentaram HHV6 positivo. Esta perda de função renal pode ser consequência tanto de rejeições agudas subclínicas, como de toxicidade pelos imunossupressores ou pelo próprio HHV6.

***8 - REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS***

ABLASHI, D.V.; SALAHUDIN, S.Z.; JOSEPHS, S.F.; IMAN, F.; LUSSO, P.; GALLO, R.C.; et al. HBVL (or HHV6) in human cells lines. **Nature**; 329 (6136): 207, 1987.

ABLASHI, D.B.; AGUT, Z.; BERNEMAN, G. Human herpesvirus-6 strain groups; a nomenclature. **Arch Virology**; 129: 363-366, 1993.

ALFORD, C.A. & BRITT, W.J. Cytomegalovirus In: Fields, B.N. & Knipe, D.M. **Virology** 2ed. New York. Raven Press; 1981-2010, 1990.

AQUINO, V.H. & FIGUEIREDO, L.T.M. Cytomegalovirus infection in renal transplant recipients diagnosed by nested-PCR. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**; 34: 93-101, 2001.

ASADA, H.; KLAUS-KOVTUN, V.; GOLDING, H., KATZ, S.I.; BLAUVELT, A. Human herpesvirus 6 infects dendritic cells and suppresses human immunodeficiency virus type 1 replication in coinfecting cultures. **Journal Virology**; 73: 4019-4028, 1999.

AUBIN, J.T.; COLLANDRE, H.; CANDOTTI, D.; INGRAND, D.; ROUZIQUX, C.; BURGARD, M.; et al. Several groups among human herpesvirus 6 strains can be distinguished by Southern blotting and polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol**, 29: 367-372, 1991

BOECK, W.M. & BOIVIN, G. Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. **Clinical Microbiology Review**; 11(3): 533-554, 1998.

BOWDEN, R.A.. Cytomegalovirus infection in transplant patients: Methods of human prevention of primary cytomegalovirus. **Transplantation Proceedings**; 23: 136-138, 1991.

BRAUN, D.K.; DOMINGUEZ, G. & PELLET, P.E. Human herpesvirus 6. **Clinical Microbiology Review**; 10 (3): 521-567, 1997.

BREESE, B.B. Jr.. Roseola infantum (exanthum subitum) New York State. **Journal Medical**; 41: 1854-1859, 1941.

BRENNAN, D.C. Cytomegalovirus in renal transplantation. **J. Am. Soc Nephrology**; 12: 848-855, 2001.

BROW, H.L. & ABERNATHY, M.P. Cytomegalovirus infection. **Seminars in Perinatology**; 22 (4): 260-266, 1998.

BROWN, N.A., SUMAYA, C.V., LIU, C.R., ENCH, Y., KOVACS, A., CORONESI, M.; KAPLAN, M.H. Fall in human herpesvirus 6 seropositivity with age. **Lancet** ii; 396, 1988.

BRUGEMMAN, C.A. Cytomegalovirus and latency: na overview. **Archiv B Cell Pathology**; 64: 325-333, 1993.

CAINELLI, F. & VENTO, S. Infection and solid organ transplantation rejection: a cause-and-effect relationship? **Lancet Infect Disease**; 2(9): 539-549, 2002.

CAMARGO, L.F.A.; GRANATO, C.; FIANÇA S.V.H.; TOMYANA, H.T.; COBO, E.; AJZEN, H.; PESTANA, J.O.M. Infecção pelo citomegalovirus em pacientes submetidos a transplante renal: Estudo de 20 casos. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**; 18(2): 130-136, 1996.

CAMPADELLI-PIUME, G.; MIRANDOLA, P.; MENOTI, L. Human herpesvirus 6: an emerging pathogen. **Emerg Infect Dis**; 5: 353-366, 1999.

CAPULONG, M.G.T.; MENDONÇA, M.; CHAVEZ, J. Cytomegalovirus pneumonitis in renal transplant patients. **Transplantation Proceedings**; 30: 3151-3153, 1998.

CARRIGAN, D.R., DROBYSKI, W.R., RUSSLER, S.K., TAPPER, M.A., KNOX, K.K.; ASH, R.C. Interstitial pneumonitis associated with human herpesvirus-6 infection after marrow transplantation. **The Lancet**; 338: 147-149, 1991.

CARRIGAN, D.R. & KNOX, K.K. Human herpesvirus 6 (HHV6) isolation from bone marrow: HHV6 associated bone marrow transplatation. In: ABLASHI, D.V; KRUEGER, G.R.; SALAHUDDIN, D.Z.; eds. **Human herpesvirus 6: epidemiology, molecular biology, and clinical pathology** v4, New York, Elsevier; 281-301, 1992.

CASERTA, M.T., MOCK, D.J.; DEWHURST, S. Human herpesvirus 6. **Clinical Infect Disease**; 33: 829-833, 2001.

CHOU, S. Newer methods for diagnosis of cytomegalovirus infection. **Rev Infect Dis**, Suppl 7: S727-736, 1990.

CLARK, D.A. Human herpesvirus 6. **Rev Med Virol**; 10: 155-173, 2000.

COSTA, S.C.B.; MIRANDA, S.R.P.; ALVES, G.; ROSSI, CL.; FIGUEIREDO, L.T.M.; COSTA, F.F. Detection of cytomegalovirus infection by PCR in renal transplant patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**; 32: 953-959, 1999.

COSTA, S.C.B. Infecção por citomegalovirus (CMV); epidemiologia, diagnóstico e tratamento. **Revista Brasileira de Clínica Terapêutica**; 25(1): 18-28, 1999.

CRUMPACKER, C.S. Ganciclovir. **N Engl J Med**; 335: 721-729, 1996.

DEBORSKA D, DURLIK M, SADOWSKA A, MATLOSZ B, BACZKOWSKA T, PACZEK L, SZMIDT J, ROWISNKI W, LAO M. Human Herpesvirus 6 and human Herpesvirus 8 seroprevalence in kidney transplant recipients. **Transplant Proc** 34: 673-674, 2002.

DEBORSKA D, DURLIK M, SADOWSKA A, NOWACKA-CIECIURA E, PAZIK J, LEWANDOWSKI Z, CHMURA A, GALAZKA Z, PACKZEK L, LAO M. Human Herpesvirus 6 in renal transplant recipients: potential risk factors for the development of human Herpesvirus 6 seroconversion. **Transplant Proc** 35(6): 2199-2201, 2003.

DEMMLER, G.J.; BUFFONE, G.J.; SHIMBOR, C.M.; MAY, R.A. Detection of cytomegalovirus in urine from newborn by using polimerase chain reaction DNA amplification. **J Infect Dis**, 158: 1177-1184, 1988.

DESJARDIN, J.A.; GIBBONS, L.; CHO, E.; SUPRAN, E.S.; FALAGAS, E.M.; WERNER, G.B.; SNYDMAN, R.D. Human herpesvirus 6 reactivation is associated with cytomegalovirus and syndromes in kidney transplant recipients at risk for primary cytomegalovirus infection. **J Infect Dis**; 178: 1783, 1998.

DOCKRELL, D.H., SMITH, T.F.; PAYA, C.V. Human herpesvirus 6. **Mayo Clinical Proceedings**; 74: 163-170, 1999.

DOCKRELL, D.H. & PAYA, C.V. Human herpesvirus-6 and -7 in transplantation. **Rev Med Virol**; 11: 23-36, 2001.

DOCKRELL, D.H.. Human herpesvirus 6: molecular biology and clinical features. **Journal Medical Microbiology**; 52(1): 5-18, 2003.

DOMINGUEZ, G.; DAMBAUGH, T.R.; STAMEY, F.R.; DEWHURST, S.; INOVE, N.; PELLET, P.E. Human herpesvirus-6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus-6A. **Journal Virology**; 73(10):8040-8052, 1999.

DRAGO, F.; ARAGONE, M.G.; LUGANI, C.; REBORA, A. Cytomegalovirus infection in normal and immunocompromised humans. **Dermatology**; 200: 189-195, 2000.

DROBYSKI, W.R.; DUNNE, W.M.; BURD, E.M.; KNOX, K.K.; ASH, R.C.; HOROWITZ, M.M.; et al. Human herpesvirus 6 (HHV6) infection in allogeneic bone marrow transplant recipients: evidence of a marrow suppressive role for HHV6 in vivo. **The Journal of Infect Disease**; 167: 735-739, 1993.

DUMMER, J.S.; HARDY, A.; POORSATTAR, A.; HO, M. Early infection in kidney, heart and liver transplant recipients on cyclosporina. **Transplantation**; 36(3): 259-367, 1983.

EINSELE, H.; EHNINGER, G.; STEIDLE, M.; VALLBRACHT, A.; MULLER, C.A., SCHIMDT, H.; et al. Polymerase chain reaction to evaluate antiviral therapy for cytomegalovirus disease. **The Lancet**; 338(8776): 1170-1172, 1991.

FIEZTE, E.; PROSCH, S.; REINKE, P.; STEIN, J.; DOCKE, W.D.; STAFFA, G.; et al. Cytomegalovirus infection in transplant recipients, **Transplantation**; 58: 675-680, 1994.

FIORAVANTE, M.T. Diagnóstico e monitorização da infecção por Citomegalovirus em transplantados renais por meio da técnica de "Nested"- PCR e antigenemia. **Dissertação de Tese de Mestrado**, DCM/FCM/Unicamp, 2001.

FLAMAND, L., GOSSELIN, J., D'ADDARIO, M., HISCOTT, J., ABLASHI, D. V., GALLO, R. C. & MENEZES, J. Human herpesvirus 6 induces interleukin-1 β and tumor necrosis factor alpha, but not interleukin-6, in peripheral blood mononuclear cell cultures. **Journal Virology**, 65: 5105-5110, 1991.

FLAMAND, L., GOSSELIN, J., STEFANESCU, I., ABLASHI, D. & MENEZES, J. Immunosuppressive effect of human herpesvirus 6 on T-cell functions: suppression of interleukin-2 synthesis and cell proliferation. **Blood**; 85: 1263-1271, 1995.

FLAMAND, L., STEFANESCU, I.; MENEZES, J. Human herpesvirus-6 enhances natural killer cell cytotoxicity via IL-15. **Journal Clinical Invest**; 97: 1373-1381, 1996.

FLECHNER, S.M.; AVERY, R.K.; FISHER, R.; MASTTROIANI, B.H.; PAPAJCIK, D.A.; O'MALLEY, K.J.; et al. A randomized prospective controlled trial of oral acyclovir versus oral ganciclovir for cytomegalovirus prophylaxis in high-risk kidney transplant recipients. **Transplantation** ; 66: 1682-1688, 1998.

FRENKEL, N.; KATSATANAS, G.C.; WYATT, L.S.; YOSHIKAWA, T.; ASANO, Y. Bone marrow transplant recipients harbor the B variant of human herpesvirus 6. **Bone Marrow Transplant**; 14: 839-843, 1994.

GENTILE, G. Post-transplant HHV6 disease. **Herpes**; 7:1, 2000.

GOMPELS, U.A.; NICHOLAS, J.; LAWRENCE, G.; JONES, M.; THONSON, B.J.; MARTIN, M.E.; et al. The DNA sequence of human herpesvirus-6: structure, coding content and genome evolution. **Virology**; 209(1):29-51, 1995.

GOODRICH, J..M.; MORI, M.; GLEAVES, C.A.; MOND, C..D., GAYS, M.; EBELING, D.F.; et al. Early treatment with ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic bone marrow transplantation. Ganciclovir. **N Engl J Med**; 325(23): 1601-1607, 1991.

GOSENS, V.J.; BLOCK, M.J.; CHRISTIANS, M..H.L.; SILLEKENS, P.; MIDDELDORP, J..M.; BRUGGEMAN, C..A. Early detection of cytomegalovirus in renal transplant recipients. Comparison of PCR, NASBA, pp65 antigenemia and viral culture. **Transplantation Proceedings**; 32: 155-158, 2000.

GOSSELIN, J.; TOMOLU, A.; GALLO, R.C.; FLAMAND, L. Interleukin-15 as an activator of natural killer cell-mediated antiviral response. **Blood**; 94: 4210-4219, 1999.

GRIFFITHS, P.D., CLARK, D. A.; EMERY, V.C. Betaherpesviruses in transplant recipients. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, 45: (Suppl. T3), 29-34, 2000.

GRIFFITHS, P.D.; AIT-KHALED, M.; BEAR CROFT, C.P.; CLARCK, D..A.; QUAGLIA, A.; DAVIE, S.E.; et al. Human Herpesvirus 6 and 7 as potential pathogens after liver transplant: prospective comparison with the effect of cytomegalovirus. **J Med Virology**; 59: 496-501, 1999.

HALL, C.B., CASERTA, M.T., SCHNABEL, K.C., LONG, C., EPSTEIN, L.G., INSEL, R.A., DEWHURST, S.. Persistence of human herpesvirus 6 according to site and variant: possible greater neurotropism of variant A. **Clinical Infect Disease**; 26: 132-137, 1998.

HE, J., MCCARTHY, M., ZHOU, Y., CHANDRAN, B.; WOOD, C. Infection of primary human fetal astrocytes by human herpesvirus 6. **Journal Virology**; 70: 1296-1300, 1996.

HERBEIN, G.; STRASSWIMMER, J. ALTIERI, M. WOEHL-JAEGLE, M.L.; WOLF, P.; OBERT, G. Longitudinal study of human herpesvirus-6 infection in organ transplant recipients. **Clin Infect Dis**; 22: 171-173, 1996.

HIBBERD, P.L.; SNYDMAN, D.R. Cytomegalovirus infection in organ transplant recipients. **Infectious Disease Clinics North America**; 9(4): 863-877, 1995.

HO, M.; SUWANSIRIKUL, S.; DOWLING, J.N.; YOUNGBLOOD, L.A. ARMSTRONG, J.A. **N Engl J Med**; 293: 1109, 1975.

HO, M. **Cytomegalovirus: Biology and infection**. 2 ed. New York, Plenum Publishing Corporation, 1440, 1991.

HO, M.; MANDELE, G.L.; DOUGLAS, J.R.; BENNET, J.E. **Principles and practice of infections disease**. 3 ed. New york Churchill Livingstone, p. 1159-1172, 1990.

HOSHINO, K.; NISHI, T.; ADASHI, H.; ITO, H.; FUKUDA, Y.; DOHI, K.; KURATA, T. Human herpesvirus-6 infection i renal allografts: retrospective immuhistochemical study in Japanese recipients. **Transplantation Int**; 8 (3): 169-173, 1995.

ISEGAWA, Y; MUKAI, T; NAKANO, K; KAGAWA, M; CHEM, J.; MORI, Y., et al. Comparison of the complete DNA sequence of human herpesvirus 6 variant A and B. **Journal Virology**; 73(10): 8053-8063, 1999.

JONG, M.D.; GALASSO, G.J.; GAZZARD, B.; GRIFFITHS, P.D.; JABS, D.A.; KERN, E.R.; SPECTOR, A.S. Summary of the II International Symposium on Cytomegalovirus. **Antiviral Research**, 39:141-162, 1998.

KIKUTA, H.; NAKANE, A.; LU, I.I.; TAGUCHI, Y.; MINAGAWA, T.; MATSUMOTO, S. Interferon induction by human herpesvirus 6 in human mononuclear cells. **The Journal of Infect Disease**, 162(1): 35-38, 1990.

KNOX, K.K.; PIETRYGA, D.; HARRINGTON, D.J.; FRANCIOSE, R.; CARRIGAN, D.R. Progressive immunodeficiency and fatal pneumonitis associated with human herpesvirus 6 infection na infant. **Clinical Infect Disease**; 20(2): 406-413, 1995.

KONDO, K.; KONDO, T.; OKUNO, T.; TAKAHASHI, M.; YAMANISHI, K. Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages. **J Gen Virol**; 72(Pt6): 1401-1408, 1991.

KRUEGER, G.R., KOCH, B., LEYSSENS, N.; et al. Comparison of seroprevalences of human herpesvirus-6 and -7 in healthy blood donors from nine countries. **Vox Sanguinis**; 75: 193–197, 1998

LEACH, C.T.; SUMAYA, C.V.; BROW, N.A. Human herpesvirus 6: clinical implications of a recently discovered, ubiquitous agent. **Journal Pediatric**; 121:173-181, 1992.

LEVY, J.A., LANDAY, A.; LENNETTE, E.T. Human herpesvirus 6 inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication in cell culture. **Journal Clinical Microbiology**; 28: 2362–2364, 1990.

LJUNGMAN, P.; PLOTKIN, A. Workshop on CMV disease; Definition, clinical severity Sores, and new Syndromes. Scandinavian **Journal of Infectious Disease**, Suppl; 99: 87-89, 1995.

LOWANCE, D.; NEUMAYER, H.H.; LEGENDRE, C.M.; SQUIFFLET, J.P.; KOVARICK, J.; BRENNAN, P.J.; et al. Valacyclovir for the prevention of cytomegalovirus disease after renal transplantation. **N Engl J Med**; 340: 1462-1470, 1999.

LUSSO, P. & GALLO, R.C. Human herpesvirus 6 in AIDS. **Immunology Today**; 16: 67-71, 1995.

LUTZ, E.; WARD, K.N.; GRAY, J.J. Maturation of antibody avidity after primary human cytomegalovirus infection is delayed in immunosuppressed solid organ transplant patients. **Transplantation**; 44: 317-322, 1995.

MAYA, T.C. & AZULAY, D.R. Infecção pelo citomegalovirus In: LUPI, O.; SILVA, A.S.; PEREIRA J.R., AC. **Herpes- clínica, diagnóstico e tratamento**, 1º edição, Medsi Editora Médica e Científica Ltda. Cap. 8, p. 135-156, 2000.

MAZZALI, M.; LEITE, J.L.; SANTOS, R.L.S.; MANFRINATO, J.A.; ALVES FILHO, G.; WARD, L.S. Prevalence of herpes virus 6 (HHV6) infection in a group of brazilian renal transplant recipients. **Transplantation**; 78: (2-suppl), 492 (abstract), 2004

MAZZALI, M.; SANTOS R.L.S.; MANFRINATO, J.A.; QUADROS, K.R.S.; WARD, L.S.; ALVES FILHO, G. Co-infection with cytomegalovirus (CMV) and herpes 6 virus (HHV6) in renal transplant recipients. **J Am Soc Nephrol**; 14: (abstract issue), 428 A, 2003.

MC CULLERS, J.A.; LAKEMAN, F.D.; WHITLEY, R.J. Human herpesvirus 6 is associated with focal encephalitis. **Clinical Infectious Disease**; 21: 571-576, 1996.

MIRANDOLA, P.; MENEGAZZI, P.; MERIGHI, S.; RAVAIOLLI, T.; CASSAI, E.; DI LUCA, D. Temporal mapping of transcripts in herpesvirus 6 variants. **Journal Virology**; 72: 3837-3844, 1998.

MORRIS, D.J.; LITTLER, E., ARRAND, J.R.; JORDAN, D.; MALLICK, N.P.; JOHSON, R.W. Human herpesvirus 6, infection in renal transplant recipients (Letter). **N Engl J Med**; 320: 1560-1561, 1989.

MURRAY, B.M. Management of cytomegalovirus infection in solid-organ transplant recipients. **Immunological Investigations**; 26(1):243-255, 1997.

MUSTAFA, M.M. Cytomegalovirus infection in solid-organ transplant recipients. **The Pediatric Infectious Disease Journal**; 13(4): 249-257, 1994.

NAIMARK, D.M.J.; COLE, E. Determinants of long-term renal allograft survival. **Transplantation Review**; 8: 93, 1994.

NORDOY, I.; MULLER, F.; NORDAL, K.P.; ROLLAD, H.; LIEN, E.; AUKRUST, P.; FROLAND, S.S. Immunologic parameters as predictive factors of cytomegalovirus disease in renal allograft recipients, **J Infect Dis**; 180: 195–198, 1999.

NORDOY, I.; MULLER, F.; NORDAL, K.P.; ROLLAD, H.; LIEN, E.; AUKRUST, P.; FROLAND, S.S. The role of the tumour necrosis factor system and interleukin-10 during cytomegalovirus infection in renal transplant recipients, **J Infect Dis**; 181: 51–57, 2000.

OKUNO, T., TAKAHASHI, K., BALACHANDRA, K., SHIRAKI, K., YAMANISHI, K., TAKAHASHI, M.; BABA, K. Seroepidemiology of human herpesvirus 6 infection in normal children and adults. **Journal Clinical Microbiology**; 27: 651-653, 1989.

OKUNO, T.; HIGASHI, K., SHIRAKI, K.; YAMANISHI, K.; TAKAHASHI, M.; KOKODO, Y.; et al. Human herpesvirus 6 infection in renal transplant. **Transplantation**; 49: 519-522, 1990.

OSMAN, H.K.; PEIRIS, J.S.; TAYLOR, C.E.; WARWICKER, P.; JARRETT, R.F.; MADELEY, C.R. Cytomegalovirus disease in renal allograft recipients: is human herpes virus 7 a co-factor for disease progression? **J Med Virol** 48; 295-301, 1996.

PACSA, A S.; ESSA, S.; VOEVODIN A.; EL-SHAZLY A; KAZAK H; NAMPOORY M.R.N.; JOHNY, K.V.; SAID, T.; AL-NAKIB,W. Correlation between CMV genotypes, multiple infections with herpesviruses (HHV6,7) and development of CMV disease in kidney recipients in Kuwait. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**; 35: 125-130, 2003.

PELLEGRIN, I.; GARRIGUE, I.; EKOVEVI, D.; COUZI, L.; MERVILLE, P.; FLEURY, H. New molecular assays to predict occurrence of cytomegalovirus disease in renal transplant recipients. **The Journal of Infectious Disease**; 182: 36-42, 2000.

PLACHTER, B.; SINGZER, C.; JAHN, G. Cell Types involved in replication and distribution of human cytomegalovirus advances. **Virus Research**; 46: 195-261, 1996.

PORTELA, D.; PATEL, R.; LARSO-KELLER, J.J.; ILSTRUP, D.M.; WIESNER, R.H.; STREERS, J.L.; et al. OKT3 treatment for allograft rejection is a risk factor for cytomegalovirus disease in liver transplantation. **The Journal of Infectious Disease**; 171: 1014-1018, 1995.

POUTEIL-NOBLE, C.; ECHOCHARD, R.; LANDRIVON, G.; DONIAMAGED, A.; TARD, J.C.; BOSSHARD, S.; et al. Cytomegalovirus infection in etiological factor for rejection. **Transplantation**; 55(4): 851-857, 1993.

RATNAMOHAN, V.M.; CHAPMAN, J.; HOWSE, H.; BOVINGTON, K.; ROBERTSON, P.; BYTH, K.; et al. Cytomegalovirus and human herpesvirus 6 both cause disease renal transplantation. **Transplantation**; 66(7): 877-882, 1998.

SALAHUDDIN, SZ; ABLASHI, DV; MARKHAM, PD; STURZENEGGER, S; KAPLAN, M; et al. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. **Science**; 234(4776): 596-600, 1986.

SANTORO, F., KENNEDY, P. E., LOCATELLI, G., MALNATI, M. S., BERGER, E. A.; LUSSO, P. CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. **Cell**; 99: 817-827, 1999.

SANTOS, R.L.S.; QUADROS, K.R.S.; FILHO, G.A. Transplante renal e citomegalovirus. In: JENNER, C.. **Atualidades de Nefrologia** ed. Sarvier; 6: 369-372, 2000.

SAIKI, R.K.; SCHARF, S.J; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARHEIM, M. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequence and restriction site analyses for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, 230: 1350-1354, 1985

SAXINGER, C., POLESKY, H., EBY, N., GRUFFERMAN, S., MURPHY, R., TEGTMEIR, G., PAREKH, V., MEMON, S.; HUNG, C. Antibody reactivity with HBLV (HHV-6) in US populations. **J Virol Methods**; 21: 199-208, 1988.

SHIBATA, D.; MARTIN, W.J.; APPLEMAN, M.D.; CAUSEY, D.M.; LEEDOM, J.M.; ARNHEIM, N. Detection of cytomegalovirus DNA in peripheral blood of patients infected with Human Immunodeficiency Virus. **J Infect Dis**, 158: 1185-1192, 1988

SCHIEWE, U., NEIPEL, F., SCHREINER, D. & FLECKENSTEIN, B. Structure and transcription of an immediate-early region in the human herpesvirus 6 genome. **Journal Virology**; 68: 2978-2985, 1994.

SCHIMIDT, C.A.; WILBORN, F.; WEISS, K.; BRINKMAN, V.; OETTLE, H.; LOBMANN, R.; et al. A prospective study of human herpesvirus type 6 detected by polymerase chain reaction after liver transplantation. **Transplantation**; 61: 662-664, 1996

SCHROEDER, R.; MESKO, J.; SANTOS, E.; KEITEL, E.; BITTAR, A.; GARCIA, V.; NEUMANN, J. Cytomegalovirus antigenemia and renal function post-kidney-transplantation. **Transplantation Proceedings**; 31: 3027-3028, 1999.

SCHULMAN, L.L.; REISON, D.S.; AUSTIN J.H.M.; ROSE, E.A. Cytomegalovirus pneumonitis after cardiac transplantation. **Archives Intern Medical**; 151: 1118-1124, 1991.

SINGH, N.; CARRIGAN, D.R.; GAYWSKI, T.; SINGH, J.; MARINO, I.R.. Variant B human herpesvirus 6 associated febrile dermatosis with thrombocytopenia and encephalopathy in a liver transplant recipient. **Transplantation**; 60: 1355-1357, 1995.

SINGH, N.; CARRIGAN, D.R. Human herpesvirus 6 in transplantation: na emerging pathogen. **Annals of Internal Medicine**; 124(12): 1065-1071, 1996.

SINGH, N. Human herpesvirus-6, -7 and -8 in organ transplant recipients. **Clinical Microbiology Infect**; 6: 453-459, 2000.

STINSK, M.F. Cytomegalovirus and its replication. In: Fields, BN; Knipe, DM. **Virology**; 2 ed., New York, Raven Press Ltda, p. 1959-1980, 1990.

SUASSUNA, J.H.R.; LEITE, L.L.; VILELA, L.H. Prevalence of cytomegalovirus infection in different patient groups of an urban university in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**; 28: 105-108, 1995.

SUASSUNA, J.H.R.; MACHADO, R.D. Diagnósticos das infecções por citomegalovirus (CMV) em pacientes com deficiência imunológica. **Revista da Associação Médica Brasileira**; 38: 33-47, 1992.

TAMASHIRO, J.C.; HOCK, L.J.; SPECTOR, D.H. Construction of a cloned library of the EcoRI fragments from the human cytomegalovirus genome (strain AD169). **Journal Virology**; 42(2): 574-557, 1982.

THE, T.H.; VAN DER PLOEG, M.; VAN DER BERG; VLIEGER, A.M.; VAN DER GIESSEN, M.; VAN SON; W.J. Direct detection of cytomegalovirus in peripheral blood leucocytes. A review of antigenemia assay and polymerase chain reaction. **Transplantation**; 54: 193-198, 1992.

THE, T.H.; VANDER B.I.J.; VAN DER BERG; VAN DER GIESSEN, M.; WEITS, J.; SPRENGER, H.G.; VAN SON, W. Cytomegalovirus antigenemia. **Review Infectious Disease**; 12 (Suppl 7): 737-744, 1990.

VAN LOON, N.M., GUMMULURU, S., SHERWOOD, D.J., MARENTES, R., HALL, C.B.; DEWHURST, S. Direct sequence analysis of human herpesvirus 6 (HHV-6) sequences from infants and comparison of HHV-6 sequences from mother/infant pairs. **Clinical Infect Disease**; 21: 1017-1019, 1995.

WALTER, E.A.; GREENBERG, P.D.; GILBER, M.J. et al. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell from donor, **N Engl J Med**; 333: 1038-1044, 1995.

WELLER, T.H. Review: Cytomegalovirus: the difficult years. **Journal Infect Disease**; 122 (6): 532-539, 1970.

YAMANISHI, K. Human Herpesvirus 6: na Evolving Story. **Herpes**; 7(3):70-75, 2000.

YAMANISHI, K.; OKUNO, T., SHIRAKI, K.; TAKAHASHI, M.; KONDO, T.; ASANO, Y.; KURATA, T.; et al. Identification of human herpesvirus 6 as a causal agent for exanthem subitum. **The Lancet**; 1(8594): 1065-1067, 1988.

YASUKAWA, M., YAKUSHIJIN, Y., FURUKAWA, M.; FUJITA, S. Specificity analysis of human CD4+ T-cell clones directed against human herpesvirus 6 (HHV-6), HHV-7, and human cytomegalovirus. **Journal Virology**; 67: 6259-6264, 1993.

YOSHUKAWA, T.; SUGA, S.; ASANO, Y.; NAKASHIMA, T.; YAZAKI, T., ONO, Y.; et al. A prospective study of human herpesvirus 6 infection in renal transplantation. **Transplantation**; 54: 879-883, 1992.

ZAIA, J.A.; FORMAN, S.J. Cytomegalovirus infection in the bone marrow recipient. **Infect Dis Clin North Am**; 9: 879, 1995

ZAHORKY, J. *Roseola infantilitis*. **Pediatrics**, **22**: 60-64, 1910

9 - ANEXOS

TAMPÃO TKM1

10mM TRIZ-HCl pH 7,6

10mM KCl

10 mM MgCl₂

20 mM EDTA

Diluído em água bi-destilada

TAMPÃO TKM2

10mM TRIZ-HCl pH 7,6

10mM KCl

0,4 M NaCl

10 mM MgCl₂

20 mM EDTA

Diluído em água bi-destilada

Pacientes com todas as amostras negativas para HHV6

Paciente nº 5	Data Tx: 11/08/99							
Datas	C	L	Plq.	AST	ALT	CMV	HHV6	
							R- 1	R- 2
22/09/99 (+42)	1,63	8140	191000	16	40	-	-	-
07/12/99 (+118)	1,4	6080	147000	17	28	+	-	-
12/01/00 (+154)	1,54	5660	185000	18	30	-	-	-
1 ano 14/08/00	1,65	5190		18	30			
3 anos 03/09/02	1,77	5370	170000	22	34			
Atual 10/11/04	1,55	5610	187000	25	35			

Paciente nº 11	Data Tx: 05/11/99							
Datas	C	L	Plq.	AST	ALT	CMV	HHV6	
							R- 1	R- 2
07/12/99 (+26)	0,74	15100		15	15	-	-	-
25/01/00 (+75)	0,68	13100				+	-	-
04/04/00 (+139)	0,89	9820		13	09	-	-	-
1 ano 05/12/99	0,78	10800	204000	16	09			
3 anos 12/11/02	1,06	12670		11	11			
Atual 03/03/05	0,82	10420	229000	19	11			

Paciente nº 13	Data Tx: 07/12/99							
Datas	C	L	Plq.	AST	ALT	CMV	HHV6	
							R-1	R-2
25/01/00 (+49)	0,96	11040	242000	13	17	-	-	-
15/03/00 (+99)	1,12	7120	270000	09	06	+	-	-
12/04/00 (+127)	1,32	6240	246000	14	13	-	-	-
1 ano 11/12/00	1,1	7230	23700	14	13			
3 anos 23/10/02	1,62	6310		14	12			
Atual 19/11/04	1,39	6300	244000	16	19			

Paciente nº 14	Data Tx: 08/02/00							
Datas	C	L	Plq.	AST	ALT	CMV	HHV6	
							R- 1	R- 2
01/03/00 (+22)	1,71	3460	266000	19	17	-	-	-
27/03/00 (+48)	1,23	4000		23	25	+	-	-
03/04/00 (+55)	1,08	4470		18	23	-	-	-
1 ano 20/02/01	1,55	6970	133000	34	14			
3 anos 12/03/03	1,38	6700		15	19			
Atual 13/12/04	1,24	8840	190000	15	13			

Paciente nº 28	Data Tx: 27/07/00							
Datas	C	L	Plq.	AST	ALT	CMV	HHV6	
							R- 1	R- 2
03/08/00 (+7)	8,7	5310	153000	10	03	-	-	-
09/08/00 Bx NTA								
22/08/00 (+26)	3,5	4930	162000	12	06	+	-	-
02/10/00 (+65)	1,29	7340		18	15	-	-	-
1 ano 08/08/01	1,7	5410		20	19			
3 anos 01/08/03	1,36	6720	209000	18	12			
Atual 18/10/04	1,44	6820	207000	22	21			

Pacientes com PCR positiva para HHV6 antecedendo a PCR para HCMV

Paciente nº 1	Data Tx: 08/06/99							
Datas	C	L	Plq.	AST	ALT	CMV	HHV6	
							R- 1	R- 2
11/08/99 (+64)	0,98	9500	297000	15	12	-	+	+
29/09/99 (+113)	1,04	6460	290000	11	10	+	+	+
29/11/99 (+174)	1,32	6860	280000	10	09	-	+	+
1 ano 07/00	1,46	5780	216000	10	17			
3 anos 07/02	1,81	10610	190000					
Atual 21/01/05	1,27	8840	241000	23	31			

Paciente nº 2	DataTx: 26/06/99							
Datas	C	L	Plq.	AST	ALT	CMV	HHV6	
							R- 1	R- 2
08/07/99 (+12)	10,87	7860	233000	22	09	+	+	+
08/07/99 Bx NTA + RCA (leve/moderada)								
19/07/99 Bx NTA + hemáceas em intertiscio + infiltrado linfocitário								
17/08/99 (+52)	1,33	7400	193000	36	18	+	-	-
21/09/99 (+87)	1,66	8390	218000			-	+	+
13/10/99 Ganciclovir IV								
1 ano 17/07/00	2,08	8640	230000	18	15			
3 anos 17/06/02	1,53	6870	177000					
06/10/04 Bx NTA + RCA Banf II + nefropatia crônica do enxerto								
Atual 01/04/05	2,6	7820	288000					

Paciente n° 3	Data Tx:26/06/99							
Datas	C	L	Plq.	AST	ALT	CMV	HHV6	
							R- 1	R- 2
13/07/99 Bx NTA + RCA								
22/07/99 (+26)	6,7	6890	198000	35	82	-	+	+
05/08/99 Bx NTA + Febre								
10/08/99 (+45)	2,79	4750	129000	13	04	+	-	-
5/10/99 (+101)	1,47	7650	190000	19	09	-	+	+
1 ano 06/00	2,33	6130	19300	23	13			
3 anos 10/06/02	3,58	5340		17	09			
Perda progressiva da função renal								

Paciente nº 7	Data Tx: 22/08/99							
Datas	C	L	Plq.	AST	ALT	CMV	HHV6	
							R- 1	R- 2
31/08/99 (+9)	9,9	8540	118000	02	15	-	+	+
31/08/99 RCA Banf II								
21/09/99 (+30)	7,56	5940	132000	36	19	+	+	-
21/09/99 Bx NTA								
24/09/99 Suspendeu Aza por leucopenia								
22/11/99 (+92)	1,55	10600	138000	11	27	-	+	+
1 ano 09/00	1,81	13700	163000	17	13			
3 anos 05/02	1,25	12750	171000	15	15			
Atual 03/05	1,66	11090	160000	14	12			

Paciente nº 8	Data Tx: 21/09/99							
Datas	C	L	Plq.	AST	ALT	CMV	HHV6	
							R-1	R-2
30/09/99 (+09)	1,26	12900	252000	13	16	-	+	-
16/11/99 (+52)	1,22	2110	149000	43	23	+	+	+
07/12/99 (+73)	1,81	4270	122000	2,5	14	-	-	+
1 ano 02/10/00	1,83	10300	180000	16	09			
3 anos 16/09/02	2,4	11910	166000	18	09			
Atual 15/10/04	4,52	7240	249000	13	10			
IgG/IgM (CMV) negativos no pré-tx Profilaxia com Ganciclovir IV								

Paciente nº12	Data Tx: 15/02/00							
Datas	C	L	Plq.	AST	ALT	CMV	HHV6	
							R- 1	R- 2
27/03/00 (+41)	0,97	8350	478000	15	21	+	+	-
09/05/00 (+84)	1,42	4800		13	14	+	+	+
23/05/00 Herpes Zoster								
29/05/00 (+104)	1,3	3910	358000	13	12	-	-	-
29/05/00 Aciclovir + Ganciclovir IV								
1 ano 13/02/01	2,1	11320	300000	11	19			
29/06/01 Bx Nefropatia crônica do enxerto								
3 anos 03/04/03	2,95	4570	205000	16	25			
Atual 13/10/05	2,18	10610	306000	19	19			

Paciente nº18	Data Tx:28/04/00							
Datas	C	L	Plq.	AST	ALT	CMV	HHV6	
							R- 1	R- 2
09/05/00 (+13)	6	9580	146000	15	01	-	+	-
09/05/00 Bx NTA + RCA borderline								
23/05/00 (+27)	4,5	6980	206000	11	05	+	+	-
06/09/00 (+131)	0,9	6640	171000			-	+	+
1 ano 13/06/01	1,15	10800	204000	11	17			
3 anos 16/04/03	1,17	6280		26	28			
Atual 17/12/04	1,19	5680	144000	46	54			

Paciente nº 21	Data Tx:01/08/00							
Datas	C	L	Plq.	AST	ALT	CMV	HHV6	
							R- 1	R- 2
08/08/00 (+7)	1,72	16050	251000	27	13	-	+	-
22/08/00 (+21)	2,2	16710	577000	19	14	+	+	-
05/09/00 (+34)	1,05	10980	304000			-	+	-
1 ano 09/01	1,22	11960		35	34			
3 anos 09/03	1,26	9810		30	33			
Atual 24/01/05	1,34	14240	273000	20	20			

Paciente nº 24	Data Tx:26/07/00							
Datas	C	L	Plq.	AST	ALT	CMV	HHV6	
							R- 1	R-2
15/08/00 (+19)	4,41	4910	270000	19	12	-	-	+
24/08/00 Bx NTA Banf I								
03/09/00 Ganciclovir IV								
05/09/00 (+40)	1,54	5290	240000	15	26	+	-	+
23/10/00 (+87)	1,29	9160	242000	13	14	+	-	-
1 ano 24/07/01	2,0	8770		15	13			
3 anos 21/07/03	1,73	6160	225000	17	14			
Atual 04/02/05	1,69	5780	252000	18	68			

Pacientes com PCR positiva para HHV6 concomitante a PCR para HCMV

Paciente n ° 4	Data Tx: 13/07/99							
Datas	C	L	Plq.	AST	ALT	CMV	HHV6	
							R- 1	R- 2
09/08/99 (+27)	0,9	13300	223000	13	10	-	-	-
24/08/99 (+42)	0,94	11000	143000	16	10	+	+	+
24/08/99 Antigenemia positiva								
03/09/99 Ganciclovir IV								
21/09/99 (+70)	0,8	6880	166000	24	45	-	+	+
1 ano 06/00	1,6	4610	330000					
20/03/02 Bx NTA + nefropatia crônica do enxerto								
3 anos 22/07/02	2,04	12470	193000	14	15			
Atual 21/01/05	1,61	11530	185000	17	15			
IgG/IgM (CMV) negativo no pré-transplante Fez profilaxia com ganciclovir IV								

Paciente nº 6	Data Tx: 11/08/99							
Datas	C	L	Plq.	AST	ALT	CMV	HHV6	
							R- 1	R- 2
26/08/99 (+15)	2,69	9470	278000	19	22	-	-	-
08/09/99 (+28)	1,48	6000	192000	19	29	+	+	-
26/10/99 (+76)	1,36	7460	186000	13	11	-	-	+
02/12/99 Bx Nefrotoxicidade por Ciclosporina								
02/08/02 Bx Banf II-III Hemodiálise								
1 ano 03/08/00	5,92	7011	143000					
Perdeu Nefropatia								

Paciente nº 14	Data Tx:30/03/00							
Datas	C	L	Plq.	AST	ALT	CMV	HHV6	
							R- 1	R- 2
06/04/00 (+07)	3,59	8920	160000	16	02	-	-	-
15/04/00 Ganciclovir por Leucopenia								
18/04/00 (+19)	2,25	1180	27000	17	37	+	+	-
18/04/00 Antigenemia positiva								
02/05/00 (+33)	1,1	4550	288000	13	16	-	-	-
1 ano 27/03/01	1,2	5700	221000	15	09			
3 anos 10/03/03	2,14	5610	263000	22	09			
Atual 19/01/05	2,3	7380	311000	17	11			

Paciente nº 17	Data Tx: 17/04/00							
Datas	C	L	Plq.	AST	ALT	CMV	HHV6	
							R- 1	R- 2
25/04/00 (+08)	7,66	9890	164000	25	03	-	-	-
09/05/00 (+22)	1,42	10670	195000	15	15	+	-	+
08/06/00 (+52)	1,02	8000	155000	14	18	-	+	+
1 ano 03/01	1,45	6320	193000	22	20			
3 anos 28/05/03	1,6	6140	211000	20	09			
Atual 26/01/05	1,5	9560	208000	20	15			

Paciente nº19	Data Tx: 05/06/00							
Datas	C	L	Plq.	AST	ALT	CMV	HHV6	
							R- 1	R- 2
03/07/00 Leucopenia								
31/07/00 (+57)	1,85	6960	142000	23	42	-	-	-
29/08/00 (+86)	1,3	4210		14	15	+	+	+
09/10/00 (+107)	1,06	4290		19	21	-	-	-
06/11/00 Leucopenia								
1 ano 08/01	1,34	8530	161000	22	25			
3 anos 05/03	0,9	6850	215000	24	26			
Atual 29/11/04	0,87	8160	218000	21	17			

Paciente nº 20	Data Tx: 30/06/00							
Datas	C	L	Plq.	AST	ALT	CMV	HHV6	
							R- 1	R- 2
09/08/00 (+41)	2,1	4340	137000	58	104	-	-	-
09/08/00 Ganciclovir IV								
11/08/00 Leucopenia								
06/09/00 (+69)	1,17	9990	178000	29	29	+	+	+
25/10/00 (+118)	1,23	12730	153000	22	28	-	-	-
1 ano 04/07/01	1,7	8900	167000	21	24			
3 anos 13/08/03	1,52	11150	156000	24	23			
Atual 15/10/04	1,46	8150	147000	16	17			

Paciente nº 22	Data Tx: 01/08/00							
Datas	C	L	Plq.	AST	ALT	CMV	HHV6	
							R- 1	R- 2
03/08/00 (+2)	3,22	14270	206000	16	12	-	-	-
15/08/00 (+14)	1,19	14060	518000	10	13	+	+	+
05/09/00 (+35)	0,78	9930	316000	28	48	-	-	-
1 ano 07/01	1,2	6370	276000	15	20			
3 anos 07/03	0,99	5580	312000					
Atual 03/12/04	1,02	6470	317000	16	14			

Paciente nº 25	Data Tx:18/08/00							
Datas	C	L	Plq.	AST	ALT	CMV	HHV6	
							R- 1	R- 2
22/08/00 (+4)	4,72	6300	165000	08	05	-	-	-
13/09/00 (+26)	1,15	8810	336000	26	42	+	-	+
11/10/00 (+54)	1,08	5610	279000	15	13	-	+	+
1 ano 25/09/01	1,26	6850	277000	14	11			
3 anos 05/2003 RCA perdeu								

Pacientes com PCR positiva para HHV6 posteriormente a PCR para HCMV

Paciente nº 15	Data Tx:29/03/00							
Datas	C	L	Plq.	AST	ALT	CMV	HHV6	
							R- 1	R- 2
31/03/00 (+02)	5,9	12500	128000	30	57	-	-	-
14/04/00 Bx RCA banf III								
18/04/00 (+20)	3,4	10980	199000	27	34	+	-	-
18/04/00 Antigenemia positiva								
21/04/00 Bx RCA Banf I tubulite sem vasculite + NTA								
23/04/00 Ganciclovir								
09/05/00 (+41)	1,3	7470	200000	26	11	-	+	-
15/03/01 Bx RCA + Nefropatia crônica do enxerto								
1 ano 28/03/01	1,93	19820	245000	13	30			
3 anos 18/03/03	3,2	5940	20000	14	07			
24/04/03 Bx Nefropatia + RCA banf II-III + NTA								
Atual 20/02/04	5,8	9060	161000	22	14			

Paciente nº 16	Data Tx: 07/04/00							
Datas	C	L	Plq.	AST	ALT	CMV	HHV6	
							R- 1	R- 2
14/04/00 Leucopenia								
18/04/00 (+11)	12,11	6260	216000	15	05	-	-	-
16/05/00 (+39)	2,52	5760	205000	10	14	+	-	-
13/06/00 (+67)	2,24	6120				-	+	+
1 ano 21/03/01	2,1	4870	212000	15	26			
3 anos 18/03/03	3,05	7190	236000	15	14			
17/11/04 Bx NTA + Nefropatia crônica do enxerto								
Atual 12/01/05	3,69	8420	262000	11	11			