

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS. INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS. PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

AURORA DEL CARMEN ROSELL SORIA

COINFECÇÃO VIRAL COMO ELEMENTO IMUNOMODULATÓRIO NA TUBERCULOSE PULMONAR

AURORA DEL CARMEN ROSELL SORIA

COINFECÇÃO VIRAL COMO ELEMENTO IMUNOMODULATÓRIO NA TUBERCULOSE PULMONAR

Tese apresentada ao Programa Multiinstitucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Amazonas, como requisito necessário para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho Co-orientador: Luiz Fernando de Souza Passos Soria, Aurora Del Carmen Rosell

Coinfecção viral como elemento imunomodulatório na tuberculose pulmonar / Aurora Dell Carmen Rosell Soria. 2015 93 f.: il.; 31 cm.

Orientadora: Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho Coorientador: Luiz Fernando de Souza Passos Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

C /

1. Tuberculose. 2. Citomegalovírus. 3. Epstein-Barr. 4. Contatos. I. Filho, Dr. Spartaco Astolfi. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

AURORA DEL CARMEN ROSELL SORIA

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, como requisito necessário para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia julgada pela Comissão composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA:

Presidente da Banca Professor Doutor Spartaco Astolfi Filho Membro da Banca Professor Doutor Aristóteles Comte de Alencar Filho Membro da Banca Professora Doutora Rosany Piccolotto Carvalho Membro da Banca Professor Doutor Carlos Gustavo Nunes da Silva Membro da Banca Professora Doutora Sônia Maria da Silva Carvalho

A comissão julgadora considerou: Local da Defesa: Auditório de Biotecnologia, Bloco Mini Campus, UFAM.

DEDICO:

- Ao meu pai Jorge Alberto Rosell Sandumbi, In memoriam, pelo amor dedicado aos filhos e pela ousadia, coragem e bravura de desvendar novos horizontes, trilha traçada por ele que me fez chegar até aqui.
- A Maria da Conceição Farias Rosell, In memoriam, pelo acolhimento, apoio incondicional e carinho que sempre me ofereceu.
- A Maria de Jesus de Oliveira de Negreiros, In memoriam, sogra e segunda mãe, muito carinhosa, que com seu cuidado e amor sempre me ajudou na criação e orientação de meus filhos.
- A minha mãe que se fazendo presente na distância com toda sua simplicidade que lhe é peculiar, pelo amor, carinho e apoio que me oferece no acompanhamento de meus filhos.
- As minhas noras e sobrinhos queridos, que concretamente vieram aumentar a minha família.
- Ao meu marido, Robson Miguel de Araújo Negreiros, que, de uma forma discreta e tranquila, tem sido a rocha que alicerça nossa família.
- Robson, Leonardo, Miguel, Suzana e Daniel, filhos que Deus me concedeu que muito amo em minha vida e me levaram ao orgulho e felicidade para continuar buscando novos horizontes.
- Aos meus netos Leonardo e Robson Neto, que durante o desenvolvimento deste projeto vieram ao mundo, trazendo felicidade para o meu coração e para a minha família; agradeço a Deus a bênção de poder receber este sentimento indescritível e grandioso de ser avó e mãe duas vezes.

AGRADECIMENTO ESPECIAL:

"Agradeço a Deus por sua presença constante em minha vida, guiando todos os meus passos, colocando pessoas que me apoiaram, dando-me forças para superar os obstáculos e concedendo-me paz para não perder a esperança no cuidado do ser humano, condição fundamental para a construção de um mundo mais justo e fraterno".

Aos pacientes que complacentemente aceitaram participar desta pesquisa e trazer junto com eles o seu contato, filho, filha, mãe, pai, marido, mulher, companheiro e companheira.

AGRADEÇO:

À Professora Doutora Cristina Maria Borborema dos Santos, por estar sempre apoiando e acreditando na capacidade de poder desenvolver e concluir este trabalho.

Ao Professor Doutor Luís Fernando Passos, pelo agraciamento deste projeto de sua autoria, mentor co-orientador, incentivador, sonhador, grande e respeitado profissional que esteve presente em todos os momentos.

Ao Instituto Leônidas e Maria Deane - FIOCRUZ/Amazônia, pela aceitação de desenvolver as técnicas utilizadas neste trabalho.

Ao Dr. Felipe Gomes Naveca, pelo apoio e abertura das portas do Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Leônidas e Maria Deane- FIOCRUZ/Amazônia e pela tecnologia desenvolvida que possibilitou a realização deste estudo.

Ao mestre George Villa Rouco, pelo apoio na aplicação das técnicas laboratoriais no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Leônidas e Maria Deane-FIOCRUZ/Amazônia.

À Dra. Irineide Antunes, diretora da Policlínica Cardoso Fontes, pela possibilidade de desenvolver esta pesquisa nessa unidade de referência de saúde.

Aos funcionários da Policlínica Cardoso Fontes, em particular à Izete da Silva Sales, Maria da Conceição da Silva e Maria da Conceição, técnicas de patologia clínica que contribuíram muito na colheita e manuseio do material para a efetivação deste trabalho.

À Dra. Marlucia da Silva Garrido, enfermeira que muito admiro; coordenadora do Programa Estadual do Controle da Tuberculose do Amazonas pela contribuição na localização dos pacientes e orientações e por aceitar participar da banca de defesa.

Ao Superintendente do Hospital Universitário Getúlio Vargas, Dr. Rubem Alves Júnior, pela colaboração e compreensão nas ausências necessárias.

À Universidade Federal do Amazonas, através do Programa Multi-Institucional de Pósgraduação em Biotecnologia, pela oportunidade de minha qualificação.

A minha amiga Celia Carvalho, pelos momentos de compreensão em situações tensas vividas neste processo.

Ao Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade, pela tranquilidade sábia na sua orientação e encaminhamento como professor e coordenador do Programa- P.P.G.Biotec, que possibilitou a efetivação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho, grande professor e cientista pela coragem e visão na área de biotecnologia no nosso estado e país.

Ao Prof. Dr. João Bosco Lopes Botelho, grande amigo, ao qual muito respeito e admiro, pela confiança e perseverança, que aceitou compor a banca de defesa deste trabalho.

Ao Professor Doutor Aristóteles Comte de Alencar Filho, por aceitar compor a banca de defesa deste trabalho e a confiança incondicional depositada em mim.

Ao Professor Carlos Gustavo Nunes da Silva, pelo apoio como coordenador do Programa P.P.G. Biotec.

À Professora Doutora Sonia Maria da Silva Carvalho, por aceitar compor a banca de defesa desta tese.

À Professora Doutora Rosany Piccolotto Carvalho, por aceitar fazer parte da banca de defesa deste trabalho.

À Fundação de Apoio e Pesquisa da Amazônia- FAPEAM, pelo financiamento deste projeto.

À Companhia de Jesus - Jesuítas Amazônia/ Manaus, na pessoa do Pe. Anselmo Dias diretor do ECOAR, pelo apoio espiritual.

A consciência é meu guia. A paz é meu abrigo. A experiência é minha escola. O obstáculo é minha lição.

Chico Xavier

RESUMO

SORIA, Aurora Del Carmen Rosell. **Coinfecção viral como elemento imunomodulatório na tuberculose pulmonar.** Orientador: Dr. Spartaco Astolfi Filho. Manaus: UFAM, 2015. Tese (Doutorado em Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia).

A tuberculose se investe na atualidade de grande importância sanitária devido a sua alta prevalência e letalidade. Possui resistência e acomete grupos populacionais vulneráveis. O citomegalovírus (CMV) e o vírus Epstein Barr (EBV), após a aquisição inicial, são capazes de estabelecer latência nos tecidos, provocando efeitos modulatórios no sistema imune, podendo proteger de infecções intercorrentes, mas favorecendo o câncer e a autoimunidade em indivíduos com o background genético favorável. O presente trabalho é um estudo de caso controle com o objetivo de verificar se a coinfecção viral pelo EBV e CMV influencia no aparecimento da Tuberculose (TB). Procedeu-se à sorologia IgG e IgM para EBV e CMV, e à pesquisa do genoma viral por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real no plasma de pacientes com TB e controles (indivíduos que tiveram contacto intradomiciliar com casos index de tuberculose). Participaram 68 pacientes com idade entre 18 a 36 anos e 56 controles pareados. Observou-se que 100% de casos e controles eram IgG positivos para EBV; 100% de casos e 96,4% de controles eram IgG positivos para o CMV, portanto, nessa pequena amostragem transversal, confirmou-se a alta prevalência da infecção pelo EBV e CMV, mas, não se observou associação entre a infecção/latência dos vírus e a ocorrência de tuberculose. Verificou-se baixa presença do genoma viral no plasma: 7 ocorrências nos casos (10,3%) e 9 ocorrências nos controles (16,1%). Apesar da diferença numérica, talvez mostrando uma tendência, não houve significância estatística. É muito importante a continuidade do estudo, desta feita em uma coorte longitudinal de indivíduos expostos (contactantes domiciliares), com maior "n" amostral, e faixa etária populacional menor, que comporte maior prevalência de expostos soronegativos para o EBV e CMV, permitindo observar contraste com expostos seropositivos.

Palavras-chave: Tuberculose. Citomegalovírus. Epstein-Barr. Contatos.

ABSTRACT

SORIA, Aurora Del Carmen Rosell. **Viral coinfection how immunomodulatory element in pulmonary tuberculosis.** Advisor: Dr. Spartaco Astolfi Filho. Manaus: UFAM, 2015. Thesis (Doctorate in Multi- institutional Program of Post -graduate in Biotechnology).

Tuberculosis demands today great sanitary importance due to it's high prevalence and lethality. It possesses antimicrobial resistance and hits vulnerable populational groups. The Cytomegalovirus (CMV) and the Epstein-Barr virus (EBV), after initial exposure, are capable of establishing latency in the tissues, causing modulatory effects on the immune system, allowing protection against intercurrent infections, but enabling cancer and autoimmunity in individuals with a favorable genetic backround. This work is a controlled case study aiming to verify if the viral co-infection by EBV and CMV have any influence on the onset of Tuberculosis (TB). IgG and IgM serology were carried out for EBV and CMV, also viral genome research through the Polymerase Chain Reaction technique in real time on the plasma of TB patients, and controls (subjects that had interdomiciiary contact with index cases of TB). 68 patients participated, ages ranging from 18 to 36 years and 56 paired controls. It was observed that 100% of cases and controls had positive IgG for EBV; and that 100% of cases and 96,4% of controls were IgG positive for CMV. Therefore, in that small transversal sampling the high prevalence of infection by EBV and CMV was confirmed, but not an association between the infection/latency of the viruses and the occurrence of TB. Low presence of the viral genome on the plasma was verified: 7 occurrences in the cases (10,3%) and 9 in the controls (16,1%). Despite the numerical difference, maybe highliting a tendency, there was no statistical significance. It is important that this study continues, in this way, in a longitudinal cohort of exposed individuals (home infected), with higher "n" sampling, and a smaller populational age range, that houses more prevalence of seronegatives exposed to EBV and CMV, allowing observation of the contrast with seropositives.

Keywords: Tuberculosis. Cytomegalovirus. Epstein-Barr. Contacts.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Características imunológicas de latência herpesvírus	33
Figura 2 – Resultados de Pesquisa em indivívuos com HBV	35
Figura 3 - Ciclo viral do CMV.	40
Figura 4 - Sorologias para CMV no HUGV em 2012	41
Figura 5 - Fluxograma clínico.	49
Figura 6 - Amplificação viral na concepção do plasmídeo e de ß Actina	51
Figura 7 - Ciclo curva padrão	53
Figura 8 - Curva padrão para Actina ß.	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características dos primers e sondas utilizados em PCR em tempo real	52
Tabela 2 - Características demográficas de casos e contatos.	56
Tabela 3 - Desenlace Primário - Sorologia	56
Tabela 4 - Presença de DNA Viral.	57
Tabela 5 - Quantificação de DNA do vírus EVB.	57

LISTA DE QUADROS

Quadro	1	-	Famílias	do	Herpesviridae -	_	Soroprevalência	/	Doenças	associadas	ao
		h	ospedeiro i	mur	ocompetente						31
Quadro	2 -	Fa	amília <i>herp</i>	esvi	ridae – Alvos de	cé	lulas líticas / late	nte	es		32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAN Anticorpo Antinuclear

AIDS Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

BAAR Bacilo Álcool Ácido Resistente

BCG Bacilo Calmette-Guerin

C'2 Marcador de superfície de célula T

C'4 Marcador de superfície de célula T

CD Marcador de superfície de célula T

CMV Citomegalovírus

CMPS Células Mononucleadas do Sangue Periférico

DC Célula Dendrítica

DNA Ácido Desoxirribonucleico

DOT Tratamento Diretamente Observado

DPOC Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

EBV Epstein-Barr Vírus

EDTA Ácido Etileno Diamino Tetra-Acético

EI Eritema Infeccioso

ELISA Enzime Linked Immuno Sorbent Assay

FAN Fator Antinúcleo

FVS Fundação de Vigilância em Saúde

HCMV Citomegalovírus humanos

HHV Herpes Vírus Humano

HIV Vírus da Imunodeficiência Humana

HLA Human Leucocyte Antigens

HSV Vírus do Herpes Simples

IFN Interferon

IgG Imunoglobulina G

IgM Imunoglobulina M

IFI Imunoflorescência Indireta

IL Interleucina

INN-Y Interferon gama

KSHV Vírus Herpez Kaposi associada ao Sarcoma

LES Lúpus Eritematoso Sistemático

MHC Complexo Principal de Histocompatibilidade

MI Mononucleose Infecciosa

MIC Concentração Inibidora em Meio Líquido

MNT Micobactéria Neo Tuberculosas

MS Esclerose múltipla

NK Células Exterminadoras Naturais

NO Óxido Nítrico

OMS/WHO Organização Mundial da Saúde

PPD Teste de Mantoux ou Teste Tuberculínico

PNCT Programa Nacional de Controle à Tuberculose

PCR Chain Reaction of Polimerase

RNA Ácido Ribonucleico

RNAm RNA Mensageiro

SIDA Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

SIMAN Sistema de Agravos de Notificação

SNC Sistema Nervoso Central

SUS Sistema Único de Saúde

TAC Crise Aplástica Transitória

TAP Tranportadoras associadas ao processamento antigênico

TB Tuberculose

TCLE Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TIF Técnica de Imunoflorescência

TR Linfócito T Auxiliar

VP1 Proteínas estruturais

VP2 Proteínas estruturais

VZV Vírus Varicela Zoster

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Hipótese	18
1.2	Objetivos	18
1.2.1	Geral	18
1.2.2	Específicos	18
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	A tuberculose	19
2.1.1	Etiopatogenia	20
2.1.2	Imunopatogenia	20
2.1.3	Manifestações clínicas	24
2.1.4	Epidemiologia	25
2.1.5	Diagnóstico	26
2.2	Vírus Elementos Imunomodulatórios	28
2.2.1	HIV/TB Coinfecção	30
2.3	Imuno modulação durante infecção latente do herpesvírus	31
2.3.1	Características imunológicas de latência herpesvírus	33
2.3.2	Populações de linfócitos durante latência dos herpesvírus	34
2.3.3	Compartimento T expandido e altamente funcional em EBV e CMV	34
2.3.4	A transcrição imunológica da latência do herpesvírus: pistas a partir de mod camundongo	
2.3.5	A latência do herpesvírus modula imunidade a outros patógenos	
2.3.6	A inflação de células de memória HCMV - específicas como cofator na sene imune	scência
2.3.7	Herpesvírus latência como cofator em doenças inflamatórias humanas	
2.3.8	EBV, lúpus eritematoso sistêmico e esclerose múltipla	
2.3.9	Aterosclerose e CMV	
	Herpesvírus e câncer: uma hipótese	
2.4	Citomegalovírus	
2.4.1	Etiopatogenia	
2.4.2	Epidemiologia	
2.4.3	Manifestações clínicas	
2.4.4	Diagnóstico	
2.5	Vírus Epstein Barr	
2.5.1	Etiopatogenia	
2.5.2	Epidemiologia	45
2.5.3	Manifestações clínicas	
2.5.4	Diagnóstico	
3	METODOLOGIA	48
3.1	População do estudo	48
3.1.1	Critérios de Inclusão	50

3.1.2	Critérios de Exclusão	50
3.2	Exames laboratoriais	50
3.2.1	Material Biológico	50
3.2.2	Extração do DNA	51
3.2.3	Desenho e elaboração de oligonucletídeos iniciadores	51
3.2.4	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) - Tempo Real	
3.2.5	Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	54
3.2.6	Análise estatística	54
4	RESULTADOS	56
4.1	Dados demográficos de pacientes e contatos	56
5	DISCUSSÃO	
6	CONCLUSÕES	65
	REFERÊNCIAS	66
	OBRAS CONSULTADAS	
	ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e esclarecido	
	ANEXO B – FORMULÁRIO DE PESQUISA DA TUBERCULOSE	
	ANEXO C – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	

1 INTRODUÇÃO

Quase todos os seres humanos no momento em que chegam à adolescência são infectados por vários vírus de herpes, sendo que a infecção pelo herpesvírus é perpetuado durante toda a vida do hospedeiro (HADINOTO et al, 2009).

A família *herpesvirideae*, de acordo com Hadinoto (2009), é composta por: Vírus Herpes Simples 1 e 2 (HSV1 e HSV2), Vírus Varicela Zoster (VZV), Epstein Barr (EBV), Citomegalovírus Humano (HCMV), Herpesvírus Humano 6 e 7 (HHV6 e HHV7) e Herpesvírus associado ao Sarcoma de Kaposi (KSHV). Estes vírus são divididos em três subfamílias (α, β e Υ), com base em similaridade biológica e genética.

A replicação viral lítica a qual domina a infecção aguda tem lugar inicialmente em superfícies epiteliais e é controlada pela resposta imune adaptativa.

A latência ao nível molecular do herpesvírus é caracterizada pela presença do genoma viral no núcleo da célula infectada, sob a forma de epissoma, de difícil detecção pelos métodos clássicos de identificação, sendo somente identificada através da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) de alta sensibilidade, na expressão mínima do gene viral. A latência do EBV ocorre em linfócitos B de memória CD4+, e do CMV em células epiteliais, incluindo mucosas aéreas e túbulos renais.

Ainda conforme Hadinoto (2009), Tronstein (2011) e Ling (2003), o baixo nível de eventos de reativação viral clinicamente silenciosas que estimulam uma resposta imune em curso, são agora conhecidos por persistir na latência, apesar da ausência de sintomas.

As células de memória não ficam dormentes, encontram-se em constante reativação viral e ativos pelo sistema imune.

Apesar da ausência de doença clínica visível, a latência do vírus do herpes sofre um período de interação contínua e intensa entre o vírus e o hospedeiro, que resulta na produção de células altamente funcionais CD4+ e CD8+ que é mantida durante toda a vida (DECMAN et al. 2005).

Durante a latência clínica, aproximadamente de 10 a 20% das células de memória TCD4+ e CD8+ ficam em circulação em adultos saudáveis e específico para os antígenos de CMVH (MOSS; KHAN, 2004).

De acordo com Sandalova (2010), as células EBV e CMV T CD8+ específico contribuem para a expansão da T CD8+ ativada. Em pesquisa realizada pelo mesmo autor em 50 pacientes com HBV, resultou em que, gripe, adenovírus agudo, identificaram expansão,

ativação e herpes específico mediado por IL-15. O CD8 herpes específico produz genoma IFN ativação / by stander.

Há evidências em modelos murinos que a latência de herpesvírus proporciona proteção a infecções intercorrentes por *Listeria monocytogenes* e *Yersinia pestis* (BARTON; WHITE; BERD, 2012).

Pouco se sabe sobre os benefícios potenciais da latência do herpesvírus em seres humanos, em vista dos estudos terem sido realizados em animais.

Sendo assim, esta tese tem como propósito verificar se a coinfecção pelo Vírus Epstein Barr (EBV) e Citomegalovírus (CMV) influenciam no aparecimento da tuberculose pulmonar em pacientes e contatos diagnosticados com tuberculose.

1.1 Hipótese

Caso a latência viral confira proteção, a presença do EBV e CMV em contactantes de TB assintomáticos seria maior do que em pacientes.

1.2 Objetivos

1.2.1 Geral

 Avaliar se a coinfecção de seres humanos pelo vírus Epstein Barr (EBV) e o citomegalovírus (CMV) confere proteção para infecções intercorrentes de TB, caracterizando uma interação simbiótica entre as espécies.

1.2.2 Específicos

- Avaliar se há diferença na soropositividade para o EBV e o CMV entre pacientes com tuberculose pulmonar comparados a contactantes intradomiciliares sem a doença;
- Determinar se há diferença na presença do genoma do EBV e do CMV no plasma de pacientes com tuberculose pulmonar comparados a contactantes intradomiciliares sem a doença;
- Avaliar se há diferença no número de cópias dos genomas do EBV e do CMV no plasma de pacientes com tuberculose pulmonar comparados a contactantes intradomiciliares sem a doença.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A tuberculose

A tuberculose é uma doença antiga e mundial. Trata-se de uma doença infecciosa, causada pelo *Mycobacteruim tuberculosis*, transmissível, que afeta o homem desde a préhistória (ROSEN, 1994; BRASIL, 1999), podendo infectar qualquer órgão do corpo, mas a principal incidência é a da tuberculose pulmonar bacilífera (BRASIL, 1999).

Atualmente é a doença infecciosa mais mortífera, apesar de ser curável (LEITE; TELAROLLI, 1997; BRASIL, 1999). A infecção pelo bacilo de acordo com Worth Heart Organization Global está presente em 1/3 da população mundial, onde ocorreram 9 milhões de casos novos e milhões de óbitos. Em 2014 foram diagnosticados 67,966 casos novos de tuberculose conforme o Sistema de Agravos de Notificação (SIMAN), o coeficiente de incidência nacional é de 33,5/1000 habitantes, apesar de que 16 capitais registraram média acima da nacional, porém foi observada uma variação de 7,9 a 99,3/1000 habitantes (SIMAN).

Esta população infectada representa uma parte do reservatório de *M. tuberculosis*, apesar da inatividade metabólica e ausência de sinais clínicos (NORTH e JUNG, 2004; KAUFMAN 2005). Os mesmos autores definem que pela própria história mundial da TB a maioria dos indivíduos é resistente à infecção, provavelmente devido à capacidade de gerar uma eficiente resposta imune a *M. tuberculosis*, de 10 a 30% das pessoas expostas se tornam infectadas e somente 5 a 10% transformam-se em TB ativa, sendo disseminado e localizado na forma pulmonar, ganglionar, renal, óssea, ou acometer outro órgão onde o diagnóstico precoce e o início do tratamento em tempo hábil são fundamentais para minimizar a transmissão e reduzir a sua morbidade.

De acordo com Bento (2011), o diagnóstico clínico é muitas vezes difícil, devido a sintomas inespecíficos e frequentemente insidiosos e diversificados. O mesmo autor acrescenta que atualmente, o diagnóstico de tuberculose ainda depende de exames microbiológicos, os quais requerem manuseio cuidadoso e rápido transporte das amostras; ainda que a baciloscopia do escarro represente um diagnóstico rápido, o método *Gold Standard* ainda é o isolamento cultural do *Mycobacterium tuberculosis*, cujo resultado demora várias semanas.

O Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil, do Ministério da Saúde, define que a tuberculose possui implicações sociais e epidemiológicas

relevantes para sua permanência. O controle e, consequentemente, a diminuição da incidência depende de fatores importantes, tais como diagnóstico precoce e um tratamento imediato e bem-sucedido, pois segundo o mesmo, a maior fonte de infecção consiste em indivíduos sem tratamento, ou naqueles com tratamento ineficazes que permanecem bacilíferos, mantendo, assim, a cadeia de transmissão (BRASIL, 2010).

Por outro lado, Scatena (2009) afirma:

O fato de indivíduos infectados terem dificuldade de acesso aos serviços de saúde contribui para que muitas coisas não sejam diagnosticadas, constituindo uma desigualdade em saúde. A deteriorização do serviço público em saúde vem resultando em dificuldade de acesso a esses serviços, falha na distribuição de fármacos antituberculose e recursos humanos treinados para o diagnóstico, notificação e a;companhamento do paciente em tuberculose, configurando obstáculos para o controle da doença.

Outro fator considerado por Oliveira e Moreira Filho (2000) é a baixa escolaridade que define um conjunto de determinantes socioeconômicos precários os quais aumentam a vulnerabilidade à tuberculose.

2.1.1 Etiopatogenia

A tuberculose é uma doença infectocontagiosa. O microorganismo que causa a doença é o *Mycobacterium tuberculosis*, da família *mycobacteriaceae*, ordem *Actinomycetoles*.

O *M. tuberculosis* é um bacilo álcool – ácido resistente (BAAR) tem o método de Ziehl-Nielsen como técnica mais utilizada em nosso meio.

De acordo com Kritski et al. (1999), o bacilo da tuberculose (ou de koch) é uma espécie aeróbica, não possui toxina nem flagelos. Este bacilo sobrevive se multiplicando no interior das células fagocitárias (parasita intracelular facultativo), além de considerar que a via aérea é a única de importância na transmissão ou contágio.

2.1.2 Imunopatogenia

A infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* pode ter três desfechos: controle na porta de entrada graças à imunidade inata, tuberculose latente ou doença ativa. Na tuberculose latente o organismo controla, mas não elimina a infecção. O bacilo fica dormente, replicando intermitentemente e com o metabolismo alterado. A infecção está sobre controle, mas não eliminada. Isto gera um enorme reservatório de tuberculose. O desequilíbrio na relação

parasito-hospedeiro, após uma reativação de um foco latente de infecção leva ao desenvolvimento da doença ativa (KRITSKI; LAPA E SILVA; CONDE, 1998).

O organismo se defende da micobactéria basicamente com o apoio de 2 tipos de células, os linfócitos T e os macrófagos. Quando a micobactéria penetra no pulmão de um indivíduo, é inicialmente fagocitado por um macrófago alveolar na intimidade do pulmão. Esse macrófago, dependendo da incidência do bacilo e da quantidade aspirada, pode resolver o problema ali na porta de entrada, mas o macrófago sozinho é, em geral, incapaz de matar a micobactéria. Ele precisa de apoio de outras células, que vão aumentar a capacidade do macrófago dentro de seu citoplasma, principalmente das células, que produzem citocinas (LAPA e SILVA; BOECHAT, 2004).

O linfócito T, além de produzir citocinas importantes, é também uma arma efetiva importante contra a micobactéria, por poder matar o macrófago por estar sendo inútil no combate a ela. Se ele reconhece que o macrófago não está sendo capaz de vencer a micobactéria, ele mata este macrófago e libera para o ambiente o bacilo, esperando que macrófagos mais eficientes o fagocitem e consigam controlá-la dessa vez. Trata-se do próprio linfócito T fazendo essa função efetiva contra a micobactéria, ainda que de forma indireta (LAPA e SILVA; BOECHAT, 2004).

As células T são elaboradas no timo, sendo as CD4 e CD8 as mais potentes na ativação dos macrófagos para matar o *Mycobacterium tuberculosis*. Elas têm a destacada propriedade de reconhecer os antígenos e outros constituintes do bacilo, para elaborarem as citocinas que ativam os macrófagos (PARRONCHI et al., 1991; SALGAME; ABRAMS; CLAYBERGER, 1991).

Por outro lado, os macrófagos residentes no tecido compõem os primeiros bacilos de defesa frente à micobactéria. Após ser fagocitado, o bacilo permanece no interior do fagossomo. A partir da fusão do fagossomo e do lisossomo, antígenos podem ser processados e, posteriormente, apresentados aos linfócitos T auxiliadores (CD4⁺), T helpers (Th) através do complexo principal de histocompatibilidade, também conhecido em inglês como *Major Histocompatibility Complex* (MHC), de classe II, presente apenas em macrófagos, células CD4⁺ do tipo 1 (Th1) desempenhando a função principal na resposta imune à micobactéria (KAUFMAM, 2005).

Contudo, células T-citotóxicas (CD8⁺), que reconhecem antígenos oriundos do citoplasma (tumorais ou virais), também participam da resposta imune ao *M. tuberculosis*. Células T CD8⁺ são capazes de reconhecer fragmentos peptídicos ligados ao MHC classe I,

moléculas expressas em praticamente todas as células diferenciadas ou maduras do organismo (WINAU et al., 2006).

Importantes subgrupos das células T são as células Th1 (helper) e Th2 (citolóxico), ambos são importantes funções imunológicas (SCHULGER & ROM, 1998; DELESPESSE; DEMEURE, YANGY, 1997).

As células Th1 tem papel importante no complexo imunitário por contribuir na elaboração da interleucina IL2 e de interferon gama (FNIy), os mais atuantes ativadores dos macrófagos (FINE, 2000; BRETSCHER, 1992). Th2, além de elaborarem interleucinas, participam da lise de células monocitárias que fagocitaram micobactérias; elas também participam da elaboração de anticorpos, receptores pelas células B, que, entretanto, não possuem função na proteção contra a tuberculose (LURIE, 1964; JACKETT; BOTHAMELY; BATRA, 1988).

As principais interleucinas elaboradas pelas células CD4, Th1 e Th2 são: IL2, IL4 e IL5, IL6, IL8, IL10, IL12, NFTa e FNIy - Interferon gama. Participa intensamente na proteção contra o *M. tuberculosis*, importante elemento na defesa contra micobactérias em geral, encontrado no sangue de pacientes com tuberculose (FLESH; KAUFMANN, 1987).

De acordo com Tsuyuguchi (1995), os linfócitos ativados pelo IL-12 polarizaram a resposta para Th1 padronizando a IL-2 que tem capacidade de ativar as células citolóxicas e a liberação de FNIy, a citocina mais importante desta resposta, responsável pela ativação macrofágica, pela formação de granulomas e na produção de óxido nítrico (NO) com intenso poder micobactericida.

Os macrófagos de doentes com tuberculose pulmonar têm maior capacidade de elaborar N.O levando à destruição das micobactérias (LAPA e SILVA; BOÉCHAT, 2004). Quanto maior a quantidade de bacilos de *M. tuberculosis* adquirida durante a infecção, a produção de citocinas do tipo Th1, como IL-2 e FNIy também é maior (GONZALES-JUARRER et al., 2001).

A hipersensibilidade desenvolve-se normalmente após 2 a 10 semanas, sendo a replicação das micobactérias inibida tanto nos focos iniciais quanto nos focos metatársicos, pela formação dos granulomas, com os bacilos, albergando de células epitelóides, perdendo a imperceptibilidade da primo-infecção (FREIRE, 1989).

A formação do granuloma é essencial para conter a infecção tuberculose, já que o mesmo funciona como uma barreira, envolta do tecido conjuntivo, delimitando o sítio de infeção (TUFARIELLO; CHAN; FLYNN, 2003).

Quando há formação de granuloma, a replicação das micobactérias no interior dos macrófagos é baixa e a infecção fica restrita ao mesmo, ocorrendo um estado de "equilíbrio" entre bacilo-hospedeiro, caracterizando a infecção latente. O bacilo pode sobreviver no interior do granuloma por vários anos, servindo como um reservatório de infecção (TUFARIELLO; CHAN; FLYNN, 2003).

A presença da hipersensibilidade tuberculínica parece proteger o indivíduo da reativação da doença a partir dos granulomas e das reinfecções exógenas perante número de partículas infectadas (KRITSKI, 1999). A resistência do hospedeiro define se a infecção ficará latente, com os bacilos não se multiplicando no interior das células (tuberculose-infecção) ou se haverá multiplicação e disseminação dos bacilos associados às manifestações clínicas (tuberculose-doença).

A tuberculose então é caracterizada por indivíduos imunocompetentes por um longo período de latência (MATHEMA et al., 2002) que devido à redução da imunidade celular poderá recrudescer a partir de um foco de tuberculose-infecção, aclamada tuberculose por primária (SUCCI, 1990), como ocorre especialmente nos casos de AIDS, terapia imunossupressiva, destruição e alcoolismo (LILLEBEAK et al., 2002).

Havendo um comprometimento do sistema infectado por *M. tuberculosis*, pode ocorrer uma reativação latente, mesmo anos após o primeiro contato. Neste caso, há o aumento da replicação das micobactérias no interior dos macrófagos, com elevada produção de citocinas e substâncias de teciduais líticos, causando extensa necrose no tecido infectado e formação de lesões cavitáreas, caracterizando a doença ativa (TUFARIELLO; CHAN; FLYNN, 2003).

É importante entender os mecanismos micobactericidas dos macrófagos e como o sistema imune pulmonar funciona, tendo em vista que praticamente todas as contaminações por tuberculose se dão por via respiratória e que 80% das formas clínicas da doença se localizam no pulmão. Além disso, a forma pulmonar é a única com importância epidemiológica, pois vai propiciar a transmissão aos contatos e a manutenção do ciclo de transmissão da doença (KRITSKI, 1998).

A citocina é um hormônio, um produto de diversos tipos de células do organismo e que tem várias funções. Existem citocinas de perfil Th-1, composto por citocinas como o interferon Y e interleucina-1 (IL-2), que ativam os mecanismos microbicidas do macrófago e as de perfil Th-2 são as citocinas tipo interleucina-4, 5 e 10 que desativam os macrófagos. Dependendo do predomínio destes tipos de citocinas, haverá a manifestação da tuberculose ou

vai impedir a infecção de progredir. Estudos recentes publicados que o próprio *Mycobacterium tuberculosis* escutam algumas proteínas em sua fase de crescimento, capazes de interferir fortemente na resposta imune, direcionando a seu favor (MURRAY et al., 1997).

As células dentríticas têm capacidade de induzir a resposta imune protetora contra a tuberculose que pode durar muito tempo. A presença deste tipo de célula, juntamente com outros tipos de células de linhagem monocítico macrofágica em número suficiente, é essencial para o estabelecimento do granuloma, que configura ao mesmo tempo uma proteção do hospedeiro contra a disseminação da infecção e uma proteção do microorganismo contra a sua eliminação. A densidade da população celular e a presença de certas citocinas, como os interferons do tipo I, são essenciais para a formação do granuloma e a diminuição da população bacteriana (BOUCHONNET et al., 2002).

2.1.3 Manifestações clínicas

Conforme o Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil (BRASIL, 2010), do Ministério da Saúde, a tuberculose pulmonar pode se apresentar sob a forma primária, pós-primária (ou secundária) ou miliar. Os sintomas clássicos da tuberculose pulmonar são: tosse persistente, produtiva ou não (com muco e eventualmente sangue), febre vespertina, sudorese noturna e emagrecimento.

Ainda segundo o Manual do Ministério da Saúde supracitado, a tuberculose primária: "É mais comum em crianças e clinicamente se apresenta na maior parte das vezes de forma insidiosa. O paciente se apresenta irritadiço, com febre baixa, sudorese noturna, inapetência e o exame físico pode ser inexpressivo" (BRASIL, 2010).

A tuberculose pós-primária:

Pode ocorrer em qualquer idade, sendo que o suor é mais comum no adolescente jovem. Tem como característica principal a tosse seca ou produtiva. (...) A expectoração pode ser purulenta ou mucóide, com ou sem sangue. A febre vespertina, sem calafrios, não costuma ultrapassar os 38,5°C. A sudorese noturna e a anorexia são comuns. O exame físico geralmente mostra "fácies" de doença crônica e emagrecimento, embora indivíduos com bom estado geral e sem perda do apetite também possam ter TB pulmonar. A ausculta pulmonar pode apresentar diminuição do murmúrio vesicular, sopro anfórico ou mesmo ser normal (BRASIL, 2010).

Na tuberculose miliar: "A denominação é vinculada ao aspecto radiológico pulmonar. É uma forma grave de doença e ocorre em 1% dos casos de TB em pacientes HIV soronegativos, em até 10% dos casos em pacientes HIV soropositivos em fase avançada de imunossupressão" (BRASIL, 2010).

O Manual de Recomendações (BRASIL, 2010) preleciona que a tuberculose extrapulmonar possui seus sinais e sintomas dependentes dos órgãos e/ou sistemas acometidos.

- Tuberculose pleural
- Erupiema pleural tuberculose
- Tuberculose gangliomar periférico
- Tuberculose meningoencefélica
- Tuberculose pericárdica
- Tuberculose óssea

2.1.4 Epidemiologia

A Organização Mundial de Saúde determina que um terço da humanidade seja infectada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, sendo que destes mais de oito milhões de casos novos e três milhões de mortes devido à doença por ano (GONÇALVES, 1998).

De acordo com Melo et al. (2005), as formas pulmonares alcançaram 85%, sendo 52,8% positivas à baciloscopia e 32,2% sem confirmação bacteriológica. Fiuza de Melo e Hijar (apud VERONESI; FOCACCIA, 1996), ainda, define que, entre as formas extrapulmonares, correspondentes a 15%, as pleurais e ganglionares são as mais encontradas, seguidas pela genitourinárias, ósseas e oculares. A forma de meningoencefalite tuberculosa foi de 5% e a miliar 6%.

Ferreira, Silva e Botelho (2005) expõe que não há perspectiva de eliminação da TB devido ao impacto causado pela pandemia da AIDS, que foi se manifestando no Brasil como importante preditora da tuberculose.

O Ministério da Saúde (BRASIL, 2002) define e tem como meta diagnosticar pelo menos 90% dos casos esperados. A expansão das ações de controle para 100% dos municípios complementa o conjunto de metas a serem alcançadas onde os gestores, Municipal e Estadual, devem agir de forma planejada para o controle. Santos (2007) se manifesta no sentido de que, em 2003, o controle da tuberculose foi detectado como prioridade dentre as políticas públicas de saúde no nosso país.

Para Morrone (2005), as mortes por tuberculose são decorrentes principalmente do diagnóstico tardio ou não realizado da doença e pela quimioterapia inapropriada. Ainda segundo o mesmo autor, nos países desenvolvidos, estima-se que o prazo mínimo para o diagnóstico de um doente seja de dois ou três meses e nos países em desenvolvimento a

demora é muito maior e, consequentemente, proporciona maior número de infectados e de novos doentes.

Em 2014 foram diagnosticados 67,966 casos novos de tuberculose. Ao longo dos anos, observou-se a redução do coeficiente de incidência, passando de 41,5/100mil habitantes em 2005 para 33,5 por 100 mil, representando 2,3% de redução. Mesmo assim continua os desafios. O Brasil registrou em 2014 cerca de 73 mil casos novos por ano, no Amazonas foram 68,4 por 100 mil habitantes.

2.1.5 Diagnóstico

A combinação de características clínicas, radiológicas e microbiológicos é o melhor método para diagnosticar a tuberculose (PALOMINO, 2005; LINUMAY et al., 1998).

2.1.5.1 Bacteriológico

É o método prioritário em adultos, tanto para o diagnóstico como para o controle do tratamento (BRASIL, 2010).

O exame microscópico direto - baciloscopia direta - é um método simples e seguro. Deve ser realizado por todo laboratório público de saúde e pelos laboratórios privados, tecnicamente habilitados.

"A pesquisa do bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) pelo método de Ziehl- Nielsen é a técnica utilizada em nosso meio" (BRASIL, 2010).

A baciloscopia de escarro permite detectar 80% dos casos de tuberculose pulmonar. A baciloscopia direta determina que deve ser solicitada aos pacientes que apresentam:

- Critérios de definição de sintomático respiratório (exame de escarro);
- Suspeita clínica e/ou radiológico da tuberculose pulmonar, independente do tempo de tosse;
- Suspeita clínica de tuberculose extrapulmonar.

A baciloscopia de escarro deve ser realizada em, no mínimo, duas amostras; uma por ocasião da primeira consulta, e outra independente do resultado da primeira, na manhã do dia seguinte, preferencialmente ao despertar. Nos casos em que há indícios clínicos e radiológicos de suspeita de TB e duas amostras de diagnóstico apresentem resultado negativo, podem ser solicitadas amostras adicionais. O método é considerado de baixa flexibilidade, uma vez que para oferecer o processo esperado necessita de uma quantidade mínima de 5.000 bacilos/ml de escarro (BRASIL, 2010)

2.1.5.2 Cultura

Para a micobactéria, a identificação de teste de sensibilidade preleciona que a "cultura é um método de elevada especificidade e sensibilidade no diagnóstico da tuberculose. Nos casos pulmonares com baciloscopia negativa, a cultura do escarro pode aumentar em até 30% o diagnóstico bacteriológico da doença" (BRASIL, 2010).

Os métodos disponíveis para o teste de sensibilidade pelos laboratórios do país são os métodos das proporções que utiliza meio sólido e, portanto, tem seu resultado após 42 dias de incubação e os métodos que utilizaram o meio líquido, com resultados disponíveis após 5 a 13 dias.

Destacando que os antimicrobianos geralmente testados são Estreptomicina, Isoniazida, Rifampicina, Etambutol e Pirazinamida (BRASIL, 2010).

A cultura para micobactéria é indicada nos seguintes casos:

- Suspeita clínica e/ou radiologia de tuberculose com baciloscopia repetidamente negativa;
- Suspeitas de tuberculose com amostras paucibacilares (poucos bacilos);
- Suspeitas de tuberculose com dificuldades de obtenção de amostra (por exemplo, crianças);
- Suspeitas de tuberculose extrapulmonar;
- Casos suspeitos de infecções causadas por micobactérias Neo Tuberculosas (MNT) – nestes casos, o teste de susceptibilidade pode ser feito com MIC (BRASIL, 2010).

2.1.5.3 Radiológico

A radiografia de tórax é um método diagnóstico bastante importante na investigação da tuberculose. Através deste método, é possível averiguar a suspeita de doença em atividade ou doença no passado. A radiografia de tórax deve ser solicitada para todos os casos em que haja paciente com suspeita clínica de tuberculose pulmonar. Porém, até 15% dos pacientes imunodeprimidos não apresentam alterações radiológicas (BRASIL, 2010).

Em pacientes com suspeita clínica de TB, o exame radiológico permite a diferenciação de imagens sugestivas de tuberculose ou de outas doenças. No entanto, como existem casos em que a TB não será identificada através das imagens, recomenda-se a cultura para micobactéria.

Ademais, em pacientes com baciloscopia positiva, tal exame tem como principal atribuição excluir qualquer possibilidade de doença pulmonar associada, como, por exemplo, câncer de pulmão em fumantes com alta carga tabágica com idade superior a 40 anos (BRASIL, 2010).

2.1.5.4 Histopatológico

No método histopatológico na investigação de formas extrapulmonares, ou nas formas pulmonares que se apresentam radiologicamente como doença difusa, a baciloscopia do tecido usualmente é negativa e a presença de uma granuloma, com necrose de caseificação, é compatível com o diagnóstico de tuberculose (BRASIL, 2010).

2.1.5.5 Chain Reaction of Polimerase (PCR)

O PCR é uma técnica molecular promissora para o diagnóstico rápido da tuberculose. Pode ser utilizada como ferramenta auxiliar no diagnóstico da tuberculose, porém associada a outros métodos (OGUSKU; SALEM, 2004; ASSIS et al., 2007). A amplificação em vitro do DNA da micobactéria através da reação de polimerase em cadeia pode, por sua vez, fornecer uma resposta diagnóstica rápida, apesar de este meio exigir um laboratório e pessoal técnico especializado (MELLO et al., 2002; SPERHACKE et al., 2004).

Os testes imunológicos relacionados à produção de IFNy por células T, em resposta a antígenos presentes no *M. tuberculosis*, baseou-se no conceito de que células T de indivíduo sensibilizados por antígenos do *M. tuberculosis* (células T de memória) liberam IFNy, quando estes reestimulados por antígenos específicos, podendo ser detectado por meio de ensaio imunoenzimático – ELISA - (PAI; RILEY; COLFORD 2004; MAZUREK, 2003).

2.2 Vírus Elementos Imunomodulatórios

Os vírus são partículas com características passíveis de subsistitir extracelularmente e formados por complexos biológicos dotados de informações genéticas elementares. Possuem a capacidade de adentrar células vivas alterando o processo metabólico normal com a finalidade de recodificar células para sua própria replicação (SOARES, 1993; FALKE, 1979).

Ainda de acordo com os mesmos autores, possuem um tamanho entre 20nm e 30nm. Suas estruturas geométricas são simples e precisas. Apresentam-se em forma de esferas, bastonetes, projéteis e tijolos, sendo constituídos por ácidos nucleicos, proteínas e lipídios.

São organismos que contém apenas um tipo de ácido nucleico: RNA ou DNA, de acordo com o grupo a que pertencem, mas nunca os dois ao mesmo tempo (LEVINSON et al., 1998; BURNETT, 1978).

Possuem várias centenas de genes em um genoma de DNA ou RNA. O ácido nucléico e as nucleoproteínas virais encontram-se quase sempre encerradas por uma capa proteica: o capsídeo. Os capsídeos são formados por uma ou várias proteínas. A unidade estrutural inteira, formada pelo ácido nucléico, nucleoproteína (s) e capsídeo, denomina-se nucleocapsídeo. Em geral, os vírus com envoltório são sensíveis a solventes lipídicos e detergentes não-iônicos que podem dissolver o envoltório, enquanto os vírus que consistem apenas em nucleocapsídeos são um pouco mais resistentes (WANG; KIEFF, 2006).

Comumente, inibem especificamente a síntese de proteína dos hospedeiros, mediante o ataque a um componente do complexo de iniciação da tradução. A apoptose é a consequência esperada da inibição, induzida pelo vírus, da síntese das macromoléculas celulares e da replicação do ácido nucléico viral (WANG; KIEFF, 2006).

O capsídeo e o envoltório de um vírus protegem seu genoma e permitem sua transmissão eficiente de uma célula à outra e a futuros hospedeiros. A infecção viral começa em uma superfície mucosa ou epitelial e se propaga ao longo dessa superfície, ou a partir dela, para tecidos mais profundos. A infecção pode então se disseminar pelo corpo através da corrente sanguínea, vasos linfáticos ou circuitos neurais. A inoculação parental também serve como meio de transmissão entre seres humanos ou a partir de animais, incluindo insetos, aos seres humanos (WANG; KIEFF, 2006).

Estudos desenvolvidos sobre a relação vírus-célula detectaram que os vírus utilizam vários mecanismos para subverter o sistema imunológico, por meio de interferência com a função das células e moléculas imunológicas (KEUTZ, 2007).

Ainda segundo o autor anteriormente mencionado, é identificada a destruição, inibição ou indução da maturação dos DCs, alterando o padrão de secreção de citocinas e de expressão de receptores nos DCs, levando a prejuízo nas suas relações com as demais células do sistema imunológico, principalmente os leucócitos T. Esta é destruída ou alterada.

Apresenta antígenos, que inibe a ação das proteínas TAP-1 e TAP-2; a formação do complexo peptídeo-MHC-I no retículo endoplasmático.

A produção de proteínas que protegem a célula infectada da ação do IFN-I e do TRF-A; e infecção dos leucócitos, B induzidos alteração na secreção de imunoglobulinas.

Para Soares (1993) e Falke (1979), os vírus possuem a capacidade de adentrar as células vivas, alterando seus processos metabólicos normais, com a finalidade de recodificá-las para sua própria replicação.

2.2.1 HIV/TB Coinfecção

De acordo com Lawn e Wood et al. (2010), as doenças oportunistas são a maior causa de mortes em pacientes com AIDS, cujo surgimento é em consequência da imunodeficiência causada pelo HIV. Com a diminuição do CD4+ para menos de 200 células/mm³, o risco de desenvolver essas doenças chega a 60% dentro de um período de 2 anos.

A tuberculose representa 13% das mortes dos pacientes com AIDS no mundo devido à imunossupressão presente no paciente, a exposição à virulência do patógeno como a tuberculose (MANSUR, 2010).

Conforme Canini et al. (2004), o HIV ataca o sistema imunológico responsável por defender o organismo de doenças atingindo os linfócitos CD4+, o vírus altera o DNA dessas células e faz cópias de si mesmo, rompendo os linfócitos em busca de outros para continuar a infecção, levando à disfunção imunológica crônica e progressiva, devido ao declínio dos níveis de linfócitos CD4+, aumentando o risco de o indivíduo desenvolver AIDS.

A infecção pelo HIV é grande fator de risco para o desenvolvimento de tuberculose ativa. Isto pode resultar de diversos fatores: alto risco de reativação da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*, risco de exposição acentuado para a TB, maior risco de infecção pelo *M. tuberculosis*, seguindo de uma exposição a uma forte infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* para TB primária ativa. (LAWN; WOOD, 2010).

A TB é de risco especial em pacientes com HIV por causa da taxa de conversão da forma latente para a forma ativa da doença. Sendo a taxa de 35 a 162 por 1000 pessoas ano em pacientes com HIV e de 12,9 por 1000 em geral. (MANSUR, 2010). Ainda segundo o mesmo autor, as manifestações de TB em pacientes com HIV/AIDS dependem do *status* de imunidade da pessoa. Para pacientes com níveis de CD4+ acima de 350 células/ml, as manifestações da doença pulmonar não são substancialmente diferentes do que na população em geral, mas a infecção extrapulmonar é mais comum.

Em pacientes com níveis de CD4+ menores, são comuns doenças pulmonares no lobo inferior, causando adenopatias e doença extrapulmonar (MANSUR, 2010).

2.3 Imuno modulação durante infecção latente do herpesvírus

Entre os patógenos prevalentes mais conhecidos, em comparação com a maioria dos outros vírus, o herpesvírus é único, na medida em que a infecção dura a vida do hospedeiro, e, sobre sua prevalência e persistência, pouco se conhece. Em sistemas humanos e animais, tem a capacidade de, durante a latência, modular a resposta imune.

A perspectiva é que seja potencialmente prejudicial e surpreendentemente benéfico nesse processo de interação ao longo da vida. A constatação de que modula a infecção latente e origina respostas imunes em hospedeiros assintomáticos, obriga a reconsiderar o que constitui um "normal" sistema imune num indivíduo saudável (ROIZMAN et al, 2007).

São conhecidos oito herpesvírus humanos: vírus herpes siruplex 1 e 2 (HSV1 e HSV2), vírus varicela zoster (VZV), citomegalovírus humano (HCMV), herpesvírus humano 6 e 7 (HHV6 e HHV7), vírus de epstein bar (EBV) e vírus do herpes Kaposi associado ao sarcoma (KSHV). Estes vírus são divididos em três famílias (α, β e γ), com base genética e semelhanças biológicas (PELLETT; ROIZMAN, 2007).

Quadro 1 - Famílias do Herpesviridae — Soroprevalência / Doenças associadas ao hospedeiro imunocompetente.

Membros	Seroprevalência	Doenças associadas no hospedeiro		
humanos	(adultos)	imunocompetente		
HSV 1	50 a 90%	HSV1/2: Úlceras orais e genitais recorrentes		
HSV 2	15 a 95%			
VZV	90 a 100%	VZV: catapora, zoster		
α				
HCMV	60 a 100%	HCMV: Mononucleose, defeitos congênitos		
HHV6	90 a 100%	HHV6/7: roséola infantil		
HHV7	90 a 100%			
β				
EBV	EBV 90 a 100% EBV: Mononucleose, linfoma de Burkitt			
		outros linfomas, carcinoma de nasofaringe		
KSHV	<5 a >50%	KSHV: sarcoma de Kaposi, doença de		
γ		Castleman multicêntrica, linfoma de efusão		
		periférica		

Fonte: Roizman et al. (2007).

Quadro 2 - Família herpesviridae — Alvos de células líticas / latentes.

Membros Alvos de células líticas		Alvos de células latentes		
humanos				
HSV1	HSV1/2: epitélio da mucosa	Gânglios neuronais sensoriais		
HSV2				
VZV	VZV:epitélio respiratório,			
α	linfócitos T			
HCMV	HCMV: epitélio da mucosa	HCMV: células hematopoiéticas		
		de linhagem mieloide, células de		
		músculo liso, epitélio salivar e		
		renal		
HHV6	HHV6/7: epitélio da	HHV6/7: células		
HHV7	mucosa	hematopoiéticas de linhagem		
β		mieloide mieloide, células		
		TCD4+, epitélio salivar		
EBV	EBV: epitélio oral	EBV: células de memória B		
KSHV	KSHV: desconhecido	KSHV: células de memória B,		
γ		células endoteliais		

Fonte: Roizman et al. (2007).

Ainda segundo Roizman et al., (2007), a infecção com o vírus do herpes é conceituada em três fases distintas correspondentes ao curso clínico da maioria dos pacientes: A) infecção aguda, B) latência e C) reativação.

A) A infecção aguda nos primeiros anos de vida é assintomática e devastadora que vai desde o trato geniturinário doloroso a úlceras de malignidades fatais. Replicação viral lítica, domina a infecção aguda. Acontece inicialmente em superfícies epiteliais e é controlada pela resposta imune adaptativa do hospedeiro (ROIZMAN et al, 2007).

B) A latência do herpesvírus no nível molecular é caracterizada: I. pela presença do genoma viral no núcleo da célula infectada, geralmente como um epissoma; II. A ausência de replicação viral de significância, medida através dos métodos clássicos, relativamente insensíveis, incluindo ensaios de placa, ensaios de transformação de células virais e a aplicação da Reação em Cadeia (PCR); III. A expressão genética viral mínima (VIRGIN; SPECK, 1999). Sabe-se, agora, que eventos de reativação viral de baixa intensidade e clinicamente silenciosos estimulam uma resposta imune contínua, tornando-se latentes apesar da ausência de sintomas (HADINOTO et al., 2009; LING et al., 2003; TRONSTEIN et al., 2011).

C) Reativações. Apresenta-se assintomática com interação constante com o sistema imune — *booster*, imunomodulação. (HADINOTO et al., 2009; LING et al., 2003; TRONSTEIN et al., 2011).

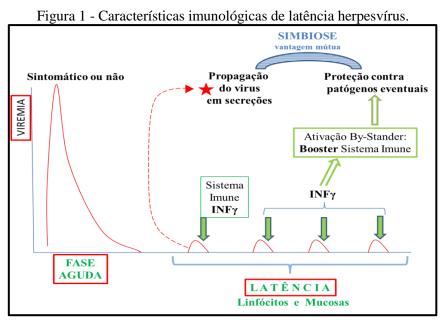
No hospedeiro hígido, apresenta-se cíclica com baixa viremia assintomática; no imunossuprimido pode se apresentar com doenças graves.

A imunomodulação é definida como qualquer efeito de latência do herpesvírus (incluindo reativação subclínica) que altera a resposta imune do hospedeiro à exposição subsequente ao antígeno (infecciosa, não infecciosa ou auto alterado). (MEIOS; LANG; JUNG, 2007; VANDEVENNE; SADZOT-DELVAUX, 2010).

2.3.1 Características imunológicas de latência herpesvírus

Durante décadas após a descoberta de herpesvírus humano, a ausência de sintomas, de expressão do gene viral durante a latência e ausência de detecção de replicação viral levou os virologistas e clínicos a acreditarem que esta fase de infecção fosse de um período de quietude viral (HADINOTO et al., 2009; TRONSTEIN et al., 2011; LING et al., 2003).

Métodos sensíveis indicam que membros das três subfamílias do herpesvírus produzem virões infecciosos em superfícies epiteliais e da mucosa quase continuamente em indivíduos aparentemente saudáveis. A infecção clinicamente latente possui um componente significativo de reativação, durante a qual, com muita frequência, uma fração do agregado de células com infecção latente recomeça a replicação reprodutiva (MEIOS; LANG; JUNG, 2009; VANDEVENNE; SADZOT-DELVAUX, 2010).



Fonte: Autor (dados da pesquisa).

A despeito da ausência de doença clínica visível, a latência do herpesvírus contitui um período de interação contínua e intensa entre o vírus e o hospedeiro que resulta na produção de um grande agregado de células T CD4+ e CD8+ altamente funcionais que é mantida por toda a vida, Figura 1. (DECMAN et al., 2005; CALLAN, 2004; MOSS e KHAN, 2004).

2.3.2 Populações de linfócitos durante latência dos herpesvírus

Durante uma infecção EBV sintomática aguda, apresentando-se como mononucleose infecciosa são ainda maiores estas proporções, com até 80% de todas as células CD8+ em circulação antígeno-específicos para EBV (CALLAN, 2004).

Este nível decai rapidamente com a resolução da infecção aguda, mas persiste, mesmo em portadores de EBV saudáveis, aproximadamente 5 a 10% de células CD8+ específicos para epítopos EBV líticos e latentes (TAN et al., 1999).

Nas amígdalas, local importante de latências e reativação, a fração vírus específica chega a 20%, indicando enriquecimento anatômico no local da expressão antígena (HISLOP, 2005).

Durante a latência clínica, aproximadamente 10 a 20% das células T CD4+ e CD8+ de memória em circulação em adultos saudáveis são específicos para antígenos HCVM (16) (MOSS, 2004; SYLWESTER et al., 2005).

2.3.3 Compartimento T expandido e altamente funcional em EBV e CMV

Nos modelos próprios de humanos e de camundongos, um subconjunto de células T CD8+ de herpesvírus ativa a produção rápida de citocinas e a função citolítica seguindo uma restimulação antígena (HISLOP et al., 2001).

Mesmo na ausência de restimulação *ex vivo*, estas células apresentam sinais de contato recente com antígenos, inclusive com proliferação (BELTZ, 2001).

Durante a maior parte da vida do hospedeiro humano, os linfócitos herpesvírus específicos não desenvolvem sinais de exaustão funcional comuns em outras infecções virais crônicas (HCV, HIV e LCMV) (KIM, 2010).

Também durante a latência, o compartimento de memórias das células T CD4+ sofre expansão, exercendo a função de efetivador rápido (LIBRI et al., 2011).

Assim, apesar da ausência de doença clínica visível, a latência do herpesvírus constitui um período de interação contínua e intensa entre o vírus e o hospedeiro que resulta na produção de um grande agregado de células T CD4+ e CD8+ altamente funcional que é mantida por toda a vida.

De acordo com Welsh (2010), este enorme compartimento de células T antiherpesvírus é essencial para o controle de reativação viral, mas, talvez, ao mesmo tempo ele altere o resultado de infecções heterólogas, fenômeno conhecido como imunidade heteróloga.

As células T CD8+ herpesvírus-específicas são ativadas no contexto de outras infecções, seja via peptídeos que apresentam cruzamento reativo e restrição por MHC expresso por outros patógenos, seja por mecanismos de expectador independentes de antígenos (SANDALOVA, 2010).

Em estudo realizado em 50 indivíduos com HBV, identificou-se expansão, ativação e herpes específico mediado por IL-15, CD8 herpes específico produz IFN ativação / by stander.

Figura 2 – Resultados de Pesquisa em indivívuos com HBV. 50 indivíduos. expansão CD8-virus específico infecção viral aguda (ativação e proliferação) (HBV, dengue, Flu, adenoVirus CD8- herpes específico -> yIFN hantaVirus) IL-15 by-stander activation expansão CD8 EBV-específico → mononucleose Infecção aguda EBV 👈 expansão CD8- influenza-especifico Adultos = Indivíduos EBV e CMV (+) Ativação linfócitos B Infecções virais grande compartimento CD8 Ativação epissoma EBV → yIFN e outras recorrentes EBV e CMV específicos IL-15

Fonte: SANDALOVA (2010).

2.3.4 A transcrição imunológica da latência do herpesvírus: pistas a partir de modelo de camundongo

Estes estudos permitem várias conclusões sobre o impacto da infecção pelo herpesvírus na expressão genética do hospedeiro.

Em primeiro lugar, os efeitos transicionais de HSV1, MCMV e MHV68 são singulares. Talvez isso não seja surpreendente, dada o diferente tropismo desses vírus, mas enfatiza o fato de os efeitos de latência ser de difícil generalização.

Em segundo lugar, um importante componente de assinatura transcricional durante a infecção por MHV68 pode ser atribuída a genes imunomoduladores.

Nestas experiências, MHV68 parecia ser o mais imunomodulador dos três vírus. Isto pode ser atribuído à restrição anatômica de HSV1 ao gânglio trigeminal (uma vez que a expressão foi medida no baço) e a inflação tem por trás o dependente da resposta das células T MCMV-específicas (que demora meses a amadurecer no sistema do camundongo) ou outros fatores.

Em terceiro lugar, a coinfeção com dois vírus leva a assinaturas transcricionais emergentes, não previsíveis a partir das infecções individuais por herpesvírus.

Em quarto lugar, a infecção latente confere uma assinatura imunológica específica durante a infecção MHV68, uma vez que muitos genes de resposta imune não foram regulados positivamente após infecção com um mutante viral com deficiência de latência.

Finalmente, a assinatura transcricional de latência MHV68 evolui ao longo do tempo, com agrupamentos únicos de genes evidentes em um a três meses (SNYDER et al., 2008).

2.3.5 A latência do herpesvírus modula imunidade a outros patógenos

Diante da capacidade da latência do herpesvírus para alterar a expressão do gene hospedeiro e as respostas das células T, é razoável supor que a infecção latente alteraria o resultado de infecções secundárias, sendo de fato, o caso.

Os dados colhidos a partir de múltiplos modelos de camundongos demonstraram o potencial da latência para aumentar a resistência à infecção secundária. Por outro lado, muito pouco se sabe sobre os benefícios potenciais de latência do herpesvírus em seres humanos.

A latência do herpesvírus também pode ter impacto prejudicial na resistência às infecções secundárias nos seres humanos, entretanto, entre os riscos até então identificados, está o aumento da suscetibilidade à infecção pelo HIV e uma possível correlação entre as células T de memória HCMV expandidas e a senescência imune nos idosos (BARTON; WHITE; BERD, 2012).

2.3.6 A inflação de células de memória HCMV - específicas como cofator na senescência imune

A resposta de linfócitos específicos de herpesvírus varia com a idade do hospedeiro. Uma crescente porção da CD8 + (e um grau menor CD4 +) compartimento de células T em idosos é dirigido contra o CMV tal que uma fracção notável (em alguns pacientes, > 40%) da célula T repertório é HCMV específico. Este fenômeno é conhecido como inflação memória (WELSH et al., 2010).

2.3.7 Herpesvírus latência como cofator em doenças inflamatórias humanas

Para Pratesi et al. (2006), EBV (vírus e outros) é responsável por uma série de doenças autoimunes, incluindo esclerose múltipla (MS) e lúpus eritematoso sistêmico (LES). EBV é também postulado que desempenham um papel no desenvolvimento de artrite reumatóide, talvez através da facilitação da geração de anticorpos contra peptídeos citrulinados (PRATESI et al., 2006).

Hipóteses sugerem herpesvírus como agentes etiológicos na doença autoimune, sendo balizadas pela observação de que síndromes virais, por vezes, precede o aparecimento da doença autoimune, bem como por experiências em que os vírus foram mostrados para provocar ou exacerbar a doença autoimune em modelos animais.

Esses mesmos autores evidenciam existir potencial para alterar a progressão ou gravidade de cancros humanos. Finalmente, descreve novos dados convincentes indicando que a notícia para os seres humanos infectados com o vírus do herpes não é de todo ruim, uma vez que um crescente corpo de dados indica que a infecção pelo início da vida com EBV e CMV, pode proteger as crianças contra o desenvolvimento de doenças alérgicas.

2.3.8 EBV, lúpus eritematoso sistêmico e esclerose múltipla

Isto, naturalmente, não exclui a possibilidade de que a modulação desencadeada por EBV latente assintomática poderia contribuir para LES. Ainda assim, os mecanismos pelos quais EBV contribui para a patogênese de LES, se for o caso, não parecem ser tão simples como uma infecção aguda com EBV desencadeamento da doença autoimune num geneticamente hospedeiro susceptível. EBV é um candidato atraente para tal gatilho.

A mononucleose infecciosa e MS são ambos observados mais frequentemente no Oeste, em caucasianos, e, em pessoas vivendo em latitudes do Norte. Quase 100% dos adultos com MS são soropositivos para EBV, enquanto que MS é rara em adultos EBV- negativa.

Como é o caso com LES, a associação entre a MS e o EBV (KHAN, 2007; GRESS; DEEKS, 2009).

Enquanto as ligações entre EBV e certos processos autoimunes são fortes, os mecanismos por EBV que poderiam desencadear ou aumentar a susceptibilidade a estas doenças permanecem desconhecidos. Vários modelos foram propostos pelo qual um vírus pode alterar o sistema imunitário resultando numa ativação inapropriada e doença autoimune posterior (KAKALACHEVA; MUNZ; LÜNEMANN, 2011).

Tolerância da célula por proteínas virais tem efeitos adjuvantes e superantígenos que são também codificadas viralmente e foram discutidos como culpados em potencial. Uma apreciação relativamente nova para a célula hospedeira, máquinas que alertam o sistema imune inato à presença de micróbios e coordenadas a ativação das respostas imunes inata e adaptativa (receptores de reconhecimento de padrões e moléculas de sinalização) pode trazer novos *insights* para os mecanismos pelos quais vírus poderiam contribuir para a autoimunidade (CHERVONSKY, 2010).

2.3.9 Aterosclerose e CMV

Sobre a resposta imunitária ineficaz o antiviral pode promover a doença vascular (WECK et al., 1997). Mais uma vez, ratos modelos forneceram dados intrigantes, sugerindo que podem ocorrer efeitos semelhantes em seres humanos, especialmente naqueles que experimentam infecção herpesvírus mais tarde na vida ou são geneticamente predispostos a uma prolongada resposta antiherpesvírus imune.

2.3.10 Herpesvírus e câncer: uma hipótese

Estudos de tumores em animais pequenos de incidência, progressão, metástase e na presença de latência de herpesvírus pode permitir a identificação de mecanismos que ligam a latência para gênese do tumor, permitindo assim estudos mais refinados em humanos para determinar se os herpesvírus são cofatores significativas nos resultados de câncer.

2.4 Citomegalovírus

2.4.1 Etiopatogenia

Todos os mamíferos parecem ser infectados por citomegalovírus, espécie específica e não por incidências de infecções cruzadas entre espécies na natureza. O homem é o único hospedeiro natural do CMV.

O CMV foi encontrado em urina, saliva, leite materno, fezes, lágrimas e sêmen (WELLER; PEARSON, 2000). Dentro do corpo humano, o CMV pode se espalhar praticamente em qualquer tecido, devido a uma ampla quantidade de células-alvo (SINGER; DIGEL; JAHN, 2008).

Pouco se sabe sobre o local dos mecanismos de latência do CMV. Estudos indicam que monócitos e granulócitos sejam portadores de CMV e locais de latência e persistência (TAYLOR-WIEDMAN, 1991; BOLOVAN-FRITTS; MOCARSKI; WIEDMAN, 1999).

Transplantes de órgãos sólidos podem transmitir CMV, portanto, é possível que essas células possam abrigar e transmitir o vírus como também é possível que outras células possam transmiti-lo (LJUNGMAN; HAKKI; BOECKH, 2010).

O citomegalovírus (CMV) é considerado atualmente um dos principais patógenos que afetam o ser humano. O espectro de suas manifestações clínicas é extremamente amplo, podendo causar infecções congênitas e perinatais, infecções adquiridas na infância e na idade adulta, além de ser considerado uma das principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos (PANNUTI, 2005).

Conhecido como HHV-5, é um herpes vírus humano (HHV) e pertence à família herpesviridae. Tem um genoma constituído por DNA de simetria icosaédrica, com 162 capsômeros envolvidos por um envelope lipídico. É bastante termolábil, com a vida média de somente 45 minutos a 37°C (PANNUTI, 2005). Ainda segundo o autor, o DNA de duplo filamento, quatro espécies de RNAm, capsídeos proteicos e envoltório de lipoproteína sofre replicação do núcleo da célula e pode provocar infecção lítica e produtiva ou infecção latente (HIRSH, 2006).

O citomegalovírus estabelece uma infecção latente por toda a vida, assim como todos os vírus do herpes humano, podendo ser reativada quando apresentado estímulo para tanto (MOCARSKI; SHENK; PASS, 2007).

Como descreve Hertel e Mocarski (2004), a infecção por CMV ocorre através da introdução do próprio vírus em um hospedeiro humano. A superfície celular da célula

hospedeira é atacada pelo DNA, o qual inclusive invade o núcleo e inicia um processo de replicação, tendo como efeito a liberação de novos vírus na corrente sanguínea e em outros fluídos corporais. O autor destaca que o processo de replicação viral tem início entre 14 e 24h após a infecção, acarretando mudanças no formato da célula hospedeira, metabolismo e transcrição genética; essenciais para a replicação eficiente.

Infecção por CMV

CMV

Entrada no organismo

Ligação ao receptor superficial da célula

Entrada do DNA viral na célula hospedeira

Síntese de novas proteínas virais no núcleo da célula hospedeira

Liberação de novos vírus

CMVD (CMV Disease) Infecção Latente

Figura 3 - Ciclo viral do CMV.

Fonte: Hertel e Mocarski (2004).

2.4.2 Epidemiologia

Estudos de soroprevalência de anticorpos anti-CMV na população mundial demonstram que o CMV ocorre em todas as regiões do mundo (GOLD; NANKERVIS, 1991).

Em estudo realizado por Cannon (2010), identificou-se que a soroprevalência para CMV entre mulheres de idade reprodutiva varia de 45 a 100%. Tais índices se apresentaram de forma mais elevada na América do Sul, África, Ásia, Itália, Turquia e Israel. Na Europa Ocidental e nos Estados Unidos, o comportamento epidemiológico se apresenta variável. Tal estudo evidencia que as condições socioeconômicas, definidas por higiene, moradia, hábitos da população, influenciam diretamente, tendo em vista que o CMV é encontrado em praticamente todos os líquidos corporais.

Ainda segundo este estudo, em crianças com menos de 6 meses de idade a soroprevalência apresentava-se mais elevada, e nas pessoas mais idosas chegou até 60%.

A soroprevalência mundial do CMV é de aproximadamente 60 a 100% da população de imunosuprimidos e imunocompetentes (RAFAILIDIS, 2008).

HUGV 2012 Sorologias para CMV - 255 testes

CMV IgG NEGATIVO 7 casos

CMV IgG POSITIVO 248 casos

Acima 26 anos – 157 casos, TODOS positivos

0 - 9 anos - 21% negativos

10 - 20 anos 5,4% negativos

20 - 30 anos 3.5% negativos

> 30 anos 0% negativos

Figura 4 - Sorologias para CMV no HUGV em 2012.

Fonte: Laboratório HUGV

Em estudo realizado no Hospital Universitário Getúlio Vargas (Manaus/AM) em 2012, identificou-se 248 casos de CMV IgG Positivo.

O CMV é o patógeno oportunista mais comum em pacientes com infecção provocada por HIV, podendo estabelecer infecção até no sistema nervoso (DREW, 1992; MCCUTCHAN, 1995; ROULLET, 1999). Evidências de infecção pelo CMV no SNC são encontradas em aproximadamente 15% dos pacientes com AIDS (GONZALES; DAVIS, 1988). Os pacientes masculinos, em 93% apresentavam amostras positivas para DNA de CMV, contudo, a razão da amostragem inicial dos pacientes com resultados PCR positivo e negativo tem a relação de 10/1. Quanto à mortalidade de 38% com AIDS com sintomas no SNC, foi encontrado a presença do DNA de CMV no LCR (SILVA et al., 2010).

2.4.3 Manifestações clínicas

2.4.3.1 Infecções congênitas

Clinicamente, os achados mais recentes são prematuridade, tamanho pequeno para a idade gestacional, icterícia, hepatoesplenomegalia, petéquias e alterações neurológicas, representando 10% dos recém-nascidos infectados (PANNUTI; VARONESI; FOCACCIA, 2005).

2.4.3.2 Infecção perinatal

O período de incubação é de quatro a doze semanas, sendo que a maioria dos recémnascidos é assintomática, podendo estar associada a quadro de pneumonia intersticial de gravidade variável e hepatoesplenomegalia (LIBMAN; WITZ, 1995).

2.4.3.3 Infecção adquirida

A manifestação clínica mais comum da infecção em hospedeiros normais, depois do período neonatal, consiste no contato de secreções corpóreas contaminadas (PANNUTI; VARONESI; FOCACCIA, 2005). Ainda segundo o autor, pode acontecer na infância por contato de urina e saliva de outras crianças, onde ambientes com aglomerado, predispõem à maior infecção. Na idade adulta, além do contato com saliva e urina, a transmissão se faz através do sêmen e secreções do cérvix.

2.4.3.4 Transmissão iatrogênica

Conforme descreve Preiksaitis, Brown e Mckenzie (1988), a transmissão ocorre através de transfusões sanguíneas e o transporte aos órgãos só é possível devido à capacidade do vírus de permanecer latente, podendo ser reativado posteriormente. Enfatiza, ainda, que a infecção por CMV é a mais comum em órgãos transplantados.

A prevalência de infecção congênita por CMV é variável em diversas partes do mundo, atingindo taxas de 0,2% a 2,6% de todos os nascimentos (CANNON et al., 2010).

Conforme descreve Negishi (1998), o vírus pode ser transmitido quando leucócitos infectados atravessam a placenta (transmissão vertical), via cordão umbilical, instalando-se no epitélio tubular renal, onde ocorre a replicação.

Foi descoberto que em órgãos transplantados há uma incidência de infecção por CMV. Em São Paulo, foi realizado um estudo no qual constatou a presença do CMV em 78,2% dos pacientes. Em outro estudo realizado em 112 doadores de tecido, identificou-se 91,1% de casos positivos de IgG-CMV (VERONESI; FOCACCIA, 2005).

Em pacientes imunocompetentes com infecções por CMV, a segunda região mais afetada é o sistema nervoso central (14%), sendo os sintomas: febre, calafrios, fadiga, mialgia, dormência motora (fraqueza localizada, paraplegia), anormalidades sensoriais (parestesia, disestesia), alteração do nível de consciência, neurose unilateral e bilateral, retenção urinária (RAFAILIDIS et al., 2008). DNA de CMV pode ser detectado no LCR de 60% das crianças com infecções congênitas sintomáticas pelo CMV

2.4.4 Diagnóstico

Conforme descreve Junqueira, Sancho e Santos (2008) no seu artigo de revisão, há vários métodos para a detecção do CMV. Sendo o isolamento viral em cultura de fibroblastos humanos considerado o método convencional, extraindo para o resultado de três a cinco dias. Na imunofluorescência indireta (IFI) o resultado demora 24, 48 ou 72 horas.

A PCR detecta o DNA viral, método que pode ser utilizado para urina ou outras amostras. É uma técnica rápida (menos de 6 horas) e de alta sensibilidade, sendo baseada na amplificação seletiva de sequências específicas de ácido nucléico (DEMMLER et al., 1988).

O método de ELISA (*Enzime Linked Immuno Sorbent Assay*) apresenta sensibilidade de 100% e especificidade de 86%, além de detectar anticorpo no sangue (DHIMINGER; BADER; EGGERS, 1999).

2.5 Vírus Epstein Barr

2.5.1 Etiopatogenia

Trata-se de um vírus membro da família Herpes, que foi descoberto em 1964, por um estudo de microscopia, de cultura de células obtidas de linfoma de Burkitt. Quatro anos após, em 1968, demonstrou-se que o EBV era o agente etiológico da mononucleose infecciosa (SILVA & ZUCOLOTO, 2003).

O genoma do EBV consiste em uma molécula de DNA linear, de 172 quilobases, que codifica, aproximadamente, 100 proteínas virais. Durante a replicação viral, essas proteínas são importantes para a regulação da expressão dos genes virais, para a replicação do DNA

viral, a fim de formar a estrutura de componentes estruturais do virion e para modular a resposta imune do hospedeiro (SILVA & ZUCOLOTO, 2003).

Mais de 50% dos pacientes com mononucleose infecciosa apresentam febre, linfadenopatia e faringite. Menos de 10% apresentam esplenomegalia, petéquias no palato e hepatomegalia. Normalmente a doença é autolimitada. Raramente, prolonga-se por mais de seis meses, quando passa a ser denominada infecção crônica, ativa, pelo EBV.

A infecção de humanos pelo EBV, usualmente, ocorre pelo contato com secreções orais. O vírus se replica nas células da orofaringe e, praticamente em todos os pacientes que apresentam sorologia positiva, pode-se detectar o vírus na saliva.

O vírus infecta o epitélio da orofaringe e o tecido linfóide, infectando os linfócitos B, maduros, de memória, induzindo a proliferação desses tipos de células, bem como os linfócitos T e as células NK. Após esta fase, o agente se propaga pela corrente sanguínea acometendo os linfócitos circulantes (HUTT-FLETCHER, 2007).

Desta proliferação de células infectadas, resulta em aumento do tecido linfóide em outras regiões (órgãos). Os títulos de imunoglobulinas M (IgM) produzidas pelas células infectadas se elevam. O agente viral pode também determinar a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos e promover grande produção de anticorpos. Esta sequência de eventos leva à transformação da célula B, sendo uma característica da infecção dessa população celular (SCHOOLEY, 2009).

O vírus estabelece dois tipos simultâneos de interação: há infecção lítica e imortalização dos linfócitos B; a seguir há infecção lisogênica dos linfócitos B, com produção de novos vírus e disseminação para outros indivíduos através da saliva (HURT; TAMMARO, 2007).

A imunidade celular é mais importante que a resposta humoral no controle da infecção desencadeada pelo EVB. Se a imunidade mediada pelas células T for comprometida, as células B infectadas pelo EVB podem começar a proliferar. O EBV é oncogênico em pacientes com imunodeficiência primária ou secundária. A principal característica patológica da MI é a notável resposta proliferativa no âmbito do sistema mononuclear fagocitário, especialmente nos linfonodos. A espécie humana pode apresentar ao longo da infecção: uma resposta celular satisfatória com resolução da entidade nosológica; uma resposta celular insatisfatória, evoluindo para a doença linfoproliferativa; ou não apresentar resposta e desenvolver mononucleose infecciosa fulminante.

2.5.2 Epidemiologia

O vírus Epstein Barr, tal como ocorre com os demais herpes vírus, não é eliminado do organismo, mantendo-o latente, mesmo quando da resolução da doença. Tem-se dois sorotipos de vírus, o EBV-1 e o EBV-2, cuja diferença entre eles determinam causas expressivas de diferenças no crescimento dos linfócitos. O EBV foi descrito como agente etiológico de MI em 1964, em crianças na África Central. Em 1968, a associação entre a infecção pelo EBV e a MI foi claramente estabelecida (HURT-FLETCHER, 2007).

Na infecção primária pelo EBV, este infecta e se multiplica nos linfócitos B, enquanto os linfócitos T citotóxicos específicos são desenvolvidos e regulam a proliferação dos infectados. Isto determina porque a infecção pelo EBV, usualmente, seja assintomática. A MI é incomum em indivíduos com idade superior a 30 anos (FIGUEIREDO, 2009).

A replicação viral primária é no epitélio da orofaringe, levando à infecção do agente etiológico com a liberação de grande quantidade de partículas virais. O EBV tem outros mecanismos de entrada como pelos linfócitos, as células da mucosa gástrica, as células musculares lisas, entre outras formas, que estejam em contato direto com as células B (GROSS, 2009).

A transmissão ocorre por via oral-oral, através do contato íntimo com a saliva de um hospedeiro infectado, sendo a porta de entrada do EBV a orofaringe. O EBV pode ser sexualmente transmissível, bem como pela transfusão sanguínea e pelo transplante de medula óssea (SUCHMACHER; GELLER, 2005).

O EBV infecta mais de 90% da população mundial. A taxa de endemicidade para o vírus EBV varia conforme a região geográfica, sendo extremamente elevada no Norte da África (Argélia e Tunísia) e extremamente baixa no norte da Europa (Dinamarca e Holanda).

O Brasil é considerado um país de endemicidade intermediária entre aquelas duas regiões. A infecção ocorre com maior frequência na fase pueril sendo assintomática. Na maioria dos casos, persiste de forma latente durante toda a vida do indivíduo. Nos países industrializados, a infecção primária, muitas vezes, ocorre na adolescência ou na fase adulta, causando uma doença linfoproliferativa, denominada mononucleose infecciosa (SILVA & ZUCOLOTO, 2003). A causa mais frequente da síndrome de mononucleose, cerca de 90% dos casos, é a infecção primária pelo EBV (HURT; TAMMARO, 2007).

A prevalência da infecção pelo EBV varia de 20 a 80% em indivíduos de dois a três anos. Em países industrializados, é mais comum a infecção primária ocorrer na adolescência. Complicações neurológicas ocorrem em cerca de 5% dos pacientes (JUNKER, 2005).

A incidência de desenvolvimento neurológico em pacientes hospitalizados devido a complicações de infecção primária pelo EBV, tem sido relatada de 5,5% a 18% nesses indivíduos (SILVERSTEIN; STEINBERG; NATHANSON, 1972).

Conforme Juel-Jensen (1987), a mortalidade do paciente por EBV passou a chegar a 33% e aqueles que sobrevivem passam a ser afetados a longo prazo.

2.5.3 Manifestações clínicas

Os sintomas neurológicos diversos têm sido atribuídos a invasão viral direta, complexas e imunes a reações inflamatórias (CONNELLY; DEWITT, 1994).

O EBV pode causar meningite linfócita, encefalite, mielite e neurite (KAJI, SHOJI, 1995; TSELIS et al., 1997; LANDGREW, 1994; GILDEN et al., 2007)

Antinori (1999) realizou PCR para detecção de DNA de EBV em pacientes infectados com HIV e com lesões cerebrais faciais. Entre os pacientes, 42% apresentaram linfoma primário no SNC relacionados a AIDS e 58% transtornos não tumorais. O PCR foi positivo em 84,6% dos pacientes com linfoma primário no SNC e foi negativo em todos os pacientes não neoplásicos.

Antes da entrada do vírus no linfócito B, a principal glicoproteína do envelope viral FP350 se liga ao receptor viral, a molécula CD21 – receptora complementar C3D (SCHLEISS, 2009).

Identificaram a proteína da membrana CR2 de linfócitos B humanas como sendo a receptora de entrada do EBV nessas células, utilizando anticorpos mononucleares.

Essa interação receptor-ligante tem implicações para o tropismo da doença no hospedeiro humano, uma vez que os principais locais onde o receptor CD2 se expressa são no epitélio da faringe e na superfície das células B. Infecções das células epiteliais pelo EBV *in vivo* resultam em replicação ativa, com produção do vírus e lise das células. Em contraste, infecção de células B pelo EBV *in vivo* resulta em infecção latente com imortalização das células. In vivo, O EBV permanece latente em células B. A replicação viral é atividade espontânea apenas em uma pequena porcentagem dessas células (SCHLEISS, 2009).

2.5.4 Diagnóstico

De acordo com Gross (2009), a reação em cadeia da polimerase PCR quantitativa tem sido utilizada para o diagnóstico e o prognóstico das condições mórbidas relacionadas com a EBV. A detecção do DNA do vírus no sangue periférico ou no soro evidencia se o

doente infectou-se pelo EBV. Porém, na interpretação dos resultados qualitativos de EBV, o DNA PCR ou carga viral apresentam alterações, especialmente os pacientes com imunodeficiência, apresentando maiores quantidades de DNA do EBV do que indivíduos imunocompetentes com infecção latente. A melhor forma de diagnóstico é a biópsia de tecidos e a hibridização *in situ*.

A diversidade de condições que simulam mononucleose é ampla, devendo ser feito o diagnóstico diferencial entre causas infecciosas e não infecciosas. O atendimento deve ser precedido de cuidadosa anamnese com história pregressa, familiar, contato com animais ou com qualquer pessoa doente. O exame físico complementa o raciocínio clínico, embora quase sempre se encontre apenas achados inespecíficos, mas que orientarão a solicitação dos exames complementares (laboratoriais). A causa mais frequente de síndrome de mononucleose é a infecção primária pelo EBV, que atinge cerca de 90% dos casos (HURT; TAMMARO, 2007).

3 METODOLOGIA

O projeto deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) com CAAE n 0357.0.115.000.10 em 15 de setembro de 2010.

Trata-se de um estudo de caso-controle, para verificar a presença do genoma dos vírus *Epstein Bar* (EBV) e *Citomegalovírus* (CMV) em pacientes com diagnóstico de tuberculose em sua forma pulmonar.

3.1 População do estudo

Foram acompanhados 68 (sessenta e oito) pacientes sequenciais com diagnóstico positivo de tuberculose e 56 (cinquenta e seis) contactantes do Centro de Referência de Tuberculose Cardoso Fontes.

Estes dados foram coletados no período de junho de 2011 a junho de 2013, sendo, portanto, o tamanho amostral de conveniência.

Trata-se de um estudo transversal de caso e controles, sendo o desenlace acontecido na ocorrência de tuberculose pulmonar; e o fator de risco prévio investigado a coinfecção viral por EBV e CMV.

Os pacientes que atendiam aos protocolos definidos foram entrevistados, avaliados e acompanhados. Além disso, foram preenchidos formulários e prontuários que serviram como base ao trabalho de pesquisa.

Os pacientes e os contatos tomaram conhecimento e concordaram com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Amazonas.

Pacientes = entrevista Atendimento Critérios inclusão Critérios exclusão Inclusão Preenchimento de dados Coleta de sangues Tratamento Entrevista Retornos Desenlaces 6 meses Entrevista Retornos Desenlaces 12 meses Identificação de Contactantes Entrevista c/ Contactantes Exclusão TCLE/dados Incluindo Sangue Retornos

Figura 5 - Fluxograma clínico.

Fonte: Autor (dados da pesquisa)

3.1.1 Critérios de Inclusão

Pacientes com tuberculose pulmonar diagnosticados pela primeira vez, com comprovação bacteriológica, antes de iniciar o tratamento; ambos os sexos com idade ente 18 e 36 anos.

Controles contactantes, coabitante há mais de 6 meses em residência de paciente recém-diagnosticado bacteriologicamente com tuberculose pulmonar; pareados por idade e sexo com os casos de tuberculose.

3.1.2 Critérios de Exclusão

Foram utilizados como critérios de exclusão nos pacientes e controles:

- Soropositivo para HIV;
- Imunossupressão farmacológica (corticóides, citotóxicos e biológicos) gestantes;
- Transplantados;
- Doenças crônicas debilitantes (câncer avançado, uremia em diálise, cirrose hepática, etc);
- Autoimunidade sistêmica (lúpus eritematoso sistêmico, dermatomiosite e esclerodermia) com doença ativa ou não.

3.2 Exames laboratoriais

Foi analisada a carga viral dos casos de tuberculose comparada a contatos sadios. Averiguou-se, também, dentro do grupo de casos de tuberculose, no subgrupo de baixa carga viral (quanto percentual inferior) comparado ao subgrupo de alta carga viral quanto percentual superior.

3.2.1 Material Biológico

Foram coletados 5 mL de sangue periférico em tubo contendo anti-coagulante EDTA (ácido etileno de amino tetra-acético) dos pacientes, dos contactantes e dos controles. As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Leônidas e Maria Deane Fiocruz Amazônia, onde se realizou a extração de DNA e ELISA e a reação em cadeia da polimerase em tempo real.

3.2.2 Extração do DNA

A extração do DNA foi realizada com utilização do kit *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (*Qiagen*), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA extraído, livre de inibidores, contaminantes, proteínas e nucleases, foi diluído em 100μL de tampão AE para uso direto e armazenagem a -80°C até o momento de uso.

3.2.3 Desenho e elaboração de oligonucletídeos iniciadores

As sequências de iniciadores, sondas e plasmídeos utilizados no presente estudo foram elaboradas pelo Professor Dr. Felipe Gomes Naveca, do Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ/Amazônia, com base ao banco de dados do *GenBank*. Essas sequências foram posteriormente alinhadas pelo algoritmo MUSCLE implementado no programa Geneious versão 6.05. Contudo, regiões conservadas foram selecionadas como alvo para elaboração das sequências de iniciadores e sonda.

Após a determinação das sequências dos oligonucleotídeos iniciadores, análises complementares foram realizadas para determinar possível amplificação não-específica com auxílio da ferramenta *Primer-Blast* com a colaboração do Msc.George Villa Rouco.

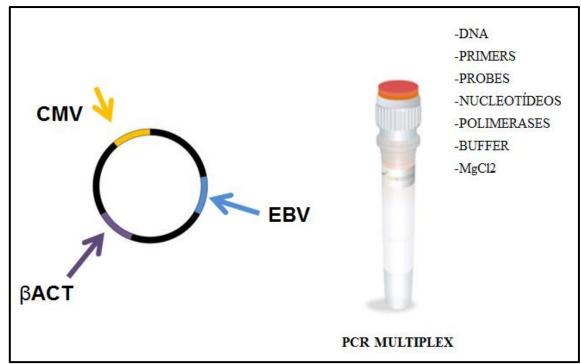


Figura 6 - Amplificação viral na concepção do plasmídeo e de β Actina.

Fonte: Autor (dados da pesquisa)

Esta tecnologia foi utilizada para amplificação viral na concepção de plasmídeo e de β-actina com os segmentos de DNA dos vírus EBV e CMV, para ser aplicada especificamente neste projeto.

3.2.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) - Tempo Real

Após a obtenção do DNA, o mesmo foi amplificado pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. Os oligonucletídeos iniciadores e a sonda utilizados na reação estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Características dos primers e sondas utilizados em PCR em tempo real.

Primer/Probe	Sequence (5' - 3')	Positions	Gene	Fragment (pb)
HCMV_FNS	CGTGTCGCCGCGCTAT	81554-81569		
HCMV_FNAS	CCGA A G A A A C G C A A C A C G T T	81510-81529	UL54 ^b	60
HCMV_FNP	VIC-TCAGCATCTGGTGCCTT	81535-81551		
EBV_FNS	CCGGAGACAACAAATTTAACATCA	79198-79175	_	
EBV_FNAS	CGCCGCTG GGA A CA TG	79139-79154	BLLF1°	60
EBV_FNP	FAM-CTGCAGTGGATACGAGAG	79173-79156		
β-Actin_FNS	TGGATCAGCAAGCAGGAGTATG	7792-7813		
β-Actin_FNAS	GCATTTGCGGTGGACGAT	7831-7848	Actin-beta ^c	57
β-Actin_FNP	NED-CGAGTCCGGCCCCT	7815-7828		

Disponível em: http/www.ncbi.nlm nih gov/tools/primers-blos.

Regiões conservadas foram escolhidas para o alvo da reação da PCR e posteriormente, por meio da ferramenta de busca *Primer-Blast*¹. As sequências foram comparadas às sequências nucleotídicas de outros organismos a fim de comprovar que os primers e a sonda são específicos para os respectivos vírus, e, não são complementares a outros alvos, assegurando a especificidade da reação.

As reações em cadeia da polimerase em tempo real foram realizadas com a utilização do mix TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, catálogo: 4444556) de acordo com as instruções do fabricante. Para maior confiabilidade dos resultados o ensaio foi conduzido com aplicação em duplicata das amostras testadas, sendo aplicado no mesmo ensaio controles positivos e negativos. Para a reação foi montado um mix de volume final de 18μL, contendo a 300 nM primers, 100 nM sonda e 10 μL do mix qPCR Taqman Advanced Multiplex.

A reação foi realizada em termociclador *Step One Plus* (Applied Biosystem) com o seguinte programa: uma primeira etapa a 50°C por 2 minutos para ativação da enzima e 95°C

_

¹ Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast.

por 20 segundos para desnaturação das fitas, seguido de 40 ciclos a 95°C por 1 segundo e 60°C por 20 segundos para hibridização dos iniciadores e detecção da amplificação.

A quantificação do DNA alvo foi realizada com utilização de uma curva padrão com diluição do controle padrão em base 10, com alcance de 2 a 2 x 10⁸ cópias por reação, em determinar o limite mínimo e máximo de detecção da reação, assim como a linearidade da reação. Assim, todos os alvos apresentaram limite de detecção de 2 cópias por reação, considerando um ensaio altamente sensível e específico.

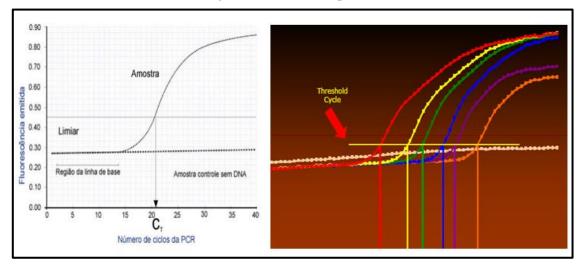
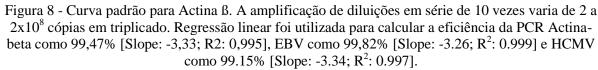
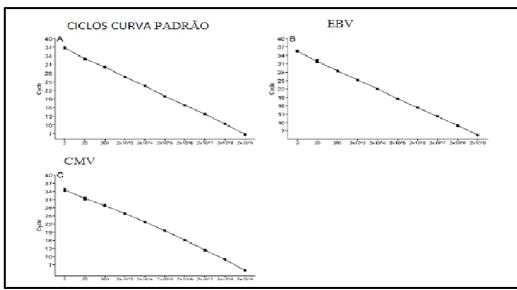


Figura 7 - Ciclo curva padrão.

Fonte: Autor (dados da pesquisa)





Fonte: Autor (dados da pesquisa)

3.2.5 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Os níveis de anticorpos IgG antígenos específicos para os vírus CMV e EBV foram quantificados por ELISA direto utilizando kit comercial (Kit Serion Elisa Classic) seguindo as recomendações do fabricante.

Inicialmente, microplacas com 96 poços sensibilizadas com antígenos virais foram adicionadas a 100 uL de soros das amostras diluídas 1/100, seguida de incubação a 37°C por 1 hora. Após incubação foram realizadas três etapas de lavagens com utilização do tampão de lavagem fornecido pelo kit. Em seguida foram adicionadas 100 uL de anticorpos conjugados com enzima e incubadas a 37°C por 30 minutos. A revelação do resultado foi realizada com adição da solução de substrato e leitura realizada em leitor de placas de ELISA em comprimentos de ondas a 405 nm.

3.2.6 Análise estatística

Mediu-se a carga viral do EBV e CMV em ambos os grupos. A variável-desfecho, portanto, é dicotômica: ter tuberculose (grupo caso) ou não ter tuberculose (mesmo sendo exposto – grupo controle de contactantes). A variável preditora primária é a presença de infeção latente pelo EBV, que foi avaliada pela presença de anticorpos IgG anti-EBV (sorologia) e o número de cópias do vírus Epstein-Barr.

Foram considerados secundariamente como variável preditora os outros vírus (CMV e EBV). A significância estatística foi aferida pelo teste *t* com uma variável dicotômica (ter tuberculose / não-ter tuberculose) *versus* a média de uma variável contínua (carga viral do EBV). Foi calculado a razão de chance (odds ratio) de ter tuberculose havendo infecção latente pelo EBV.

Os dados foram organizados em planilhas eletrônicas Microsoft Excel e o *software* utilizado para as análises foi o SPSS na sua versão 16, com vários pacotes. O nível de significância utilizado foi de 5%.

O teste estatístico utilizado para verificar associação significativa, foi o Teste Exato de Fisher Generalizado (AGRESTI, 1990) no caso de cruzamento entre variáveis categóricas. No caso de variável categórica e numérica utilizou-se o teste de Mann-Whitney.

Conceituação dos testes empregados nas análises segundo Agresti (1990):

- Teste Exato de Fisher Generalizados para tabelas $r \times c$.

Esse teste foi inicialmente proposto para tabelas 2 × 2. É um teste baseado em uma distribuição exata, em vez de uma aproximação da distribuição de Qui-Quadrado utilizado nos testes de Qui-Quadrado de Pearson e o da razão de verossimilhança.

O teste Exato de Fisher é útil quando valores esperados nas células são baixos e a aproximação de qui-quadrado não é boa. A ideia básica do teste é testar se existe associação entre variáveis categóricas, no entanto, agora usando probabilidade exata e generalizada para tabelas de tamanhos maior ou igual a 2 × 2.

- Teste de Mann-Whitney

Esse teste consiste na classificação de duas amostras, utilizando-o para a igualdade de duas medianas populacionais.

Um pressuposto para o teste de Mann-Whitney é que todos os dados são independentes de amostras de duas populações que tenham a mesma forma, cujas variações são iguais e que pertencem a uma escala no mínimo ordinal. A ideia básica é comparar duas populações se são distintas ou não. No campo paramétrico, o seu equivalente é o teste T para amostras independentes.

4 RESULTADOS

4.1 Dados demográficos de pacientes e contatos

Neste estudo participaram 68 pacientes com diagnóstico de tuberculose com média de idade de 26 anos para os pacientes e 38 anos para os contatos. Quanto ao sexo dos pacientes com TB, 47,1% são do sexo feminino e 52,9% do sexo masculino; dos contatos 75% são do sexo feminino e 25% do sexo masculino.

A procedência é de Manaus em 98,5% dos pacientes de TB e 98,4% dos contatos. A escolaridade dos pacientes é de 64,7% do Ensino Fundamental e 27,9% do Ensino Médio; dos contatos, 62,5% são do Ensino Fundamental e 23,2% do Ensino Médio.

Tabela 2 - Características demográficas de casos e contatos.

	Idade	S	exo	Proc	edência		Escolarida	ıde	
Grupo	Mediana (IIQ)	Feminino	Masculino	Coari	Manaus	Analfabeto	Ensino Fundamental	Ensino Médio	Ensino Superio r
Casos n = 68 (%)	26 (23,7 - 30,3)	32 (47,1)	36 (52,9)	1 (1,5)	67 (98,5)	1 (1,5)	44 (64,7)	19 (27,9)	4 (5,9)
Contato $n = 56 (\%)$	38 (29,2 - 49,1)	42 (75,0)	14 (25,0)	1 (1,8)	55 (98,2)	8 (14,3)	35 (62,5)	13 (23,2)	-
Total n = 124 (%)	32,4 (26,2 - 49,4)	74 (59,7)	50 (40,3)	2 (1,6)	122 (98,4)	9 (7,3)	79 (63,7)	32 (25,8)	4 (3,2)
p-valor	< 0,001*	0,00	010**	0,4	166**		0,0421**	k	

Fonte: Autor (dados da pesquisa).

A sorologia pelo método Elisa EBV e CMV foi positivo em 68 pacientes (100%).

Na análise viral dos contatos do Elisa EBV, detectou-se a positividade em 56 contatos (100%). No Elisa CMV a positividade esteve presente em 100% dos pacientes e 96,4% dos contatos.

Tabela 3 - Desenlace Primário - Sorologia.

	Gı	rupo	Total	_
Variáveis	Caso	Contato	n = 124 (%)	p-valor
	n = 68 (%)	n = 56 (%)	II – 124 (70)	
ELISA_EBV_Categorica				0,5323**
Positivo	68 (0)	56 (0)	124 (0)	
Negativo	0 (100)	0 (100)	0 (100)	
ELISA_CMV_Categorica				0,4117**
Positivo	68 (100)	54 (96,4)	122 (98,4)	
Negativo	0 (0)	2 (3,6)	2 (1,6)	

Fonte: Autor (dados da pesquisa).

Ao utilizar o método PCR no plasma dos pacientes com tuberculose, identificou-se a presença do genoma do vírus EBV em 7 pacientes (10,3%), sendo que os genomas do vírus CMV não foram encontrados.

Nos contatos, utilizando o PCR no plasma, o genoma do vírus CMV não foi encontrado. O do EBV foi encontrado em 9 contatos (16,1%).

A PCR β Actina no sangue funcionou em 56 contatos (100%) e em 68 pacientes (100%).

Tabela 4 - Presença de DNA Viral.

	Gr	upo	Total	
Variáveis	Caso	Contato	n = 124 (%)	p-valor
	n = 68 (%)	n = 56 (%)	II = 12+ (70)	
EBV				0,2331**
Genoma +	7 (10,3)	9 (16,1)	16 (12,9)	
Genoma -	61 (89,7)	47 (83,9)	108 (87,1)	
CMV				0,2979**
Genoma +	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Genoma -	68 (100)	56 (100)	124 (100)	

Fonte: Autor (dados da pesquisa)

Tabela 5 - Quantificação de DNA do vírus EVB.

Caso	Contato	p-valor
(n = 7)	(n = 9)	
32,3	33,0	0,378**

Fonte: Autor (dados da pesquisa)

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho parte de uma hipótese desenvolvida por Erik Barton e colaboradores, com a tentativa de explicar a alta prevalência dos vírus da família *herpeviridea* na espécie humana. De fato, esses vírus estão presentes em quase 100% da população adulta do planeta, sobretudo o EBV e o CMV. A quase totalidade dessas pessoas não apresenta morbidade decorrente da presença e latência viral. Fica a pergunta: por que duas espécies se associam mutuamente de forma perene, constante e com alta prevalência? Não é por acaso, à luz das teorias de Darwin e Dobzhansky (VARKI, 2012). Deve haver uma explicação para esta associação.

Provavelmente há uma vantagem evolutiva mútua configurando uma coevolução, uma espécie se adaptando à outra através dos milênios, auferindo benefícios sem prejudicar a parceira. A hipótese de Barton é que os vírus herpes promovam um reforço ao sistema imune sem prejuízo para o hospedeiro humano. Com isso haveria maior capacidade defensiva contra patógenos em geral, e, o ser humano, albergaria os vírus e garantiria sua transmissão e perpetuação eficaz.

A localização dos vírus herpes é estratégica para esse fim: EBV fica latente em linfócitos B, representando um booster sistêmico; CMV em epitélios, representando um booster em mucosas e portas de entrada dos patógenos usuais; HSV em tecido urogenital, outra porta de entrada importante; varicela zoster em território neural.

Estudos em modelos animais demonstram claramente que o estado de latência não é dormência, pois o vírus entra em fases líticas ciclicamente com baixas viremias. Talvez os gatilhos para tais reativações do herpes sejam estímulos naturais, como infecções intercorrentes (sistêmicas e mucosas), exposição solar e estresse. Tais pequenas viremias são contidas por força do próprio sistema imune, que produz citocinas como o interferon-gama para conter o herpesvírus, mas que agirá como um reforço imune em inespecífico em células vizinhas (*by-stander cells*), numa ação parácrina.

Modelos animais demonstram a sobrevivência de camundongos infectados por citomegalovírus murino quando expostos a bactérias extracelulares (*Yersinia pestis*) e intracelulares (*Listeria monocitogenes*), enquanto controles não infectados morrem (BARTON; WHITE; BERD, 2012).

Entretanto, evidências na espécie humana são parcas e frágeis, usando desenlaces intermediários, como expansão linfocítica e produção de citocinas face a patógenos

espontâneos (SANDALOVA, 2010). A evidência definitiva consistiria na comprovação de proteção real face a uma infecção natural bem definida.

A contribuição no combate à tuberculose e a preocupação de que é importante pesquisar e conhecer fatores envolvidos na transmissão do patógeno e na susceptibilidade do hospedeiro. A reação imune engendrada contra a micobactéria é componente essencial no equilíbrio entre resistência e susceptibilidade.

Os fatores genéticos e ambientais são fundamentais na modulação da resposta imune e no desenlace clínico da doença, incluindo-se o estado nutricional, condições socioeconômicas, comorbidade, uso de medicamentos imunossupressores e a coinfecção por patógenos, que tendem a diminuir a resposta imune do hospedeiro.

Destaca-se o caso do vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), que fez a tuberculose reemergir como sério agravo mundial à saúde pública.

Os vírus Epstein-Barr (EBV), o Citomegalovírus (CMV) são da família *Parvoviridae*. São vírus que estabelecem latência prolongada no organismo, com persistência perene após a aquisição inicial, provocando efeitos imprevisíveis no sistema imune do hospedeiro, seja por diminuir a resposta ou por favorecer infecção e câncer, além de precipitar quadros de autoimunidade.

Poucos são os estudos e pesquisas da coinfecção por estes vírus na tuberculose humana, sobretudo com ferramentas atuais, como o PCR em tempo real, que permite verificar, além da presença do genoma, a carga viral imediata e correlacionar com dados epidemiológicos.

Milhares de mortes no mundo têm como causa as infecções virais. O HIV (vírus da imunodeficiência humana) é, atualmente, a segunda maior causa de morte, responsável por 4,9% das mortes no mundo no ano de 2004 e pelo menos 13.320 mortes no Brasil no mesmo ano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004).

O vírus, ao infetar seus hospedeiros, utilizam, na grande maioria, as mucosas, principalmente pelas vias aéreas, pelo trato gastrointestinal e pelo trato urogenital, onde células de Langherans capturam o agente invasor, iniciando a resposta imune nos linfomados periféricos, estimulando a resposta imune inata (TANG et al., 1999).

Devido à alta taxa de replicação e/ou mutação, os vírus conseguem ultrapassar resposta imune inata, levando a ativação da resposta antígena específica. O mecanismo de defesa mais ativo contra a infeção viral é a média dos linfócitos TCD8+ específicos. Estes reconhecem a célula infectada e através da apostose é eliminada. Outra propriedade desta

célula na infecção viral é a produção de IFN-^a, que reduz diretamente a replicação de certos vírus, como o LCMV e o HBV (VAN DOMMELEN et al., 2006; VIDAL; LANIER, 2006).

Nesse estudo, procurou-se verificar se a coinfecção viral influencia o aparecimento da tuberculose pulmonar, assim como também a presença de genomas dos vírus EBV e CMV em pacientes com tuberculose, comparando-os aos contactantes.

Utilizou-se, para isto, o Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) — Tempo real, para a identificação e a quantificação do vírus. A amplificação viral na concepção de plasmídeo e de β actina com os segmentos de DNA dos vírus EBV e CMV.

Ao ser utilizado o Ensaio Imunoenzimático (ELISA) nos pacientes, detectou-se alta prevalência do vírus EBV e CMV ambos atingindo 100% dos pacientes.

Nos contatos, identificou-se soroprevalência alta, sendo que o vírus EBV atingiu 100% dos pacientes e o vírus CMV atingiu 96,4% dos pacientes.

Verificou-se uma grande prevalência do vírus EBV na população estudada, contribuindo, assim, com dado epidemiológico deste vírus na cidade de Manaus.

Ao se utilizar a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), foi identificada a presença do vírus EBV em 10,3% dos pacientes e atingiu 16,1% nos contatos. Não foi identificado o genoma do vírus CMV em nenhum paciente de tuberculose ou em seus contatos.

Os anticorpos específicos induzidos pelo EBV podem ser demonstrados por imunoflorescência ou ensaio enzimático (ELISA). Os títulos de anticorpos IgM e IgG mostraram-se elevados e foi utilizado para avaliar exposição prévia ao EBV (LEACH; SUMAYA, 2004; HURT e TAMMARO, 2007; GULLEY, 2008; JAWETZ et al., 2009).

O uso de técnicas de biologia molecular, como a reação em cadeia da Polimerase PCR, tem sido utilizado. Ela fornece uma boa evidência de que o doente tenha sido infectado pelo EBV.

A quantificação do PCR em tempo real para o EBV é considerada uma técnica eficaz para monitorar a terapia antiviral, pois apresentaram significativos títulos virais comparados com indivíduos portadores de infecção latente (JEBBINK et al., 2005).

O vírus Epstein Barr (EBV) pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Gama Herpes Virinae*. Este é o único que tem particularidade em infectar humanos (GRATAMO & EMBERG, 1995). É o agente etiológico da mononucleose infecciosa, doença linfoproliferativa de evolução aguda.

Foi descrita pela primeira vez em 1950 como linfoma em regiões da África, acometendo principalmente crianças (BURKITT et al., 2004).

Os primeiros estudos soroepidemiológicos foram realizados por Henle & Henle (1967), utilizando a imunoflorescência indireta – IFI (CANDEIAS & PEREIRA, 1970; WOLF et al., 1984). Os mesmos autores, em 1968, descreveram a associação do vírus à mononucleose infecciosa, sendo confirmado depois por outros autores.

A transmissão do EBV ocorre geralmente pelo contato direto com as secreções de orofaringe ou indiretamente por manipulação de objetos pessoais contaminados pelo agente viral (RICKINSON & KEIFF, 2007).

De acordo com Ambinder, Freedman e Connor (2012), o vírus Epstein Bar (EBV) ou herpesvírus humano tipo 4 infecta a maioria dos indivíduos antes da idade adulta e se apresenta sem sintomas e os anticorpos estão presentes em todos os grupos de população e cerca de 90 a 95% dos adultos são soropositivos.

Em estudo de revisão realizado, destacou-se que a soropositividade mundial de pessoas que entraram em contato com EBV e de cerca de 90 a 95%; porém a presença de DNA do vírus não foi identificada em pacientes com doença de Hodgkin, destacando que o vírus representa um fator de risco, associado à imunidade e outras condições do paciente.

Sousa et al. (2011), ao realizar pesquisa em indivíduos doadores de sangue saudáveis, identificou a presença de DNA de EBV em 39,7% em homens e 33,2% em mulheres; quanto à idade, identificaram a frequência maior em indivíduos com mais de 56 anos; revelando frequência elevada com características diferentes em relação a gênero e idade.

A EBV infecta mais de 90% da população mundial. A taxa de endemicidade varia conforme a região geográfica. O norte da África é considerado uma região com elevado número de casos, enquanto que o norte da Europa é considerado uma região com baixo nível de endemicidade. Dinamarca, Holanda e Brasil são considerados regiões com endemicidade intermediária (CRAWFORD, 2001).

Estudos realizados em países em desenvolvimento de clínica tropical demonstraram prevalência em crianças em idade pré-escolar perto de 100% em Uganda (KAFUKO et al., 1972), índice registrado também no Quênia (HENLE & HENLE, 1967).

Em estudo realizado por Leght & Sugden (2000), identificou-se a proteína EBNA¹, que media o início da síntese do DNA viral responsável pela segregação e manutenção do DNA viral.

Em estudo realizado em doadores de sangue e indivíduos com AIDS na cidade de São Paulo, o vírus Epstein Baar (VCA – IgG) foi encontrado em quase a totalidade dos voluntários saudáveis e em todos os pacientes com AIDS (em 68 pacientes, de 70), comportamento de acordo com os estudos publicados e conhecidos mundialmente (KUSCHNAROFF; BERROCAL et al., 2007).

Babcock (1996) afirmou que os locais de persistência do EBV nos indivíduos, sejam as células B latentes de memória e o número de células infectadas é de uma a cinquenta células B a por milhões, que permanecem por anos.

A proteína do antígeno nuclear do EBV (EBNA¹) liga-se ao DNA viral, fazendo com que o genoma viral permaneça na célula infectada, mantendo a infecção latente pelo EBV (YATES et al., 1984).

O indivíduo torna-se portador do vírus por toda a vida, após a infecção, permanecendo o EBV de forma latente nas células B de memória (GRYWALSKA et al., 2013; THOMPSON & KURZROCK, 2004; YOUNG & MURRAY, 2003).

Young & Kickinson (2004) definem que algumas das células B infectadas são eliminadas pela resposta imune do hospedeiro através das células T citotóxicas; outros tem a capacidade de sobreviver pela regulação da expressão de diferentes proteínas virais.

Em estudo de prevalência e aspectos clínicos da infecção congênita por citomegalovírus realizado por Yamamoto (1999), a prevalência da infecção foi de 2,6%, e 95% das mães tinham IgG anti-CMV.

No Brasil, os estudos têm demonstrado uma prevalência de anticorpos IgG para CMV em gestantes na ordem de 66,5% e 92% (FIGUEIRO-FILHO et al., 2005).

A maior incidência está em populações de baixo poder aquisitivo, que apresentam condições favoráveis para a disseminação, como condições inadequadas de moradia, de higiene pessoal e *habitat* da população (PARSLOW; STELES; TERR, 2004).

A infecção pelo CMV ocorre em praticamente todas as regiões do mundo. Estudos demonstram que as taxas de soroprevalência variam de 40 a 60% nos países do hemisfério norte, enquanto que na América Latina e África as taxas de soroprevalência são de 80 a 100% (VERONESI et al., 2002).

Matos, Meyer e Lima (2011) ressaltam que o citomegalovírus (CMV) é um patógeno de alta prevalência na população geral; possui vários mecanismos de escape do sistema imunológico. Eles definem como um agente infeccioso muito importante entre indivíduos imunossuprimidos.

Taylor (2003) e Junqueira, Sancho e Santos (2008) estimam que a prevalência mundial da infecção por CMV varia entre 40% a 100% nas diversas populações, porém a prevalência do CMV varia com o grau de desenvolvimento do país; nos países de baixo nível de desenvolvimento, a incidência varia de 70 a 100%, enquanto que nos países desenvolvidos, os níveis variam de 40 a 60%.

A sorologia é a técnica mais utilizada para a triagem populacional, sendo realizada por imunoensaio enzimático – ELISA (STAGNO et al., 1985).

A realização de técnicas de biologia molecular para a detecção de DNA do CMV, como a Reação em cadeia da Polimerase em Tempo Real, permite a emissão de resultado em aproximadamente 6 horas (MADHAVEN, 2010).

Em estudo soroepidemiológico utilizando o método ELISA, demonstrou-se uma soropositividade de 78% no estado do Ceará, de 97% no estado do Rio de Janeiro e de 80% no estado de São Paulo.

A soropositividade por faixa etária foi observada por Almeida (2001), o qual identificou que, de 18 a 24 anos, atingiu 67%, e acima de 50 anos a taxa atingiu 100%, demonstrando que cresce com a exposição e com a idade.

A infecção primária por CMV é resultado da introdução do vírus em um hospedeiro humano. O DNA do CMV, após penetrar no citoplasma da célula hospedeira, entra no núcleo e começa o processo de replicação, tendo como consequência a liberação de novos vírus no sangue e em outras feridas corporais (JUNQUEIRA; SANCHO; SANTOS, 2008).

A característica peculiar é a capacidade de latência. Após a infecção o vírus não é eliminado do organismo. Com a baixa do sistema imunológico, ela pode reativar, como no caso da gestação, AIDS, uso de drogas imunossupressores (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005; JUNQUEIRA; SANCHO; SANTOS, 2008).

A pesquisa de anticorpos da classe IgG para EBV neste estudo condiz com a literatura mundial. Nos pacientes de tuberculose se detectou alta prevalência, atingindo 68 pacientes (100%).

Verificou-se a presença do genoma viral, identificado em 10,3% dos pacientes e em 16,1% dos contatos. Sendo assim, nos pacientes com tuberculose o achado foi de 100% de latência, alta prevalência do vírus EBV, com 10,3% de viremia.

Quanto ao vírus CMV em pacientes com tuberculose, identificou-se 100% de latência sem viremia e anticorpos de classe IgG. Nos contatos, o vírus esteve presente em 96,4% deles.

Acredita-se que a baixa prevalência dos genomas virais deve corresponder à realidade epidemiológica da cidade de Manaus.

6 CONCLUSÕES

Neste estudo, foi possível evidenciar:

- 1. Confirmou-se que a epidemiologia do EBV e CMV em Manaus reproduz o padrão internacional, com prevalência de quase 100% em adultos.
- 2. Os dados demonstram a presença dos vírus EBV e CMV em 100% dos casos.
- 3. Não foi identificada significância importante na quantificação de DNA do vírus EBV encontrado nos casos de tuberculose/contatos.
- 4. Os resultados encontrados mostraram que existe uma probabilidade de proteção, no entanto é necessário avaliar em número maior de portadores e não portadores de tuberculose.
- 5. Verificou-se que a grande maioria dos contatos tinham vírus, mas não desenvolveram TB, o que pode sugerir proteção; no entanto, há necessidade de melhor avaliação.
- 6. Com os dados obtidos, tem-se suporte para desenhar um projeto de continuidade com desenho mais adequado, incluindo faixa etária com maior seronegatividade para EBV e CMV e acompanhamento longitudinal.

REFERÊNCIAS

AGRESTI A. Categorical data analysis. New York: Wiley. 1990. p. 59-66.

ALMEIDA, NLB et al. Citomegalovirus Seroepidemiology in on Urban Community of São Paulo, Brazil. Rev. Saúde Pública. 2001. Apr. 35 (2): 124 – 9.

AMBINDER, R. F..; FREEDMAN, A. S.; CONNOR, R. F. The role of Epstein-Barr virus in Hodgkin lymphoma. June 26, 2012.

ANTINORI A, et al. Value of combined approach with thallium-201 single-photon emission computed tomography and epstein-barr virus DNA polymerase chain reaction in CSF for the diagnosos of AIDS-related Primary CNS lymphoma. **Journal of Clinical Oncology**, New York, v. 17, n. 2, p. 554-560, 1999.

ASSIS, N.; LOPES, M.; CARDOSO, M; COSTA, M.; SOUSA, C; LIMA, K. Diagnóstico molecular da tuberculose pulmonar. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial. J. Bras. Patol. Med. Lab., Rio de Janeiro, v. 43, n. 1, Feb. 2007.

BABCOCK, G. I.; DECKER, L. L; VOLK, M.; LAWSON, T. D. EBV Persistence in Memory cells in vivo. **Ymmunity**, v. 9, p. 395-404, 1998

BARTON, E.; WHITE, D.; BERD, S. Modulação imune durante latente Herpesvirus Infecção. **Immunol. Rev.**, [s. 1.], v. 24, 2012.

BELZ GT, et. al. Virus-specific and bystander CD8+ T-cell proliferation in the acute and persistent phases of a gammaherpesvirus infection. **J Virol.**, [s. l.], n. 75, and 9, may, 2001,

BENTO, J., et al. Métodos diagnósticos em tuberculose. **Acta Médica Portuguesa**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 145-154, 2011.

BOLOVAN-FRITTS C. A.; MOCARSKI, E. S.; WIEDEMAN, J. A. Peripheral blood CD14 (1) cells from healthy subjects carry a circular conformation of latent cytomegalovirus genome. **Blood**, New York, v. 93, n. 1, p. 394-398, 1999.

BOUCHONNET, F.; BOECHAT, N.; BONAY, M.; HANCE, A.J. Alpha/beta interferon impairs the ability of human macrophages to control growth of Mycobacterium bovis BCG. **Infect. Immun.**, [s. l.], v. 70, n. 6, 2002.

	da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Vigilância epidemiológica de pecíficos: tuberculose . Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 1999.
da Saúde, 2002.	Guia de doenças infecciosas e parasitárias. Brasília: Ministério
	Manual de bacteriologia da tuberculose. 2. ed. Rio de Janeiro:

Ministério da Saúde, 2010. 115 p

BRETSCHER, P. A. An hypothesis to explain why cell-mediated immunity alone can contain infections by certain intracellular parasites and how immune class regulation of the response against such parasites can be subverted. **Immunol Cell Biol**, [s.l.], p. 343-51, Oct., 1992.

BURKITT, P.; KERYER, C.; OOKA, T.; CORBEX, M. EBV-associate nasopharyngeal carcinomas: from epidemiology to virus-tergeting strategies: **Trends in Microbiology**, [s.l.], ano 12, p. 256-360, 2004.

BURNETT, G. W. **Microbiologia Oral e Doenças Infecciosas**. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 1978.

CALLAN, M. F. A resposta imunitária ao vírus EpsteinBarr. **Micróbios Infect**. v. 6, p. 937-945, 2004.

CANDEIAS, J.A.N.; PEREIRA, M.S. **Pesquisa de anticorpos para o vírus EB em adultos e crianças**. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 12, ano 5, p. 333-338, 1970.

CANINI, R. M. et al. Qualidade de vida de indivíduos com HIV/AIDS: uma revisão de literatura. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 6, p. 940-645, nov./dec., 2004

CANNON, M. J., et al. Review of cytomegalovirus seroprevalenc and demographic characteristics associate with infection. **Rev Med Virol**, v. 20, ano 4, p. 202-13, 2010.

CHERVONSKY, A.V. Influência do ambiente microbiano sobre autoimunidade. **Nat Immunol**, v. 11, p. 28-35, 2010.

CONNELLY, K. P.; DEWITT, L. D. Neurologic complications of infectious mononucleosis. Pediatric Neurology. **Chippewa Falls**, v. 10, p. 181-184, 1994.

CRAWFORD, D. H. Biology and disease associations of Epstein-Barr virus. Philos Trans R **Soc Lond B Biol Sci**, p. 356:461-473, 2001.

DELESPESSE, G. C. E.; DEMEURE, L. P.; YANGY, et al. Maturation of naive human CD4 + T Linfocytes in to Th1, Th2 effectors. **Int Arch Allergy Immunol**, p. 113-157, 1997.

DEMMLER, G. J.; BUFFONE, G. J.; SCHIMBOR, C. M.; MAY, R. A. Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification. **J Infect Dis**, v. 158, ano 6, p. 1177-84, 1988.

DECMAN, V., et al. Immune control of HSV-1 latency. **Viral Immunol**, v. 18, p. 466-473, 2005.

DHIMINGER, A.; BADER, U.; EGGERS, M. Evaluation of two novel enzyme immunoassays using recombinant antigens to detect cytomegalovirus specific immunoglobulins M in sera from pregnant women. **J Clin Virol**, v. 13, p. 161-171, 1999.

DREW, W. L. Cytomegalovirus infection in patients with AIDS. Clinical infectious diseases, Chicago, v. 14, p. 608-615, 1992.

- FALKE, D. Virologia. 2. ed. São Paulo: Editora Springer, 1979.
- FERREIRA, S. M. B.; SILVA, A. M. C.; BOTELHO, C. Abandono do tratamento da tuberculose pulmonar em Cuiabá MT Brasil. **J. Bras. Pneumol**. v. 31, ano 5, p. 427-435, 2005. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1590/S1806-37132005000500011 Acesso em: 06 nov. 2012.
- FIGUEIREDO, L. T. M. Mononucleose infecciosa. In: Lopes AC (Org.). **Tratado de Clínica Médica**. São Paulo: Editora Roca; 2009. p. 3862-4.
- FIGUEIRÓ-FILHO, E. A.; SENEFONTE F. R. A.; LOPES, A. J. H. A.; MORAIS, O. O.; SOUZA JÚNIOR V. G; MAIA T. L. et al. Toxoplasmose aguda: estudo da frequência, taxa de transmissão vertical e relação entre os testes diagnósticos materno-fetais em gestantes em estado da região centro-oeste do Brasil. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 27, n. 8, p. 442-9, 2005.
- FINE PEM. Immunities in and to tuberculosis: implications for pathogenesis and vaccination, in tuberculosis, back to the future. New York: J Porter; 2000.
- FIUZA DE MELO, F. A.; HIJAR, M. A. Introdução. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu; 1996, p. 914-15.
- FLESH, L., KAUFMANN, SH. Mycobacterium growth inibition by interferon-gamaactivated bone marrow macrophages and differencial susceptisility among strain of Mycobacterium tuberculosis. **J Immunol**, v. 138, 1987. p. 4408.
- GILDEN, D. H., et al. Herpesvírus infections of the nervous system. **Nature Clinical Practice Neurology**, London, v. 3, n. 2, p. 82-93, 2007.
- GOLD, E.; NANKERVIS, G. A. Cytomegalovirus. Viral infections of human: epidemiology and control. 3. ed. New York: Plenum Press, 1991.
- GONÇALVES, H. D. Corpo Doente: estudo acerca da percepção corporal da tuberculose. In: Duarte LFD (Org.). **Doença, sofrimento, perturbação: perspectivas etnográficas**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1998. p. 210.
- GONZALES, M. F.; DAVIS, R. L. Neuropathology of acquired immunodeficiency syndrome. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, Oxford, v. 14, p. 345-363, 1988.
- GONZALEZ-JUARRER, O. M., et al. Temporal and spatial arrangement of lymphocytes within lung granulomas induced by aerosol infection with Mycobacterium tuberculosis. **Infection and Immunity**. Washington, v. 69, p. 1722-1728, 2001.
- GRATAMO, J. W.; ERNBERG, I. Molecular epidemiology of Epstein Barr vírus infection. **Advances in Cancer Research**, v. 67, p. 197-253, 1995.
- GRESS, R. E.; DEEKS, S. G. Timo actividade reduzida e a infecção envelhecer prematuramente o sistema imunitário. **J Clin Invest**, v. 119, p. 2884-2887, 2009.

GROSS, T. G. Infectious mononucleosis and other Epstein-Barr virus related disorders. In: Greer JP, Foerster J, Rodgers GM, et al. (editors). **Wintrobe's clinical hematology**, 12 th ed. Philadelphia: Lippincott Williams, 2009. p. 1589-1611.

GRYWALSKA, E. et al. Epstein-Barr Virus-Associated Lymphoproliferative Disorders. **Postepy Hig Med Dosw**, v. 67, p. 481-490, 2013.

GULLEY, M. L.; TANG, W. Laboratory assays for Epstein-Bar vírus-related disease. **Jol Mol Diagn**, v. 10, ano. 4, p. 279-92, 2008.

HADINOTO, V.; SHAPIRO, M.; SUN, C. C.; THORLEY-LAWSON, D. A. The dynamics of EBV shedding implicate a central role for epithelial cells in amplifying viral output. **PLoS Pathog**. 2009.

HENLE, G.; HENLE, W.; DIEHL, V. Inmunofluorescnce, interference and complement fixation technique in the detection of the herpes types virus in *Burkitt's* tumor cell lines. **Cancer Research**, v. 27, p. 2442-2446, 1967.

HERTEL, L., MOCARSKI, E. S. Global analysis of host cell gene expression late during cytomegalovirus infection reveals extensive dysregulation of cell cycle gene expression and induction of Pseudomitosis independent of US28 function. **J Virol**, v. 78, ano 21, p. 1988-2011, 2004.

HIRSH, M. S. In: KASPER, D. L. *et al.* **Harrison Medicina Interna**. v. 1. 16. ed. Rio de Janeiro: McGrawHill, 2006, p. 1002.

HISLOP, A. D., et al. EBV-specific CD8+ T cell memory: relationships between epitope specificity, cell phenotype, and immediate effector function. **J Immunol**, v. 167, 2001.

_____. Homing tousilar de células específicos do vírus de Epesteim – bam T CD8+ e o vírus-hospedeiro equilíbrio. **J Clin Invest.**, n. 115, 2005. p. 2546-2555.

HURT, C.; TAMMARO, D. Diagnostic evaluation of mononucleosis-like illnesses. **Am J Med**, v. 120, ano 10, 2007. p. 911.

HUTT-FLETCHER, L. M. Epstein-Barr virus entry. J Virol, v. 81, n. 15, p. 7825-32, 2007.

JACKETT, P. S.; BOTHAMELY, G. H.; BATRA, H. V., et al. Specifivity of antibodies to immunodominant mycobacterial antigens in pulmonary tuberculosis. **J Clin Microbiol**, v. 26, 1988. p. 2318.

JAWETZ, E. et al. **Microbiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

JEBBINK, J.; BAI, X.; ROGERS, B. B.; DAWSON, D. B.; SCHEUERMANN, R. H.; DOMIATI-SAAD, R. Development of real-time PCR assays for the quantitative detection of Epstein-Barr virus status on presenting features and outcome in age-defined subgroups of patients with classic Hodgkin lymphoma: a population-based study. **Blood**, v. 106, n. 7, p. 2444-2451, 2005.

JUEL-JENSEN, B. E. Infectious mononucleosis: Epstein-Barr virus disease. In: Weatherall, D. J.; Ledingham J GG; Warrell DA. **Oxford textbook of medicine**, Oxford, p. 572-575, 1987.

JUNKER, A. K. Epstein-Barr virus. **Pediatrics in Review**. Elkgrove Village, v. 26, n. 3, p. 79-85, 2005.

JUNQUEIRA, J. J. M.; SANCHO, T. M.; SANTOS, V. A. Citomegalovírus: Revisão dos Aspectos Epidemiológicos, Clínicos, Diagnósticos e de Tratamento. **Revista de Medicina**, São Paulo, edição 86, 2008. Disponível em: http://www.newslab.com.br/newslab/pdf/artigos86/art01/art01.pdf. Acesso em: 5 fev. 2015.

JUNQUEIRA, J. J. M.; SANCHO, T. M.; SANTOS, V. A. Citomegalovirus: Revisão dos Aspectos Epidemiológicos, Clínicos, Diagnóstico e de Tratamento. **NewsLab**, v. 86, p. 88-104, 2008.

KAFUKO, G. W.; HENDERSON, B. E.; KIRYA, B. G.; MUNUBE, G. M. Epstein-Barr virus antibody levels in children from the West Nile district of Uganda. **Lancenet**, p. 706-709, 1972.

KAKALACHEVA, K.; MUNZ, C.; LÜNEMANN, J. D. Gatilhos virais da esclerose múltipla. **Biochim Biophys Acta**, p. 132-140, 2011.

KAJI, M.; SHOJI, H. Detection of Epstein-Barr virus genome in peripheral leucocytes and CSF by the polymerase chain reaction in two patients with Epstein-Barr virus related to aseptic meningitis. **Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry**, London, v. 59, p. 99-104, 1995.

KASPER, D. L, *et al.* **Harrison Medicina Interna**. 16 ed., v. 1. Rio de Janeiro: McGrawHill, 2006. P. 1099.

KAUFMANN, S. H. Recent findings in immunology give tuberculosis vaccines a new boost. **Trends Immunol**, v. 26, n. 12, p. 660-7, 2005.

KHAN, N. A sobrecarga imunológica da infecção por citomegalovírus humano. **Arch Immunol Exp Ther (Warsz)**, v. 55, p. 299-308, 2007.

KIM, P. S; AHMED, R. Features of responding T cells in cancer and chronic infection. **Curr Opin Immunol**, n. 22, 2010.

KEUTZ, L. C. Resposta imunológica contra vírus. In: Furtado F (Org.). **Virologia veterinária**. Santos: UFSM, 2007. p. 239-258.

KRITSKI, A. L.; LAPA E SILVA, J. R.; CONDE, M. B. Tuberculosis and HIV: renewed challenge. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, n. 3, p. 417-422, May 1998.

_____. CONDE, M. B., SOUZA, G. R. M. **Tuberculose: do ambulatório à enfermaria**. São Paulo: Atheneu, 1999.

KUSHNAROFF, T. M.; BERRROCAL, T. G. et al. Prevalencia da infecção pelo vírus Epstein Barr em voluntários doadores de sangue e indivíduos com AIDS na Cidade de São Paulo. Arquivos Médicos da Faculdade de Ciencias médicas Santa Casa São Paulo, 52 (1), B-13, 2007.

LANDGREW, M. et al. Diagnosis of Epstein-Barr Virus-induced Central Nervous System Infections by DNA Amplification from Cerebrospinal Fluid. **Annals of Neurology**, Boston, v. 35, n. 5, p. 631-635, 1994.

LAPA E SILVA, J. R.; BOÉCHA, T. N. Jornal Brasileiro de Pneumologia. O ressurgimento da tuberculose e o impacto do estudo da imunopatogenia pulmonar. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, São Paulo, v. 30, n. 4, July/Aug. 2004.

LAWN, STEPHEN D.; WOOD, ROBIN. Tuberculosis in HIV. In: COHEN, Jonathan; OPAL, Steven M; POWDERLY, William G. **Infectious Diseases**. 3. ed. Philadelphia: Elsevier, 2010. p. 981-988.

LEACH, C. T.; SUMAYA, C. V. **Epstein Barr virus**: general laboratory findings. In: Fegin RD, Cherry JD, Demler JD, Kaplan SL. Textbook of pediatric infectious diseases. 5 ed. Philadelphia: Saunders, Elsevier, 2004, p. 1943-6.

LEITE, C. Q. F., TELAROLLI, J. R. R. Aspectos epidemiológicos e clínicos da tuberculose. 1997.

LEVINSON, W.; JAWETZ, E., et al. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 4. ed. Porto Alegre: Editora ARTMED, 1998.

LIBMAN, H.; WITZ, R. A. **Infecção pelo HIV – Um Manual Clínico**. 2. Ed. [s.l.]: Medsi Editora Médica e Científica Ltda, 1995.

LIBRI, V, et al. Cytomegalovirus infection induces the accumulation of short-lived, multifunctional CD4+ CD45RA+ CD27 T cells. **Immunology**, p. 132-326, 2011.

LEIGHT, E. R; SUGDEN, B. **EBNA** – **I**: A Protein pivotal to latent infection by Epstein-Barr Virus. **Rev. Med. Viral**, v. 10, p. 83-100, 2000.

LILLEBAEK, T.; ANDERSEN, A. B., DIRKSEN, A.; SMITH, E.; SKOVGAARD, L. T. KOK-JENSEN, A. Persistent high incidence of tuberculosis in immigrants in a low-incidence country. **Emerg Infect Dis**, v. 8, n. 7, p. 679-84, 2002.

LING, P. D., et al. The dynamics of herpesvirus and polyomavirus reactivation and shedding in healthy adults: a 14-month longitudinal study. **J Infect Dis**, n. 187, p. 1571-1580, 2003. LINUMA, Y.; ICHIYAMA, S.; YAMORI, S.; OOHAMA, J.; TAKAGI, N.; HASEGAWA, Y., et al. Diagnostic value of the Amplicor PCR assay for initial diagnosis and assessment of treatment response for pulmonary tuberculosis. **Microbiol Immunol**, v. 42, n. 4, p. 281-7, 1998.

LJUNGMAN, P.; HAKKI, M.; BOECKH, M. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. **Infectious disease clinics of North America**, Philadelphia, v. 24, p. 319-337, 2010.

- LURIE, M. B. Resistence to tuberculosis, experimental studies in native and acquired defensive mechanisms. USA: Harward Univ Press, 1964.
- MADHAVAN, H. N. pp65 antigenemia and real time polymerase chain reaction (PCR) based-study to determine the prevalence of human cytomegalovirus (HCMV) in kidney donors and recipients with follow-up studies. **Virology Jounal**, 2010.
- MANSUR; HENRY. Management of Opportunistic Infections Associated with Human Immunodeficiency. **Virus Infection**. In: BENNETT, John; DOLIN; Raphael, 2010.
- MATOS, S. B.; MEYER, R.; LIMA, F. W. M. Citomegalovírus: uma revisão da patogenia, epidemiologia e diagnóstico de infecção. Rev. Saúde. Com, v. 7, n. 1, p. 44-57, 2011.
- MATHEMA B.; DRISCOLL, J. R.; BIFANI, P. J.; MCGARRY, M.A.; ZICKAS, G.M.; KREISWIRTH, B. N.; TABER, H. W. Spoligologos: a bioinformatic approach to displaying and analyzing Mycobacterium tuberculosis data. **Emerg Infect Dis**, v. 8, n. 11, p. 1306-9, 2002.
- MAZUREK, G. H. Guidelines for using the QuantiFERON®-TB test for diagnosing latent *Mycobacterium*tuberculosis infection. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, 2003. Disponível em: http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5202a2.htm. Acesso em: 16 nov. 2015.
- MCCUTCHAN, J. A. Cytomegalovirs infections of the nervous system in patients with AIDS. **Clinical infectious diseases**, Chicago, v. 20, p. 747-754, 1995.
- MEIOS, R. E.; LANG, S. M.; JUNG, J. U. Gammaherpesvírus humana estratégias de evasão imune. In: ARVIN, A. et al., **Herpesviruses Humanos**: Biologia, Terapia e Imunoterapia. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.
- MELLO, F. C. Q. et al. Evaluation of an amplification test AMPLICOR *Mycobacterium* tuberculosis (MTB test Roche Molecular Systems for the diagnosis of smear negative pulmonary tuberculosis (SNPT) at a teaching hospital, in Rio de Janeiro, Brasil [abstract]. **Am J Respir Crit Care Med**, n. 165, 2002.
- MELO, F. A. F.; AFIUNE, J. B.; HIJJAR, M. A.; GOMES, M.; RODRIGUES, D. S. S.; KLAUTAU, G. B. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 3. ed. São Paulo: Ed Atheneu; 2005; p. 1139.
- MOCARSKI, E. S.; SHENK, T.; PASS, R. F. **Cytomegaloviruses**. In Fields Virology, 5th edn, Knipe DM, Howley PM (eds). Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 2007. p. 2702-2772.
- MORRONE, N. Diagnóstico da tubercurlose em sintomáticos respiratórios: comentários a respeito das II Diretrizes da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia e Ministério da Saúde. **Jornal brasileiro de Pneumologia**, v. 31, n. 4, São Paulo July/Aug. 2005.
- MOSS, P.; KHAN, N. CD8(+) T-cell immunity to cytomegalovirus. **Hum Immunol**, n. 65, p. 456-464, 2004.

MURRAY, P. J.; WANG, L.; ONUFRYK, C.; TEPPER, R.I.; YOUNG, R.A. T cell-derived IL-10 antagonizes macrophage function inmycobacterial infection. **J. Immunol**, v. 158, p. 312-21, 1997.

NEGISHI, H et al. Intraperitoneal administration of cytomegalovirus hyperimmunoglobulin to the cytomegalovirus-infected fetus. **J Perinatol**, v. 18, p. 466-9, 1998.

NORTH, R. J.; JUNG, Y. J. Immunity to Tuberculosis. **Annu Rev Immunol**, v. 22, p. 599-623, 2004.

OGUSKU, M. M.; SALEM, J. I. Análise de diferentes *primers* utilizados na PCR visando ao diagnóstico da tuberculose no estado do Amazonas. **J Bras Pneumol**, v. 30, n. 4, p. 343-9, 2004.

OLIVEIRA, H. B.; MOREIRA FILHO, D. C. Abandono de tratamento e recidiva da tuberculose: aspectos de episódios prévios, Campinas, SP, Brasil, 1993-1994. **Rev Saúde Pública**, v. 34, n. 5, p, 437-443, 2000. Disponível em: http://www.sciel.br/pdf/rsp/v34n5/3211.pdf. Acesso em: 06 nov. 2012.

PAI, M.; RILEY, L. W.; COLFORD, J. M. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. **Lancet Infect Dis**, v. 4, n. 12, p. 761-76, 2004.

PALOMINO, J. C. Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis: feasibility and applicability in the field. **Eur Respir J**, v. 26, n. 2, p. 339-350, 2005.

PANNUTI, C. S. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 3. ed. São Paulo: Ed Atheneu; 2005. p. 311.

PARRONCHI, P. et al. Allergen and bacterial antigen-specific T Cell clones established from atopic donnors show indifferent profile of cytokine production. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 88, n. 45, 1991.

PARSLOW, G. T.; STELES, P. D.; TERR, I. A. **Imunologia Médica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 566.

PELLETT, P. E.; ROIZMAN, B. A família Herpesviridae: Uma Breve Introdução. In: KNIPE, D. M.; HOWELY, P. M. Fields Virology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2.479-2500.

PREIKSAITIS, J. K.; BROWN, L.; MCKENZIE, M. The risk of cytomegalovirus infection in seronegative transfusion recipients not receiving exogenous immunosuppression. **J Infect Dis**, v. 156, n. 523, 1988.

PRATESI, F. et al.. Deiminated Epstein-Barr antigénio nuclear 1 é um alvo de anticorpos anti-proteína citrulinados na artrite reumatóide. **Artrite Rheum**, v. 54, p. 733-741, 2006.

RAFAILIDIS, P. I. et al. Severe cytomegalovirus in apparentle immunocompetent pacients: a systematic review. **Virology Journal**, London, v. 5, n. 47, March 2008.

REVISTA DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS. São Paulo, v. 18, n. 1, p. 17-28, 1997.

RICKINSON, A. B.; KIEFF, E. D. Esptein Barr virus In: ROIZMAN, B.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A; MARTIN, M. A.; STRUS, S. S. (eds). Fields Virology. 5th; Philadlphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 2656-2660.

ROSEN G. Uma história da Saúde Pública. São Paulo: Hucitec, 1994. 423 p.

ROULLET, E. Opportunistic infections of the central nervous system during HIV-1 infection (emphasis on cytomegalovirus disease). **Journal of Neurology**, Berlin, v. 246, p. 237-243, 1999.

SALGAME, P.; ABRAMS, J.; CLAYBERGER, C. et al. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. **Science**, p. 254:279, 1991.

SANDALOVA, E. et al. Contribution of herpesvirus specific CD8 T cells to anti-viral T cell response in humans. **PLoS Pathog**., 6, 2010.

SANTOS, J. Resposta brasileira ao controle da tuberculose. **Rev. Saúde Pública**, v. 41, p. 87-94, 2007.

SCATENA, L. M. Dificuldades de Acesso a Serviços de Saúde para Diagnóstico de Tuberculose em Municípios do Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, n. 3, p. 389-397, 2009.

SCHLEISS, M. R. Persistent and recurring viral infections: the human herpesvíruses. **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, St. Louis, v. 39. p. 7-23, jan. 2009.

SCHOOLEY, R. Infecção pelo vírus Epstein Barr. In: Cecil: Tratado de medicina interna. Rio de Janeiro: **Elsevier**, p. 2900-3, 2009.

SCHULGER, N. W.; ROM, W. N. The host immune response to tuberculosis. **Am J Respir Crit Care Med**, n. 154, 1998.

SHOOLEY, R. Infecção pelo virus Epstein Barr. In: Cecil: **Tratado de medicina interna**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 2900-3.

SILVA, A; ZUCOLOTO, S. O papel do vírus Epstein-Barr na tumorigênese humana. **Medicina Ribeirão Preto**, v. 36, n. 1, p. 16-23, 2003.

SILVA, C. A. et al. Neurologic Cytomegalovirus complications in patients with AIDS: retrospective review of 13 cases and review of the literature. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 52, n. 6, p. 305-310, 2010.

SILVERSTEIN, A.; STEINBERG, G.; NATHANSON, M. Nervous system involment in infectious mononucleosis. **Archives of neurology**, Chicago, v. 26, p. 353-358, 1972.

SINGER, C.; DIGEL, M.; JAHN, G. Cytomegalovirus cell tropism. Current Topics in Microbiology and Immunology, Berlin, v. 325, p. 63-83, 2008.

SNYDER, C. M. et al. Inflação memória durante a infecção viral crônica é mantido por produção contínua de curta duração, T funcional células. **Imunidade**, v. 29, p. 650-659, 2008.

SOARES, J. L. Dicionário Etimológico e Circunstanciado de Biologia. [s.l.]: Editora Scipione, 1993.

SOUSA, H.; SILVA, J.; AZEVEDO, L.; PINTO-CORREIA, A. L.; CATARINO, R.; PINTO, D.; LOPES, C.; MEDEIROS, R. Epstein-Barr virus in healthy individuals from Portugal. **Acta Med Port**, v. 24, p. 707-712, 2011.

SPERHACKE, R.D.; MELLO, F. C.; ZAHA, A.; KRITSKI, A. L.; ROSSETI, M. L. Detection of Mycobacterium tuberculosis by a polymerase chain reaction colorimetric dot-blot assay. **Int J Tuberc Lung Dis**, v. 8, n. 3, p. 312-7, 2004.

STAGNO, S., Whitley RJ. **Herpesvirus infection of pregnancy**. N. Engl. J Med; 313: 1270 – 1274, 1985.

SUCCI, R. C. M. Meningoencefalite Tuberculosa na Infância - Estudo de 358 casos, aspectos clínicos, laboratoriais e fatores prognósticos. 1990. 240p. Tese (Doutorado) - Departamento de Pediatria da Escola Paulista de Medicina, 1990.

SUCHMACHER, M; GELLER, M. Qual o diagnóstico? Rio de Janeiro: **EPUB**, p. 75-6, 2005.

SYLWESTER, A. W. et al. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. **J Exp Med**, n. 202, p. 673–685, 2005.

TANG, Y. Q.; YUAN, J.; OSAPAY, G., et al. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. Scinece (Wash.), n. 286, p. 498-502, 1999.

TAN, L. C. et al. A re-avaliação da freqüência de células T CD8 + específico para EBV em vírus saudável transportadoras. **J Immunol**, n. 162, p. 1827-183, 1999.

TAYLOR, G. H. Cytomegalovirus. Am Fam Phys, v. 67, n. 3, p. 519-24, 2003.

TAYLOR-WIEDEMAN, J. et al. Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. **Journal of general virology**. London, v. 72, p. 2059-2064, 1991.

THOMPSON, M. P.; KURZROCK R. Epstein – barr Virus and Cancer. Clin Cancer Res, v. 10, ano 3, 2004.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. [s. l.]: Ed. Atheneu, p. 603-605, 2005.

TRONSTEIN, E. et al. Genital shedding of herpes simplex virus among symptomatic and asymptomatic persons with HSV-2 infection. **J Am Med Assoc**, n. 305, p. 1441-1996, 2011.

TSELIS, A. et al. Epstein-Barr virus encephalomyelitis diagnosed by polymerase chain reaction: Detection of the genome in the CSF. **Neurology**, New York, v. 48, p. 1351-1355, 1997.

TSUYUGUCHI, I. Immunology of tuberculosis and cytokines. **Kekkaku**, v. 70, n. 5, 335-46, 1995.

TUFARIELLO, J. M.; CHAN, J.; FLYNN, J. L. Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. **Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 3, p. 578-590, 2003.

VANDEVENNE, P; SADZOT-DELVAUX, C. J. Piette inata resposta imune e interferência viral estratégias desenvolvidas pelos herpesvírus humanos. **Biochem Pharmacol**. 2010.

VAN DOMMUNELEN, S. L. et al. Perforin and granzymes have distinct roles in defensive immunity and immunopathology. **Imunity**, v. 25, n. 5, p. 835-848, 2006.

VARKI, A. Nothing in medicine makes sense, except in the light of evolution. **J Mol Med**, v. 90, n. 5, p. 481-94, may 2012.

VERONESI, R. et al. Tratamento de Infectologia. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. p. 190.

_____. FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 3. ed. São Paulo: Ed Atheneu; 2005; p. 1141.

VIDAL, S. M.; LANIER, L. L. NK cell recognition of mouse cytomegalovirus-infected cells. **Curr Top Microbiol Immunol**, n. 298, p. 183-206, 2006.

VIRGIN, H. W.; SPECK, S. H. Desvendando imunidade a gama-herpesvírus: um novo modelo de compreensão do papel da imunidade na infecção pelo vírus da crônica. **Curr Opin Immunol**, n. 11, p. 371-379, 1999.

WANG, F; KIEFF, E. In: Kasper, DL. *Et .al*. **Harrison Medicina Interna**, v. 1. 16^a. Edição. Rio de Janeiro: McGrawHill, 2006, p. 1006.

WECK, K. E., et al. Murino gama-herpesvírus 68 causas grave arterite grandes vasos em ratinhos falta de resposta interferon-gama: um novo modelo para a doença vascular induzida por vírus. **Nat Med**, n., p. 1346-1353, 1997.

WELLER, T. H.; PEARSON, R. **Citomegaloviruses**: a historical perspective. Herpes, Worthing, v. 7, n. 3, p. 66-69, 2000.

WELSH, R. M. et al. Heterologous immunity between viruses. **Immunol Rev**, v. 235, n. 1, p. 244-66, may. 2010.

WINAU, F.; WEBER, S.; SAD, S.; DE DIEGO, J.; HOOPS, S. L.; BREIDEN, B., et al. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. **Immunity**, v. 26, n. 1, p. 105-17, 2006.

WOLF, H. Epstein-Barr virus and carcinoma. Nature, v. 312, n. 5996, Dec. 1984.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. Geneva: WHO Report; 2012.

YAMAMOTO, A. Y. et al. Infecção congênita e perinatal por citomegalovírus: aspectos clínicos, epidemiologia, diagnósticos e tratamento. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 32, p. 49-56, jan./mar., 1999.

YATES, J.; WARREN, N.; REISMAN E & SUGDEN B. A cisacting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latenly infected cells. **Proc Natl Acad Sci**, USA 81, p. 3806-3810, 1984.

YOUNG, L. S.; MURRAY, P. G. Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. Oncogene, p. 5108-5121, 2003.

_____. RICKINSON, A. **Epstein Barr Virus:** 40 years on Nature Reviws Cancer 4, p. 757-768, 2004.

OBRAS CONSULTADAS

- BRANCO, D. W. et al. Infecção herpesvírus células NK braços latente. **Sangue**, n. 115, p. 4377-4383, 2010.
- BRAYMAN, K. L., et al. **Prophylasies of serious cytomegalovirus infection in renal transplant candidates using live human cytomegalovirus vaccine**. Arch Surg, vol. 123, ano 12, p. 1502-1508, 1998.
- COSTA, I. C.; VALLADA, M. G.; VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 3 ed. São Paulo: Ed Atheneu; 2005. p. 576.
- COUTO, F. C.; RODRIGUES, M. V.; MELO, G.; MENEZES, G. A; LEITE, J. M. Citomegalovírus e Gestação: Um Antigo Problema sem Novas Soluções. **Femina**, n. 06, v. 31, p. 509-516, Jul. 2003.
- DAVIDSON, A.; ARANOW, C. Patogenesis and treatment of systemic lupus erythematosus nephritis. **Curr Opin Rheumatol**, v. 18, ano 5, p. 468-75, 2006.
- DELLAVANCE, A.; LESER, P. G.; ANDRADE, L. E. C. Análise crítica do teste de anticorpos antinúcleo (FAN) na prática clínica. **Rev Bras Reumatol**, v. 47, p. 265-75, 2007.
- Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. This Official Statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was Adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This Statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America. September 1999. **Am J Respir Crit Care Med**. 2000; 161 (4 Pt 1):1376-95.
- FAUQUET, C. M.; FARGETTE. International Committee on Taxonomy of Viruses. **Virol**, .n. 64, 2009. Disponível em: http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?taxnode_id=19930088. Acesso em: 06 fev. 2015.
- FICA, A. Síndrome de mononucleosis infecciosa en pacientes adolescentes y adultos. **Rev Chil Infect**, v. 20, ano 4, p. 235-42, 2003.
- GONÇALVES, M. J. F.; PENNA MARIA, L. F. Morbidade por tuberculose e desempenho do programa de cole em municípios brasileiros, 2001-2003. **Rev. Saúde Pública**, v. 41, suppl.1. São Paulo, Sept. 2007.
- GROSSMAN, W. J.; VERBSKY, J. W.; TOLLEFSEN, B. L.; KEMPER, C.; ATKINSON, J. P.; LEY, T. J. Diferencial expressão de granzimas A e B em subconjuntos de linfócitos citotóxicos humanos e células T reguladoras. **Sangue**, v. 104, p. 2840-2848, 2004.
- HAQUE, A.; RACHINEL, N.; QUDDUS, M. R.; HAQUE, S.; KASPER, L.H.; USHERWOOD, E. Co-infecção de malária e gama-herpesvírus: inflamação pulmonar exacerbada ou protecção cruzada depende da fase de infecção viral. **Clin Exp Immunol**, v. 138, p. 396-404, 2004.
- HENLE, G.; HENLE, W.; DIEHL, V. Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. **Proc. Natl Acad Sci**, U.S.A. v. 59, ano 1, p. 94-101, 1968.

KAUFMANN, S. H.; SCHAIBLE, U. E. Antigen presentation and recognition in bacterial infections. **Curr Opin Immunol**, v. 17, n. 1, p. 79-87, 2005.

LEICHT, E. R; SUGDEN, B. EBNA-1: a protein pivotal to latente infection by Epstein-Barr vírus. **Reviews Medical Virology**, n. 19, p. 83-100, 2000.

MARUZA, M. et al. Risk factors dor default from tuberculosis treatment in HIV-infected individuals in the state of Pernambuco, Brazil: a prospective cohort stydy. **BMC Infections Diseases**, v. 16, n. 11, 2011.

MANDELL, G. L. **Principles and Practice of Infectious Diseases**. 7. ed. Philadelphia: Elsevier, 2010. p. 1855-1886.

MATOS, S. B.; MEYER, R.; LIMA F. W. M. Seroprevalence and Serum Profile of Cytomegalovirus Infection Among Patients With Hematologic Disorders in Bahia State, Brazil. J. Med. Virol, n. 83, p. 298-304, 2011.

MEHTA, C. R.; PATEL, N. R. Algorithm 643. FEXACT: A Fortran subroutine for Fisher's exact test on unordered r x c contingency tables. **ACM Transactions on Mathematical Software**, 12, p. 154-161, 1986.

MELISH, M. E.; HANSHAW, J. B.; ROCHESTER, N.Y. Congenital cytomegalovirus infection. **Am J Dis Child**, n. 126, p. 190-94, 1973.

MUSSI-PINHATA, M. M.; YAMAMOTO, A. Y. Congenital and perinatal infections. **J Pediatr**, v. 75, p. 15-30, 1999.

NGUYEN, Y.; MCGUFFIE, B. A.; ANDERSON, V. E.; WEINBERG, J. B. Gammaherpesvirus modulação de rato adenovírus tipo 1 patogênese. **Virology**, v. 380, p. 182-190, 2008.

OLIVEIRA, A. S.; CAMACHO, L. A.; BETTINI, L. R.; FERNANDES, D. G.; GOUVEA, N. A.; BARROS, R. A.; SETUBAL, S.; SIQUEIRA, M. M. The joint manifestation of exanthematous viroses. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 32, n. 2, p. 125-130, 1999.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Directrices para el tratamento de la tuberculose, 2012.

PANNUTI, C. S; VILAS-BOAS, L. S.; ANGELO, M. J. O.; CARVALHO, R. P. S.; SEGRE, C. M. Congenital cytomegalovirus infection. Occurence in two socioeconomically distinct populations of a developing country. **Rev Inst Med Trop**, v. 27, p. 105-107, 1985.

R Development Core Team R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-90051-07-0, disponível em: http://R-project.org version 3.0.1

SCOTT, L. A.; STONE, M. S. Viral exanthems. **Dermatol Online J.** v, 9, n. 3, 2003.

- SELIN, L. K. et al. Broad cross-reactive TCR repertoires recognizing dissimilar Epstein-Barr and influenza A virus epitopes. **J Immunol**, n. 185, v. 11, 2010.
- SIEGEL, S.; CASTELLAN, N. J. Estatística não-paramétrica para ciências do comportamento. Tradução Sara Ianda Correa Carmona. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.
- STAGNO, S. Cytomegalovirus. In: REMINGTON, J. S.; KLEIN, J. O. Infectious Diseases of the fetus newborn infant. **W.B.Saunders Company**, p. 312-45, 1995.
- STAGNO, S.; DWORSKY, M. E.; TORRES, J.; MESA, T.; HIRSH, T. Prevalence and importance of congenital cytomegalovirus infection in three different populations. **J Pediatr**, n. 101, p. 897-900, 1982.
- STAGNO, S.; PASS, R. F.; DWORSKY, M. E. et al. Maternal cytomegalovirus infection and perinatal transmission. **Clin Obstet Gynecol**, n. 25, p. 563-576, 1982.
- STARAS, S. A. S.; FLANDER, W. D.; DOLLARD, S. C.; PASS, R. F.; MCGOWAN-JR, J. E.; CANNON, M. J. Cytomegalovirus seroprevalence and childhood sources of infection: A population-based study among pre-adolescents in the United Sates. **J Clin Virol**, n. 3, p. 266-71, 2008.
- TEIXEIRA, R. V. **Tuberculose**: doença ocupacional nos profissionais de saúde. 2011. Dissertação, Faculdade Redentor, Rio de Janeiro, 2011.
- TUBERCULOSIS FARMACORRESISTENTE. Programa Mundial Contra la Tuberculosis. 1993.
- TUUMINEN, T, et al. Geração humana memória de células T CD8 + na infecção por hantavírus Puumala ocorre após a fase aguda está associada com e aumentando de CD8 + de memória de células T específicas do EBV. **J Immunol**, n. 179, p. 1988-1995, 2007.
- WASKMAN, S. A vitória sobre a tuberculose. São Paulo: Ed. Cultrix, 1964.
- WHITLEY, R. J., et al. Ganciclovir treatment of symptomatic congenital cytomegalovirus infection: results of a phase II study. **J Infect Dis**, n. 175, p. 1080-1086, 1997.
- WILLIAMSON, W. D.; DESMOND, M.M.; LAFEVERS, N.; TABER, L. H.; CATLIN, F. I.; WEAVER, T. G. Symptomatic congenital cytomegalovirus. Disorders of language, learning, and hearing. **Am J Dis Child**, n. 139, p. 902-905, 1982.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. The World health report: 2004: Changing history. In. Geneva: World Health Organization; 2004:1 CD-ROM.
- YAMASHITA, N.; KIMURA, H.; MORISHIMA, T. Virological aspects of Epstein-Barr virus infections. **Acta Med Okayama**, v. 59, n. 6, p. 239-46, 2005.
- YAMOTO, A. Y.; MUSSI-PINHATA, M. M.; FIGUEIREDO, L. T. M. Congenital and perinatal cytomegalovirus infections: clinical aspects, epidemiology, diagnosis and treatment. **Medicina**, Ribeiro Preto, p. 32:49-56, 1999.

YANAMOTO, A. Y.; FIGUEIREDO, L. M. F.; MUSSI-PINHATA, M. M. Prevalência e aspectos clínicos da infecção congênita por citomegalovírus. **Jornal de Pediatria**, v. 75, n. 1, 1999.

ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e esclarecido

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

PROJETO DE PESQUISA

"COINFECÇÃO VIRAL COM ELEMENTO IMUNOMODULATÓRIO NA TUBERCULOSE PULMONAR E EXTRAPULMONAR"

TERMO DE CONSENTIMIENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisador: Aurora del Carmen Rosell Soria Instituição: Universidade Federal do Amazonas

Telefone: (92) 3638-2590

Patrocinador da pesquisa: FAPEAM/MS

Descrição e Objetivo do Estudo:

Sabe-se que alguns vírus podem alterar a capacidade do organismo em reagir às infecções. É bem sabido que após uma gripe é maior o risco de contrair uma pneumonia e que o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) esgota as defesas do corpo provocando diversas infecções. Entretanto, não se sabe ao certo se outros vírus comuns no ser humano são capazes de alterar as defesas e causar infecções. São vírus que vivem no organismo da maioria das pessoas, sem sintomas aparentes, mas que podem interferir nas células de defesa (o chamado "sistema imunológico").

O vírus Epstein Barr (EBV) e o citomegalovírus (CMV) são vírus deste tipo. É importante estudar se as pessoas portadoras destes vírus têm maior risco de infecções, como a tuberculose. É importante estudar não só se o vírus está presente, mas também a quantidade de partículas virais presentes no corpo da pessoa. Assim, o presente trabalho visa procurar se os vírus citados estão presentes e em que quantidade no organismo de pessoas com tuberculose e quantidade de vírus em pessoas que tiveram contato com o bacilo da tuberculose e não adoeceram (contactantes). Se a hipótese for comprovada através deste estudo, estará entendido que os vírus realmente interferem no sistema imunológico e diminuem as defesas contra a tuberculose, o que trará melhor compreensão da doença e melhores formas de tratamento.

Benefícios do Estudo para os pacientes:

De forma imediata haveria o beneficio de diagnosticar a virose no paciente, e, se houver indicação, efetuar o tratamento. A longo prazo, caso se confirme a hipótese de um dos vírus ser fator associado à tuberculose, o benefício seria geral, pois ter-se-ia uma compreensão otimizada dessas doenças e poder-se-ia ter formas novas e mais eficazes de tratamento.

Procedimentos e risco associados ao estudo:

O procedimento programado na pesquisa é apenas a coleta de uma amostra de sangue da via do braço, com um tubo de vácuo de 20 ml. O risco, portanto, é praticamente nenhum,

apenas o desconforto da picada. O material colhido será utilizado exclusivamente para os objetos do Projeto.

O Projeto de Pesquisa visa apenas o diagnóstico de vírus e as características clínicas dos pacientes, não havendo nenhuma intervenção experimental ou ensaio de tratamento. Caso haja necessidade de tratamento do vírus, a decisão e a escolha da medicação ficarão a cargo da equipe médica que atende regularmente o paciente.

Confidencialidade e sigilo:

Todo o manuseio do material biológico será feito por códigos, sem identificação nominal, preservando o sigilo e a confidencialidade. Quando publicados em comunicações científicas (revistas, congressos), os dados serão apresentados na forma de números coletivos e sem identificação nominal. O material biológico coletado será usado única e exclusivamente para identificação e quantificação do material viral.

Direito à retirada do estudo:

A qualquer momento, se o paciente ou controle assim o desejar, poderá solicitar a sua exclusão do trabalho, com o descarte de seu material biológico colhido, sem que com isso perca o direito de ser acompanhado e tratado normalmente pela equipe assistencial.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Após ter recebido informações claras sobre o presente Projeto de Pesquisa, e tendo compreensão de seus objetivos, risco e benefícios, **expresso livremente o consentimento em participar,** nas condições estipuladas neste termo.

Manaus,	/	/		
	Pac	iente	 -	

ANEXO B – FORMULÁRIO DE PESQUISA DA TUBERCULOSE

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS PROJETO COINFECÇÃO VIRAL TB

FORMULÁRIO
CASOS DE TUBERCULOSE
Dados colhidos por:em//
Número da matrícula:
Número do prontuário:
DADOS DEMOGRÁFICOS:
Nome:Sexo: ()M ()F Idade:
Nome:Sexo: ()M ()F Idade: Data de nascimento:/Local de nascimento:
Raça/cor (autodefinida): ()branca ()negra ()parda ()indígena ()oriental ()não-declara
Escolaridade: ()zero ()0-4 ()4-9 ()10-12 ()+12=técnico ()+12=universitário
Profissão:Onde trabalha:
Residência:Telefone
Residência: Telefone Peso: Altura: IMC:
Local a TB: () pulmonar-foca () pulmonar-miliar () pulmonar-pleural () extrapulmonar: ()SNC ()rim ()pele ()osso ()linfonódulo ()olho ()outro Diagnóstico: () BAAR () Cultura () Patologia () PCR () Outro TB Prévia () = exclusão já em tratamento () = exclusão Extensão da doença: ()mínima ()moderada () extensa Repercussão sistêmica: () mínima () moderada () extensa Tempo de sintomatologia () 1 mês () 2 meses () 3 meses PPD: () não-reator () reator fraco () reator forte () Teste do Gama-interferon
COMORBIDADE: () gestante ()HIV ()transplante ()imunossuprimido ()doença crônica ()tabagismo ()drogas-ilícitas ()asma ()DPOC ()diabetes ()HAS ()alcoolismo ()ICC ()malária prévia ()hepatite prévia ()herpes simples ou zoster prévio Contato com TB: () na família () no trabalho DADOS EVOLUTIVOS (6 MESES) (12 MESES) Tratamento instituído (início em/) () INH RIF PZA () 6 meses () 12 meses () outro
Desenlace do tratamento após 6 meses: () tratamento completo, boa adesão, alta por cura () tratamento incompleto por abandono () tratamento incompleto por toxidade () mudança de tratamento por persistência sintomática (resistência)

Desenlace do tratamento com 12 meses:

Recaída: () sim () não

Dados transferidos para computador por	em	/	_/						

ANEXO C – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/UFAM



PARECER DO COMITÉ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas aprovou, em reunião ordinária realizada nesta data, por unanimidade de votos, o Projeto de Pesquisa protocolado no CEP/UFAM com CAAE nº 0357.0.115.000-10, intitulado: "COINFECÇÃO VIRAL ELEMENTO IMUNOMODULATÓRIO NA TUBERCULOSE PULMONAR E EXTRAPULMONAR", tendo como pesquisador responsável Luiz Fernando Souza Passos.

Sala de Reunião da Escola de Enfermagem de Manaus (EEM) da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus/Amazonas, 15 de setembro 2010.

> Prof.MSc. Plínio José Cavalcante Monteiro Coordenador CEP/UFAM