

MÁRCIO REIS DA COSTA

**FREQÜÊNCIA DA INFECÇÃO PELO TORQUE TENO VÍRUS (TTV),
GÊNERO *ANELLOVIRUS*, E SUA DIVERSIDADE GENÉTICA EM
PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO.**

Campo Grande
2009

MÁRCIO REIS DA COSTA

**FREQÜÊNCIA DA INFECÇÃO PELO TORQUE TENO VÍRUS (TTV),
GÊNERO *ANELLOVIRUS*, E SUA DIVERSIDADE GENÉTICA EM
PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO.**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Saúde e
Desenvolvimento na Região Centro-Oeste
da Universidade Federal de Mato Grosso do
Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Izaias Pereira da Costa

Campo Grande
2009

FOLHA DE APROVAÇÃO

MÁRCIO REIS DA COSTA

**FREQÜÊNCIA DA INFECÇÃO PELO TORQUE TENO VÍRUS (TTV),
GÊNERO *ANELLOVIRUS*, E SUA DIVERSIDADE GENÉTICA EM
PACIENTES COM LÚPUS ERITEMATOSO SISTÊMICO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

RESULTADO: _____.

Campo Grande (MS), de de .

BANCA EXAMINADORA

_____.

Prof. Dr. Izaias Pereira da Costa – Presidente.

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS

_____.

Prof. Dr. Natalino Hajime Yoshinari – Membro.

Universidade de São Paulo – USP

_____.

Prof. Dra. Ana Rita Coimbra Motta de Castro - Membro

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS

_____.

Prof. Dra. Inês Aparecida Tozetti – Membro Suplente

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico que lutam em silêncio contra uma doença, a qual a medicina ainda tem tão poucas respostas, sem nunca perderem a esperança de saírem vitoriosos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, por minha vida, por minha saúde e por ter me permitido conviver com pessoas que sempre estiveram ao meu lado apoiando-me.

Agradeço ao meu orientador **Dr. Izaias** pela paciência com meus erros, pela dedicação com que me orientou e principalmente pelo respeito que sempre teve com aqueles que, como eu, estão iniciando a carreira acadêmica.

Agradeço a **Dra. Sylvie Devalle**, que interrompeu seus próprios projetos de pesquisa para me auxiliar neste trabalho, pela forma didática com que me orientou, pelo tão precioso tempo que dispensou comigo e pela sua amizade.

Agradeço ao **Dr. Christian Niel** que cedeu às dependências do Laboratório de Virologia Molecular da Fundação Instituto Oswaldo Cruz para a realização dos meus experimentos.

Agradeço aos meus pais, **Elias e Libertina**, pela educação – segundo meu pai: “A maior herança que um pai deixa ao filho” -, pelo exemplo de dignidade, respeito e honestidade que sempre me guiarão, mas principalmente pelo amor e pelo carinho com que têm comigo.

Agradeço a minha namorada **Cláudia**, pela paciência que sempre teve comigo, nas minhas ausências, viagens e em todas as minhas (longas) horas em frente ao computador; pelo apoio que sempre me deu e pela força quando eu apresentava sinais de cansaço.

Agradeço as minhas irmãs **Eliane e Daniela**, minhas melhores amigas, por estarem sempre ao meu lado torcendo por mim.

Finalmente agradeço **a todas as pessoas que doaram material biológico para meus experimentos**, pois sem estas pessoas meu trabalho jamais se concretizaria.

Preste muita atenção em sua vida para não se esquecer dos acontecimentos que seus olhos viram e que eles nunca se apartem de sua memória, nenhum dia de sua vida. Ensine-os a seus filhos e a seus netos.

Deuteronômio 4:9

RESUMO

Costa MR. Frequência da Infecção pelo Torque Teno Vírus (TTV), Gênero *Anellovirus*, e sua Diversidade Genética em Pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico. Campo Grande; 2009.

O vírus Torque Teno (TTV), gênero *Anellovirus*, descoberto em 1997, revelou-se o protótipo de uma nova família de vírus, a família *Circoviridae*. Os recentes conhecimentos da biologia do TTV permitiram construir a hipótese de que o vírus possa ser um desencadeante de doenças reumáticas auto-imunes, como o lúpus eritematoso sistêmico (LES). O objetivo deste estudo foi determinar a existência de correlação entre a infecção pelo TTV e o lúpus eritematoso sistêmico e observar se a infecção pelo TTV pode alterar o curso clínico e o perfil sorológico dos pacientes lúpicos. Foram obtidas aleatoriamente 46 amostras de soro de pacientes lúpicos atendidos no Ambulatório de Reumatologia do Núcleo do Hospital Universitário de Campo Grande da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (NHU/FAMED/UFMS). Para os controles, foram utilizadas 46 amostras de soro de doadores saudáveis. O DNA viral foi extraído das amostras de soro utilizando o *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (QIAGEN, Hilden, Alemanha). O DNA viral foi amplificado utilizando a técnica de reação de cadeia de polimerase *nested*. Dados sobre as manifestações clínicas e laboratoriais destes pacientes foram obtidos a partir de seus prontuários médicos. Trinta e sete por cento (n=17/46) dos pacientes lúpicos apresentaram TTV positivo e a infecção viral foi observada em apenas 15,2% (n=7/46) dos controles. Houve uma relação significativa entre lúpus eritematoso sistêmico e TTV (teste z, p=0,03). Não houve relação entre TTV, sinais clínicos e o perfil sorológico dos pacientes avaliados neste estudo. A infecção pelo TTV poderia ter um papel como desencadeante para o desenvolvimento do LES.

Palavras-chave: *Anellovirus*, doenças auto-imunes, lúpus eritematoso sistêmico, vírus Torque Teno.

ABSTRACT

Costa MR. Frequency of Infection for Torque Teno Virus (TTV), Genus *Anellovirus*, and its Genetic Diversity in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. Campo Grande; 2009.

Torque Teno virus (TTV), genus *Anellovirus*, discovered in 1997, showed the prototype of a new family of virus, Circoviridae family. The recent knowledge of the biology of TTV had allowed constructing the hypothesis that virus can have a role as trigger for rheumatic autoimmune diseases, as systemic lupus erythematosus (SLE). The objective of this study was to determine the correlation between the infection for TTV and systemic lupus erythematosus and to observe if the infection for TTV can modify the clinical course and the serologic profile of patients with lupus. Forty and six serum samples of lupic patients, taken care in the Rheumatology Clinic of the University Hospital of Campo Grande - Brazil, had been gotten randomly. For the controls, 46 serum samples from healthy blood donors had been used. Viral DNA was extracted of serum samples having used QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany). Viral DNA was amplified using nested polymerase chain reaction (nested PCR) assay. Clinical and laboratories manifestations had been gotten from its medical register. Thirty and seven percent (n=17/46) of lupic patients had presented positive TTV and viral infection was observed in only 15.2% (n=7/46) of the controls. It had a significant relation between systemic lupus erythematosus and TTV (test z, p=0.03). It did not have relation between TTV, clinical signals and serologic profile of patients evaluated in this study. TTV infection could be a trigger for the development of SLE.

Keywords: *Anellovirus* , autoimmune disease, systemic lupus erythematosus, Torque Teno virus

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Freqüência relativa e absoluta de indivíduos com lúpus eritematoso, de acordo com a positividade do TTV e o seu genogrupo. Campo Grande, 2009.....	42
Tabela 2 - Freqüência relativa e absoluta de indivíduos com lúpus eritematoso, de acordo com o sinal clínico observado. Campo Grande, 2009.....	43
Tabela 3 - Freqüência relativa e absoluta de indivíduos com lúpus eritematoso, de acordo com o sinal clínico observado e sua relação com o TTV. Campo grande, 2009.....	44
Tabela 4 - Freqüência relativa e absoluta de indivíduos com lúpus eritematoso, de acordo com outros sinais clínicos observados no estudo. Campo Grande, 2009.....	46
Tabela 5 - Freqüência relativa e absoluta de indivíduos com lúpus eritematoso, de acordo com a sorologia observada. Campo Grande, 2009.....	47
Tabela 6 - Freqüência relativa e absoluta de indivíduos com lúpus eritematoso, de acordo com a sorologia observada e sua relação com o TTV. Campo Grande, 2009.....	48
Tabela 7 - Freqüência relativa e absoluta de indivíduos com lúpus eritematoso, de acordo com seu grau de imunossupressão e sua relação com o TTV. Campo Grande, 2009.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Genoma do TTV (protótipo TA278).....	16
Figura 2 - Gráfico ilustrando a frequência relativa de indivíduos, em relação ao TTV e ao lúpus eritematoso	40
Figura 3 - Gráfico ilustrando a frequência relativa de indivíduos, em relação ao TTV e aos sinais clínicos dos indivíduos com lúpus eritematoso.....	45
Figura 4 - Gráfico ilustrando a frequência relativa de indivíduos, em relação ao TTV e à sorologia dos indivíduos com lúpus eritematoso.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	Aminoácidos
ACO	Anticoncepcional oral
AR	Artrite reumatóide
bp	Pares de base (do inglês: <i>base pair</i>)
CAV	Vírus da anemia do frango (do inglês: <i>Chicken anaemia virus</i>)
CMV	Citomegalovírus
DNA	Ácido desoxirribonucléico (do inglês: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxirribonucleotídeo fosfato (do inglês: <i>deoxyribonucleotide phosphate</i>)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético (do inglês: <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EUA	Estados Unidos da América
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (do inglês: <i>Human immunodeficiency virus</i>)
HLA	Antígeno leucocitário humano (do inglês: <i>Human leukocyte antigen</i>)
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (do inglês: <i>major histocompatibility complex</i>)
NK	<i>Natural Killer</i>
ORF	Região potencialmente codificadora (do inglês: <i>open reading frame</i>)
PCR	Reação de cadeia de polimerase (do inglês: <i>Polymerase chain reaction</i>)
TAIP	Proteína indutora de apoptose derivada do vírus TT (do inglês: <i>TT virus-derived apoptosis-inducing protein</i>)
TNF	Fator de necrose tumoral (do inglês: <i>tumor necrosis factor</i>)
TRH	Terapia de reposição hormonal
TTV	Vírus Torque Teno (do inglês: <i>Torque Teno virus</i>)
UTR	Região não traduzível (do inglês: <i>Untranslated region</i>)
VHA	Vírus da hepatite A
VHB	Vírus da hepatite B
VHC	Vírus da hepatite C

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 Características gerais	15
2.2 Organização genômica e proteínas virais	15
2.3 Diversidade genética	17
2.4 Vias de transmissão	18
2.5 Distribuição geográfica	20
2.6 Distribuição no organismo do hospedeiro	21
2.7 Potencial patogênico	22
2.8 Infecções virais e auto-imunidade	23
2.9 Lúpus eritematoso sistêmico	27
2.9.1 Fatores genéticos	27
2.9.2 Patogenia	29
2.9.3 Fatores ambientais	31
2.10 TTV e auto-imunidade	32
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivo geral	34
3.2 Objetivos específicos	34
4 MATERIAL E MÉTODO	35
4.1 Amostras	35
4.2 Seleção de pacientes	35
4.2.1 Critérios de inclusão	35
4.2.2 Critérios de exclusão	36
4.2.3 Dados de prontuário	36
4.3 Extração de DNA	37
4.4 Amplificação do DNA	37
4.5 Eletroforese em gel de agarose	38
4.6 Análise estatística	39
5 RESULTADOS	40
6 DISCUSSÃO	51

7 CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
APÊNDICES	69
ANEXOS	74

1 INTRODUÇÃO

Em 1997, Nishizawa *et al.* isolaram um novo vírus a partir de amostras de soro de um paciente com hepatite pós-transfusional de etiologia desconhecida. Este vírus foi denominado vírus TT (TTV em inglês), nome dado a partir das iniciais do paciente, ou como propôs o próprio Nishizawa, as iniciais poderiam representar *transfusion transmitted virus* (SIMMONDS *et al.*, 1998). Entretanto este nome enfatizaria apenas uma e certamente não a mais freqüente forma de transmissão deste vírus (WATANABE *et al.*, 2005). Desta forma, mais tarde o vírus seria chamado de vírus Torque Teno, conservando as iniciais TTV (BIAGINI *et al.*, 2004).

Embora inicialmente o TTV tenha sido associado à doença hepática e a uma alta mortalidade entre pacientes com hepatite aguda pelo vírus da hepatite B (VHB), esta associação não foi confirmada por estudos mais recentes (WATANABE *et al.*, 2005).

Além disso, ainda não foram detectadas alterações morfológicas nos hepatócitos infectados pelo TTV, bem como não foram evidenciadas diferenças entre o curso clínico e os parâmetros laboratoriais dos pacientes com hepatite co-infectados com o TTV, daqueles sem co-infecção (WATANABE *et al.*, 2005).

Estudos epidemiológicos têm evidenciado a presença do TTV em várias patologias, tais como: doença de Hodgkin, anemia aplástica, fibrose pulmonar idiopática, doença pulmonar aguda, pênfigo bolhoso, piora do prognóstico do câncer de laringe e redução da sobrevida em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana - HIV (GARBUGLIA *et al.*, 2003; MIYAMOTO *et al.*, 2000; BANDO *et al.*, 2001; JONES *et al.*, 2005; MAGGI *et al.*, 2003; BLAZSEK *et al.*, 2008; SZLADEK *et al.*, 2005; CHRISTENSEN *et al.*, 2000). Contudo, estes estudos não conseguiram caracterizar o real significado da presença do TTV nestas enfermidades (GERGELY *et al.*, 2006).

Atualmente tem-se discutido o papel das infecções virais como fator desencadeador das doenças auto-imunes (ÁLVAREZ-LAFUENTE *et al.*, 2005). Os recentes conhecimentos da biologia do TTV permitiram construir a hipótese de que o vírus possa ser um desencadeador de doenças reumáticas auto-imunes (GERGELY *et al.*, 2006). Entretanto, existem poucos trabalhos que relacionam a infecção pelo TTV a estas doenças reumatológicas (GERGELY *et al.*, 2005a; GERGELY *et al.*, 2005b).

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença do tecido conjuntivo, multissistêmica, considerada o protótipo das doenças auto-imunes. Sendo caracterizada por um espectro clínico bastante variado e pela produção de um grande número de auto-anticorpos (D'CRUZ *et al.*, 2007).

Acredita-se que, na etiopatogenia do LES, além da susceptibilidade genética do indivíduo, seja necessário um fator ambiental. As infecções virais podem representar um importante fator para o desenvolvimento do LES (SHIRAI & HIROSE, 2006). Vários estudos investigaram a relação entre infecções virais e o LES, mas os resultados não foram conclusivos (MEYER, 2003; JAMES *et al.*, 2006; BARZILAI *et al.*, 2007).

O presente trabalho pretende verificar a frequência da infecção pelo TTV e sua diversidade gênica em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico; e verificar se ocorre correlação entre a presença do vírus, as manifestações clínicas e o perfil sorológico de auto-anticorpos anti-nucleares apresentados pelos pacientes lúpicos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Características gerais

O vírus Torque Teno (TTV), descoberto em 1997, revelou-se o protótipo de uma nova família de vírus (NISHIZAWA *et al.*, 1997). Virologistas vêm se dedicando à classificação dos vírus da família do TTV (BIAGINI *et al.*, 2004). Atualmente o TTV está classificado dentro da família *Circoviridae*, gênero *Anellovirus*, sendo o primeiro vírus descoberto desta família a infectar humanos (HINO & MIYATA, 2007).

A partícula viral do TTV é esférica, densa (1,26 g/cm³ em sacarose; 1,31 a 1,35g/ml em cloreto de cério), tem entre 30 e 50nm de diâmetro, não possui envelope lipídico externo e o genoma é formado por uma fita simples de DNA circular com aproximadamente 3800 pares de bases (BENDINELLI *et al.*, 2001).

2.2 Organização genômica e proteínas virais

O genoma do TTV é dividido em duas regiões: uma região potencialmente codificadora – *open reading frame* (ORF) e uma região não traduzível – *untranslated region* (UTR) (BENDINELLI *et al.*, 2001).

A região não traduzível (UTR) contém um segmento rico em citosina-guanina que conecta as duas extremidades da fita de DNA, assim como várias seqüências regulatórias (BENDINELLI *et al.*, 2001).

A região codificadora é formada na maioria das vezes por duas regiões, parcialmente sobrepostas, ORF1 (maior) e ORF2 (menor). Alguns genótipos do TTV podem apresentar um pequeno ORF adicional denominado ORF3, localizado imediatamente após a ORF1. ORF adicionais, como a ORF4, podem estar presentes, mas estas não devem ser funcionais. (BENDINELLI *et al.*, 2001). A figura 1 mostra a localização das quatro ORF em relação ao genoma, assim como a estrutura genômica do TTV.

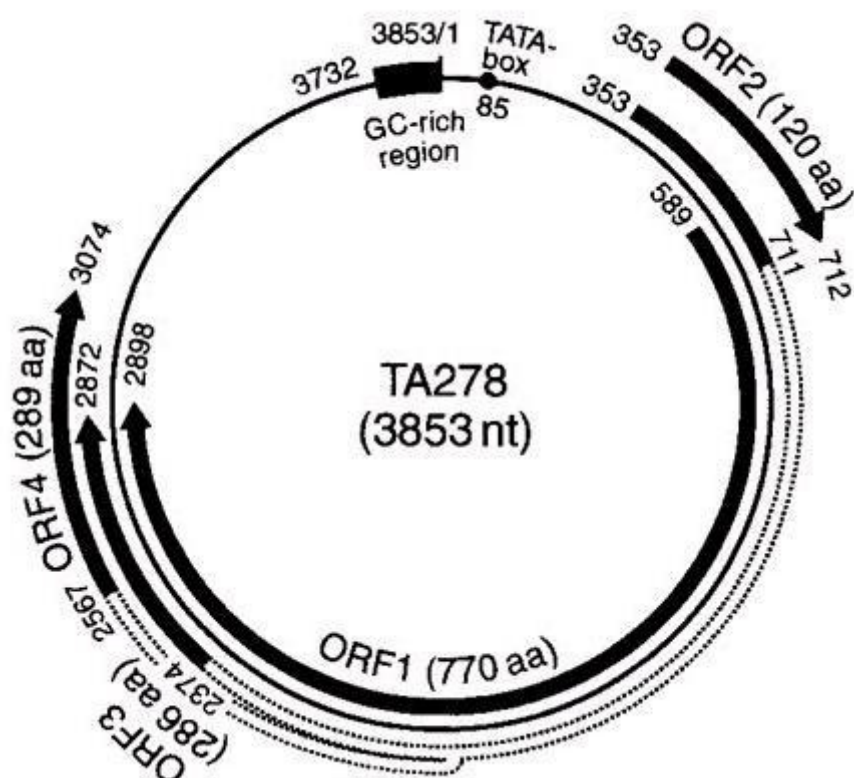


Figura 1 - Genoma do TTV (protótipo TA278)
Okamoto e Mayumi, 2001

As ORF codificam proteínas putativas de, aproximadamente, 770 aminoácidos (aa) (ORF1), 120 aa (ORF2), 286 aa (ORF3) e 289 aa (ORF4). As ORF 1 e 2 não são segmentadas. Embora estejam parcialmente sobrepostas, estas duas ORF iniciam-se em fases de leitura distintas, o que resulta em duas proteínas putativas sem homologia. Por outro lado, as ORF 3 e 4 são formadas pela junção de dois segmentos genômicos cada. O primeiro segmento (5') de ambas as ORF 3 e 4 são comuns e correspondem à quase totalidade da ORF2, sendo que os segmentos em questão possuem um nucleotídeo a menos que a ORF2. Os segmentos 3' das ORF3 e 4, assim como a porção 3' da ORF1, são parcialmente sobrepostos mas não codificam proteínas com porções comuns já que todos os três se situam em fases de leitura diferentes (OKAMOTO & MAYUMI, 2001).

A proteína codificada pela ORF1 é uma proteína estrutural que compõe o capsídeo. Sua extremidade N-terminal básica extremamente rica em arginina provavelmente se ancora ao DNA genômico no interior do vírus, enquanto sua porção central, contendo vários sítios de glicosilação localizados em resíduos de

asparagina, deve permanecer exposta na superfície da partícula viral. As freqüentes substituições dos aminoácidos no conjunto de sítios de glicosilação da ORF1 sugerem a existência de vários sorotipos com epítomos de superfície antigenicamente heterogêneos. Além da função estrutural, acredita-se que a proteína codificada pela ORF1 também desempenhe um papel enzimático na replicação viral (MUSHAHWAR *et al.*, 1999).

Embora ainda incerto, acredita-se que a região ORF2 codificaria proteínas não-estruturais relacionadas à replicação viral e, apesar de ser altamente heterogênea entre os isolados de TTV, seus segmentos 46-66 contêm cinco regiões bastante conservadas (BENDINELLI *et al.*, 2001).

A proteína codificada pela ORF3 é uma proteína fosforilável, semelhante à proteína não-estrutural 5A (NS5A) do vírus da hepatite C (VHC). Esta última, reprime a atividade de uma proteína quinase celular mediadora da resposta anti-viral por *interferon*. Esta semelhança levanta a hipótese de que a proteína ORF3 module funções das proteínas celulares do hospedeiro e exerça uma função na manutenção da infecção (ASABE *et al.*, 2001).

Em 2004, uma proteína putativa denominada proteína indutora de apoptose derivada do TTV (TAIP em inglês), codificada em um gene ORF3 presente em dois isolados do TTV (TA278 e VT 416, ambos do genótipo1), apresentou capacidade de induzir apoptose em linhagens de células humanas cancerígenas. Em células de carcinoma hepatocelular esta capacidade foi semelhante a da apoptina, principal agente indutor de apoptose do Vírus da Anemia do Frango (CAV em inglês). Mas em outras linhagens celulares, osteossarcoma e carcinoma pulmonar de pequenas células, sua capacidade, embora presente, foi menor que a da apoptina (KOOISTRA *et al.*, 2004).

Até a presente data, não foram atribuídas funções às proteínas codificadas pela ORF4.

2.3 Diversidade genética

Ao contrário de outros DNA vírus, o TTV exibe uma alta heterogeneidade genética. Entretanto, esta divergência é desigualmente distribuída pelo genoma. A região UTR é comparativamente mais conservada. Em contraste, as regiões ORF

apresentam um extraordinário grau de diversidade, sendo muito maior na região central da ORF1, que exibe pelo menos três regiões de hipervariabilidade (WATANABE *et al.*, 2005).

Desde 1999, vários vírus semelhantes ao TTV, como o SANBAN (HIJIKATA *et al.*, 1999), o YONBAN (TAKAHASHI *et al.*, 2000a), o PMV (HALLETT *et al.*, 2000), TTMV (TAKAHASHI *et al.*, 2000b), o SEN-V (UMEMURA *et al.*, 2001), e o SAV (JONES *et al.*, 2005) foram identificados em humanos. Dinis-Mendes *et al.*, em 2004, realizaram a primeira caracterização genômica de um vírus SEN-V isolado na América do Sul.

Segundo Bendinelli *et al.* (2001), a alta diversidade genética do TTV sugere que ele seja um vírus muito antigo, entretanto outros fatores poderiam estar envolvidos. Muitas espécies de animais podem abrigar o TTV fazendo transmissão inter-espécie, a necessidade de adaptação ao novo hospedeiro representaria um importante impulso a mudança genética. Infecções mistas com múltiplos genótipos também são freqüentes e conseqüentemente a recombinação genética entre eles poderia contribuir para a variabilidade. Finalmente, a grande habilidade do TTV para produzir infecção crônica caracterizada pela viremia persistente por muitos anos, poderia oferecer ao sistema imune do hospedeiro a oportunidade para exercer uma continua pressão para a evolução do vírus.

Devido a sua grande diversidade genética, são conhecidos mais de 30 genótipos de TTV, que foram classificados em 05 grupos genômicos maiores. O Grupo 1 é representado pelo protótipo TA278 isolado do genótipo 1 e inclui cinco genótipos adicionais (2 - 6). O Grupo 2 compreende cinco genótipos e é representado pelo isolado PMV. O Grupo 3 é composto por onze genótipos e inclui SANBAN, TUS01, e TYM9. O Grupo 4 consiste em nove genótipos, enquanto o Grupo 5 consiste de três genótipos (DEVALLE & NIEL, 2004).

2.4 Vias de transmissão

A transmissão do TTV pode ocorrer parenteralmente (SIMMONDS *et al.*, 1998). Mas ao contrário do que se supunha quando foi descrito pela primeira vez, a grande prevalência e distribuição mundial do vírus, assim como a freqüência elevada de TTV em doadores de sangue saudáveis nunca expostos a produtos sanguíneos,

tornam pouco provável que a transmissão parenteral do vírus seja a principal forma de transmissão (WATANABE *et al.*, 2005).

O TTV é capaz de se replicar no fígado, sendo eliminado pelas fezes (OKAMOTO *et al.*, 1998), onde partículas virais foram visualizadas através de microscopia eletrônica (ITOH *et al.*, 2000). De fato, a detecção de DNA de TTV no soro de macacos *Rhesus* após a inoculação entérica de amostras de fezes contaminadas confirmou a transmissibilidade via fecal do vírus (LUO & ZHANG, 2001).

A via de disseminação sexual foi considerada viável baseada em trabalhos que encontraram DNA de TTV no sêmen (INAMI *et al.*, 2000) e em colo uterino de indivíduos infectados (CALCATERRA *et al.*, 2001). Krekulova *et al.* (2001) observaram ainda uma correlação positiva entre a infecção pelo TTV e o número crescente de parceiros sexuais, sustentando a participação ocasional da via sexual na transmissão deste vírus.

Ainda tem-se considerado a transmissão vertical. Um primeiro trabalho realizado por Simmond *et al.* (1999) não demonstrou a transmissão intra-uterina do TTV. Mas em 2000, Morrica *et al.* testaram o sangue do cordão umbilical de 15 mulheres italianas positivas para o TTV e em 12 foram encontrados o vírus, este dado sugeriu que a transmissão uterina poderia ser importante. Gerner *et al.*, em 2000, observaram que a prevalência da infecção pelo TTV em um grupo de recém-nascidos aumentava uma semana após o nascimento. A detecção do vírus no leite materno sugeriu aos pesquisadores que esta pode ser uma via de transmissão pós-natal.

Foi levantada a hipótese da existência de uma via aérea de transmissão em função da carga viral elevada de TTV em *swabs* de secreção nasal de crianças. A existência dessa via explicaria, pelo menos em parte, a prevalência elevada do TTV em populações saudáveis, sem história de transfusões, de países desenvolvidos nos quais as prevalências de outros agentes classicamente transmitidos pela via fecal-oral são baixas (MAGGI *et al.*, 2003).

Leary *et al.* (1999) demonstraram a presença de TTV em animais de consumo humano: infecção em 30% de ovinos, 25% de bovinos, 20% de suínos e 19% de frangos. Neste trabalho os autores chegaram a sugerir que estes animais poderiam representar uma fonte de contaminação humana, pela ingestão de carne mal cozida, mas estes dados não foram confirmados. Foi descrito ainda, a infecção

em animais domésticos como cães (*Canis familiaris*) e gatos (*Felis catus*), assim como em várias espécies de primatas (OKAMOTO *et al.*, 2002).

2.5 Distribuição geográfica

O TTV tem distribuição mundial. Soroprevalências extremamente elevadas (60-98%) do vírus TTV têm sido demonstradas em pessoas aparentemente saudáveis em várias regiões do mundo. Existe grande variabilidade genética em diferentes regiões geográficas, mas alguns genótipos do vírus são distribuídos globalmente, mesmo em populações que apresentam pouco ou quase nenhum contato com outras, como é o caso de alguns grupos que habitam a floresta equatorial de Papua Nova Guiné, Oceania (PRESCOTT *et al.*, 1999).

Em 1999, Abe *et al.* coletaram amostras de soro de indivíduos do Japão (233 indivíduos sem doença hepática), Mianmar (51 indivíduos saudáveis e 92 pacientes com doença hepática), Nepal (177 doadores de sangue), Egito (95 doadores de sangue), Bolívia (95 doadores de sangue), Vietnã (62 profissionais de saúde), Coreia (73 pacientes em hemodiálise), Camboja (08 portadores do vírus da imunodeficiência humana – HIV em inglês), Gana (95 portadores do HIV) e Estados Unidos de América (68 portadores do HIV). Estes autores encontraram uma prevalência variando de 70% (Japão) a 100% (Camboja). Os genótipos mais comuns foram o 1 e o 2, mas não houve correlação entre os genótipos e sua origem geográfica.

No Brasil, a infecção pelo TTV parece ser muito difundida, mesmo entre indivíduos sem história de transfusão sanguínea (BASSIT *et al.*, 2002). Niel *et al.*, em 1999, estudando 191 amostras de soro de indivíduos sem história de transfusão sanguínea, no Estado do Rio de Janeiro – RJ, encontraram uma prevalência de infecção pelo TTV de 65,4%. Em 31 indivíduos todas as seqüências de DNA viral encontradas foram analisadas, obtendo 59 seqüências de nucleotídeos diferentes. Nenhuma seqüência foi idêntica quando derivada de indivíduos diferentes. Além disso, seis indivíduos, em que todas as seqüências foram analisadas, apresentavam co-infecção entre dois a sete diferentes genótipos de TTV. Estes dados sugerem que no Brasil a co-infecção entre vários genótipos de TTV também seja muito comum.

Vasconcelos *et al.* (2001), em um estudo realizado na região Sul do Brasil com 130 pessoas (91 adultos e 39 crianças com idade de 0 a 10 anos) encontraram uma prevalência de 73% entre as crianças e 44% entre os adultos.

Em 2007, Amarante *et al.* em um estudo realizado no Brasil, com 270 amostras de soro de doadores de sangue saudáveis e 75 amostras de indivíduos politransfundidos, divididos em dois grupos: grupo 1: portadores de coagulopatias (n=32); e grupo 2: portadores de hemoglobinopatias (n=43) encontraram uma prevalência de infecção pelo TTV de 50,5% entre os doadores, 95,0% no grupo 1 e 82,0% no grupo 2.

2.6 Distribuição no organismo do hospedeiro

O DNA do TTV foi quantificado no sangue, nos linfonodos, músculos esqueléticos, tireóide, pâncreas, rins, pulmões, baço, fígado e medula óssea. Sendo os títulos mais altos encontrados nestes últimos quatro órgãos (ABRAHAM, 2005).

O TTV replica-se preferencialmente em células hematopoéticas da medula óssea, mas também pode fazê-lo em hepatócitos (IRSHAD *et al.*, 2006a).

Takahashi *et al.*, em 2002, estudando 27 indivíduos infectados pelo TTV, observaram que a carga viral no sangue total foi significativamente mais alta que no plasma. Os pesquisadores analisaram então amostras de sangue de 03 indivíduos que apresentavam alta viremia a fim de detectar a carga viral nas diferentes células sanguíneas. A mais alta carga viral foi encontrada em neutrófilos, seguido em ordem decrescente por monócitos, células *natural killer* (NK) e linfócitos T e B. Não foram encontradas partículas virais em hemácias.

Foi observado ainda que, embora o TTV não se replique em células mononucleares em repouso, quando estas células são estimuladas o TTV passa a se replicar ativamente (MAGGI *et al.*, 2001). O fato de o vírus TT poder invadir e replicar-se em células responsáveis pela resposta imunitária poderia a longo prazo causar anormalidades no sistema imunológico.

Alguns genótipos do TTV poderiam apresentar predileção pelas células hematopoéticas e outros pelas células hepáticas, como sugerem Okamoto *et al.* em 2000. Neste trabalho foi pesquisado DNA viral em 108 indivíduos com função hepática normal e encontrada uma prevalência de infecção viral em células

mononucleares superior a do plasma, principalmente dos genótipos 3 e 4 do TTV. Partículas virais no interior de monócitos poderiam infectar outros indivíduos quando introduzidos por transfusão, ou mesmo o próprio indivíduo quando os níveis plasmáticos de anticorpos específicos diminuíssem devido ao tempo ou a imunossupressão.

2.7 Potencial patogênico

A relação entre a infecção pelo TTV e doença hepática permanece controversa (WATANABE *et al.*, 2005). Estudos iniciais sugeriram que o vírus estivesse relacionado ao aumento de transaminases hepáticas (TOKITA *et al.*, 2001) e a capacidade de induzir hepatite aguda (TAWARA *et al.*, 2000). Mas outros estudos posteriores não confirmaram estas associações (LYRA *et al.*, 2005; IRSHAD *et al.*, 2006b).

Christensen *et al.* (2000) em seu trabalho com 185 pacientes infectados pelo HIV-1 sugeriram que este vírus poderia facilitar a replicação do TTV, provavelmente de maneira indireta pelo seu efeito imunossupressor. Por outro lado, observaram que a presença do TTV era um fator associado à piora do prognóstico dos pacientes infectados pelo HIV-1, independentemente de outros fatores sabidamente relacionados com agravamento do quadro clínico destes pacientes.

Além disto, Diniz-Mendes *et al.* (2004) observaram que o DNA do TTV tem sido detectado em pacientes infectados pelo HIV com alta carga viral em níveis mais altos do que nos controles. Os autores propuseram que os níveis de TTV poderiam refletir um decréscimo da imunidade do hospedeiro. Além disto, a co-infecção com diferentes genótipos de TTV tem sido muito mais freqüente em pacientes infectados pelo HIV do que nos controles.

Gergely *et al.*, em 2006, lembraram que todo o potencial patogênico do TTV se baseia em levantamentos epidemiológicos e que alguns pesquisadores duvidam deste potencial.

Porém, como será descrito adiante, alguns estudos indicam que a infecção pelo TTV poderia servir como fator desencadeante para doenças auto-imunes, entre elas o LES.

2.8 Infecções virais e auto-imunidade

Existem vários mecanismos propostos pelos quais um agente infeccioso poderia induzir a auto-imunidade, como por exemplo:

a) O mimetismo molecular entre seqüências de proteínas de bactérias e vírus que apresentam homologia com seqüências de auto-antígenos. A resposta imune dirigida àquelas proteínas poderia então reconhecer antígenos do hospedeiro. Porém a homologia por si só não mostra ser uma evidência definitiva para o possível papel de determinante antigênico entre agente infeccioso e os auto-antígenos. É necessário obter mais evidências para responsabilizar um epítopo em questão e isto tem sido conseguido em um número bem limitado de doenças, como a febre reumática e a infecção pelo estreptococos β -hemolítico, e a síndrome de Guillain – Barré e o *Campylobacter jejuni* (BACH, 2005).

b) Ativação policlonal que ocorre quando vírus linfotrópicos infectam células B, esta infecção leva a proliferação de células B causando o aumento da produção de anticorpos, resultando no acúmulo de complexos imunes circulantes que poderiam causar dano a tecidos do hospedeiro (FERRI & ZIGNEGO, 2000).

c) Superantígenos virais podem causar reações auto-imunes, pois eles ativam um conjunto policlonal de células T, sem considerar sua especificidade. Isto ocorre devido a sua habilidade em ligar-se fora da fenda de ligação do complexo de histocompatibilidade principal de classe II (MHC II em inglês) e ao domínio variável da cadeia β dos receptores de células T (BARZILAI *et al.*, 2007).

d) A ativação *bystander* ocorre quando, depois de uma infecção, o aumento da produção de citocinas induz a expansão de células T auto-reativas que já estavam presentes dentro do próprio organismo do hospedeiro, mas devido ao seu pequeno número, eram incapazes de causar uma doença auto-imune (MURALI-KRISHNA *et al.*, 1998; WUCHERPFENNIG, 2001).

e) O fenômeno de clivagem de auto-antígenos por proteases virais poderia representar outro mecanismo relevante para induzir a auto-imunidade. Um importante evento no ciclo de vida de muitos vírus é a interação entre proteases codificadas por vírus e proteínas celulares do hospedeiro. Esta interação pode inibir a tradução e a transcrição nas células do hospedeiro, permitindo a promoção da replicação viral e a liberação de partículas virais pelas células infectadas. Mas, além disto, a clivagem pelas proteases virais pode ter outras conseqüências: a geração de

novos epítomos que podem servir de desencadeador para a resposta auto-imune. Por exemplo, o auto-antígeno La é clivado pela protease 3C do poliovírus, podendo contribuir para a geração de epítomos auto-antigênicos. Entretanto a imunogenicidade destes fragmentos ainda deve ser formalmente determinada (GRAHAM & UTZ, 2005).

f) Finalmente, a propagação de epítomos ocorre quando, em um estado inflamatório, há uma forte ativação local de células apresentadoras de antígeno. Esta ativação poderia resultar em um grande processamento e apresentação de antígenos, e atração de um grande número de células T com larga faixa de especificidade, possivelmente contra auto-antígenos. Infecções, principalmente virais, poderiam induzir respostas de auto-imunidade através deste mecanismo (BACH, 2005).

Em 1998, Pandey & LeRoy propuseram que a infecção latente pelo citomegalovírus (CMV) poderia acelerar as anormalidades vasculares observadas na esclerodermia. O dano vascular poderia ser resultado direto da infecção do CMV nas células endoteliais, onde o vírus induz a produção de citocinas fibrogênicas (fator de crescimento transformador beta – TGF - β), e colagenase tipo IV que degrada o colágeno tipo IV, principal componente estrutural da membrana basal do endotélio da microcirculação.

Para escapar da destruição mediada por linfócitos T citotóxicos, o CMV, *in vitro*, interfere com a expressão de moléculas do MHC classe I, um elemento central no reconhecimento de células infectadas por vírus. O CMV induz a produção de proteínas que parecem agir sequencialmente e sinergicamente obstruindo o transporte de moléculas de MHC classe I pela célula do hospedeiro, impedindo a sua expressão. Além disso, o gene UL 18 do CMV codifica uma proteína homologa ao MHC classe I. O produto do gene UL 18 torna a célula infectada resistente ao ataque pelas células NK. Estas alterações poderiam contribuir para a desregulação do sistema imune levando possivelmente a auto-imunidade (PANDEY & LEROY, 1998). Posteriormente Neidhart *et al.* (1999) descreveram, em pacientes com esclerose sistêmica progressiva, altos níveis de imunoglobulina G (IgG) contra antígenos do CMV.

Barzilai *et al.* (2007) em um trabalho de revisão observaram que existe uma alta prevalência de anticorpos anti-CMV IgM em pacientes portadores de lúpus eritematoso sistêmico, síndrome antifosfolípide, cirrose biliar primária, esclerose

sistêmica, polimiosite, síndrome de Sjögren e diferentes tipos de vasculite. Assim como foi observado uma alta prevalência de anticorpos anti-CMV IgG em pacientes com LES. Além disso, foi observado que a infecção pelo CMV, em modelo murino, poderia levar a anormalidades imunológicas semelhante às observadas no LES.

A relação entre o parvovírus B19 e as doenças auto-imunes reumatológicas permanece controversa. A infecção aguda pelo B19 poderia simular a artrite reumatóide (AR) inicial ou o LES. Além disso, há relatos de AR ou LES que se desenvolveram logo após a infecção pelo B19 (MEYER, 2003).

Em 1999, Trapani *et al.* relataram 04 casos de infecção pelo B19 simulando o lúpus eritematoso sistêmico. Estes pacientes apresentavam febre, *rash* malar, artrite, mal estar geral e pancitopenia. Em três casos, após 18 meses, houve remissão completa dos sinais e sintomas. Entretanto, um caso persistiu com doença ativa e reativações repetidas.

Em um estudo com 72 pacientes lúpicos, Hsu & Tsay (2001) observaram uma maior prevalência de parvovírus B19 entre estes pacientes quando comparada aos controles saudáveis (n=22) e a pacientes portadores de outras doenças auto-imunes (artrite reumatóide, cirrose biliar primária, polimiosite, síndrome de Sjögren e doença de Raynaud). Além disso, nos pacientes com lúpus foram detectados menos anticorpos (IgG e IgM) dirigidos ao vírus. Desta forma os autores concluíram que a prevalência aumentada da infecção pelo B19 nos pacientes lúpicos poderia ser devido à redução dos anticorpos anti-B19 causada ou pelo imunocomprometimento natural do hospedeiro ou pelo uso de drogas imunossupressoras.

Sève *et al.*, em 2005, em uma revisão de literatura de todos os casos de infecção pelo B19 associados ou que mimetizavam manifestações do LES, catalogados no PubMed (banco de dados desenvolvido pelo *National Center for Biotechnology Information*, mantido pela *National Library of Medicine*) entre os anos de 1975 e 2003, encontraram 38 casos. Após analisarem estes casos, os autores concluíram que a infecção pelo B19 pode ser clínica e laboratorialmente difícil de distinguir de um primeiro episódio de LES ou ainda de uma reativação de um lúpus prévio. Porém faltam estudos que possam implicar o B19 na patogênese do LES.

A prevalência do parvovírus B19 parece também ser mais alta em pacientes com artrite reumatóide do que em controles. Lundgvist *et al.* (2005), em um estudo com 22 pacientes artríticos, encontraram uma frequência mais alta de DNA do

parvovírus B19 em aspirado de medula óssea de pacientes artríticos do que seria esperado na população geral, baseado em dados da literatura.

Chen *et al.* (2006), em um trabalho com 79 pacientes com AR e 55 controles, pesquisaram anticorpos anti-parvovírus B19 IgG e IgM e DNA B19 no plasma e no líquido sinovial. Foi realizado também imuno-histoquímica para detectar a proteína viral VP1 do B19 na membrana sinovial e também a genotipagem HLA-DR. Os autores encontraram uma prevalência da infecção B19 significativamente maior nos pacientes com AR comparado aos controles. Os autores propuseram ainda que efeitos sinérgicos entre HLA - DR4 e a infecção pelo parvovírus B19 poderiam ter um papel na susceptibilidade à artrite reumatóide. Entretanto, o significado clínico da positividade do DNA B19 em pacientes artríticos ainda deve ser interpretado com cautela.

A infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV em inglês) tem sido associada ao LES desde a década de 60. A resposta imune contra o EBV e o antígeno nuclear 1 do EBV (EBNA-1) em particular, foi diferente entre pacientes com LES e em controles saudáveis. Ao contrário do que se observa nos controles, a resposta imune humoral ao EBNA -1 dos pacientes lúpicos levou a geração de anticorpos auto-reativos persistentes. Estes anticorpos anti-EBNA – 1 foram também capazes de se ligar a auto-antígenos LES específicos, como Sm e Ro, devido a similaridade estrutural entre eles. Tem sido demonstrado que o EBNA-1 poderia induzir o surgimento de auto-anticorpos anti-dsDNA, também via mimetismo molecular (JAMES *et al.*,2006).

Em 2006, Kosminsky *et al.* em um trabalho com 66 amostras de sangue periférico de pacientes lúpicos, distribuídos em pacientes com LES em atividade (n=22) e pacientes com LES inativo (n=44), pesquisaram a presença e o índice de avidéz de anticorpos anti-EBV IgG. Os autores encontraram uma prevalência alta de infecção nos dois grupos, respectivamente 95,5% e 90,9%, mas não foi demonstrada associação entre a atividade do LES e a reativação do EBV.

Estudos têm demonstrado a capacidade de outros agentes infecciosos de induzir auto-anticorpos observados no LES. Assim o vírus políoma estaria relacionado aos auto-anticorpos anti-histona e anti-dsDNA; HIV aos auto-anticorpos anti-Sm, anti-Ro, anti-La, anti-P ribossomal e anti-cardiolipina; *Streptococcus pneumoniae* ao anti-dsDNA e as infecções pelo *Trypanosoma cruzi*, *Pseudomonas sp.*, *Candida albicans*, *Leishmania sp.* e *Bartonella sp.* ao anti-P ribossomal (RIEMECASTEN & HAHN, 2005).

2.9 Lúpus eritematoso sistêmico

O lúpus eritematoso sistêmico é uma doença auto-imune, com grande número de apresentações clínicas e caracterizado por um curso de surto e remissão. Apresenta predileção pelo sexo feminino em uma proporção de 9:1, seu pico de incidência ocorre no final da adolescência até os 40 anos. Tende a ser mais comum e severa em negros e asiáticos quando comparados com brancos. (BUYON *et al.*, 2005).

O LES apresenta um espectro clínico bastante variado, incluindo não somente achados clínicos clássicos, mas outras manifestações mais raras que devem ser reconhecidas como parte da doença. Bezerra *et al.* (2005) em uma avaliação retrospectiva de 164 pacientes portadores de LES, observaram que as manifestações cutâneas (90,2%) foram as manifestações clínicas mais comuns nestes pacientes, seguidas pela artrite não-erosiva (87,2%), alterações hematológicas (59,8%) e nefrite (45,1%).

Laboratorialmente, o lúpus é caracterizado pela produção contínua de auto-anticorpos, muitos ainda sem um potencial patogênico comprovado, não existindo nenhuma outra doença auto-imune similar ao LES quanto ao número observado de auto-anticorpos. Em uma revisão, Sherer *et al.* (2004) descreveram 116 auto-anticorpos em pacientes lúpicos. Estes auto-anticorpos incluíam anticorpos dirigidos a antígenos nucleares, citoplasmáticos, da membrana celular, das células sanguíneas, das células endoteliais, das células do sistema nervoso central, das proteínas do plasma e da matriz extracelular, fosfolipídios-associados, entre outros.

2.9.1 Fatores genéticos

O lúpus tem uma prevalência de 10,0-12,0% em indivíduos com pelo menos um grau de parentesco com pacientes portadores da doença. A concordância do LES entre gêmeos dizigóticos é de 2,0-5,0% e entre monozigóticos de 24,0-58,0%. Apesar de alta, a taxa em gêmeos monozigóticos menor que 100,0% sugere que a susceptibilidade seja multifatorial e envolva também fatores não genéticos como os ambientais e hormonais. Existem evidências de que a patogênese e a susceptibilidade ao LES devam envolver vários genes e alelos de múltiplos loci. O

mapeamento do genoma tem identificado pelo menos 08 regiões cromossômicas com significativa ligação com o LES (1q23, 1q25–31, 1q41–42, 2q35–37, 4p16–15.2, 6p11–21, 12q24, 16q12–13) que foram confirmadas por coorte individual, sugerindo que os genes susceptíveis possam ser identificados em cada um destes loci (WONG & TSAO, 2006).

Assim, a heterogeneidade do LES pode ser interpretada principalmente devido às diferenças genéticas individuais dos pacientes. Mas estes genes controladores da susceptibilidade ao LES ainda não foram precisamente identificados provavelmente porque o modelo de susceptibilidade herdado seja extremamente complexo (SHIRAI & HIROSE, 2006).

No complexo de histocompatibilidade principal, os genes dos antígenos leucocitários humanos (HLA), são altamente polimórficos e têm importantes funções na regulação do sistema imune. Associações significativas de haplótipos de MHC classe II com o LES em estudos com modelos humanos e animais têm sugerido que genes classe II teriam um papel na susceptibilidade ao LES. Dentro da região do HLA no cromossomo 6p21.31, são identificados três haplótipos classe II contendo risco de LES em população caucasiana (DRB1*1501 (DR2)/DQB1*0602, DRB1*0301), (DR3)/DQB1*0201 e DRB1*0801 (DR8)/DQB1*0402. Próximo de dois terços dos pacientes lúpicos caucasianos têm pelo menos um destes haplótipos de risco. Foi confirmada a associação do DR2 (DRB1*1501 ou DRB1*1502) em populações asiáticas, DRB1*0301 em populações hispânicas; e DR2, DRB1*1503 e DR3 em afro-americanos. Moléculas de MHC classe II em células apresentadoras de antígenos poderiam ligar-se a auto-epítomos. Ou ainda, estas moléculas poderiam estar envolvidas em anormalidades na seleção negativa de células T auto-reativas no timo. Entretanto o papel do MHC classe II na patogênese do LES ainda não é bem compreendido e alguns estudos têm sugerido que os alelos MHC classe II estejam mais relacionados ao padrão de auto-anticorpos apresentados pelos pacientes do que com a atividade da doença (WONG & TSAO, 2006).

Dentro da região do MCH classe III, existem genes que codificam fator de necrose tumoral (TNF em inglês) α e β , componentes do complemento C2 e C4, e proteína do choque térmico 70 (hsp70 em inglês). Em particular, TNFs, C2 e C4 têm sido implicados na susceptibilidade ao LES. Pacientes lúpicos com DR2, DQw1 têm baixos níveis de TNF- α , e tem uma incidência aumentada de nefrite lúpica. A

relação entre os genes de TNF e a predisposição ao LES, contudo permanece inconclusiva (WONG & TSAO, 2006).

Os genes dos componentes do complemento dentro do MHC classe III incluem C2, C4a, C4b e o fator B. Eles são importantes na resistência a infecções microbianas e na depuração de fragmentos apoptóticos que poderiam tornar-se auto-antígenos (WONG & TSAO, 2006). A deficiência homozigótica destes componentes do complemento é rara. A deficiência de C2 é a mais comum e estima-se que ocorra em 0,01 a 0,02% da população geral. Mas a prevalência de desenvolvimento de LES nestas situações é estimada em 75,0% para C4 e 10,0% para C2 (HARLEY *et al.*, 2006).

2.9.2 Patogenia

A diminuição dos níveis de C1q no soro devido ao gene C1q polimórfico observado em LES humano e murino poderiam diminuir a depuração de complexos imunes, resultando na aceleração da injúria tecidual mediada por imunocomplexos. Este defeito também diminui a depuração de fragmentos apoptóticos e facilita seu reconhecimento por células dendríticas como uma fonte de antígenos nucleares para a produção de anticorpos anti-nucleares (SHIRAI & HIROSE, 2006).

Anormalidades nos mecanismos de apoptose são conhecidas como contribuintes para a patogenia do LES. Defeitos nos mecanismos de morte celular podem levar a falha na eliminação de linfócitos B e T auto-reativos, e possivelmente também de células dendríticas, causando perda da auto-tolerância. Algumas pesquisas indicam ainda que ou a produção de restos celulares apoptóticos no LES seja excessiva, devido a sua depuração defeituosa, ou que existam diferenças qualitativas nos restos apoptóticos no lúpus em comparação aos gerados em indivíduos normais. Fragmentos apoptóticos anormais poderiam então estimular células B auto-reativas através da sinalização de receptores *toll-like*. Desta forma, a indução de morte celular apoptótica poderia ser um importante mecanismo causador de dano tecidual em indivíduos com LES (COHEN, 2006).

Diversos estudos apontam para o papel da protease pró-apoptótica granzima B na quebra da auto-tolerância no LES. Granzimas são proteases citotóxicas liberadas por linfócitos T e células NK. A granzima B tem sido implicada

na rápida indução de apoptose. Defeitos na ação da granzima B levariam a clivagem de auto-antígenos produzindo fragmentos auto-antigênicos que não são vistos durante a morte celular caspase-mediada. Estes fragmentos poderiam então desencadear reações de auto-imunidade (GRAHAM & UTZ, 2005).

Receptores *toll-like*, localizados principalmente na membrana citoplasmática das células, estão envolvidos no reconhecimento de vários componentes microbianos como lipopolissacarídeos, lipoproteínas, proteínas bacterianas como a flagelina, RNA viral e sítios CpG não-metilados de DNA viral e bacteriano. Sítios CpG são regiões do DNA onde os nucleotídeos citosina e guanina estão dispostos em uma sequência linear de bases, separados por um radical fosfato. Dinucleotídeos CpG são metilados por metiltransferases nas células dos organismos eucarióticos, sendo rara a ocorrência de sítios CpG não-metilados nestas células, mas bastante prevalente no DNA viral e bacteriano. A ativação de um desses receptores *toll-like*, o TLR9, pode ter um papel importante na ativação de células B auto-reativas. Células apoptóticas poderiam liberar cromatina contendo motivo CpG não-metilado do próprio organismo, que então poderia se ligar a receptores TLR9 de células B reativas a cromatina. Estas células ativariam então outras células B e células dendríticas, fazendo a ligação entre a resposta imune inata e a adaptativa (ANDERS, 2005).

Embora não seja muito bem compreendido, a desregulação dos mecanismos que impedem os linfócitos auto-reativos de responder a auto-antígenos é certamente o evento chave na patogênese do LES. Estudos recentes das moléculas co-estimulatórias têm identificado a existência de diversas moléculas inibitórias e estimulatórias. O balanço entre estes sinais inibitórios e estimulatórios é crítico na ativação de células T. Existem evidências que defeitos em moléculas co-inibitórias como CTLA-4 e PD-1 tenham um papel crucial no desenvolvimento do LES (SHIRAI & HIROSE, 2006).

2.9.3 Fatores ambientais

O envolvimento de fatores ambientais na patogênese do LES causa uma complexidade adicional. É bem conhecido que a exposição solar intensa assim

como o estresse emocional e infecções podem ser fatores para desencadear crises (D'CRUZ *et al.*, 2007).

Compostos químicos têm sido associados ao lúpus ou a fenômenos auto-imunes. Estes incluem aminas e hidrazinas aromáticas, sílica, silicone, cloreto de vinil, solventes orgânicos e metais pesados. Entretanto a sua evidência é limitada e freqüentemente baseada apenas em relato de casos (EDWARDS, 2005).

Diferenças no metabolismo dos hormônios sexuais masculinos e femininos são pelo menos um dos mecanismos que explicam o predomínio feminino do lúpus. Entre março de 1996 e junho de 2002, Buyon *et al.* (2005) conduziram um estudo randomizado duplo-cego, placebo-controlado com 351 mulheres lúpicas menopausadas para avaliar o efeito da terapia de reposição hormonal (TRH) na atividade da doença. Estes autores encontraram um risco significativamente maior de crises leves a moderadas entre as pacientes que utilizaram TRH em relação aos controles, mas não de crises graves.

Em geral, um fator ambiental isoladamente não é suficiente para causar o lúpus. Acredita-se que os fatores ambientais funcionem como desencadeantes para a doença em indivíduos geneticamente susceptíveis. Entretanto, a forma como ocorre esta interação permanece desconhecida (D'CRUZ *et al.*, 2007).

Entre os fatores ambientais, as infecções, e em especial as infecções virais, têm despertado o interesse dos pesquisadores. Alguns vírus com tropismo por linfócitos e toxinas bacterianas têm um potencial para ativação policlonal de células B e T, inclusive linfócitos auto-reativos. Outros podem causar apoptose de linfócitos regulatórios ou estimular a indução de diversas citocinas que podem desviar as células T regulatórias para a susceptibilidade ao LES ou levar a progressão das injúrias teciduais. Além disso, o mimetismo molecular entre antígenos microbianos pode estimular linfócitos auto-reativos. Assim, existem muitos relatos de associação entre infecção microbiana e o lúpus, mas nenhuma relação exata entre causa e efeito tem sido definida (SHIRAI & HIROSE, 2006).

Uma explicação para isto, seria o fato de que a maioria dos estudos têm principalmente focado em processos infecciosos no período próximo ao início do lúpus ou em indivíduos que já tem a doença. A patologia imune que resulta no lúpus inicia-se muitos anos antes da expressão clínica da doença. Tem sido demonstrado que anticorpos anti-nucleares são detectados até 10 anos antes da apresentação do LES (EDWARDS, 2005).

2.10 TTV e auto-imunidade

Um dos primeiros trabalhos a tentar correlacionar a infecção pelo TTV e o LES foi o de Maggi *et al.* que em 1999, pesquisaram o DNA do TTV em um grupo de 660 indivíduos, sendo 221 pacientes de diferentes idades e com diferentes diagnósticos, os quais tinham o soro estocado no laboratório do Centro de Virologia da Universidade de Pisa, Itália, para análise de rotina sorológica – grupo não selecionado. Os outros 439 indivíduos foram escolhidos com base em um diagnóstico clínico específico, entre eles, LES, artrite reumatóide e psoríase. A prevalência da infecção viral nestas doenças auto-imunes foi a mesma ou, no caso da artrite reumatóide, foi mais baixa que a encontrada para o grupo não selecionado. Os autores sugeriram então que o TTV não represente um importante fator para o desenvolvimento destas doenças.

Chua *et al.*, em 2000, realizaram um trabalho com 123 pacientes, com idade variando de 01 mês a 08 anos (média e mediana de 2,4 e 1,5 anos respectivamente) e não conseguiram demonstrar correlação entre a infecção pelo TTV e a doença de Kawasaki.

Em 2001, o TTV foi pesquisado em amostras de soro de 168 pacientes: 84 com esclerodermia, 41 com artrite reumatóide e 43 com osteoartrite. Os controles foram 122 doadores voluntários de sangue saudáveis. Não foi encontrada diferença significativa na prevalência da infecção pelo TTV entre indivíduos portadores de osteoartrite, esclerose sistêmica, artrite reumatóide e controles saudáveis. Este estudo também observou uma prevalência significativamente menor do fator reumatóide em pacientes com TTV em comparação aos não-infectados, mas não houve mudança no padrão de auto-anticorpos em pacientes com esclerose sistêmica infectados pelo TTV quando comparado com os não-infectados. (SEEMAYER *et al.*, 2001).

Gergely *et al.* (2005a), pesquisaram o DNA do TTV em 579 indivíduos, sendo 211 pacientes lúpicos, 78 parentes de 1º grau saudáveis de portadores de lúpus, 199 doadores saudáveis de sangue e 91 portadores de artrite reumatóide. Neste trabalho foi encontrada uma prevalência significativamente aumentada ($p < 0,01$) do TTV em pacientes lúpicos (120 - 56,87%) em relação aos doadores saudáveis (66 - 33,16%) e em portadores de artrite reumatóide (23 - 25,27%). A prevalência do TTV nos parentes saudáveis de 1º grau de pacientes com lúpus

(51,3%) foi significativamente mais baixa do que em pacientes lúpicos (66,1%), mas mais alta do que em doadores saudáveis de famílias sem lúpus (33,9%). Assim fatores genéticos desconhecidos para LES poderiam também influenciar a infecção pelo TTV.

Neste mesmo trabalho, os autores pesquisaram a possibilidade de uma reação imune cruzada entre o auto-antígeno nuclear HRES-1/p28 com antígenos de infecções virais. Anticorpos dirigidos contra o HRES-1/p28 são detectados em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. Epítomos do HRES-1/p28 mostraram similaridade a proteínas do TTV e no experimento dos autores todos os 16 soros que foram reativos ao HRES-1/p28 reconheceram pelo menos um peptídeo TTV específico. O soro destes pacientes lúpicos apresentaram ainda uma forte afinidade de ligação para um peptídeo que mostra similaridade com o auto-antígeno lúpico 70k U1 snRNP sugerindo que uma reação cruzada do HRES-1/p28 com o TTV e com o 70k U1 snRNP poderia contribuir para a geração de anticorpos anti-nucleares.

Em outro trabalho, Gergely *et al.* (2005b) não encontraram diferença significativa na prevalência da infecção pelo TTV entre 94 pacientes com miopatia inflamatória idiopática, 95 portadores de artrite reumatóide e em 95 doadores saudáveis. Mas foi observada uma correlação significativa entre pacientes considerados portadores de miopatia grave (aumento dos níveis de enzimas musculares, manifestações extramusculares e refratariedade a drogas) e a infecção pelo TTV. Este dado poderia provavelmente indicar um fenômeno miosite específico, porque o tratamento imunossupressor, severidade ou atividade da doença não foram relacionados à infecção pelo TTV na artrite reumatóide. Assim, neste caso a infecção pelo TTV poderia ser mais um fator aditivo para o desenvolvimento de uma doença mais progressiva e refrataria do que um agente causador direto.

Devido a sua grande distribuição geográfica e prevalência mesmo em populações saudáveis, o TTV tem sido considerado por alguns autores como um simples comensal. Porém muitos aspectos de sua interação com o hospedeiro ainda permanecem desconhecidos e estudos adicionais ainda são necessários para determinar seu real potencial patogênico (GERGELY *et al.*, 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar a frequência da infecção pelo Torque Teno Vírus (TTV), gênero *Anellovirus*, e sua diversidade genética em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico.

3.2 Objetivos específicos

- a. Determinar a prevalência da infecção pelo TTV em pacientes com LES;
- b. Determinar a existência de associação entre a infecção pelo TTV e o lúpus eritematoso sistêmico.
- c. Determinar a prevalência de cada genogrupo do TTV nos pacientes com LES infectados pelo vírus.
- d. Verificar se há correlação entre a infecção pelo TTV e as manifestações clínicas e o perfil sorológico de auto-anticorpos anti-nucleares nos pacientes com LES.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Amostras

Foram utilizadas nesse trabalho, 46 amostras de soro obtidas aleatoriamente de pacientes, entre 14 e 51 anos, portadores de lúpus eritematoso sistêmico, atendidos no Ambulatório de Reumatologia do Núcleo do Hospital Universitário de Campo Grande da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (NHU/FAMED/UFMS). Para os controles, foram utilizadas 46 amostras de soro, obtidas de doadores de sangue saudáveis do Hemonúcleo do NHU/FAMED/UFMS.

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob o número de protocolo 900/2007 (Anexo A; p.76).

4.2 Seleção de pacientes

Todos os pacientes selecionados deveriam preencher os seguintes critérios:

4.2.1 Critérios de inclusão:

- Serem atendidos no Ambulatório de Reumatologia do Hospital Universitário de Campo Grande da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (NHU/FAMED/UFMS).
- Apresentar pelo menos 04 dos 11 Critérios de Classificação Revisados para Lúpus Eritematoso Sistêmico do Colégio Americano de Reumatologia (HOCHBERG,1997).

- Concordar em participar da pesquisa após explicação e entendimento da mesma e assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A; p.69)

4.2.2 Critérios de exclusão:

- Apresentar outras doenças infecciosas associadas, neoplasias malignas ou outras patologias auto-imunes.

4.2.3 Dados de prontuário

Os seguintes dados dos pacientes selecionados foram pesquisados a partir de seus prontuários médicos arquivados no Serviço de Arquivamento Médico do NHU/FAMED/UFMS.

- Sexo;
- Idade;
- Manifestações clínicas do LES;
- Tempo de doença;
- Presença de Fator Antinúcleo – FAN (técnica de imunofluorescência indireta, substrato células HEp2);
- Presença dos seguintes auto-anticorpos: anti-DNA (imunofluorescência indireta, substrato *Criethidia luciliae*), anti-Ro, anti-La, anti-Sm, anti-RNP (técnica de ELISA);
- Tratamento prévio e atual.

Estes dados foram então registrados em uma Ficha de Avaliação desenvolvida pelo autor deste estudo (Apêndice B; p.72).

Para a análise dos resultados, o tratamento dos pacientes foi considerado como baixa imunossupressão quando uso de cloroquina e/ou prednisona na dose de até 20mg/dia. O uso de prednisona (dose acima de 20mg/dia) e/ou azatioprina

e/ou metotrexate e/ou ciclofosfamida e/ou ciclosporina foi considerado como alta imunossupressão.

4.3 Extração de DNA

Para a extração do DNA viral a partir do soro foi utilizado o *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (QIAGEN, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante.

Foram pipetados 20,0 µl de Proteinase K no fundo de um tubo de microcentrifuga de 1,5 ml. Adicionou-se então ao tubo, 200,0 µl de soro e após 200,0 µl de tampão AL. A mistura foi homogeneizada por agitação (Vortex) por 15 segundos. A amostra foi então incubada a 56°C por 10 min. O tubo foi centrifugado rapidamente para remover gotículas da parte inferior da tampa. Adicionou-se 200,0 µl de etanol a 100% na amostra, e homogeneizou-se novamente por agitação por 15 s. O tubo foi então centrifugado rapidamente para remover gotículas da parte inferior da tampa. A mistura foi colocada em uma coluna fornecida pelo kit dentro de um tubo coletor de 2,0 ml e centrifugada a 8000 rpm por 1 min. O filtrado foi então descartado e a coluna colocada em um novo tubo coletor. Adicionou-se 500,0 µl de tampão AW2 à mistura e centrifugou-se a 14000 rpm por 3 min. O filtrado foi então novamente descartado e a coluna colocada em um tubo de microcentrifugação de 1,5 ml. Adicionou-se 200,0 µl de tampão AE (10,0 mM Tris - hidroximetilamino metano, 0,5 mM EDTA – ácido etilenodiaminotetraacético; pH 9,0). Incubou-se a mistura por 1 min a temperatura ambiente e então foi centrifugada por 8000 rpm por 1 min. O DNA viral extraído foi então conservado a -20°C até sua utilização.

4.4 Amplificação do DNA

Foi utilizada a técnica de reação de cadeia de polimerase *nested* (PCR nested) descrita por Devalle *et al.* em 2005. Todos os oligonucleotídeos utilizados pela técnica de PCR (T1S e T2S, senso; T1A, T2G1A, T2G2A, T2G3A, T2G4A e T2G5A, antisenso) utilizados neste trabalho foram descritos por Devalle *et al.* em 2004 (Anexo B; p.77).

O DNA viral extraído das amostras de soro foi submetido a uma primeira fase de PCR onde foram utilizados oligonucleotídeos genéricos capazes de amplificar todas as seqüências de TTV humano conhecidos. O oligonucleotídeo iniciador foi determinado para identificar regiões genômicas conservadas (UTR) entre 53 seqüências completas de nucleotídeos de TTV disponíveis no GenBank (banco de dados genético do Instituto Nacional de Saúde do EUA), pertencentes a todos os cinco grupos genômicos conhecidos.

A primeira reação de PCR foi realizada em um volume final de 25,0 µl contendo 2,5 µl de DNA viral, 0,2 mM de dNTP (desoxirribonucleotídeos fosfatados), 3,0 mM de Cloreto de Magnésio ($MgCl_2$), 0,2 µM de cada um dos oligonucleotídeos iniciadores (senso e antisenso) e 0,75 U de *Taq DNA polymerase Platinum* (Invitrogen, Carlsbad, EUA). Depois de uma desnaturação inicial do DNA por 90 s a 94°C, a amplificação foi realizada em 35 ciclos (94°C por 30 s, 59°C por 30s e 72°C por 3 min e 30s), seguido por uma elongação final de 10 min a 72°C.

Os produtos de PCR foram então submetidos a um segundo PCR. Nesta fase, cinco ensaios de PCR nested foram desenvolvidos para amplificar especificamente cada grupo genômico do DNA do TTV. Para cada ensaio foi utilizado um oligonucleotídeo grupo específico. Estes oligonucleotídeos foram definidos para identificar segmentos genômico conservados entre isolados do mesmo grupo genômico, mas distintos de um grupo para o outro.

A segunda fase do PCR foi realizada com 0,1 µl do produto da primeira fase, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo senso e antisenso e 0,5 U *Taq DNA polymerase Platinum* (Invitrogen, Carlsbad, EUA). A desnaturação foi por 3 min a 94°C, a amplificação foi realizada em 30 ciclos (94°C por 30s, 59°C por 30s, e 72°C por 1 min e 15 s), seguido por uma elongação final de 7 min a 72°C. Os produtos de PCR obtidos através dos cinco ensaios de PCR específicos foram de tamanhos diferentes para cada grupo: Grupo 1: 397 bp (pares de base em inglês); Grupo 2: 700 bp; Grupo 3: 885 bp; Grupo 4: 111 bp; e Grupo 5: 485 bp.

4.5 Eletroforese em gel de agarose

Gel de agarose (2,0%) foi preparado para eletroforese utilizando agarose ultra-pura (Gibco, EUA) dissolvida em tampão TBE (89,0 mM Tris , 89,0 mM ácido

bórico, 2,5 mM EDTA; pH 8). A dissolução da agarose foi efetuada por aquecimento em forno de microondas e 0,3 µg/ml de brometo de etídeo foram acrescentados. Dez microlitros do produto de PCR foram misturados a 2,0 µl de tampão de aplicação de amostra (Ficoll 15%, azul de bromofenol 0,05%, EDTA 0,1 mM, SDS 0,5 % - Dodecil sulfato de sódio 0,5 %) e a corrida eletroforética foi efetuada a uma tensão constante de 110 volts por aproximadamente 60min. As bandas de DNA resultantes da amplificação foram então visualizadas sob luz ultravioleta.

4.6 Análise estatística

A relação entre TTV e lúpus eritematoso sistêmico foi avaliada por meio do teste exato de Fisher. O mesmo teste foi utilizado para avaliar a relação entre o lúpus eritematoso e os genogrupos do TTV, entre TTV e os sinais clínicos, entre TTV e os resultados observados na sorologia e entre TTV e o esquema de tratamento utilizado. A comparação do percentual de indivíduos com TTV positivo entre o grupo controle e aquele de indivíduos com LES foi realizada por meio do teste z. Já a comparação entre indivíduos com TTV positivo e aqueles com TTV negativo, em relação ao tempo de doença (lúpus eritematoso sistêmico) foi realizada por meio do teste t-student. Os demais resultados das variáveis avaliadas neste estudo foram apresentados na forma de estatística descritiva ou na forma de tabelas e gráficos (SHOTT, 1990). A análise estatística foi realizada utilizando-se os “Softwares” SigmaStat, versão 2.0 e SPSS, versão 13.0, considerando diferenças e relações significativas quando o valor de “p” foi menor que 0,05.

5 RESULTADOS

Neste estudo foram avaliados 92 indivíduos sendo que destes 50,0% (n=46) eram portadores de lúpus eritematoso sistêmico e 50,0% (n=46) eram indivíduos não portadores desta afecção reumática, ou seja, do grupo controle.

A idade dos indivíduos que apresentavam LES variou entre 14 e 51 anos, sendo a idade média de $31,8 \pm 9,4$ anos (média $\pm$ desvio padrão da média). Em relação ao sexo, 95,7% (n=44) eram do sexo feminino, enquanto apenas 4,3% (n=2) eram do sexo masculino.

O tempo de doença dos indivíduos com lúpus eritematoso sistêmico variou entre 1 e 17 anos, sendo o tempo médio de $6,0 \pm 4,1$ anos.

Entre os indivíduos portadores de LES (n=46), 37,0% (n=17) apresentavam TTV positivo e 63,0% (n=29) apresentavam TTV negativo. Já entre os indivíduos do grupo controle, apenas 15,2% (n=7) apresentavam TTV positivo, enquanto 84,8% (n=39) apresentavam TTV negativo. Houve uma relação significativa entre lúpus eritematoso sistêmico e TTV (teste exato de Fisher, $p=0,02$), sendo que o percentual de indivíduos com TTV positivo nos portadores de lúpus eritematoso foi significativamente maior do que o observado para aqueles do grupo controle (teste z, $p=0,03$). Estes resultados estão ilustrados na Figura 2.

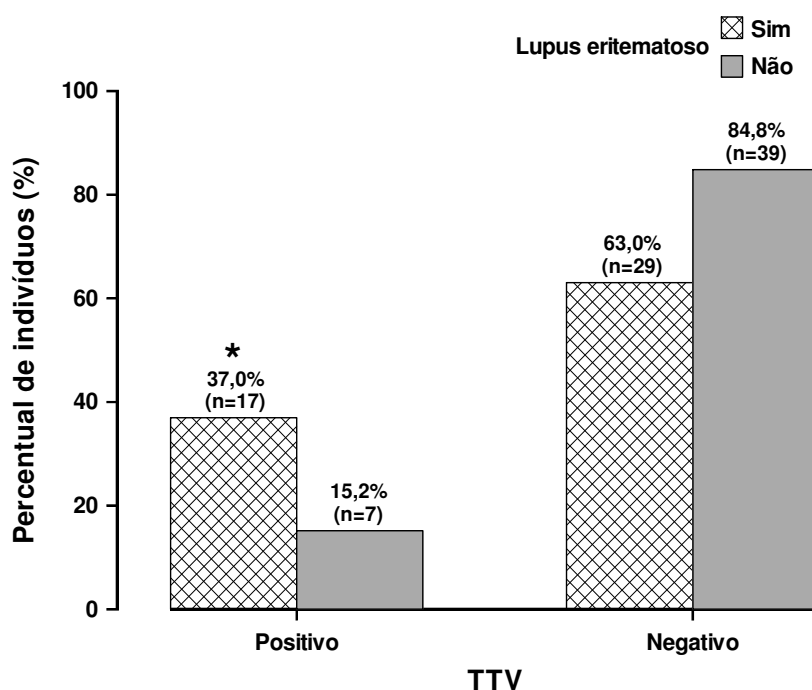


Figura 2 - Gráfico ilustrando a frequência relativa de indivíduos, em relação ao TTV e ao lúpus eritematoso. Cada coluna representa o valor percentual. * Diferença significativa em relação aos indivíduos do grupo controle (teste z, $p=0,03$).

O tempo de doença dos indivíduos que apresentavam TTV positivo foi de $6,10 \pm 3,89$ anos, enquanto que o daqueles que apresentavam TTV negativo foi de $5,88 \pm 4,72$ anos. Não houve diferença significativa entre os indivíduos com TTV positivo e aqueles com TTV negativo, em relação ao tempo de doença (teste t-student, $p=0,86$).

Entre os indivíduos com lúpus eritematoso e TTV positivo ($n=17$), 41,2% ($n=7$) apresentavam TTV do genogrupo G1, nenhum (0,0% - $n=0$) apresentava TTV do genogrupo G2, 41,2% ($n=7$) apresentavam TTV do G3, outros 41,2% ($n=7$) apresentavam TTV do G4 e finalmente outros 41,2% ($n=7$) apresentavam TTV do genogrupo G5.

Dos sete indivíduos do grupo controle e que apresentavam TTV positivo, nenhum deles apresentavam TTV do genogrupo G1 e nem do G2. Por outro lado, 42,9% ($n=3$) deles apresentavam TTV do genogrupo G3, 57,1% ($n=4$) apresentavam TTV do G4 e apenas um indivíduo (14,3%) apresentava TTV do genogrupo G5.

Dos indivíduos do grupo controle e TTV positivo ($n=7$), 85,7% ($n=6$) apresentavam TTV de apenas um genogrupo e apenas um dos indivíduos (14,3%) apresentava TTV de dois genogrupos. Já entre os indivíduos com lúpus eritematoso e TTV positivo ($n=17$), 52,9% ($n=9$) apresentavam TTV de apenas um genogrupo, enquanto os demais ($n=8$ – 47,1%) apresentavam TTV de mais de um genogrupo. Especificamente, 35,3% ($n=6$) apresentavam TTV de dois genogrupos, um indivíduo (5,9%) apresentava TTV positivo de três genogrupos, outro (5,9%) apresentava TTV positivo de quatro genogrupos e nenhum dos indivíduos apresentava TTV positivo dos cinco genogrupos. Os resultados referentes ao TTV dos indivíduos com LES estão apresentados na Tabela 1. Não houve relação entre ter ou não lúpus eritematoso e a quantidade de genogrupos TTV positivos observados (teste exato de Fisher, $p=0,19$).

De forma geral, em relação aos sinais clínicos pesquisados entre os indivíduos que apresentavam LES ($n=46$), 87,0% ($n=40$) apresentavam artrite, 80,4% ($n=37$) apresentavam fotossensibilidade, 73,9% ($n=34$) deles apresentavam eritema malar, 60,9% ($n=28$) apresentavam manifestações hematológicas, 58,7% ($n=27$) apresentavam úlcera oral ou nasal, 54,3% ($n=25$) apresentavam manifestações renais, 32,6% ($n=15$) apresentavam serosites, 8,7% ($n=4$) apresentavam lesão cutânea discóide e 6,5% ($n=3$) apresentavam manifestações neurológicas. Estes resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 1 - Frequência relativa e absoluta de indivíduos com lúpus eritematoso, de acordo com a positividade do TTV e o seu genogrupo - 2009

Característica	Frequência	
	Relativa	Absoluta
TTV (n=46)		
Positivo	37,0%	17
Negativo	63,0%	29
Genogrupo TTV positivo (n=17)		
G1	41,2%	7
G2	0,0%	0
G3	41,2%	7
G4	41,2%	7
G5	41,2%	7
Genogrupo TTV positivo (n=17)		
1 genogrupo	52,9%	9
2 genogrupos	35,3%	6
3 genogrupos	5,9%	1
4 genogrupos	5,9%	1
5 genogrupos	0,0%	0

Tabela 2 - Frequência relativa e absoluta de indivíduos com lúpus eritematoso, de acordo com o sinal clínico observado - 2009

Sinal clínico	Frequência	
	Relativa	Absoluta
Artrite	87,0%	40
Fotossensibilidade	80,4%	37
Eritema malar	73,9%	34
Manifestação hematológica	60,9%	28
Úlcera oral ou nasal	58,7%	27
Manifestação renal	54,3%	25
Serosites	32,6%	15
Lesão cutânea discóide	8,7%	4
Manifestação neurológica	6,5%	3

Não houve relação entre TTV e cada um dos sinais clínicos (eritema malar, lesão cutânea discóide, fotossensibilidade, úlcera oral ou nasal, artrite, serosites, manifestação renal, manifestação neurológica e manifestação hematológica) avaliados neste estudo (teste exato de Fisher, p variando entre 0,07 e 1,00). Estes resultados estão apresentados na Tabela 3 e ilustrados na Figura 3.

Tabela 3 - Frequência relativa e absoluta de indivíduos com lúpus eritematoso, de acordo com o sinal clínico observado e sua relação com o TTV - 2009

Sinal clínico	TTV		Valor de “p”
	Positivo	Negativo	
Eritema			
Sim	41,2% (n=14)	58,8% (n=20)	0,49 NS
Não	25,0% (n=3)	75,0% (n=9)	
Lesão cutânea discóide			
Sim	50,0% (n=2)	50,0% (n=2)	0,62 NS
Não	35,7% (n=15)	64,3% (n=27)	
Fotosensibilidade			
Sim	37,8% (n=14)	62,2% (n=23)	1,00 NS
Não	33,3% (n=3)	66,7% (n=6)	
Úlcera			
Sim	44,4% (n=12)	55,6% (n=15)	0,24 NS
Não	8,9% (n=04)	0,0% (n=00)	
Artrite			
Sim	37,5% (n=15)	62,5% (n=25)	1,00 NS
Não	33,3% (n=2)	66,7% (n=4)	
Serosite			
Sim	33,3% (n=5)	66,7% (n=10)	1,00 NS
Não	38,7% (n=12)	61,3% (n=19)	
Manifestação renal			
Sim	24,0% (n=6)	76,0% (n=19)	0,07 NS
Não	52,4% (n=11)	47,6% (n=10)	
Manifestação neurológica			
Sim	66,7% (n=2)	33,3% (n=1)	0,55 NS
Não	34,9% (n=15)	65,1% (n=28)	
Manifestação hematológica			
Sim	39,3% (n=11)	60,7% (n=17)	0,76 NS
Não	33,3% (n=6)	66,7% (n=12)	

Os dados estão apresentados em frequência relativa (frequência absoluta); NS=relação não significativa; Valor de "p" no teste exato de Fisher.

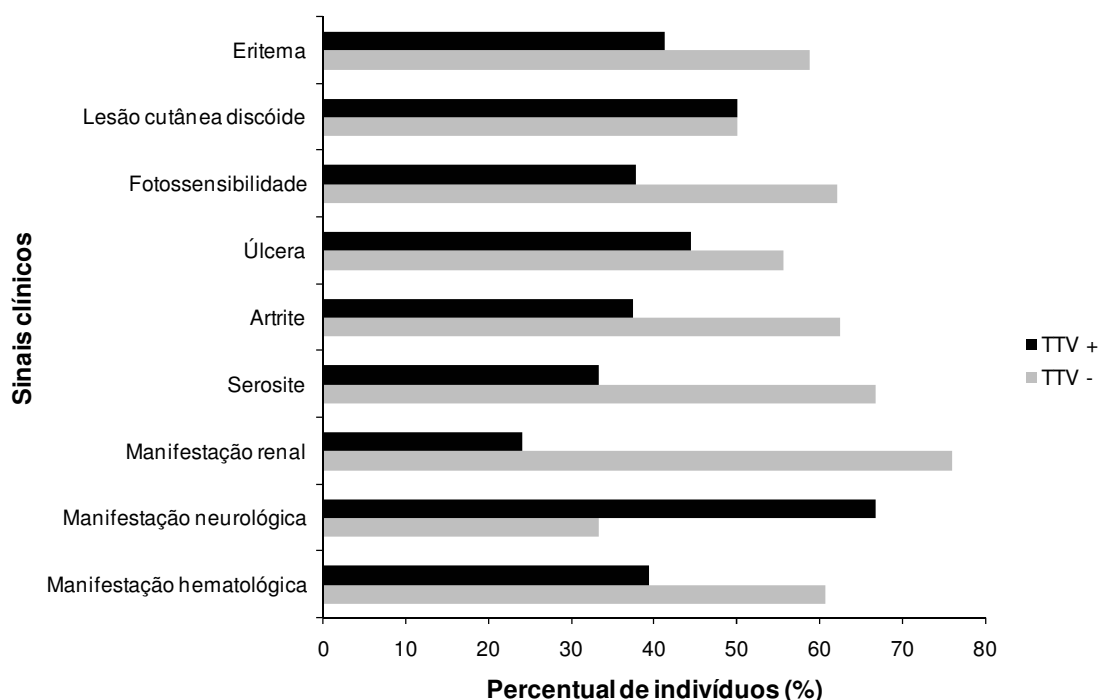


Figura 3 - Gráfico ilustrando a frequência relativa de indivíduos, em relação ao TTV e aos sinais clínicos dos indivíduos com lúpus eritematoso. Cada coluna representa o valor percentual.

Entre outras manifestações clínicas avaliadas neste estudo, 37,0% (n=17) dos indivíduos LES apresentavam anemia não hemolítica, 30,4% (n=14) deles apresentavam alopecia, 23,9% (n=11) apresentavam fenômeno de Raynaud, 19,6% (n=9) apresentavam vasculite cutânea, 17,4% (n=8) apresentavam cefaléia, 10,9% (n=5) apresentavam livedo reticular, 4,3% (n=2) apresentavam miopatia inflamatória e foram observadas em apenas um paciente (2,2%) as seguintes manifestações clínicas: neuropatia motora, eritema nodoso, vasculite do sistema nervoso central (SNC), osteonecrose, poliadenomegalia, lesão valvar cardíaca e vasculite digital. Os resultados referentes às outras manifestações clínicas dos indivíduos com lúpus eritematoso estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Frequência relativa e absoluta de indivíduos com lúpus eritematoso, de acordo com outros sinais clínicos observados no estudo - 2009

Outros sinais clínicos	Frequência	
	Relativa	Absoluta
Anemia não hemolítica	37,0%	17
Alopécia	30,4%	14
Raynaud	23,9%	11
Vasculite cutânea	19,6%	9
Cefaléia	17,4%	8
Livedo reticular	10,9%	5
Miopatia	4,3%	2
Neuropatia motora	2,2%	1
Eritema nodoso	2,2%	1
Vasculite do SNC	2,2%	1
Osteonecrose	2,2%	1
Poliadenimegalia	2,2%	1
Lesão valvar	2,2%	1
Vasculite digital	2,2%	1

SNC: Sistema Nervoso Central

Em relação à sorologia, 76,1% (n=35) dos indivíduos com lúpus eritematoso sistêmico apresentavam fator antinúcleo (FAN) positivo, 56,5% (n=26) apresentavam anticorpo anti-DNA, 47,8% (n=22) deles apresentavam anticorpo anti-Ro, 15,2% (n=7) apresentavam anticorpo anti-Sm, outros 15,2% (n=7) apresentavam anticorpo anti-La e 13,0% (n=6) apresentavam anticorpo anti-RNP. Os resultados referentes à sorologia dos indivíduos com LES estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Frequência relativa e absoluta de indivíduos com lúpus eritematoso, de acordo com a sorologia observada - 2009

Sorologia	Frequência	
	Relativa	Absoluta
Fator antinúcleo (FAN)		
Sim	76,1%	35
Não	17,4%	8
Sem informação	6,5%	3
Anticorpo anti-DNA		
Sim	56,5%	26
Não	34,8%	16
Sem informação	8,7%	4
Anticorpo anti-Sm		
Sim	15,2%	7
Não	78,3%	36
Sem informação	6,5%	3
Anticorpo anti-Ro		
Sim	47,8%	22
Não	47,8%	22
Sem informação	4,3%	2
Anticorpo anti-La		
Sim	15,2%	7
Não	80,4%	37
Sem informação	4,3%	2
Anticorpo anti-RNP		
Sim	13,0%	6
Não	78,3%	36
Sem informação	8,7%	4

Não houve relação entre TTV e FAN (teste exato de Fisher, $p=0,23$). Da mesma forma, não houve relação entre TTV e os auto-anticorpos (anti-DNA, anti-Sm, anti-Ro, anti-La e anti-RNP) avaliados neste estudo (teste exato de Fisher, p variando entre 0,12 e 1,00). Estes resultados estão apresentados na Tabela 6 e ilustrados na Figura 4.

Tabela 6 - Frequência relativa e absoluta de indivíduos com lúpus eritematoso, de acordo com a sorologia observada e sua relação com o TTV - 2009

Sorologia	TTV		Valor de “p”
	Positivo	Negativo	
Fator antinúcleo (FAN)			
Positivo	34,3% (n=12)	65,7% (n=23)	0,23 NS
Negativo	62,5% (n=5)	37,5% (n=3)	
Anticorpo anti-DNA			
Positivo	30,8% (n=8)	69,2% (n=18)	0,12 NS
Negativo	56,3% (n=9)	43,8% (n=7)	
Anticorpo anti-Sm			
Positivo	14,3% (n=1)	85,7% (n=6)	0,22 NS
Negativo	44,4% (n=16)	55,6% (n=20)	
Anticorpo anti-Ro			
Positivo	31,8% (n=7)	68,2% (n=15)	0,38 NS
Negativo	45,5% (n=10)	54,5% (n=12)	
Anticorpo anti-La			
Positivo	14,3% (n=1)	85,7% (n=6)	0,22 NS
Negativo	43,2% (n=16)	56,8% (n=21)	
Anticorpo anti-RNP			
Positivo	33,3% (n=2)	66,7% (n=4)	1,00 NS
Negativo	41,7% (n=15)	58,3% (n=21)	

Os dados estão apresentados em frequência relativa (frequência absoluta); NS=relação não significativa; Valor de "p" no teste exato de Fisher.

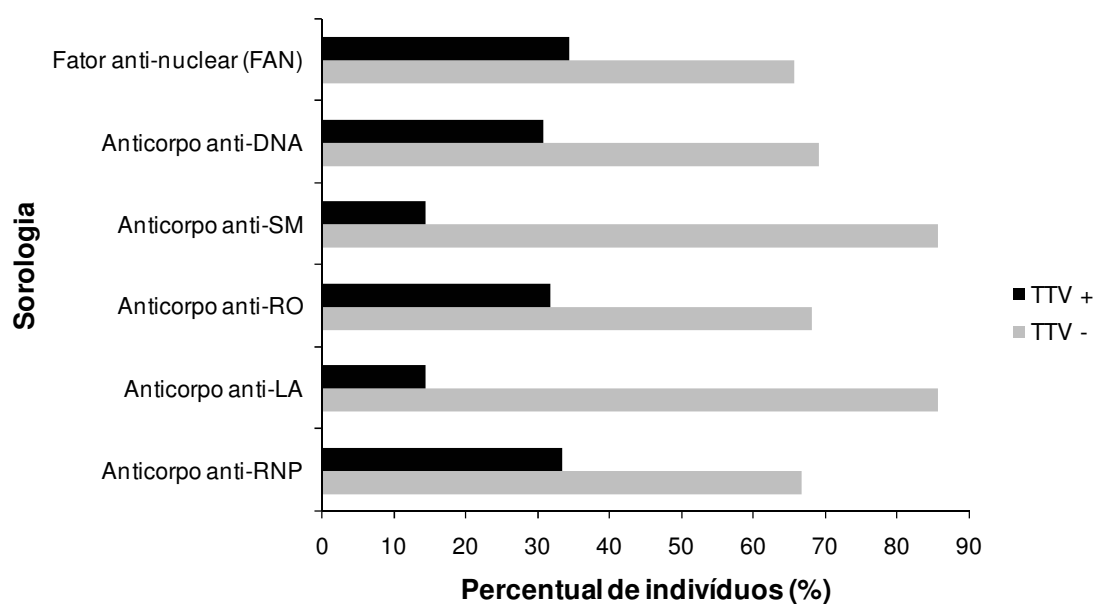


Figura 4 - Gráfico ilustrando a frequência relativa de indivíduos, em relação ao TTV e à sorologia dos indivíduos com lúpus eritematoso. Cada coluna representa o valor percentual.

Em relação ao tratamento para LES, 28,3% (n=13) dos indivíduos estavam sendo submetidos à imunossupressão baixa, enquanto que os demais (71,7% - n=33) estavam sendo submetidos a imunossupressão alta.

Entre os indivíduos com lúpus eritematoso e que apresentavam TTV positivo (n=17), 17,6% (n=3) estavam sendo tratados com imunossupressão baixa e 82,4% (n=14) estavam sendo submetidos à imunossupressão alta. Já entre os que apresentavam TTV negativo (n=29), 34,5% (n=10) estavam sendo tratados com imunossupressão baixa e 65,5% (n=19) com imunossupressão alta. Não houve relação entre o esquema de tratamento utilizado e o TTV (teste exato de Fisher, $p=0,32$). Estes resultados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Frequência relativa e absoluta de indivíduos com lúpus eritematoso, de acordo com seu grau de imunossupressão e sua relação com o TTV - 2009

Imunossupressão	TTV		Valor de "p"
	Positivo	Negativo	
Alta	82,4% (n=14)	65,5% (n=19)	0,32 NS
Baixa	17,6% (n=3)	34,5% (n=10)	

Os dados estão apresentados em frequência relativa (frequência absoluta); NS=relação não significativa; Valor de "p" no teste exato de Fisher.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo encontramos um predomínio de mulheres (95,7% - n=44) em idade fértil (idade média $31,87 \pm 9,44$ anos). Este dado está de acordo com o encontrado na literatura onde a relação entre mulheres e homens é estimado em 9:1. Esta desproporção entre os sexos levanta a possibilidade da ação hormonal sobre a patogênese da doença. Alguns trabalhos associam um risco relativo aumentado para o desenvolvimento e agravamento da doença em mulheres que fazem uso de anticoncepcionais orais (ACO) e terapia de reposição hormonal (TRH) contendo hormônio estrógeno em relação a mulheres que nunca fizeram uso deste hormônio exógeno (D'CRUZ *et al.*, 2007).

Foi encontrada neste trabalho uma prevalência de infecção pelo TTV mais baixa que a relatada na literatura (ABE *et al.*, 1999; PRESCOTT *et al.*, 1999) seja nos pacientes lúpicos (37,0% - n=17), seja nos controles (15,2% - n=7).

Para a detecção do DNA viral, são críticos os métodos de extração do DNA e a região do genoma viral reconhecido pelos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na técnica de PCR (VASCONCELOS *et al.*, 2001).

Devido a grande variabilidade genética do TTV, a escolha do segmento de DNA viral que servirá de alvo para sua amplificação tem um enorme impacto na sensibilidade do método de PCR. Assim os primeiros protocolos de PCR utilizavam oligonucleotídeos que reconheciam a região N22 da ORF1. Posteriormente foram desenhados oligonucleotídeos dirigidos para a região UTR que é a mais conservada do genoma viral. Com isso houve um grande aumento da sensibilidade do método em questão (BENDINELLI *et al.*, 2001).

Os primeiros estudos japoneses realizados utilizavam amplificação por PCR baseados na região N22 dentro da ORF1 do genoma viral e a infecção pelo TTV era encontrada em aproximadamente 12% dos doadores de sangue (OKAMOTO *et al.*, 1998). Após o início do uso de PCR com oligonucleotídeos homólogos a região UTR uma frequência muito maior (92%) foi encontrada em indivíduos japoneses saudáveis (BASSIT *et al.*, 2002).

De Paula (2003), ao comparar 04 métodos diferentes de extração de RNA do vírus da hepatite A (VHA) em amostras de soro e fezes, concluiu que os métodos que utilizam fenol-clorofórmio são mais eficientes para extração de RNA viral em

amostras de soro, enquanto que os métodos que utilizam a guanidina são mais eficientes em amostras fecais. Embora o TTV seja um DNA vírus, esta observação talvez seja válida e possa explicar a baixa prevalência encontrada, uma vez que o *QIAamp DNA Blood Mini Kit* utilizado neste trabalho não contém fenol-clorofórmio mas utiliza guanidina.

Niel *et al.* (1999) utilizando método de extração de DNA a base de fenol-clorofórmio encontraram uma prevalência de infecção pelo TTV em doadores de sangue normais de 62% (n=45) e 71% (n=37) em paciente com hepatite não A-C. Devalle *et al.*, em 2004, utilizando os mesmos oligonucleotídeos utilizados neste estudo e com método de extração de DNA a base de fenol-clorofórmio encontraram uma prevalência de 46% (n=11) em doadores de sangue.

Encontrou-se neste estudo uma associação estatisticamente significativa entre o lúpus eritematoso sistêmico e a infecção pelo TTV. Este resultado está de acordo com o resultado dos trabalhos de Gergely *et al.* (2005a), mas em desacordo com o encontrado por Maggi *et al.* em 1999.

Desta forma, o vírus Torque Teno ao infectar indivíduos susceptíveis pode ser um fator desencadeante para o desenvolvimento do LES e vários poderiam ser os meios pelos quais o vírus levaria ao LES.

Shirai *et al.* (2006) relataram que vírus com tropismo por linfócitos, como o TTV, têm um potencial para ativação policlonal de células B e T, inclusive linfócitos auto-reativos. Assim, o TTV causaria uma ativação *bystander* de células auto-reativas que já estariam presentes no hospedeiro, mas que devido ao seu número reduzido ou a sua baixa atividade eram incapazes de produzir doença.

Ao infectar as células do hospedeiro, muitos vírus, através da ação de suas proteases, alteram o metabolismo destas (GRAHAM & UTZ, 2005). Após infectar células do sistema imunológico, como macrófagos e células T, o TTV poderia interferir como o processamento e a apresentação de antígenos, gerando novos epítomos que poderiam servir de desencadeantes para a auto-imunidade. Poderia ainda, semelhantemente ao que ocorre com o CMV (PANDEY & LEROY, 1998), interferir com a expressão de moléculas de MHC classe I. Desta forma o TTV poderia estimular a indução de diversas citocinas que podem desviar as células T regulatórias para a susceptibilidade ao LES.

Foi observada em alguns isolados de TTV, a presença de uma proteína com potencial apoptótico (KOOISTRA *et al.*, 2004). Anormalidades na apoptose poderiam

levar a perda de linfócitos regulatórios essenciais para o controle da auto-imunidade. Ou ainda a produção excessiva de restos apoptóticos, ou mesmo a produção de restos apoptóticos qualitativamente diferentes devido a apoptose anormal, associadas à depuração defeituosa geneticamente mediada ou induzida pelo vírus poderiam estimular células B auto-reativas via receptores *toll-like*.

Além disso, o mimetismo molecular entre antígenos do TTV e auto-antígenos poderia estimular linfócitos auto-reativos, sinalizando para o desenvolvimento de uma resposta de auto-imunidade. Gergely *et al.* (2005a) observaram a resposta cruzada entre o auto-antígeno nuclear HRES-1/p28, peptídeos específicos do TTV e o auto-antígeno lúpico 70kU1 snRNP. Mas o significado clínico desta resposta ainda não foi estabelecido.

Deve-se ressaltar que o TTV poderia utilizar mais de um meio para desenvolver a auto-imunidade. Mas que ainda serão necessários outros trabalhos a fim de determinar o real potencial patogênico do TTV dentro do sistema imune, sua capacidade de induzir uma resposta auto-imune e produzir lúpus eritematoso sistêmico em indivíduos geneticamente predispostos.

A associação encontrada entre a infecção pelo TTV e o LES poderia, no entanto, ser decorrente da imunossupressão provocada pelo seu tratamento, à base de corticoesteróides e imunossupressores, tais como, azatioprina e ciclofosfamida. Neste caso deveríamos considerar a infecção pelo TTV como uma infecção oportunista. A relação entre a infecção pelo TTV e o grau de imunossupressão dos pacientes foi avaliada e não houve diferença estatística significativa entre os indivíduos que apresentavam alta e baixa imunossupressão. Apesar deste dado sugerir não haver relação entre a imunossupressão e a infecção pelo TTV, ele deve ser considerado com cautela, pois um dos grupos (TTV positivo submetido à imunossupressão baixa) apresentou um número muito baixo de indivíduos (n=3), o que dificulta a avaliação estatística. Trabalhos adicionais com número maior de pacientes e com um grupo de pacientes lúpicos que ainda não iniciaram o tratamento imunossupressor seriam necessários para confirmar este dado.

Niel *et al.*, em 2000, sugeriram ser comum, no Brasil, a co-infecção entre vários genótipos de TTV. Apesar disto, em nosso trabalho a maioria dos indivíduos infectados pelo TTV, seja do grupo controle, seja do grupo com LES, apresentou infecção por apenas um genogrupo (respectivamente 85,1% e 52,9%). Não havendo diferença estatística entre estes dados.

A freqüência de infecções mistas entre os pacientes lúpicos foi de 47,1% (n=8), portanto superior aos 29% encontrados entre os pacientes portadores de HBV e inferior aos 71% observados nos pacientes HIV-1 (DEVALLE & NIEL, 2004).

Entre os pacientes lúpicos todos os genogrupos foram encontrados exceto o genogrupo 2, que juntamente com o genogrupo 4 são os menos comuns do TTV no Brasil, segundo Devalle & Niel (2004). Estes autores encontraram ainda um predomínio do genogrupo 5 (46%), seguido pelo 3 (43%) e 1 (35%), diferentemente do observado neste trabalho onde não houve diferença estatística entre os 04 genogrupos restantes (41,2%).

Neste trabalho as seis manifestações clínicas do lúpus mais prevalentes foram: artrite (87,0%, n=40), fotossensibilidade (80,4%, n=37), eritema malar (73,9%, n=34), alterações hematológicas (60,9%, n=28), úlceras orais ou nasais (58,7%, n=27) e alterações renais (54,3%, n=25). Semelhante ao que foi observado por Bezerra *et al.* (2005). Não houve relação estatisticamente significativa entre TTV e cada um dos sinais clínicos avaliados neste estudo. Porém as manifestações neurológicas apresentaram uma freqüência maior nos indivíduos TTV positivos, enquanto que as outras manifestações, principalmente as renais, predominaram entre os indivíduos TTV negativos.

A positividade do FAN foi menor entre os pacientes deste trabalho (76,1%), quando comparada ao estudo realizado em 2005 por Bezerra *et al.* (97%). Mas a freqüência de anti-DNA (56,5%) e anti-SM (15,2%), foi maior que a observado por estes autores, respectivamente 33,9% e 10,8%. Da mesma forma, não houve relação estatisticamente significativa entre TTV e os auto-anticorpos nucleares avaliados neste estudo, mas o FAN e todos os outros auto-anticorpos avaliados apresentaram uma freqüência maior nos indivíduos TTV negativos.

Seemayer *et al.*, em 2001, discutiu que infecções virais poderiam, ao alterar a resposta imunológica de seus hospedeiros, modificar o perfil clínico e sorológico das doenças auto-imunes. Em 2005b, Gergely *et al.* observou que indivíduos infectados pelo TTV pareciam desenvolver uma miopatia inflamatória mais grave e refratária ao tratamento sendo, portanto um fator de pior prognóstico.

Embora neste estudo não tenha sido encontrado diferença estatisticamente significativa entre os perfis clínico e sorológico de indivíduos lúpicos infectados e não infectados pelo TTV, estudos adicionais com um número maior de indivíduos serão necessários para confirmar este dado.

7 CONCLUSÕES

- a. A frequência da presença do TTV em pacientes com LES foi de 37% (n=17).
- b. Existe uma correlação estatisticamente significativa entre a infecção pelo TTV e o lúpus eritematoso sistêmico.
- c. A prevalência dos genogrupos de TTV nos pacientes lúpicos foi de 41,2% para o genogrupo G1, nenhum para o G2, 41,2% para o G3, 41,2% para o G4 e 41,2% para o G5.
- d. As manifestações clínicas e o perfil sorológico dos pacientes lúpicos não diferiram estatisticamente entre os infectados e os não-infectados pelo TTV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe K, Inami T, Asano K, Miyoshi C, Masaki N, Hayashi S, *et al.* TT virus infection is widespread in the general populations from different geographic regions. J Clin Microbiol. 1999; 37(8):2703-5.

Abraham, P. TT viruses: How much do we know? Indian J Med Res. 2005; 122(1):7-10.

Álvarez-Lafuente R, Fernández-Gutiérrez B, Miguel S, Jover JA, Rollin R, Loza E, *et al.* Potential relationship between herpes viruses and rheumatoid arthritis: analysis with quantitative real time polymerase chain reaction. Ann Rheum Dis. 2005; 64(9):1357- 9.

Amarante MFC, Kashima S, Covas DT. TT virus (TTV) genotyping in blood donors and multiple transfused patients in Brazil. Virus Genes. 2007; 35(3):503–9.

Anders HJ. A Toll for lupus. Lupus. 2005; 14(6):417-22.

Asabe S, Nishizawa T, Iwanari H, Okamoto H. Phosphorylation of serine-rich protein encoded by open reading frame 3 of the TTV genome. Biochem Biophys Res Commun. 2001; 286(2): 298-304.

Bach JF. Infections and autoimmune diseases. J Autoimmun. 2005; 25(Suppl):74-80.

Bando M, Ohno S, Oshikawa K, Takahashi M, Okamoto H, Sugiyama Y. Infection of TT virus in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med*. 2001; 95:935–42.

Barzilai O, Ram M, Shoenfeld Y. Viral infection can induce the production of autoantibodies. *Curr Opin Rheumatol*. 2007; 19(6):636-43.

Bassit L, Takei K, Hoshino-Shimizu S, Nishiya AS, Sabino EC, Bassitt RP, *et al.*. New prevalence estimate of TT virus (TTV) infection in low and high risk population from São Paulo, Brasil. *Rev Inst. Med trop*. 2002; 44(4):233-4.

Bendinelli M, Pistello M, Maggi F, Fornal C, Freeer G, Vatteroni ML. Molecular properties, biology and clinical implications of TTV, a recently identified widespread infectious agent of humans. *Clin Microbiol Rev*. 2001; 14(1):98-113.

Bezerra ELM, Vilar MJP, Barbosa OFC, Santos SQ, Castro MA, Trindade MC, *et al.*. Lúpus eritematoso sistêmico (LES): perfil clínico-laboratorial dos pacientes do hospital universitário Onofre Lopes (UFRN - Natal/Brasil) e índice de dano nos pacientes com diagnóstico recente. *Rev Bras Reumatol*. 2005; 45(6):339-42.

Biagini P, Todd D, Bendinelli M, Hino S, Mankertz A, Mishiro S, *et al.*. Anellovirus. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA. *Virus Taxonomy*. Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London: Academic Press; 2004. p. 335-41.

Blazsek A, Sillo P, Ishii N, Gergely P Jr, Poor G, Preisz K, *et al.* Searching for foreign antigens as possible triggering factors of autoimmunity: Torque Teno virus DNA prevalence is elevated in sera of patients with bullous pemphigoid. *Exp Dermatol.* 2008; 17(5):446-54.

Buyon JP, Petri MA, Kim MY, Kalunian KC, Grossman J, Hahn BH, *et al.*. The effect of combined estrogen and progesterone hormone replacement therapy on disease activity in systemic lupus erythematosus: a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2005;142(12 Pt 1):953-62.

Calcaterra S, Zaniratti MS, Serraino D, Peroni M, Abbate I, Cappiello G *et al.* . Cervicovaginal shedding of TT virus in HIV-infected women. *J Hum Virol.* 2001; 4 (6): 343-5.

Chen YS, Chou PH, Li SN, Tsai WC, Lin KH, Tsai KB, Yen JH, Liu HW. Parvovirus B19 infection in patients with rheumatoid arthritis in Taiwan. *J Rheumatol.* 2006; 33(5):887-91.

Chua PK, Nerurkar VR, Yu Q, Woodward CL, Melish ME, Yanagihara R. Lack of association between Kawasaki syndrome and infection with parvovirus B19, human herpesvirus 8, TT virus, GB virus C/hepatitis G virus or Chlamydia pneumoniae. *Pediatr Infect Dis J.* 2000; 19(5):477-9.

Christensen JK, Eugen-Oslen J, Sørensen M, Ullum H, Gjedde SB, Pedersen BK *et al.*. Prevalence and prognostic significance of infection with TT virus in patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis,* 2000; 181(5):1796-9.

Cohen PL. Apoptotic cell death and lupus. Springer Semin Immunopathol. 2006; 28(2):145-52.

D'Cruz DP, Khamashta MA, Hughes GRV. Systemic Lupus Erythematosus. Lancet. 2007; 369(9561):587-96.

De Paula VS, Villar LM, Coimbra Gaspar AM. Comparison of four extraction methods to detect hepatitis A virus RNA in serum and stool samples. Braz J Infect Dis. 2003; 7(2):135-41.

Devalle S, Niel C. Distribution of TT virus genomic groups 1 -5 in Brazilian blood donors, HBV carries, and HIV-1 infected patients. J Med Virol. 2004; 72(1):166-73.

Devalle S, Niel C. A multiplex PCR assay able to simultaneously detect Torque teno virus isolates from phylogenetic groups 1 to 5. Braz J Med Biol Res. 2005; 38(6):853-60.

Diniz-Mendes L, Devalle S, Niel C. Genomic Characterization of Brazilian TT virus isolate closely related to SEN virus-F. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004; 99(3): 301-6.

Edwards CJ. Environmental factors and lupus: are we looking too late? Lupus. 2005; 14(6):423-5.

Ferri C, Zignego AL. Relation between infection and autoimmunity in mixed cryoglobulinemia. Curr Opin Rheumatol 2000; 12:53–60.

Garbuglia AR, Iezzi T, Capobianchi MR, Pignoloni P, Pulsoni A, Sourdís J, *et al.* Detection of TT virus in lymph node biopsies of B-cell lymphoma and Hodgkin's disease, and its association with EBV infection. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2003; 16:109 –18.

Gergely Jr P, Pullmann R, Stancato C, Otvos L Jr, Koncz A, Blazsek A, *et al.* Increased prevalence of transfusion-transmitted virus and cross-reactivity with immunodominant epitopes of the HRES-1/p28 endogenous retroviral autoantigen in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol.* 2005a; 116(2):124-34.

Gergely JR P, Blazsek A, Dnkó K, Poyi A, Poór G. Detection of TT virus in patients with idiopathic inflammatory myopathies. *Ann N Y Acad Sci.* 2005b; 1050:304-13.

Gergely Jr P, Pearl A, Poór G. Possible pathogenic nature of the recently discovered TT virus: Does it play a role in autoimmune rheumatic diseases? *Autoimmun Rev.* 2006; 6(1):5-9.

Gerner P, Oettinger R, Gerner W, Falbrede J, Wirth S. Mother-to-infant transmission of TT virus: prevalence, extent and mechanism of vertical transmission. *Pediatr Infect Dis J.* 2000; 19(11):1074-7.

Graham KL, Utz PJ. Sources of autoantigens in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol.* 2005; 17(5):513-7.

Hallet RL, Clewley JP, Bobet F, McKiernan PJ, Teo CG. Characterization of a highly divergent TT virus genome. *Journal of General Virology.* 2000; 81(pt9): 2273-9.

Harley JB, Kelly JA, Kaufman KM. Unraveling the genetics of systemic lupus erythematosus. *Springer Semin Immunopathol.* 2006; 28(2):119-30.

Hijikata M, Takahashi K, Mishiro S. Complete circular DNA genome of a TT virus variant (isolate name SANBAN) and 44 partial ORF2 sequences implicating a great degree of diversity beyond genotypes. *Virology.* 1999; 260(1):17-22.

Hino S, Miyata H. Torque teno virus (TTV): current status. *Rev Med Virol.* 2007; 17(1):45-57.

Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997; 40:1725.

Hsu TC, Tsay GJ. Human parvovirus B19 infection in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford).* 2001; 40(2):152-7.

Inami T, Konomi N, Arakawa Y, Abe K. High prevalence of TT virus in human saliva and semen. *J Clin Microbiol.* 2000; 38 (6): 2407-8.

Irshad M, Joshi YK, Sharma Y, Dhar I. Transfusion transmitted virus: A review on its molecular characteristics and role in medicine. *World J Gastroenterol.* 2006a; 12(32):5122-34.

Irshad M, Sharma Y, Dhar I, Singh J, Joshi YK. Transfusion-transmitted virus in association with hepatitis A-E viral infections in various forms of liver diseases in India. *World J Gastroenterol.* 2006b; 12(15):2432-6.

Itoh Y, Takahashi M, Fukuda M, Shibayama T, Ishikawa T, Tsuda F, *et al.*. Visualization of TT virus particles recovered from the sera and feces of infected humans. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 279(2):718-24.

James JA, Harley JB, Scofield RH. Epstein-Barr virus and systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol*. 2006; 18(5):462-7.

Jones MS, Kapoor A, Lukashov VV, Simmonds P, Hecht F, Delwart E. New DNA viruses identified in patients with acute viral infection syndrome. *J Virol*. 2005; 79(13):8230-6.

Kooistra K, Zhang YH, Henriquez NV, Weiss B, Mumberg D, Noteborn MH. TT virus-derived apoptosis-inducing protein induces apoptosis preferentially in hepatocellular carcinoma-derived cells. *J Gen Virol*. 2004; 85(Pt 6):1445-50.

Kosminsky S, Menezes RC, Coelho MRCD. Infecção pelo vírus Epstein-Barr em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. *Rev Assoc Med Bras*. 2006; 52(5): 352-5.

Krekulova L, Rehak V, Killoran P, Madrigal N, Riley LW. Genotypic distribution of TT virus (TTV) in a Czech population: evidence for sexual transmission of the virus. *J Clin Virol*. 2001; 23 (1-2): 31-41.

Leary TP, Erker JC, Chalmers ML, Desai SM, Mushahwar IK. Improved detection for TT virus reveal high prevalence in humans, non-human primates and farm animals. *J Gen Virol*. 1999; 80 (8): 2115-20.

Lundgvist A, Isa A, Tolfvenstam T, Kvist G, Broliden K. High frequency of parvovirus B19 DNA in bone marrow samples from rheumatic patients. 2005; 33(1):71-4.

Luo K, Zhang L. Enteric transmission of transfusion-transmitted virus. Chin Med J. 2001; 114(11):1201-4.

Lyra AC, Pinho JR, Silva LK, Sousa L, Saraceni CP, Braga EL, *et al.* HEV, TTV and GBV-C/HGV markers in patients with acute viral hepatitis. Braz J Med Biol Res. 2005; 38(5):767-75.

Maggi F, Fornai C, Morrica A, Casula F, Vatteroni ML, Marchi S, *et al.* High prevalence of TT virus viremia in italian patients, regardless of age, clinical diagnosis, and previous interferon treatment. J Infect Dis. 1999; 180(3):838-42.

Maggi F, Fornai C, Zaccaro L, Morrica A, Vatteroni ML, Isola P, *et al.* TT virus (TTV) loads associated with different peripheral blood cell types and evidence for TTV replication in activated mononuclear cells. J Med Virol. 2001; 64(2):190-4.

Maggi F, Pifferi M, Fornai C, Andreoli E, Tempestini E, Vatteroni M *et al.* TT virus in the nasal secretions of children with acute respiratory diseases: relations to viremia and disease severity. J Virol. 2003; 77 (4): 2418-25.

Miyamoto M, Takahashi H, Sakata I, Adachi Y. Hepatitis-associated aplastic anemia and transfusion-transmitted virus infection. Intern Med 2000;39:1068–70.

Meyer O. Parvovirus B19 and autoimmune diseases. *Joint Bone Spine*. 2003; 70(1):6-11.

Morrica A, Maggi F, Vatteroni ML, Fornai C, Pistello M, Ciccorossi P, *et al.* TT virus: evidence for transplacental transmission. *J Infect Dis*. 2000; 181(2):803-4.

Murali-Krishna K, Altman JD, Suresh M, Sourdive DJD, Zajac AJ, Miller JD, *et al.* Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity*. 1998; 8:177–187.

Mushahwar IK, Erker JC, Murhoff AS, Leary TP, Simons JN, Birkenmeyer LG *et al.* Molecular and biophysical characterization of TT virus: evidence for a new family infecting humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96(6):3177-82.

Neidhart M, Kuchen S, Distler O, Brühlmann P, Michel BA, Gay RE, *et al.* Increased serum levels of antibodies against human cytomegalovirus and prevalence of autoantibodies in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 1999; 42(2):389-92.

Niel C, de Oliveira JM, Ross RS, Gomes SA, Roggendorf M, Viazov S. High prevalence of TT virus infection in Brazilian blood donors. *J Med Virol*. 1999; 57(3):259-63.

Niel C, Saback FL, Lampe EJ. Coinfection with multiple TT virus strains belonging to different genotypes is a common event in healthy Brazilian adults. *Clin. Microbiol*. 2000; 38(5):1926-30.

Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; 241(1):92-7.

Okamoto H, Akahane Y, Ukita M, Fukuda M, Tsuda F, Miyakawa Y, *et al.* Fecal excretion of a noenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non-A-G hepatitis. *J Med Virol.* 1998; 56(2):128-32.

Okamoto H, Takahashi M, Kato N, Fukuda M, Tawara A, Fukuda S, *et al.* Sequestration of TT virus of restricted genotypes in peripheral blood mononuclear cells. *J Virol.* 2000; 74(21):10236-9.

Okamoto H, Mayumi M. TT virus: virological and genomic characteristics and disease associations. *J Gastroenterol.* 2001; 36 (8): 519-29.

Okamoto H, Takahashi M, Nishizawa T, Tawara A, Fukai K, Muramatsu U, *et al.* Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaia. *J Gen Virol.* 2002; 83(Pt 6):1291-7.

Pandey JP, LeRoy E C. Human cytomegalovirus and the vasculopathies of autoimmune diseases (especially scleroderma), allograft rejection, and coronary restenosis. *Arthritis Rheum.* 1998; 41:10-5.

Prescott LE, MacDonald DM, Davidson F, Mokili J, Pritchard DI, Arnot DE, *et al.* Sequence diversity of TT virus in geographically dispersed human populations. *J Gen Virol.* 1999; 80(7):1751-8.

Riemekasten G, Hahn BH. Key autoantigens in SLE. *Rheumatology (Oxford)*. 2005; 44(8):975-82.

Seemayer CA, Vizov S, Brühlmann P, Michel BA, Gay RE, Roggendorf M, *et al.*. Prevalence of TTV DNA and GBV-C RNA in patients with systemic sclerosis, rheumatoid arthritis, and osteoarthritis does not differ from that in healthy blood donors. *Ann Rheum Dis*. 2001; 60(8):806-9.

Sève P, Ferry T, Koenig M, Cathebras P, Rousset H, Broussolle C. Lupus-like presentation of parvovirus B19 infection. *Semin Arthritis Rheum*. 2005; 34(4):642-8.

Sherer Y, Gorstein A, Fritzler MJ, Shoenfeld Y. Autoantibody explosion in systemic lupus erythematosus: more than 100 different antibodies found in SLE patients. *Semin Arthritis Rheum*. 2004; 34(2):501-37.

Shirai T, Hirose S. Molecular pathogenesis of SLE. *Springer Semin Immun*. 2006; 28:79 - 82

Shott S. Statistics for health professionals. London: W.B. Saunders Company; 1990.

Simmonds P, Davidson F, Lycett C, Prescott LE, MacDonald DM, Ellender J *et al.*. Detection of a novel DNA virus (TTV) in blood donors and blood products. *Lancet*. 1998; 352 (9137): 1394.

Simmonds P, Prescott LE, Logue C, Davidson F, Thomas AE, Ludlam CA. TT virus - part of the normal human flora? *J Infect Dis*. 1999; 180(5):1748 - 9.

Szladek G, Juhasz A, Kardos G, Szoke K, Major T, Sziklai I, et al. High co-prevalence of genogroup 1 TT virus and human papillomavirus is associated with poor clinical outcome of laryngeal carcinoma. *J Clin Pathol*. 2005; 58:402–5.

Takahashi K, Hijikata M, Samokhvalov EI, Mishiro S. Full or near full length nucleotide sequences of TT virus variants (Types SANBAN and YONBAN) and the TT virus-like mini virus. *Intervirology*. 2000a; 43(2):119-23.

Takahashi K, Iwasa Y, Hijikata M, Mishiro S. Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus. *Archives of Virology*. 2000b. 145(5):979-93.

Takahashi M, Asabe S, Gotanda Y, Kishimoto J, Tsuda F, Okamoto H. TT virus is distributed in various leukocyte subpopulations at distinct levels, with the highest viral load in granulocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 290(1):242-8.

Tawara A, Akahane Y, Takahashi M, Nishizawa T, Ishikawa T, Okamoto H. Transmission of human TT virus of genotype 1a to chimpanzees with fecal supernatant or serum from patients with acute TTV infection. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;278(2):470-6.

Tokita H, Murai S, Kamitsukasa H, Yagura M, Harada H, Tawara A, *et al.*. Influence of TT virus on the clinical course of alcoholic liver disease. *Hepatol Res*. 2001;19(2):180-93.

Trapani S, Ermini M, Falcini F. Human parvovirus B19 infection: its relationship with systemic lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum*. 1999; 28(5):319-25.

Umemura T, Yeo AE, Sottini A, Moratto D, Tanaka Y, Wang RY, *et al.* SEN virus infection and its relationship to transfusion-associated hepatitis. *Hepatology*. 2001; 33(5):1303-11.

Vasconcelos HC, Menezes ME, Niel C. TT virus infection in children and adults who visited a general hospital in the south of Brazil for routine procedure. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96(4):519-22.

Watanabe MAE, Miranda HC, Oliveira KB, Oliveira CEC, Tristão FSM, Duarte LM, *et al.* Aspectos patológicos, imunológicos e propriedades moleculares do TT vírus. *J Bras Patol Med Lab*. 2005; 41(4):223-8.

Wong M, Tsao BP. Current topics in human SLE genetics. *Springer Semin Immunopathol*. 2006; 28(2):97-107.

Wucherpfennig KW. Mechanisms for the induction of autoimmunity by infectious agents. *J. Clin. Invest*. 2001; 108(8): 1097-1104.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Termo de consentimento livre e esclarecido

1- Número de Registro: _____.

2- Dados sobre a pesquisa clínica

Título da Pesquisa: Prevalência, Diversidade Genética e Antigenicidade de *Anellovirus* em Pacientes Portadores de Artrite Reumatóide e em Portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico.

Pesquisadores:

Prof. Dr. Izaias Pereira da Costa – Coordenador da pesquisa.

Márcio Reis da Costa – Mestrando

3- Explicações para o voluntário ou seu representante legal sobre a pesquisa

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Você precisa decidir se quer participar ou não. Por favor, não se apresse em tomar a decisão. Leia cuidadosamente o que se segue e pergunte ao responsável pelo estudo qualquer dúvida que tiver.

Por que o estudo está sendo feito?

Algumas doenças reumáticas, entre elas o Lúpus Eritematoso Sistêmico e a Artrite Reumatóide, apesar de todo o conhecimento acumulado nos últimos anos, não tem sua causa totalmente conhecida. Recentemente foi descoberto um novo vírus no Japão, chamado TTV, alguns estudos mostram que ele pode ser responsável por algumas doenças. Nosso estudo tem como objetivo pesquisar se esse vírus ou algum vírus da família dele pode desencadear o Lúpus ou a Artrite Reumatóide.

Quem participará do estudo? Quais são meus requisitos?

Poderão participar deste estudo pessoas que preencham critérios diagnósticos, ou seja, que tenham diagnóstico comprovado, para artrite reumatóide ou lúpus eritematoso sistêmico.

Quem não pode ou não deve participar deste estudo?

Pessoas que possuam problemas de saúde como doenças infecciosas crônicas (de longa data), câncer, exame positivo para sífilis.

O que serei solicitado a fazer?

Você será submetido a um exame médico de rotina e a uma série de exames de sangue.

Quais prejuízos ou agravos podem acontecer comigo se eu participar deste estudo?

Você poderá sentir dor no local da picada da agulha durante a coleta de sangue para os exames.

Quais benefícios posso esperar?

A melhor compreensão da causa dessas doenças pode futuramente levar os médicos a desenvolver tratamentos mais eficientes e com menos efeitos colaterais.

Caso seja detectada na amostra de seu sangue a presença do vírus TTV ou de algum vírus da família dele, você será informado, e se for necessário será iniciado tratamento específico. É importante destacar que sua participação neste trabalho **não** será remunerada de forma alguma.

Quem poderá ver os meus registros/respostas e saber que eu estou participando do estudo?

Se você concordar em participar do estudo, seu nome e identidade serão mantidos em sigilo. A menos que requerido por lei, somente o pesquisador, seu médico, a equipe do estudo e o Comitê de Ética independente terão acesso as suas informações.

Eu posso recusar a participar ou pedir para sair do estudo?

Sua participação no estudo é voluntária. Você pode decidir participar ou não do estudo e, inclusive, desistir a qualquer momento. Neste caso você não perderá nenhum benefício ao qual tem direito e nem será proibido de participar de novos estudos.

Em caso de dúvidas adicionais entrar em contato com:

- **Prof. Dr. Izaias Pereira da Costa – fone: 9985 – 7208 ou Márcio Reis da Costa – fone: 9216 – 07 21, ou ainda na sala do Serviço de Reumatologia do Departamento de Clínica Médica - HU, localizado no Hospital Universitário, na Avenida Senador Filinto Muller, s/n, CEP: 79056-010, bairro Ipiranga, Campo Grande – MS, fone: 3345-3203.**
- **Comitê de Ética e Pesquisa: 3345 - 7187**

Declaro que li este formulário de consentimento, todas as minhas dúvidas foram esclarecidas e que sou voluntário a tomar parte neste estudo.

Assinatura do voluntário..... Data:.....

Assinatura do pesquisador..... Data:.....

Testemunha..... Data:.....

APÊNDICE B – Ficha epidemiológica.

amostra N° _____

FICHA EPIDEMIOLÓGICA/LES**I. IDENTIFICAÇÃO** Data de coleta da amostra (soro): ____/____/____

1. Prontuário:_____. 1.a) Iniciais:_____.
2. Sexo: feminino masculino 3. Idade:_____
4. Cidade: _____ 5. Naturalidade: _____
7. Escolaridade:_____.

II. DADOS COMPLEMENTARES

1. Critérios ACR:

- A) Eritema malar:_____.
- B) Lesão cut. discóide:_____.
- C) Fotossensibilidade:_____.
- D) Úlcera oral ou nasofaríngea:_____.
- E) artrite n-erosiva (2 ou +):_____.
- F) Serosite (onde?):_____.
- G) Acometimento renal* (qual?):_____.
- H) Convulsão ou psicose:_____.
- I) Alteração hematológica* (qual?):_____.
- J) FAN:_____. Título:_____. Padrão:_____.
- L) Alterações imunológicas:
- L1) anti-DNA: . Ou,
- L2) anti-SM: . Ou,
- L3) Anticoagulante lúpico:_____. anticardiolipina IgG:_____. IgM:_____.
- VDRL:_____. FTABS:_____. (falso positivo)

2. Outras manifestações clínicas:_____.
3. anti-RO:____. anti-La:____. anti-RNP:____.Outros auto-anticorpos:_____.
4. Outras doenças presentes:_____.
5. Data do primo diagnóstico: ____/____/____
6. Paciente tratado: sim não
- 6.1 Se sim, tratado desde: ____/____/____ ou ____ (anos) ____ (meses) ____ (dias).
7. Tratamento atual:_____.
8. Uso prévio de outros imunossupressores? Quais?_____.
9. Outros medicamentos em uso _____.
10. Paciente submetido a:
- | | | | |
|------------|---------------------|------------------|----------|
| Transfusão | Drogas injetáveis | Hemodiálise | Cirurgia |
| Doador | Transplante | Acupuntura | Piercing |
| Tatuagem | Acidente percutâneo | Transm. Vertical | |
- Rel. sex desprotegida
- 10.1 se sim para alguma resposta, há quanto tempo? _____

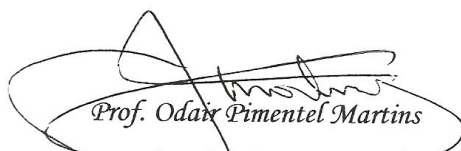
- Acometimento renal*: proteinúria persistente: (0,5g/d ou 3+) ou cilindros celulares;
- Alterações hematológicas*: anemia hemolítica com reticulocitose, ou leucopenia (< 4000), ou linfopenia (< 1500), ou trombocitopenia (<100.000).

ANEXOS**ANEXO A – Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa/ CEP/ UFMS**

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comitê de Ética em Pesquisa /CEP/UFMS

*Carta de Aprovação*

A minha assinatura neste documento, atesta que o protocolo nº 900 do Pesquisador Izaías Pereira da Costa intitulado “Prevalência, diversidade e antigenicidade de Anellovirus em pacientes portadores de Artrite Reumatóide e Lupus Eritematoso Sistêmico”, e o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, foram revisados por este comitê e aprovados em reunião ordinária no dia 31 de maio de 2007, encontrando-se de acordo com as resoluções normativas do Ministério da Saúde.


Prof. Odair Pimentel Martins
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS

Campo Grande, 31 de maio de 2007.

Comitê de Ética da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
<http://www.propp.ufms.br/bioetica/cep/>
bioetica@propp.ufms.br
fone 0XX67 345-7187

ANEXO B – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo

Oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo - 2009

iniciador	Polaridade	Seqüência de nucleotídeos (5' a 3')	Posição (isolado referência)	Grupo Genômico
Universal				
T1S	Senso	CCGDAGGTGAGYTTACACACCG	180 a 201 (TA278)	1 – 5
T1A	Antisenso	AGGCCYTATGGCGAAGTCTGG	3372 a 3352 (TA278)	1 – 5
T2S	Senso	AGTCAAGGGGCAATTCGGGC	203 a 222 (TA278)	1 – 5
Grupo-específico				
T2G1A	Antisenso	CCATAGGCCATGGTGCTCKATC	599 a 578 (TA278)	1
T2G2A	Antisenso	GTGGTRCCCGTTCCACAGAT	897 a 878 (PMV)	2
T2G3A	Antisenso	CCTGTATCTGGCCAGGTCTAG	1083 a 1063 (SANBAN)	3
T2G4A	Antisenso	CGGCGGTCTCCACGGCAT	319 a 302 (KC009)	4
T2G5A	Antisenso	TCYGCGAAGTCKGCCACGGGT	678 a 658 (CT39F)	5

A: adenina; C: citosina; G: guanina; T: timina; D= A, G ou T; Y= C ou T; K= G ou T; R= A ou G.