

SONIA MARA RABONI

## **ADENOVIRUS E CISTITE HEMORRÁGICA EM PACIENTES DO TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA**

Dissertação apresentada como quesito parcial  
à obtenção do grau de Mestre. Curso de Pós-  
Graduação em Medicina Interna, Setor de  
Ciências da Saúde, Universidade Federal do  
Paraná.

Orientadores: Prof. Dr. Ricardo Pasquini  
Dr.<sup>a</sup> Marilda Mendonça Siqueira

CURITIBA

1999



## PARECER

Parecer Conjunto dos Professores Dr. Ricardo Pasquini, Dr.<sup>a</sup> Marilda M. Siqueira, Dr. Cláudio Panutti e Dr. Rogério Andrade Mulinari sobre a Dissertação de Mestrado em Medicina Interna da Universidade Federal do Paraná, elaborada pela Dr.<sup>a</sup> SONIA MARA RABONI, intitulada "**ADENOVIRUS E CISTITE HEMORRÁGICA EM PACIENTES DO TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA**".

A Banca Examinadora considerou que a Dr.<sup>a</sup> SONIA MARA RABONI, apresentou trabalho adequado para Dissertação de Mestrado e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, atribuindo-lhe **Conceito "A"**, correspondente ao **Grau "10"** sendo pois unanimemente recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de **Mestre em Medicina Interna** e a publicação da Dissertação em veículo de divulgação conveniente, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições.

Curitiba, 19 de março de 1999.

Prof. Dr. Ricardo Pasquini

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marilda M. Siqueira

Prof. Dr. Cláudio Panutti

Prof. Dr. Rogério Andrade Mulinari

Não te dei face, nem lugar que te seja próprio, nem dom algum que te faça particular, ó Adão, a fim de que tua face, teu lugar e teus dons, tu os desveles, conquistes e possuas por ti mesmo. Natureza definida de outras espécies em leis por mim estabelecidas. Mas tu a que nenhum confim delimita, por teu próprio arbítrio, entre as mãos daquele que te colocou, tu te defines a ti mesmo. Te pus no mundo, a fim de que possas melhor contemplar o que contém o mundo. Não te fiz celeste nem terrestre, mortal ou imortal, a fim de que tu mesmo, livremente, à maneira de um bom pintor ou de um hábil escultor, descubras tua própria forma . . .

*Picco della Mirandola  
Oratio de hominis dignitate*

*À Alfredo, companheiro de todos os momentos e minhas filhas Carolina e Marina, com todo o meu amor*

*À minha mãe Aozonia, meu carinho e eterna gratidão*

## **AGRADECIMENTOS**

- Agradeço a todos os que estiveram presentes direta ou indiretamente na realização deste trabalho, em especial:

- À **Dra. Marilda Mendonça Siqueira** pelo apoio, estímulo, amizade, compreensão e dedicação dispensada na orientação deste trabalho.

- Ao **Dr. Ricardo Pasquini** pelo apoio, dedicação e estímulo na orientação deste trabalho.

- À **Dra. Jussara Pereira do Nascimento** pela acolhida calorosa, apoio, amizade e incentivo dispensados nos meus primeiros passos dentro da Virologia.

- Às colegas de trabalho do laboratório de Virologia do Hospital de Clínicas **Meri B. Nogueira, Luine V. Tsutchyia** e **Gislene R. A. Takahashi** pelo apoio incondicional e constante estímulo na execução deste trabalho.

- Ao **Dr. José Paulo Gagliardi Leite** pelo apoio e orientações nas análises dos resultados do ensaio imunoenzimático.

- Ao colega **Dr. Sérgio M. de Almeida** pela amizade, apoio constante e leitura crítica de partes deste trabalho.

- À estagiária **Valéria M. Hakim** pela amizade e oportunidade de crescimento através do conhecimento de minhas próprias limitações na orientação de sua monografia.

- À **Dra. Silvana Rodrigues Portes** do laboratório de Vírus Respiratórios da Fundação Oswaldo Cruz pela colaboração técnica e estímulo na execução de partes deste trabalho.

- Aos médicos e enfermeiras do Serviço de Transplante de Medula óssea pela colaboração na colheita das amostras clínicas.
- Aos pacientes do Transplante de Medula Óssea que participaram deste trabalho.
- Aos funcionários da Seção de Urinálise pela realização do exame parcial de urina.
- Às amigas **Dra. Cléa Elisa Ribeiro** e **Dra. Cristina Alves Rodrigues** pelo constante incentivo durante a execução deste trabalho.
- Aos meus irmãos **Leila, Cirlei e Edson** exemplos de comportamento e amizade em que sempre me espelhei.
- À **Sra. Matilde M. Ferreira** pelo apoio constante e dedicação às minhas filhas nos momentos de minha ausência.
- À bibliotecária **Sra. Áurea M<sup>a</sup>. Costin** pela atenciosa revisão das referências bibliográficas.
- À **Sra. Ângela M. S. Martins** pelo auxílio na realização da análise estatística deste trabalho.
- Ao **Sr. Ângelo Edval Roman** pela paciência e auxílio dispensados na correção gramatical desta dissertação.
- À **Sra. Maria Isabel Schiavon Kinasz** pela edição final deste trabalho.

## SUMÁRIO

	<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	iv
	<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vi
	<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	vii
	<b>RESUMO</b> .....	ix
	<b>ABSTRACT</b> .....	x
1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1	<b>ADENOVÍRUS</b> .....	1
1.1.1	<b>Estrutura e Biologia</b> .....	3
1.1.2	<b>Taxonomia</b> .....	6
1.1.3	<b>Replicação Viral</b> .....	9
1.1.4	<b>Patogênese e Imunidade</b> .....	14
1.1.5	<b>Aspectos Epidemiológicos</b> .....	16
1.1.6	<b>Aspectos Clínicos</b> .....	17
1.1.6.1	<b>Doenças Respiratórias</b> .....	22
1.1.6.2	<b>Síndrome <i>Pertussislike</i></b> .....	23
1.1.6.3	<b>Infecções Oculares</b> .....	24
1.1.6.4	<b>Cistite Hemorrágica Aguda</b> .....	25
1.1.6.5	<b>Meningoencefalite</b> .....	26
1.1.6.6	<b>Doença Gastrointestinal</b> .....	27
1.1.7	<b>Diagnóstico Laboratorial</b> .....	28
1.1.7.1	<b>Detecção Direta em Espécimen Clínico</b> .....	29
1.1.7.2	<b>Isolamento Viral</b> .....	37

1.1.7.3	Pesquisa de Anticorpos .....	39
1.1.8	<b>Vacina</b> .....	40
1.1.9	<b>Tratamento</b> .....	41
1.2	<b>ADENOVÍRUS EM PACIENTES IMUNOCOMPROMETIDOS</b> .....	42
1.3	<b>CISTITE HEMORRÁGICA POR ADENOVÍRUS EM TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA</b> .....	46
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	53
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	54
3.1	<b>CASUÍSTICA</b> .....	54
3.1.1	<b>Definição de Cistite Hemorrágica</b> .....	55
3.1.2	<b>Amostras</b> .....	55
3.2	<b>MÉTODOS</b> .....	57
3.2.1	<b>Isolamento</b> .....	57
3.2.2	<b>Imunofluorescência Indireta</b> .....	58
3.2.3	<b>Ensaio Imunoenzimático</b> .....	58
3.2.4	<b>Detecção de Ácido Nucleico</b> .....	59
3.2.4.1	Preparo das Amostras da Urina para PCR.....	60
3.2.4.2	Extração do ADN Viral.....	60
3.2.4.3	Seleção dos Oligonucleotídeos Sintéticos .....	62
3.2.4.4	Amplificação do ADN Viral pela Técnica de PCR.....	63
3.2.4.5	Detecção do Produto Amplificado .....	63
3.2.5	<b>Imunohistoquímica</b> .....	64
3.2.6	<b>Método Estatístico</b> .....	66
4	<b>RESULTADOS</b> .....	67
4.1	<b>DADOS DEMOGRÁFICOS</b> .....	67



4.2	PERÍODO DE COLETA DE MATERIAL .....	69
4.3	HEMATÚRIA EM PACIENTES DE TMO.....	70
4.4	CULTURA, EIE E PCR PARA ADENOVÍRUS .....	72
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	81
6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	95
7	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	96

## LISTA DE TABELAS

1	ADENOVÍRUS – PROTEÍNAS E SUAS FUNÇÕES.....	5
2	CLASSIFICAÇÃO DOS ADENOVÍRUS HUMANOS .....	6
3	CÊPAS PROTÓTIPOS DE ADENOVÍRUS .....	18
4	DOENÇAS CAUSADAS POR ADENOVÍRUS HUMANOS.....	22
5	DADOS GERAIS DO SEXO, IDADE E MORTALIDADE POR TIPO DE TMO .....	67
6	DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS DOS PACIENTES SUBMETIDOS A TMO .....	68
7	PERÍODO DA COLETA DE URINA POR TIPO DE TMO NO PERÍODO PRÉ-TRANSPLANTE.....	69
8	NÚMERO DE AMOSTRAS ANALISADAS COM RELAÇÃO À PRESENÇA OU NÃO DE HEMATÚRIA NOS MESES PÓS-TRANSPLANTE .....	70
9	PRESENÇA E INTENSIDADE DE HEMATÚRIA POR TIPO DE TMO NO PERÍODO PRÉ-TRANSPLANTE .....	71
10	FREQÜÊNCIA, NÚMERO DE EPISÓDIOS DE HEMATÚRIA E URINAS COLETADAS POR TIPO DE TMO NO PERÍODO PÓS-TRANSPLANTE .	71
11	INTENSIDADE DE HEMATÚRIA POR TIPO DE TMO NO PERÍODO PÓS-TRANSPLANTE .....	72
12	ADENOVÍRUS ISOLADOS EM URINAS DOS PACIENTES COM OU SEM HEMATÚRIA NO PERÍODO PRÉ E PÓS TRANSPLANTE.....	73
13	ACHADOS LABORATORIAIS E ESTATÍSTICOS DA ANÁLISE DAS URINAS NO PERÍODO PRÉ-TRANSPLANTE .....	75
14	ACHADOS LABORATORIAIS DAS ANÁLISES DAS URINAS DE ACORDO COM A INTENSIDADE DE HEMATÚRIA NO PERÍODO PÓS-TRANSPLANTE .....	75
15	COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DE EIE DE AMOSTRA CONCENTRADA E NÃO CONCENTRADA.....	76

16	COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DE CULTURA DE AMOSTRA CONCENTRADA E NÃO CONCENTRADA .....	76
17	COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS DE EIE E CULTURA .....	77
18	COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS DE PCR E CULTURA.....	78
19	ACHADOS LABORATORIAIS POR TIPO DE TMO E INTENSIDADE DE HEMATÚRIA NO PERÍODO PÓS-TRANSPLANTE.....	80

## LISTA DE FIGURAS

1	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PARTÍCULA DE ADENOVÍRUS .....	3
2	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REPLICAÇÃO VIRAL .....	9
3	REPLICAÇÃO DO ADENOVÍRUS: EVENTOS E GENES ENVOLVIDOS	13
4A	IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA DE CÉLULAS HEp-2 NÃO INFECTADAS, CONTROLE NEGATIVO. 400X.....	73
4B	IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA DE CÉLULAS HEp-2 INOCULADAS COM URINA COM DETECÇÃO DE INCLUSÕES INTRANUCLEARES DE ADENOVÍRUS. 400X.....	74
5	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DOS PRODUTOS DO DNA DO ADENOVÍRUS DAS AMOSTRAS AMPLIFICADAS PELA REAÇÃO DE PCR.....	78
6A	CONTROLE NEGATIVO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA DETECÇÃO DE ADENOVÍRUS EM TECIDO RENAL. 400X.....	79
6B	IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA DETECÇÃO DE ANTÍGENO DE ADENOVÍRUS EM CÉLULAS TUBULARES DE TECIDO RENAL. 400X .....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A 549	- linhagem celular de carcinoma de pulmão
Ad	- adenovírus
ADN	- ácido desoxirribonucleico
ADN pol	- polimerase ADN dependente
AL	- aglutinação em látex
ARN	- ácido ribonucleico
ARNm	- ácido ribonucleico mensageiro
BK	- espécie de poliomavírus
CDC	- <i>Center for disease Control and Prevention</i>
CH	- cistite hemorrágica
CIE	- contraímunoeletroforese
CMV	- citomegalovírus
dATP	- desoxiadenosina-trifosfato
dCTP	- desoxicitidina-trifosfato
dGTP	- desoxiguanosina-trifosfato
dNTP	- desoxinucleosídeo-trifosfato
dTTP	- desoxitimidina-trifosfato
DBP	- <i>DNA binding protein</i>
DECH	- doença do enxerto contra o hospedeiro
DO	- densidade óptica
ECP	- efeito citopático
EIARA	- ensaio imunoenzimático combinado para rotavírus e adenovírus
EIE	- ensaio imunoenzimático
FC	- fixação de complemento
FIA	- fluoroimunoensaio
FITC	- isotiocianato de fluoresceína
g	- unidade de rotação
G+C	- guanosina + citosina
HEK	- linhagem celular de rim embrionário humano

HeLa	- linhagem celular de carcinoma de cérvix
HEp-2	- linhagem celular de carcinoma de nasofaringe
HIV	- vírus da imunodeficiência humana
HLA	- antígeno de histocompatibilidade humano
IFI	- imunofluorescência indireta
IME	- imunomicroscopia eletrônica
kD	- kilodaltons
MME	- meio mínimo de "Eagle"
ME	- microscopia eletrônica
nm	- nanômetros
pb	- pares de base
PBS	- solução tampão salina fosfato
PGE2	- prostaglandina E2
RIA	- radioimunoensaio
SDS	- <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SIDA	- síndrome da imunodeficiência humana adquirida
STMO	- serviço de transplante de medula óssea
SV40	- <i>simian virus</i> tipo 40
TBE	- tris borato EDTA
TMB	- tetrametil-benzidina
TMO	- transplante de medula óssea
TNE	- solução tampão composta de Tris-HCl, EDTA e NaCl
TP	- <i>terminal protein</i>
μl	- microlitro
VSR	- vírus sincicial respiratório
WI 38	- linhagem celular de fibroblasto fetal humano

## RESUMO

Cistite hemorrágica (CH) é uma das mais freqüentes complicações em pacientes submetidos a transplante de medula óssea (TMO). Normalmente é atribuída ao emprego da droga ciclofosfamida durante o regime de condicionamento. Contudo, infecções virais também podem causar CH e, pacientes transplantados são de alto risco para estas infecções devido ao comprometimento de seu sistema imunológico. CH associada ao adenovírus tem se tornado uma seqüela reconhecida da imunossupressão. As manifestações clínicas mais freqüentes são febre, disúria, dor suprapúbica e hematúria macroscópica. Apesar de ser uma doença habitualmente autolimitada, ela freqüentemente está associada a um período de internamento prolongado, alto custo, significativo desconforto para o paciente e necessidade de múltiplas transfusões sangüíneas. Neste trabalho realizou-se um estudo prospectivo para detecção de adenovírus em pacientes com CH nos primeiros 100 dias pós-transplante, compararam-se diferentes métodos laboratoriais e procurou-se uma correlação definitiva entre a excreção urinária de adenovírus e a CH. Estudaram-se 75 pacientes que receberam TMO no Hospital de Clínicas da UFPR, no período de julho de 1996 e junho de 1997. Realizou-se análise das amostras de urina de todos os pacientes na fase pré-transplante e apenas daqueles com hematúria micro ou macroscópica no pós-transplante. As urinas foram processadas para a detecção de adenovírus pelos métodos de cultura celular, ensaio imunoenzimático (EIE) e reação de polimerização em cadeia (PCR). Foram processadas 143 amostras de urina, 75 pré-transplante com ou sem hematúria e 68 pós-transplante apenas nas urinas com hematúria. Após o TMO a hematúria ocorreu em 38,9% dos pacientes, sendo com maior freqüência em paciente com transplante alogênico não consangüíneo e no primeiro mês pós-transplante. No período pré-transplante, adenovírus foi isolado em um paciente que estava assintomático e, em três pacientes no pós-transplante. Esses apresentavam CH grau 3 ou 4 (grave), e estavam entre o segundo e terceiro mês pós-transplante. A sensibilidade do EIE para a detecção de adenovírus em urina foi de 30,0% e especificidade de 98,5%. A sensibilidade do PCR foi de 88,9% e especificidade de 59,0%. A imunohistoquímica (IH) dos pacientes com CH e adenovírus na urina que evoluíram para óbito demonstrou grande quantidade de antígenos desse vírus em túbulos renais confirmando a doença renal.

## ABSTRACT

Hemorrhagic cystitis is a major cause of morbidity during bone marrow transplantation (BMT) and is usually attributed to the use of high-dose cyclophosphamide in the preparation for BMT. However, viral infection can also cause hemorrhagic cystitis and, transplant patients are at high risk for infection because of the compromised immune system. Adenovirus-associated hemorrhagic cystitis has become a recognized sequel of immunosuppression. Acute hemorrhagic cystitis due adenovirus has most frequently been found clinically manifested by fever, disuria, suprapubic pain and gross hematuria. Although adenovirus hemorrhagic cystitis is usually a self-limited disease, it's often associated with a prolonged and expensive hospital stay, significant patient discomfort and multiple blood product transfusion. The diagnosis of viral infection is usually determined by viral cultures. In recipients of BMT viremia and viruria are often observed in recipients without any symptoms. We designed a prospective study of adenovirus detection attempted 100 days after BMT from urine, compare different laboratory techniques and found the definite correlation between urinary adenovirus excretion and HC. The study included 75 patients who received BMT at the Clinical Hospital of Federal University of Parana from July 1996 to June 1997. The analysis of samples of urine was made of all patients before transplantation and every 10 days after BMT, if it was presented microscopic or macroscopic hematuria, until 100 days. The urine specimens were processed for adenovirus detection by culture in HEp-2 cells, PCR and enzyme-linked assay. It was processed 143 samples of urine, 75 pre-transplant with and without hematuria and 68 post-transplant, only of the urine with hematuria. After of BMT, hematuria occurred in 38,9% of patients, was more frequent in unrelated donor transplant and during first month period (60,7%). Adenovirus was isolated at one pre-transplant patient that was without symptoms and, in three post-transplant patients. All of them had hemorrhagic cystitis grade 3 or 4 (severe), and were at month 2 or 3 post-transplant. The sensitivity of EIA was 30,0% and specificity was 98,5% to adenovirus detection in urine samples. The sensitivity of PCR tests was 88,9% and specificity was 59,0%. The immunohistochemistry of kidneys of patients that died demonstrated adenovirus antigens in renal tubules thus confirming the renal disease.



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ADENOVÍRUS

Os adenovírus foram cultivados e relatados como agentes virais distintos em 1953 por ROWE, HUEBNER, GILMORE et al., durante tentativa de estabelecer linhagens de cultura de tecido adenoidal humano, removido cirurgicamente de crianças. Foram descritos como um agente transmissível, capaz de levar as culturas celulares a um processo de degeneração espontânea.

Posteriormente, tornou-se evidente que os adenovírus, além de persistirem por anos como infecções latentes do tecido linfóide, apresentavam também capacidade de multiplicação ativa relacionada com manifestações clínicas. Agente similar fora isolado em cultura de células HeLa, a partir de materiais de recrutas militares febris com sintomatologias respiratórias agudas febris. (HILLEMAN e WERNER, 1954).

Estudos subseqüentes demonstraram que havia múltiplos sorotipos desse novo agente, antigenicamente relacionados por um antígeno fixador de complemento grupo-específico. Esses vírus foram inicialmente indicados como agentes da degeneração adenoidal, da doença faringo-conjuntival e da doença respiratória aguda. (HORWITZ, 1990). Em 1956, foi adotada a nomenclatura atual dos adenovírus. (ENDERS, DINGLE, FRANCIS et al., 1956).

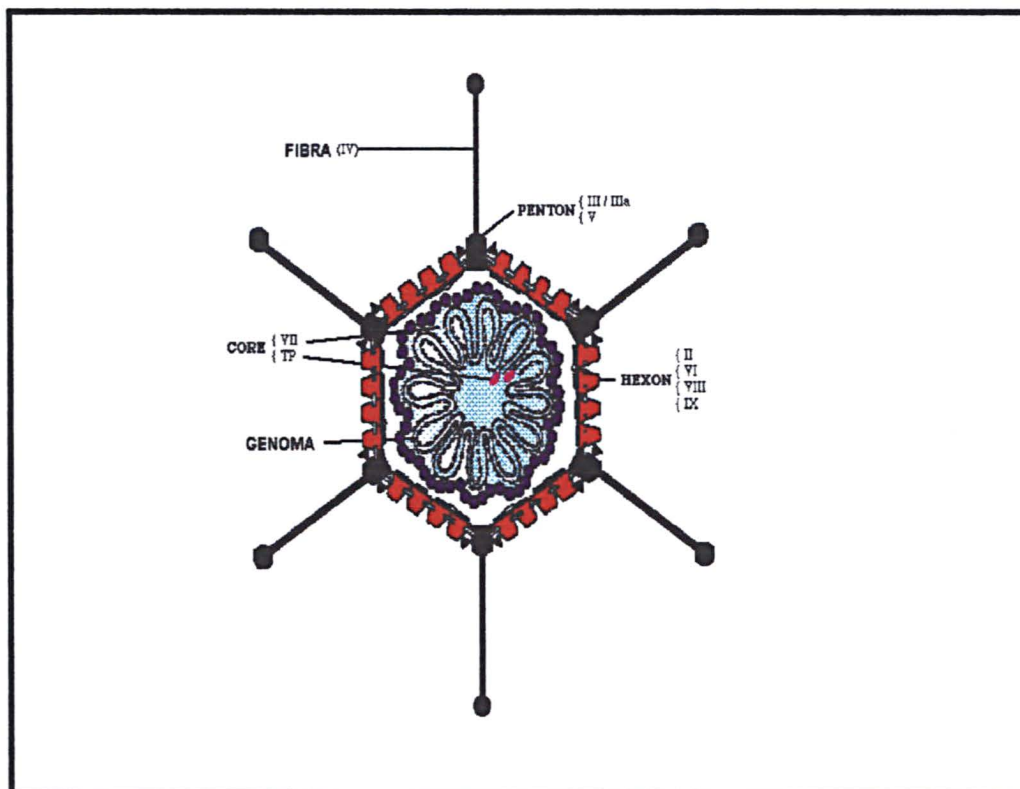
Diversos relatos clínicos e epidemiológicos que se seguiram revelaram a multiplicidade dos sorotipos desses agentes, demonstrando a sua prevalência em

surtos de doença humana respiratória, conjuntival e intestinal em todo o mundo. (ROWE, HARTLEY e HUEBNER, 1958). Posteriormente, alguns sorotipos foram descritos como veiculadores de uma doença autolimitada no tracto genitourinário de pacientes com cistite hemorrágica aguda (NUMAZAKI, KUMASAKA, YANO et al., 1973) e, mais recentemente, alguns deles têm sido associados a gastroenterite e a infecções em pacientes imunossuprimidos. (WHITE e FENNER, 1994).

Em 1962, demonstrou-se que os adenovírus tipo 12 poderiam causar tumores malignos em roedores. Essa foi a primeira descrição de um vírus patogênico humano como indutor de tumores malignos em animais. (TRENTIN, YABE e TAYLOR, 1962). O potencial oncogênico dos adenovírus despertou o interesse de pesquisadores em biologia molecular pela bioquímica da replicação desse agente e pela sua oncogênese, obtendo um detalhado conhecimento de muitos aspectos dos ciclos líticos e transformantes da infecção viral. (HORWITZ, 1990).

Apesar de ter se tornado claro que os adenovírus não participam no desenvolvimento do câncer humano, os conhecimentos gerados por esses estudos têm seu maior impacto sobre a compreensão da expressão genética em células de mamíferos e vírus. Como exemplos, descreveu-se o fenômeno de *splicing* (junção) dos ácidos ribonucleicos (ARN) transcritos, assim como a importância das proteínas nos processos de replicação do ácido desoxirribonucleico (ADN). Também, as técnicas pioneiras para elucidação da regulação dos programas de transcrição, em sistemas eucarióticos. (HORWITZ, 1990; WHITE e FENNER, 1994).

### 1.1.1 Estrutura e Biologia



**FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PARTÍCULA DE ADENOVÍRUS**

As partículas de adenovírus (Figura 1) são estruturas não envelopadas, de simetria icosaédrica, de 65 a 80 nm de diâmetro; o capsídeo é composto por dois tipos principais de proteínas, chamadas conjuntamente de capsômeros: 240 “hêxons”, que formam as 20 faces triangulares do icosaedro, e 12 “pêntons”, que formam os vértices. De cada vértice, projeta-se uma estrutura chamada “fibra”,

dando ao vírion o aspecto de um satélite. O comprimento da fibra varia com o sorotipo do vírus.

Cada pênion contém uma base sobre a superfície do capsídeo e uma fibra projetando-se desta, que é cercada por cinco héxons. O nome "pênion" é derivado dessa relação geométrica. Todos os outros capsômeros são héxons, sendo assim chamados por estarem circundados por seis estruturas idênticas vizinhas (HORWITZ, 1990; WHITE & FENNER, 1994).

O capsídeo protege o ADN da degradação física e química, e as fibras estão, provavelmente, envolvidas no processo de união do vírus aos receptores de superfície celular (BAUM, 1992).

A composição de polipeptídeos do vírion foi estudada por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (Tabela 1). Os héxons, que são as maiores subunidades do capsídeo icosaédrico, consistem de um trímero de polipeptídeos II com um poro central; polipeptídeos menores VI, VIII e IX também estão associados ao héxon, e parecem estar envolvidos com a estabilização e/ou montagem da partícula.

Os pênions são mais complexos. A base consiste de um pentâmero de peptídeo III, associado a cinco moléculas de peptídeo IIIa, que têm atividade toxigênica. Pênions purificados causam efeito citopático na ausência de qualquer outro componente viral.

A fina fibra de glicoproteína IV que se projeta do centro de cada pênion é responsável pela hemaglutinação, no entanto, o receptor molecular da hemácea é desconhecido, e atua, também, direcionando a ligação entre o vírus e a célula. É um determinante do tropismo dos adenovírus (KAJON, 1995).

O core da partícula contém pelo menos quatro polipeptídeos: TP (proteína terminal), que é ligada covalentemente à porção 5' final do genoma, V (180

cópias/partícula) e VII (1070 cópias/partícula), que atuam como bases protéicas (ricas em arginina, similar às histonas) associadas não covalentemente ao genoma, formando uma substância semelhante à cromatina, e uma pequena proteína denominada Mu (4kD), cuja localização e função não são conhecidas (ADENOVIRUSES, 1997).

O genoma consiste de uma molécula linear, não segmentada, de dupla fita de ácido desoxirribonucleico (ADN), de 36-38 pares de kilobases (tamanho é variável entre os diferentes sorotipos), peso molecular de  $23 \times 10^6$ , um conteúdo G+C de 48,0 a 61,0%, com repetições terminais invertidas, e capacidade teórica de codificar 30-40 genes. Há uma relação inversa entre a quantidade de C+G e a oncogenicidade. (BAUM, 1992). O ADN, em associação com uma proteína de 55kD que é covalentemente ligada a cada terminal 5', é infeccioso quando transferido para células susceptíveis. (WHITE e FENNER, 1994; ADENOVIRUSES, 1997).

**TABELA 1 - ADENOVIRUS - PROTEINAS E SUAS FUNÇÕES**

NOME	LOCALIZAÇÃO	FUNÇÕES
II	monômero héxon	estrutural
III	base pênton	penetração
IIIa	associado com a base pênton	Penetração
IV	Fibra	ligação ao receptor, hemaglutinação
V	core; associada com ADN & base pênton	semelhante a histona - empacotamento
VI	polipeptídeo menor héxon	Estabilização/ montagem da partícula ?
VII	Core	semelhante a histona
VIII	polipeptídeo menor héxon	Estabilização/ montagem da partícula ?
IX	polipeptídeo menor héxon	Estabilização/ montagem da partícula ?
TP	Genoma	Replicação
Mu	Desconhecido	Desconhecido

## 1.1.2 Taxonomia

Em 1976, em sessão do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus, os adenovírus foram classificados em uma família chamada *Adenoviridae*. Esta inclui dois gêneros, *Mastadenovirus* e *Aviadenovirus*, entre os quais não há qualquer reatividade imunológica cruzada. (WIGAND, BARTHA, DREIZIN et al, 1982).

O gênero *mastadenovirus* compreende numerosos sorotipos de adenovírus específicos de mamíferos. Atualmente, 49 sorotipos de adenovírus humanos são reconhecidos, com base em critérios de propriedades de hemaglutinação, oncogenicidade para hamster recém-nascido, homologia do ADN, conteúdo G+C do ADN genômico, peso molecular dos polipeptídeos estruturais, comprimento da fibra, tecido alvo e epidemiologia. Esses adenovírus são classificados em seis subgêneros (A - F) (Tabela 2). (WHITE e FENNER, 1994; KAJON, 1995).

**TABELA 2 - CLASSIFICAÇÃO DOS ADENOVÍRUS HUMANOS**

Subgêneros	Sorotipos (Ad)	Homologia do DNA (%)	Potencial oncogênico	Hemaglutinação	
				Rhesus	rato
A	12, 18, 31	48-69	alto	-	+/-
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35	89-94	Fraco	+	-
C	1, 2, 5, 6	99-100	Nenhum	-	+/-
D	8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42- 49	94-99	Nenhum	+/-	+
E	4	58	Nenhum	-	+/-
F	40, 41	não descrito	Nenhum	-	+/-

Ad: Adenovírus

**Subgênero A** consiste dos sorotipos 12, 18 e 31. São altamente oncogênicos para roedores, representando cerca de 0,5% dos isolados. Frequentemente fazem infecção assintomática, e são comumente detectados em fezes. (KAJON, 1995). O sorotipo 31 tem sido isolado em pacientes com doença gastrointestinal e é um agente potencialmente importante nas enterites infantis. (KRADJEN, 1990).

**Subgênero B** divide-se em dois grupos, com base no grau de homologia do ADN : B1 (3, 7, 16 e 21) e B2 (11, 14, 34 e 35). (WADELL, HAMMARSKJÖLD, WINBERG et al, 1980). O primeiro está associado a infecções respiratórias e conjuntivite. O segundo compreende aproximadamente 1,0% dos isolados. (KAJON, 1995). O Ad14 está envolvido nas infecções respiratórias de recrutas militares. (VAN DER VEEN e KOK, 1957). Os demais membros, 11, 34 e 35, estão mais envolvidos com infecção de tracto urinário. (NUMAZAKI et al., 1973; MUFSON e BELSHE, 1976). Também têm sido isolados em pacientes imunossuprimidos, transplantados (SHIELDS, HACKMAN FIFE et al., 1985) ou com Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida (SIDA). (HIERHOLZER, 1992).

**Subgênero C** é composto pelos sorotipos 1, 2, 5 e 6, que constituem mais da metade de todos os isolados no mundo. Podem causar infecções latentes de tecido linfóide e serem eliminados nas fezes, por períodos prolongados. As infecções geralmente ocorrem na infância, com comprometimento do tracto respiratório. (KAJON, 1995).

**Subgênero D** contém 29 sorotipos estabelecidos, e os dois candidatos Ad48 e Ad49. (SCHNURR & DONDERO, 1993). Os sorotipos 8, 19 e 37 estão associados a surtos de ceratoconjuntivite e, os 43 a 49 foram isolados em pacientes com SIDA. (HIERHOLZER, 1992).

**Subgênero E** contém apenas o sorotipo 4, descrito em casos de conjuntivite e em surtos de infecção respiratória em crianças e adultos. (KAJON, 1995).

**Subgênero F** compreende os chamados adenovírus entéricos ou fastidiosos, sorotipos 40 e 41, que estão associados a gastroenterite infantil. (ALLARD, ALBINSSON e WADELL, 1992).

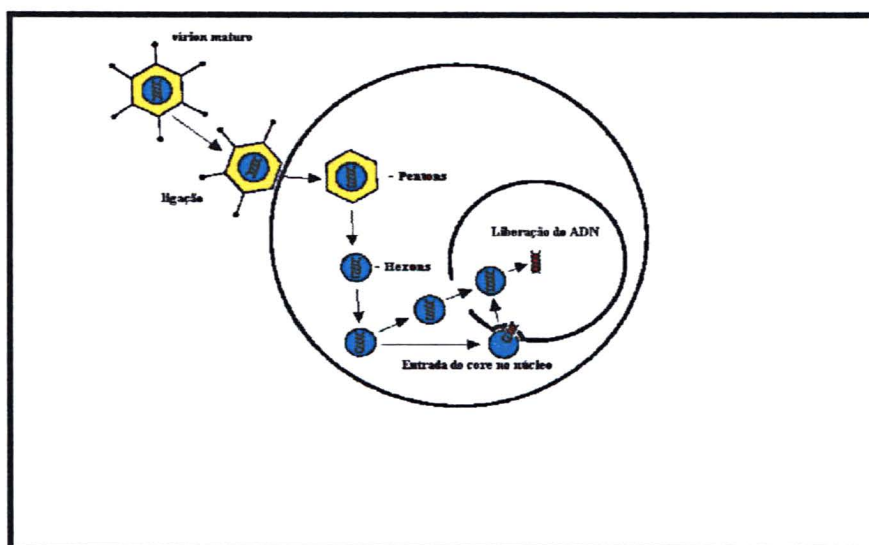
Mais recentemente, os adenovírus têm sido tipados por meio de análise de seu ADN com enzimas de restrição. Tem-se estudado, também, a sua relação genética dentro de um mesmo subgênero e entre os diferentes subgêneros. Observou-se que a distinção dos subgêneros A, B, C, D, E e F é inequívoca. No entanto, tais estudos têm confirmado uma alta variabilidade genética dentro de alguns subgêneros, como o C, apesar de terem um comportamento sorológico idêntico nos ensaios de neutralização, demonstrando que os epítopes responsáveis pela especificidade sorológica nos héxons e fibras são altamente conservados. (ADRIAN, BEST e WIGAND, 1985; ADRIAN, SASSINEK e WIGAND, 1990). Essa técnica demonstrou que o subgênero B pode ser dividido em dois grupos B1 (3, 7, 16 e 21) e B2 (11, 14, 34 e 35) e que há uma comigração entre os membros dos subgêneros A e F. Essas análises trazem informações adicionais a respeito da tipagem e dados epidemiológicos sobre as infecções por adenovírus. (FIFE, ASHLEY, SHIELDS, et al., 1985; ADRIAN, WIGAND e HIRHOLZER, 1985; ADRIAN, WADELL, HIRHOLZER et al., 1986).

A recombinação genômica dos adenovírus foi descrita demonstrando o cruzamento genético entre os Ad2 e o mutante Ad5 *ts*. (BOURSNELL e MAUTNER, 1981). Diversos isolados de pacientes com SIDA têm sido difíceis de serem tipados. Eles formam epítopes com a fibra e/ou proteínas héxons de um ou mais sorotipos distintos. Seqüenciamento do ácido nucleico dessas amostras deverão revelar se as



chamadas cepas intermediárias são decorrentes de mutação ou recombinação genética. (WHITE e FENNER, 1994).

### 1.1.3 Replicação Viral



**FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA REPLICAÇÃO VIRAL**

A replicação de todos os adenovírus é similar e ocorre no núcleo (Figura 2). O ciclo é dividido em fases precoce e tardia. Esta última inicia-se com a replicação do ADN viral e caracteriza-se pela expressão das proteínas estruturais dos vírus. Estes termos são convenientes, porém literais, pois a sua distinção funcional muitas vezes não é possível. (KAJON, 1991).

A replicação viral inicia-se com a adsorção do vírion à superfície celular, num processo lento que pode durar horas. Ocorre por ligação da fibra ao receptor celular do hospedeiro, que é desconhecido. A penetração acontece por um processo de endocitose, seguido por fusão, após o qual o capsídeo viral é removido e o core, compreendendo o genoma viral associado a suas histonas, migra para o núcleo onde ocorrem a transcrição, a replicação do ADN viral e a encapsidação. (WHITE e FENNER, 1994).

**Fase Precoce.** No núcleo celular, o genoma viral é transcrito de uma forma complexa. Os genes são codificados em vários locais da fita de ADN: "l" = reverso (*leftward strand*) e "r" = direto (*rightward strand*). Múltiplos produtos protéicos são feitos pelo gene por um processo de junção dos ácidos ribonucleicos mensageiros (ARNm) transcritos. (LI, 1988; ADENOVIRUSES, 1997). A transcrição do ARN ocorre em uma ordem temporal precisamente controlada; seis diferentes regiões de transcrição precoce foram identificadas: E1A, E1B, E2A, E2B, E3 e E4. (LI, 1988).

A primeira ARNm/proteína a ser feita, aproximadamente uma hora após a infecção, é a **E1A**, a qual ativa a regulação da transcrição de outras regiões, e também é capaz de ativar a transcrição de uma variedade de outros promotores virais e celulares. (ADENOVIRUSES, 1997).

A segunda proteína feita é a **E1B**. A E1A e a E1B contêm genes essenciais que estão envolvidos na regulação da transcrição viral precoce e que são responsáveis pela transformação celular. Essa transformação consiste em uma alteração nos parâmetros morfológicos, bioquímicos ou de crescimento da célula, que pode ou não resultar em células capazes de produzir tumores em animais experimentais. (LI, 1988; KAJON, 1991; ADENOVIRUSES, 1997).

A E1A também tem capacidade de ligar-se à proteína celular, **p105-RB**, que atua como um “antioncogene” ou “supressor tumoral”. A E1B liga-se à **p53**, um outro supressor tumoral envolvido no controle do ciclo celular. Essas observações indicam que os adenovírus, no processo de seqüestramento da maquinaria celular e alteração do meio ambiente intracelular, para favorecer a replicação viral, têm profundos efeitos sobre a função celular. Isso demonstra que a transformação é um processo acidental, e raro, na evolução do processo infeccioso.

A base da oncogênese, ou seja, a imortalização das células *in vitro*, não é clara, mas cita-se que a E1A dos adenovírus 12 altera as moléculas da classe I do complexo maior de histocompatibilidade, possivelmente permitindo ao tumor escapar da destruição pelos linfócitos T citotóxicos. (ADENOVIRUSES, 1997).

As regiões **E2A** e **E2B**, transcritas da cadeia “l”, codificam várias proteínas necessárias para a replicação do ADN, como a proteína de ligação do ADN, a proteína terminal de 55 kD, que se une covalentemente aos extremos 5' dos genoma viral, e a ADN polimerase viral. (LI, 1988; KAJON, 1991).

A região **E3**, que se transcreve a partir da cadeia “r”, é necessária para a replicação viral em cultivos celulares e codifica uma glicoproteína de 19 kD. Esta interage com a cadeia pesada do antígeno de histocompatibilidade classe I, impedindo sua glicosilação e subsequente transporte para a membrana celular. Isso leva a uma alteração no processo de reconhecimento das células infectadas pelos linfócitos T citotóxicos. (LI, 1988; WASSERMAN, AUGUST e PLOTKIN, 1988; KAJON, 1991).

A região **E4**, transcrita a partir da cadeia “l”, está envolvida com a replicação dos adenovírus em seus hóspedes naturais, na mudança de expressão

dos genes precoces para os tardios, assim como no bloqueio da síntese protéica da célula hospede. (LI, 1988; KAJON, 1991).

**Replicação do ADN.** Pelo menos três proteínas codificadas pelo vírus parecem estar envolvidas na replicação do ADN: uma proteína terminal (TP) de 55 kD, que se une covalentemente ao extremo 5' da fita e atua como um iniciador da duplicação do ADN; uma proteína de ligação ao ADN (DBP) e uma polimerase ADN dependente (ADN Pol). Adicionalmente, muitas proteínas celulares do núcleo também participam na replicação do genoma (ex. fator nuclear I, fator nuclear II, topoisomerase I. (LI, 1988; ADENOVIRUSES, 1997).

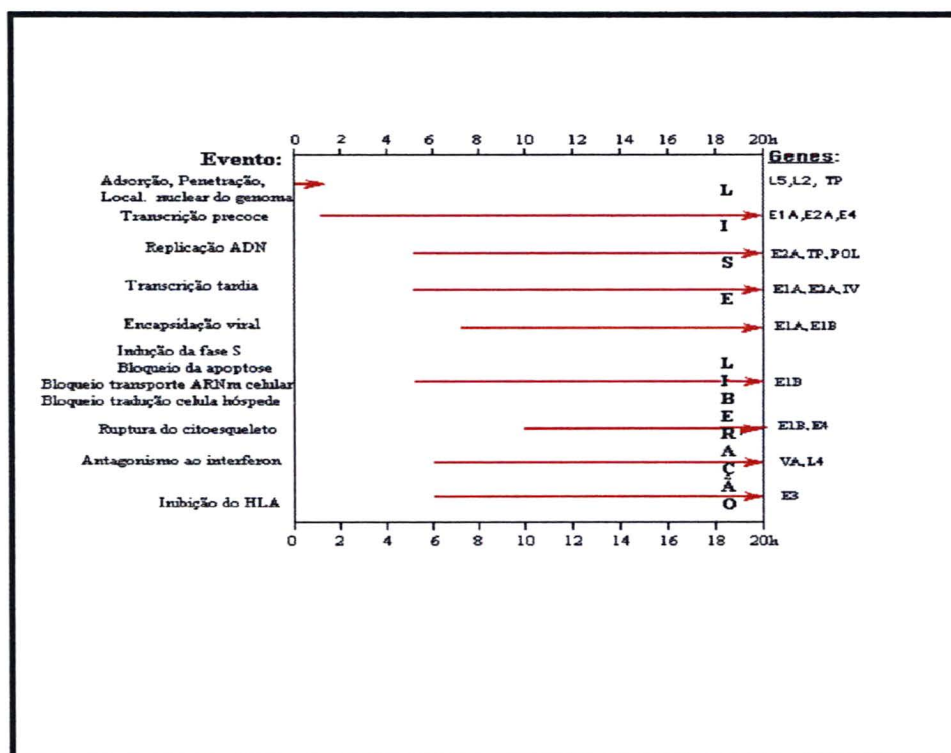
**Fase Tardia** Logo após começar a replicação do ADN, inicia-se a transcrição dos ARN tardios, a partir de transcritos primários da cadeia "I". Estes são processados, codificando, no citoplasma, todas as proteínas estruturais dos vírus, com exceção dos polipeptídeos IX e IVa2. (LI, 1988; KAJON, 1991).

**Encapsidação e Maturação.** A encapsidação inicia-se no citoplasma e se completa no núcleo. Em uma fase inicial, os monômeros individuais formam os capsômeros, héxons e pêntons. No núcleo, esses capsídeos imaturos envolvem o core, que consiste no genoma ADN e proteínas. Apesar da síntese de proteínas macromoleculares cessar cedo na infecção, as células infectadas mantêm-se intactas e levam a uma desestruturação do citoesqueleto, demonstrada pela alteração da morfologia celular, que se tornam arredondadas. Partículas virais acumulam-se no núcleo e são visíveis ao microscópio como cristais eosinofílicos, denominados de corpos de inclusão. Estes parecem ser a base das infecções latentes. A reativação ocorre pela lise acidental das células infectadas, que libera as partículas virais do núcleo, levando efetivamente a uma reinfeção. Mais

propriamente, esse tipo de mecanismo de persistência é conhecido como infecção “oculta”, ao contrário de “latente”. (ADENOVIRUSES, 1997).

Para os sorotipos de crescimento mais rápido, em cada célula infectada, formam-se em torno de  $10^5$  partículas virais após 30 horas do início da infecção. (LI, 1988; KAJON, 1991). Observa-se também uma síntese excessiva de proteína e ADN viral que não são incorporados ao vírion. Logo ao final do ciclo lítico, a célula infectada tem um aumento de duas vezes no conteúdo total de proteína e ADN. (GREEN e DAESCH, 1961).

A Figura 3 demonstra os eventos que ocorrem durante o processo de replicação viral, correlacionando com os diferentes genes envolvidos.



**FIGURA 3 - REPLICAÇÃO DO ADENOVÍRUS: EVENTOS E GENES ENVOLVIDOS**

#### 1.1.4 Patogênese e Imunidade

São descritos três tipos de interações entre os adenovírus e as células. A primeira, denominada **infecção lítica**, ocorre quando há o ciclo replicativo inteiro em células epiteliais, com a produção de uma grande quantidade de novos vírus, resultando em uma inibição nos processos de replicação do ADN e síntese celular, que é incompatível com a sobrevivência da célula. Esta célula, denominada de *smudge cell* (célula borrada) apresenta algumas alterações morfológicas características, como núcleo aumentado, inclusões anfólicas envoltas por um fino citoplasma. (HORWITZ, 1996).

A segunda interação é a **infecção latente ou crônica**. Usualmente envolve as células linfóides, como por exemplo as amígdalas, e seu mecanismo é desconhecido. Nesse caso, apenas pequeno número de vírus são liberados, e a morte celular é suplantada pela multiplicação celular.

A terceira interação é a **transformação oncogênica**, na qual apenas os passos iniciais da replicação ocorrem. O ADN viral aparentemente integra-se e replica-se com o celular, sem produzir vírion infeccioso.

Nesses três tipos de infecção, são produzidas proteínas virais específicas (antígenos T), que podem ser detectadas por reação de fixação de complemento ou por imunofluorescência de células humanas infectadas. (BAUM, 1997). Resposta similar à transformação não tem sido reconhecida em infecções agudas em humanos, entretanto o tecido linfático é freqüentemente hipertrofiado e com centros germinativos ativos. (HORWITZ, 1996).

Observa-se que a proteína da base do pênton apresenta uma atividade tóxica responsável pelo desprendimento da monocamada celular em cultivo, e também que a cápside é capaz de exercer um efeito direto sobre a bicamada lipídica do endossoma. Isso provoca a liberação de seu conteúdo no citossol. (KAJON, 1991). Ainda não é conclusiva a importância do pênton em doenças humanas, porém ele tem sido encontrado no sangue em vários casos de doença fatal de pneumonia por adenovírus. Produção viral de toxinas é incomum, mas o pênton parece ser uma exceção a esse ponto. (HORWITZ, 1996; BAUM, 1997).

Há uma marcante diferença de tropismo entre os membros dos seis subgêneros, provavelmente decorrente da afinidade diferencial existente nas fibras dos adenovírus pelos distintos componentes da parede celular. (HORWITZ, 1996).

Estudos *in vitro* têm demonstrado que várias proteínas produzidas na fase precoce da replicação dos adenovírus atuam como moduladores da resposta imune, especificamente por interferirem com a expressão dos antígenos classe I do complexo maior de histocompatibilidade, os quais são necessários no reconhecimento da célula infectada pelos linfócitos T citotóxicos. Durante a infecção viral, o transporte dos antígenos classe I é inibido, e a quantidade de moléculas expressas na membrana citoplasmática é gradualmente diminuída. Esse pode ser um fator importante no estabelecimento da persistência e latência viral. (FLOMENBERG, CHEN e HORWITZ, 1987). Observou-se também que há um maior bloqueio do antígeno na molécula HLA-A2 do que na HLA-B7, sugerindo-se que a patogenicidade do vírus pode ser dependente do tipo de HLA do indivíduo infectado. (SEVERINSSON, MARTENS e PETERSON, 1986).

Após sete dias do início da infecção, surgem os anticorpos neutralizantes, inibidores da hemaglutinação e fixadores de complemento, que chegam a um pico

em torno da segunda ou terceira semana. Simultaneamente, imunoglobulinas A e G surgem nas secreções nasais. (KAJON, 1991). Ao contrário das infecções por outros vírus respiratórios, as infecções por adenovírus levam a imunidade duradoura para a reinfecção com o mesmo sorotipo, possivelmente devido ao extenso envolvimento das células linfóides do trato intestinal e linfonodos regionais. Os anticorpos maternos protegem o recém-nato contra infecções respiratórias por esses agentes até o sexto mês de idade. (KAJON, 1991; WHITE e FENNER, 1994).

### **1.1.5 Aspectos Epidemiológicos**

Os adenovírus são agentes cosmopolitas e acometem tanto humanos como animais. Com algumas exceções, sorotipos humanos geralmente não acometem animais e os sorotipos animais apenas causam doença dentro da espécie de origem.

A transmissão da infecção e a doença por adenovírus podem ocorrer de forma esporádica ou epidêmica. Como muitas das doenças relacionadas com esses vírus não são patognomônicas, uma melhor elucidação desse agente apenas foi conseguida após estudos epidemiológicos prospectivos, que monitorizavam famílias, orfanatos e um grande número de crianças. Esses estudos demonstraram que há um alto grau de recorrência de eliminação do vírus em fezes e que há um grande número de infecções assintomáticas. A maior parte das infecções em crianças ocorrem por transmissão fecal/oral, embora exista a transmissão pela via respiratória. O estado de portador prolongado em intestino torna as fezes como a



fonte mais comum de infecções. A importância epidemiológica da longa latência em tecido de adenóides é desconhecida. (HORWITZ, 1996).

Inquéritos sorológicos em várias populações demonstram presença de anticorpos para os tipos mais comuns 1, 2 e 5, em 40,0% a 60,0% das crianças. É incomum a presença de anticorpos para os tipos 3, 4 e 7 nessa população, justificando a maior frequência de infecções de adultos por esses agentes. (HORWITZ, 1996). Algumas formas epidêmicas de infecções por esses vírus têm sido descritas. Entre elas, estão as infecções respiratórias agudas que acometem exclusivamente recrutas militares jovens, sem características de sazonalidade e sem comprometer outros grupos sociais. Parecem estar relacionadas com outros fatores de risco, como aglomeração nos dormitórios e exposição à fadiga decorrente de exercícios extenuantes. (BERGE, ENGLAND, MAURIS et al., 1955).

Posteriormente, identificou-se, em muitos desses surtos, os sorotipos 4 e 7. Eles acometem 80,0% dos recrutas, com 20,0 a 40,0% de hospitalização e disseminam-se por via respiratória. (HORWITZ, 1996).

Infecções por esses agentes também podem ter disseminação nosocomial, como foi demonstrado pelo isolamento de adenovírus entéricos em bebês hospitalizados em um mesmo ambiente, sugerindo a possibilidade de disseminação hospitalar. (KRAJDEN, BROWN, PETRASEK et al., 1990).

### **1.1.6 Aspectos Clínicos**

Os adenovírus têm sido isolados de praticamente todos os órgãos e sistemas humanos e estão associados a muitas síndromes clínicas. Podem replicar em diversos sítios corporais, como trato respiratório, olhos, trato gastrointestinal, bexiga

urinária e fígado. Com menor freqüência, causam doenças em outros órgãos, como pâncreas ou sistema nervoso central. Neste, por exemplo, a meningoencefalite pós-infecção de trato respiratório. Na Tabela 3 estão relacionados os 49 adenovírus humanos já descritos. (HIERHOLZER, 1995; HORWITZ, 1996).

**TABELA 3 - CÉPAS PROTÓTIPOS DE ADENOVÍRUS**

TIPO	CEPA	FONTE	DIAGNÓSTICO	REFERÊNCIA
1	Ad 71	adenóide	tonsilas e adenóide hipertrofiadas	HUEBNER et al., 1954
2	Ad 6	adenóide	tonsilas e adenóide hipertrofiadas	HUEBNER et al., 1954
3	G.B.	secreção nasal	resfriado comum	HUEBNER et al., 1954
4	RI-67	secreção de garganta	pneumonia atípica primária	HILLEMANN & WERNER, 1954
5	Ad 75	adenóide	tonsilas e adenóide hipertrofiadas	HUEBNER et al., 1954
6	Ton. 99	tonsilas	tonsilas e adenóide hipertrofiadas	HUEBNER et al., 1954
7	Gomen	secreção de garganta	Faringite	BERGE et al., 1955
8	Trim	swab de olho	ceratoconjuntivite epidêmica	JAWETZ et al., 1955
9	Hicks	fezes	artrite reumatóide ?	KIBRICK et al., 1957
10	J.J.	swab de olho	Conjuntivite	ROWE et al., 1956
11	Slobitski	fezes	pólio (também isolado pólio 1)	KIBRICK et al., 1957
12	Huie	fezes	pólio não paraltico ?	KIBRICK et al., 1957
13	A.A.	fezes	criança assintomática	ROWE et al., 1958
14	deWit	swab de garganta	doença respiratória aguda	VAN DER VEEN & KOK, 1957
15	Ch.38	swab de olho	conjuntivite (tracoma inicial ?)	MURRAY et al., 1957
16	Ch.79	swab de olho	conjuntivite (tracoma inicial ?)	MURRAY et al., 1957
17	Ch.22	swab de olho	conjuntivite (tracoma inicial ?)	MURRAY et al., 1957
18	D.C.	swab anal	doença de Niemann-Pick ?	ROWE et al., 1958
19	587	raspado conjuntival	Tracoma	BELL et al., 1959
20	931	raspado conjuntival	Conjuntivite	BELL et al., 1959
21	1645	raspado conjuntival	Tracoma	BELL et al., 1959
22	2711	raspado conjuntival	Tracoma	BELL et al., 1959
23	2732	raspado conjuntival	Tracoma	BELL et al., 1960
24	3153	raspado conjuntival	Tracoma	BELL et al., 1960
25	BP-1	swab anal	não associado	ROSEN et al., 1961
26	BP-2	swab anal	não associado	ROSEN et al., 1961
27	BP-4	swab anal	não associado	ROSEN et al., 1961
28	BP-5	swab anal	não associado	ROSEN et al., 1961
29	BP-6	swab anal	não associado	ROSEN et al., 1962
30	BP-7	swab anal	não associado	ROSEN et al., 1962
31	1315/63	fezes	criança assintomática	PEREIRA et al., 1965
32	H.H.	swab anal	criança assintomática	BLACKLOW et al., 1969
33	D.J.	swab anal	criança assintomática	BLACKLOW et al., 1969
34	Compton	urina	febre, receptor de transplante renal	HIERHOLTZER et al., 1975
35	Holden	pulmão, rins	pneumonia, receptor de transplante renal	de STALDER et al., 1977
36	275	fezes	Enterite	WIGAND et al., 1980
37	GW	swab de olho	ceratoconjuntivite epidêmica	DE JONG et al., 1981
38	LJ	fezes	broncopneumonia (VSR por sorologia)	DE JONG et al., 1984
39	D335	fezes	doença respiratória grave	HIERHOLTZER et al., 1982
40	Dugan	fezes	gastroenterite infantil	DE JONG et al., 1983
41	Tak	fezes	gastroenterite infantil	DE JONG et al., 1983
42	54/82	fezes	gastroenterite infantil	WIGAND et al., 1987
43-47	-	fezes	gastroenterite infantil	HIERHOLTZER et al., 1988
48*	T85-884	fezes	pacientes com SIDA	SCHNURR & DONDERO, 1993
49*	T87-677	fezes	não descrito	SCHNURR & DONDERO, 1993

\* Foram propostos candidatos a adenovírus tipo 48-49. Ad: adenovírus. VSR: vírus sincicial respiratório.

Os adenovírus têm uma predileção por células epiteliais, multiplicam-se inicialmente na faringe, conjuntiva ou intestino delgado. Fazem um comprometimento relativamente localizado e apresentam um período de incubação de cinco a oito dias. (BAUM, 1992). As infecções subclínicas entéricas são freqüentes, ao contrário das respiratórias, que habitualmente são acompanhadas de sintomatologia.

Apesar de estarem associados a doenças respiratórias e oculares, e de serem, com freqüência, transmitidos por gotículas respiratórias ou por contato, os adenovírus provavelmente disseminam-se pela via entérica. (HORWITZ, 1996).

Estudos familiares prolongados têm demonstrado que pessoas infectadas por adenovírus eliminam grande quantidade desse agente nas fezes ( $10^{11}$  vírions/grama) num período de vários meses. Esses portadores infectam cerca de 50,0% dos susceptíveis da mesma família. Provavelmente por esse motivo, é freqüente observar-se a presença de imunidade a dois ou mais sorotipos comuns do subgênero C (1, 2 e 5) em crianças com idade inferior a dois anos. Em torno da metade dessas infecções são subclínicas, e as outras apresentam-se como faringite ou febre faringo-conjuntival. (WHITE e FENNER, 1994).

A disseminação respiratória, por gotículas ou contato, ocorre particularmente em casos chamados de sorotipos epidêmicos B e E, que causam surtos de febre faringo-conjuntival em crianças (tipos 3, 4 e 7), ou doença respiratória aguda em recrutas militares (tipos 4 e 7) no inverno e primavera. (HIERHOLZER, 1995).

As infecções oculares podem ser adquiridas por contato de mãos com secreções respiratórias, por via alimentar, ou por contato com água de piscina

contaminada (conjuntivite dos nadadores). Também tem sido crescente o índice de ceratoconjuntivite epidêmica iatrogênica, transmitida por procedimentos cirúrgicos com técnicas assépticas insuficientes, instrumental e soluções oftálmicas contaminadas. (WHITE e FENNER, 1994).

Infecções generalizadas e, ocasionalmente, morte, podem ocorrer, particularmente em pacientes imunossuprimidos e, em casos de infecções pelo sorotipo 7, o mais patogênico.

Infecções pelos tipos endêmicos 1, 2 e 5 podem ser assintomáticas e persistir em tonsilas e adenóides. São eliminados intermitentemente por anos, durante períodos de reativação que ocorrem seguindo infecções por outros agentes, como por exemplo pelo vírus do sarampo ou pela bactéria *Bordetella pertussis*. O mecanismo de persistência é desconhecido. Talvez a infecção seja contida pelos anticorpos sintetizados nesses órgãos linfóides. (HIERHOLZER, 1995).

Vírus do subgênero B, particularmente tipos 34 e 35, são freqüentemente eliminados na urina de pacientes imunossuprimidos, como os transplantados renais e os portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Muitos desses sorotipos são novos e/ou raros e alguns parecem ser geneticamente recombinantes. Os sorotipos do subgênero C caracterizam-se por prolongada latência em tecido linfóide. Também podem ser reativados em pacientes com SIDA e são incomumente descobertos no sangue. (BAUM, 1992; WHITE e FENNER, 1994).

A maioria das manifestações das infecções por adenovírus localizam-se em olhos e faringe, porém muitos casos resultam em uma extensão direta para o pulmão. Em situações de doença disseminada fatal, o vírus pode ser cultivado em sangue. Sua presença em fezes é freqüente, onde normalmente replicam mas não

causam doença. Por esse motivo, utiliza-se a via oral para a imunização. Mais recentemente, foram descritos os sorotipos 40 e 41, que são capazes de causar doença intestinal.

Adenovírus causa doença em bexiga de pessoas imunocompetentes, primariamente os pertencentes ao grupo B. Sugere-se que esse agente seja virêmico e em algum estágio da infecção atinja esse órgão. É um sorotipo encontrado com menor frequência no intestino e é mais comum em paciente masculino jovem do que feminino. (HORWITZ, 1996).

Os adenovírus do subgênero B são eliminados pela urina e os do subgênero D (19 e 37) são presumivelmente transmitidos por contato sexual, pois podem estar associados a infecções genitais. (WHITE e FENNER, 1994).

Apenas 1/3 dos sorotipos conhecidos de adenovírus humanos estão diretamente relacionados a doença. A Tabela 4 descreve as doenças mais comuns associadas a esses agentes. (HORWITZ, 1996).

Os adenovírus 1 - 8 são as espécies mais comumente encontradas (90,0% dos isolados) e relacionadas com a maioria dos casos de doenças. Cerca de 5,0% das doenças respiratórias agudas em crianças menores de 1 ano, e 1,0% das infecções de adultos têm sido causadas pelos adenovírus. Os sorotipos 40 e 41 estão envolvidos em até 10,0% das gastroenterites infantis. Os principais sorotipos envolvidos em infecções oculares são o 8, 19 e 37. Os tipos 19 e 37 podem também causar infecções genitais. (WHITE e FENNER, 1994).

**TABELA 4 - DOENÇAS CAUSADAS POR ADENOVÍRUS HUMANOS**

DOENÇA	IDADE	SOROTIPOS COMUNS*	SUBGÊNERO PRINCIPAL	FONTE DE INFECÇÃO
<b>Infecções Respiratórias</b>				
Faringite	Criança	<b>1,2,3,5,6,7</b>	B,C	Garganta
Doença Resp. Aguda	Recruta militar	<b>3,4,7,14,21</b>	B,E	Garganta
Pneumonia	Criança	<b>1,2,3,4,5,7,21</b>	B,C	Garganta
	Recruta militar	<b>4,7</b>	B,E	Garganta
<b>Infecções Oculares</b>				
Febre faringo-conjuntival	Criança	<b>1,2,3,4,6,7</b>	B,C,E	Garganta, olho
Ceratoconjuntivite epidêmica	Qualquer idade	<b>8,19,37</b>	D	Olho
<b>Infecções Genitourinárias</b>				
Cervicites, uretrites	Adulto	<b>19,37</b>	D	Secreção genital
Cistite hemorrágica	Criança	<b>11,21</b>	B	Urina
<b>Infecções entéricas</b>				
Gastroenterites	Criança	<b>31,40,41</b>	A,F	Fezes
<b>Infecções em imunocomprometidos</b>				
Encefalites, pneumonia	Qualquer idade, SIDA	<b>7,11,34,35</b>	B	Urina, pulmão
Gastroenterites	SIDA	<b>D,+ 43 e 47</b>	D	Fezes
Generalizadas	SIDA	<b>2,5</b>	C	Sangue

\*em negrito: sorotipos mais comumente encontrados.

### 1.1.6.1 Doenças Respiratórias

#### INFECÇÕES ENDÊMICAS EM CRIANÇAS

Em torno de 5,0% das infecções respiratórias agudas em crianças com menos de cinco anos são devidas ao adenovírus. Os sintomas comuns são febre, congestão nasal e coriza. Alguns pacientes podem apresentar amigdalite supurativa indistinguível das infecções estreptocócicas. Podem ser observadas também as manifestações sistêmicas de mal estar, tremores, cefaléia e mialgia. Os sorotipos habitualmente envolvidos são 1, 2, 5 e 6 do subgênero C, e, ocasionalmente, tipo 3 do subgênero B. O quadro clínico é semelhante às infecções causadas por outros vírus respiratórios. (HIERHOLZER, 1995). Se, associado a esses sintomas, ocorrer

o comprometimento conjuntival, a doença é designada de febre faringo-conjuntival. O adenovírus mais comumente envolvido é o tipo 3, mas os tipos 7 e 14 também têm sido isolados. (HORWITZ, 1996). Nos casos mais severos, podem evoluir para pneumonia.

Os adenovírus são responsáveis por aproximadamente 10,0% das pneumonias infantis. A maioria tem evolução benigna, porém algumas epidemias de Ad7 têm apresentado uma alta mortalidade. (MORAES, 1992; KAJON e WADELL, 1994; HORWITZ, 1996).

Alguns pacientes, anos após a infecção primária, podem apresentar seqüelas como bronquiectasias. (BECROFT, 1971).

### **DOENÇA RESPIRATÓRIA AGUDA DE RECRUTAS MILITARES**

Em muitos aspectos é semelhante à infecção respiratória da criança, habitualmente causada pelos Ad4, Ad7 e, ocasionalmente, pelo Ad3.

Ocorre com frequência em recrutas militares jovens expostos a situações de fadiga e aglomeração, e é incomum em adultos saudáveis. Alguns casos têm evoluído para pneumonite. (HIERHOLZER, 1995; HORWITZ, 1996).

#### **1.1.6.2 Síndrome *Pertussislike***

A descrição do isolamento de adenovírus em órgãos de uma criança com doença semelhante à coqueluche tem levado a especulações de que talvez muitos dos casos dessa doença possam estar relacionados com infecções por esse vírus,

nos quais também se observa a presença de linfocitose. No entanto, em estudos controlados não houve evidência de que eles, sozinhos, sejam responsáveis pela síndrome. Acredita-se que muitos dos casos de isolamento de adenovírus em pacientes com coqueluche sejam decorrentes de reativação do vírus latente em tecido de adenóide. (HORWITZ, 1996).

### 1.1.6.3 Infecções Oculares

Conjuntivite folicular aguda pode ocorrer isoladamente ou associada a sintomas respiratórios ou faringeal. É uma doença leve, autolimitada, com envolvimento bulbar e conjuntival, afeta ambos os olhos e é acompanhada de linfonodomegalia pré-auricular. Pode acometer várias pessoas de uma mesma família e ser transmitida por água (conjuntivite dos nadadores). Os sorotipos mais comumente envolvidos nos surtos são os Ad3 e Ad7. (HORWITZ, 1996).

Outra forma altamente contagiosa e mais grave de acometimento ocular é a ceratoconjuntivite epidêmica, que se apresenta com um comprometimento extenso, edema palpebral, dor, lacrimejamento e fotofobia. Apresenta um infiltrado subepitelial corneal, geralmente unilateral, e associada a sintomas constitucionais. Pode evoluir com opacidade de córnea de longa duração. O primeiro agente descrito nesses casos foi o Ad8, porém em outros surtos têm sido descritos os sorotipos 19 e 37. (HIERHOLZER, 1995).



#### 1.1.6.4 Cistite Hemorrágica Aguda

Em 1968, NUMAZAKI, SHIGETA, KUMASAKA et al. descreveram o isolamento de Ad11 em nove de 10 pacientes que apresentavam cistite hemorrágica aguda, sem acompanhamento de grupo-controle. Relataram também um aumento nos títulos dos anticorpos neutralizantes em todos os casos examinados. Com esses resultados, propuseram que o adenovírus poderia ser a causa da cistite hemorrágica em crianças.

Esses achados foram contestados em publicações posteriores, relatando que essa doença poderia ter múltiplas causas. (MUFSON, ZOLLAR, MANKAD et al., 1971). Após acompanhamento de um grupo maior de pacientes, no entanto, caracterizou-se que a cistite hemorrágica aguda é a primeira doença de bexiga associada a uma infecção viral descrita. (MUFSON e BELSHE, 1976).

Em 1973, NUMAZAKI et al. descreveram 28 casos de cistite hemorrágica aguda. Desses, foram diagnosticados adenovírus tipo 11 em 20 pacientes (71,0%), por exames virológicos ou por conversão sorológica. Nesse estudo, relatou-se que essa é uma doença predominante em crianças entre cinco e 14 anos de idade, do sexo masculino (3,4:1), e que o isolamento apenas foi possível quando se utilizaram amostras de urina frescas. Nas amostras congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , o isolamento foi sempre negativo, o que não foi possível explicar, pois sabe-se que os adenovírus são muito estáveis nessa temperatura.

Em 1976, MUFSON e BELSHE publicaram os resultados do acompanhamento de 67 pacientes com cistite hemorrágica aguda. Adenovírus tipos 11 e 21 foram isolados em 23,0% dos casos, também com maior frequência em

pacientes masculinos (2,3:1), e até 14 anos de idade. Não foi observada sazonalidade.

A cistite hemorrágica aguda por adenovírus caracteriza-se pela presença de hematúria grave, associada a disúria e polaciúria. É uma doença autolimitada, de evolução benigna, duração variável (em torno de 14 dias) e acompanhada por excreção prolongada do vírus na urina. (DEVRIES e FREIHA, 1990; HORWITZ, 1996). O mecanismo de penetração desse agente na bexiga é desconhecido. A disseminação por via retrógrada não é aparente, pela predominância observada em pacientes masculinos. É provável que ocorra por viremia e o comprometimento da bexiga seja via filtração renal, ou pelo suprimento sangüíneo vesicular. Contudo, não foi detectado vírus nos casos de cistite hemorrágica em que se tentou o isolamento do sangue. (MUFSON e BELSHE, 1976).

#### 1.1.6.5 Meningoencefalite

O isolamento de adenovírus em líquido cefalorraquiano ou cérebro é raro, no entanto, alguns relatos têm demonstrado a sua presença nesses locais, principalmente em pacientes imunossuprimidos. Em alguns casos de meningoencefalite, também tem se considerado, para a identificação do agente, a presença do vírus em um sítio extraneural, ou o aumento de títulos de anticorpos, especialmente associado a epidemias de pneumonias por Ad7 em crianças. (HORWITZ, 1996).

Com as novas técnicas de biologia molecular, têm se realizado alguns estudos de pesquisa de adenovírus em líquido cefalorraquiano, por reação de polimerização em cadeia (PCR), que têm demonstrado uma alta positividade. Em um estudo realizado por TORFASON, GUÔNADÓTTIR, ELEFSEN et al. em 1998, utilizou-se a PCR na investigação de 298 espécimens de líquido cefalorraquiano de pacientes com meningite. Em 16,0% dos casos detectou-se adenovírus, 13,0% enterovírus e 2,9% vírus herpes simplex.

#### 1.1.6.6 Doença Gastrointestinal

A relação entre os adenovírus e a doença diarréica tem sido alvo de estudo desde os primeiros relatos desse agente. Como os adenovírus replicam-se eficientemente no intestino e são excretados nas fezes, sugeriu-se que fossem fortes candidatos como causadores da diarréia ou outras infecções que os pacientes apresentavam. (KIBRICK, MELENDEZ e ENDERS, 1957). Contudo, muitos estudos epidemiológicos confirmaram a presença desses agentes, tanto nos pacientes com diarréia, como nos grupos controles, inclusive com o desenvolvimento de anticorpos em ambos, demonstrando casos de infecções assintomáticas. (HORWITZ, 1996). Posteriormente, esses vírus passaram a ser novamente estudados com os relatos de observação de adenovírus não cultiváveis, visualizados por microscopia eletrônica em fezes de pacientes com diarréia.

Dois tipos de adenovírus foram então descritos, caracterizando-se por serem defectivos, pois apenas crescem em cultivos com sistema de células

transformadas como HEK-293, ou células conjuntivais de Chang. Esses agentes foram chamados de “entéricos” ou “não-cultiváveis”, e são conhecidos como tipos 40 e 41. (GARY, HIERHOLZER e BLACK, 1979; DE JONG, WIGAND, KIDD et al., 1983; WIGAND, BAUMEISTER, MAASS et al., 1983).

Esses vírus caracterizam-se por provocar um quadro de diarréia aquosa, associada a febre, que pode durar de 1 a 2 semanas. São mais comuns em crianças menores de quatro anos de idade, podem estar associados a sintomas respiratórios e envolvidos em surtos hospitalares. (HORWITZ, 1996; BAUM, 1997).

Estudos mais recentes de enterites por adenovírus têm detectado, com menor freqüência que os anteriores, o sorotipo 31, que provoca uma síndrome clínica indistinguível da causada pelos Ad40 e Ad41, também está associado a surtos hospitalares. (BROWN, 1990; KRADJEN et al. 1990).

Novos métodos laboratoriais em estudo, como a PCR, capazes de detectar a presença específica do agente infeccioso, mesmo em pequenas quantidades, provavelmente demonstrarão uma incidência maior desses sorotipos nos casos de doença diarréica. (ALLARD et al., 1992).

### **1.1.7 Diagnóstico Laboratorial**

Dependendo da apresentação clínica, o espécimen apropriado para o diagnóstico pode ser constituído por fezes, raspado faringeal, aspirado nasofaríngeo, aspirado transtraqueal, lavado broncoalveolar, raspado conjuntival ou lágrimas, secreções genitais, urina e tecidos de biópsia ou autópsia. (WHITE e

FENNER, 1994). O diagnóstico laboratorial pode ser esquematicamente dividido em três fases: detecção direta em espécimens clínicos, isolamento viral, e pesquisa de anticorpos. (HIERHOLZER, 1995).

Até a década anterior, o diagnóstico das infecções virais baseava-se em dados clínicos ou achados histopatológicos. O desenvolvimento de novas metodologias permitiu uma rápida e específica definição etiológica, diminuindo assim as possibilidades de falhas diagnósticas, como citado por LANDRY, FONG, NEDDERMANN et al. em 1987.

#### 1.1.7.1 Detecção Direta em Espécimen Clínico

Diversos são os métodos empregados para detecção de antígenos de adenovírus em amostras clínicas. Alguns são procedimentos já estabelecidos, porém pesquisas ainda são realizadas nessa área, devido à necessidade de um método rápido e acurado para diagnóstico da infecção viral.

A microscopia eletrônica (ME), imunomicroscopia eletrônica (IME) e imunofluorescência indireta (IFI) são os principais métodos de diagnóstico rápido de adenovírus, em espécimens clínicos. (HIERHOLZER, 1995).

A ME tem sido descrita como metodologia diagnóstica, utilizada para a detecção de partículas virais em tecidos obtidos de biópsias ou necrópsia e, também, em amostras de aspirado de nasofaringe, fezes e urina. A sensibilidade do método é aumentada pela IME, em que a amostra é previamente tratada com anti-soros hiperimunes, e os agregados de partículas são visualizados pela morfologia

viral e pela reação específica com o soro utilizado. Este último tem sido muito empregado no diagnóstico de gastroenterite induzida por adenovírus, que se caracterizam por serem de crescimento lento e necessitarem de sistema de células diferenciados para o isolamento. (DE JONG et al., 1983).

A IFI é um método de grande aceitação. Foi a primeira técnica de diagnóstico rápido de infecção respiratória causada por vírus. É sensível e específica para a detecção de antígeno viral direto em espécimens clínicos por imunocitoquímica, porém, estudos comparando com o isolamento viral têm demonstrado uma sensibilidade em torno de 60,0%, dependendo da qualidade da amostra coletada, tornando-se mais sensível quanto maior for o número de células na amostra. (LEHTOMAKI, JULKUNEN, SANDELIN ET AL., 1986). A mesma técnica tem sido empregada para pesquisa de antígeno em materiais de biópsias ou autópsias parafinados por imunohistoquímica, confirmando a infecção viral nos achados histopatológicos. Isso não seria possível pelo isolamento, devido à inativação viral decorrente do processo de tratamento dos tecidos. (CHANDLER e GORELKIN, 1983).

Um método altamente sensível, que é uma extensão semi-automatizada da IFI, é o fluoroimunoensaio (FIA), no qual a fluorescência específica da amostra é medida por um fluorômetro, após passado um tempo para que toda a autofluorescência desapareça. Parece ser uma técnica eficiente, flexível e específica para a detecção de antígenos virais direto de espécimens clínicos. Comparando esse método com as técnicas de ensaio imunoenzimático (EIE) em amostras já submetidas a cultivo celular, observou-se que houve uma correlação em torno de 90,0% dos resultados do FIA e cultura para os aspirados de nasofaringe, semelhante ao EIE, e de 100,0% nos exames de amostras fecais, superior à

correlação observada com o EIE. Estudos têm demonstrado ser um dos mais sensíveis ensaios, porém tem como inconvenientes a necessidade de um alto investimento em equipamento e reagentes para a sua implantação. É aplicável apenas quando utilizado para análise de grande número de amostras. (HIERHOLZER, JOHANSSON, ANDERSON et al., 1987; BROWN, SHAMI, ZYWULKO et al., 1990).

A contraimunoeletroforese (CIE) é um teste utilizado para detectar antígenos de adenovírus em materiais clínicos e amostras de meio ambiente. Baseia-se na migração de anticorpos em direção ao antígeno, colocado em poços opostos através de um gel de agarose, quando uma corrente elétrica é aplicada. A técnica pode ser gênero-específica, se um anticorpo anti-héxon é aplicado, ou tipo-específica, se soro anti-pênton é usado. (HIERHOLZER e BARME, 1974). Tem sido aplicada para detectar adenovírus em águas de piscinas, espécimens de soros, colírios utilizados em consultórios de oftalmologia e em amostras de fezes. (HIERHOLZER, 1995).

Teste de aglutinação com partículas de látex ou aglutinação em látex (AL) marcadas com anti-soro tipo específico também tem sido útil para a detecção rápida de adenovírus em amostras de fezes, pela facilidade de execução e sensibilidade. É um dos métodos mais utilizados nos laboratórios de rotina clínica. (SANEKATA, TANIGUCHI, DEMURA et al., 1990).

Ensaio imunoenzimático (EIE) é o teste de escolha para a pesquisa de muitos antígenos virais. Comparando com outras técnicas de diagnóstico rápido, esse método tem se mostrado com algumas vantagens, pois a imunofluorescência é um exame que consome tempo, não é automatizado, deve ser realizado para pequenos números de amostras e necessita de um técnico experiente para a leitura.

O radioimunoensaio pode ser utilizado para análise em grande escala, porém tem os inconvenientes da meia-vida curta de seus reagentes, é muito caro e o descarte dos radioisótopos pode ser problemático. Sobrepondo-se a essas dificuldades, as técnicas enzimáticas têm encontrado a sua aplicabilidade no diagnóstico laboratorial, tanto para a detecção de anticorpos, como para a de antígenos. (VOLLER, BARTLETT e BIDWELL, 1978).

Vários formatos de EIE têm sido descritos. Inicialmente, foi o EIE direto, no qual um soro anti-adenovírus é adsorvido em placa, e a amostra clínica detectada por um anticorpo policlonal anti-adenovírus, conjugado com uma enzima. Esse teste, aplicado comparativamente à cultura, demonstrou uma alta especificidade, porém uma sensibilidade ainda baixa, em torno de 72,0%. (WIGAND et al., 1983).

Outro teste é o EIE indireto, no qual um anticorpo policlonal de captura é adsorvido à placa, como fase sólida. Antígenos ou espécimens e um segundo anticorpo policlonal (detector) de uma espécie animal diferente são seqüencialmente adicionados, seguidos de um anticorpo anti-espécie conjugado com enzima, e do respectivo substrato com desenvolvimento de cor. Esse teste tem sido utilizado para a pesquisa de antígeno viral em secreção de nasofaringe, porém sua maior aplicação é para o diagnóstico de adenovírus entérico, em casos de gastroenterites infantis. Em secreção de nasofaringe, a sensibilidade do método, como na IFI, tem se mostrado inferior ao isolamento, provavelmente por necessitar de uma quantidade maior de células infectadas, o que nem sempre é possível nesse tipo de amostra. (LEHTOMAKI et al., 1986).

GRANDIEN, PETTERSSON, GARDNER et al. (1985), ao comparar as técnicas de IFI e EIE de diagnóstico rápido para infecção respiratória aguda viral, observaram que o EIE, apesar de ser um teste satisfatório, foi menos sensível que a



IFI, talvez devido aos processos de diluição da amostra que são realizados naquele teste.

Atualmente tem sido utilizado, na investigação de gastroenterites virais, um ensaio imunoenzimático combinado para rotavírus e adenovírus (EIARA), tipo duplo sanduíche. Nele, as amostras testadas são colocadas em placas marcadas com anticorpo anti-adenovírus ou anti-rotavírus produzido em cabra. A presença dos antígenos é detectada por um anti-soro misto de cobaio para os mesmos vírus, seguido pela adição de IgG anti-cobaio conjugado com peroxidase, e revelado pelo substrato ortofenileno-diamino. Comparando os resultados deste com outros EIEs, a IME e a eletroforese em gel de poliacrilamida, demonstrou-se que o EIARA é aceitavelmente sensível e específico para a detecção de rotavírus. Para a detecção de adenovírus, o teste foi altamente específico, porém sua sensibilidade foi inferior à IME, quando analisadas amostras mantidas a -20°C por mais de dois anos. A vantagem do ensaio está em reduzir o trabalho técnico, pois, com um exame, dois vírus são investigados. Também por incorporar um controle interno, o que reduz a necessidade de testes confirmatórios. (PEREIRA, AZEREDO, LEITE et al., 1985).

A sensibilidade dos EIEs tem sido maior pelo uso de anticorpos monoclonais nas fases de captura e de soro detector, que aumentam a especificidade e diminuem a coloração inespecífica de fundo. Estudos comparando os resultados desse teste com cultura de células têm demonstrado uma sensibilidade e especificidade de 95,0%. (SINGH-NAZ, ROGRIGUEZ, KIDD et al., 1988). Também recentemente os EIEs têm usado um substrato menos tóxico e mais sensível para a peroxidase, o 3,3',5,5' - tetrametil-benzidina (TMB), ao qual se adiciona peróxido de hidrogênio. O teste é incubado por 20 minutos em temperatura

ambiente, e detectada, posteriormente, a intensidade de cor. (HIERHOLZER et al., 1987).

Radioimunoensaio (RIA) tem mesma sensibilidade e facilidade de execução do EIE, porém com o inconveniente do uso de radioisótopos. (SARKKINEN, HALONEN, ARSTILA et al., 1981). Atualmente, tem sido utilizado para avaliar a sensibilidade e especificidade dos anticorpos monoclonais de adenovírus produzidos para testes diagnósticos. (CEPKO, WHETSTONE e SHARP, 1983).

A análise por restrição enzimática foi uma técnica introduzida em 1981, utilizada para a detecção direta do adenovírus entérico. Consiste na extração do ADN viral, que é clivado por uma endonuclease de restrição. Os fragmentos são separados por eletroforese em placa de gel horizontal; a presença de padrões de peso molecular típicos de adenovírus 40 e 41 são considerados positivos para esse vírus. (SINGH-NAZ et al., 1988). Atualmente, essa metodologia de análise de genoma tem sido aplicada, não apenas para a detecção do antígeno viral, mas principalmente nos estudos epidemiológicos, do ponto de vista molecular, de surtos de infecções por adenovírus. (BROWN, 1990; KRADJEN et al., 1990). Também, na caracterização da variabilidade genética existentes intergrupos e intertipos desse agente. (WADELL et al., 1980; WADELL, 1984; WADELL, COONEY, LINHARES et al., 1985; ADRIAN et al., 1985b; HAMMOND, MAUTHE e JOSHUA, 1985; ADRIAN et al., 1986; WEBB, SHIELDS e FIFE, 1987; LI, 1988; ADRIAN et al., 1990; LI, HAMBRAEUS e WADELL, 1991; NIEL, MORAES, MISTCHENKO et al., 1991; MORAES, 1992; KAJON, SUÁREZ, AVENDAÑO et al., 1993; KAJON e WADELL, 1994).

A tecnologia de sondas de ADN para a detecção direta de adenovírus tem avançado significativamente desde a sua introdução em 1985. (HIERHOLZER, 1995).

A hibridização *in situ* consiste na detecção do ácido nucleico viral diretamente na amostra clínica, por meio de sondas preparadas a partir de ADN de um adenovírus purificado, ou de um plasmídeo recombinante contendo fragmentos do ADN viral. Essas sondas podem ser marcadas por radioisótopos, raramente usados ou, mais comumente, são biotinizadas, o que facilita o seu emprego nos laboratórios clínicos. Essa metodologia correlaciona-se bem com os resultados de IFI, detecta todos os sorotipos do vírus igualmente, e requer a mesma quantidade de tempo para realização. É aplicável a todos os espécimens e tem maior sensibilidade que as técnicas de hibridização *dot-blot*. (GOMES, NASCIMENTO, SIQUEIRA et al., 1985).

A técnica de hibridização em *spot* ou *dot-blot* também pode ser utilizada para a detecção gênero-específico, usando-se uma sonda complementar ao gene que codifica o antígeno héxon, comum a todos os adenovírus, ou para a detecção subgrupo-específico, usando-se sondas da porção do genoma, comum a apenas alguns subtipos. Estudos comparativos dessa técnica com o método por análise com endonucleases demonstraram uma sensibilidade desse sistema de 91,0% e especificidade de 71,0%. (TAKIFF, SELDLIN, KRAUSE et al., 1985). É um teste com reprodutibilidade, porém menos sensível que o RIA (HIERHOLZER, 1995) e com diversas dificuldades técnicas para uso em espécimen clínico direto, como secreção de nasofaringe. (GOMES et al., 1985).

O mais recente teste de detecção direta de adenovírus é a amplificação do ADN por PCR, que consiste em um método de amplificação enzimática de uma

seqüência alvo específica do ácido nucleico. Poucas cópias deste podem ser amplificadas para um nível detectável por eletroforese em gel.

Este teste pode ser grupo-específico, capaz de detectar qualquer adenovírus humano, se os oligonucleotídeos sintéticos iniciadores forem relacionados às regiões de seqüência de base do héxon, que exibe o maior grau de homologia entre os sorotipos. Da mesma forma, a PCR pode ser subgrupo-específico, se os oligonucleotídeos sintéticos iniciadores forem relacionados a seqüências conservadas em genes de apenas um sorotipo de adenovírus. (ALLARD, GIRONES, JUTO et al., 1990).

Estudos realizados, utilizando essa metodologia para investigar adenovírus em fezes de adultos e crianças com e sem doença diarréica, têm demonstrado uma alta prevalência desse vírus quando são utilizados oligonucleotídeos grupo-específico. Possivelmente, devido à alta freqüência de eliminação desses agentes pelas fezes, nem sempre relacionados com manifestação clínica. Apenas consegue-se ter uma maior correlação, quando um segundo PCR *nested* é realizado, utilizando oligonucleotídeos que amplificam seqüências específicas dos adenovírus entéricos. (ALLARD et al., 1992).

Estudos comparativos dessa técnica com outras metodologias de pesquisa de ácido nucleico, como hibridização *in situ*, confirmam a possibilidade de seu uso clínico no diagnóstico da infecção por adenovírus. (MATSUSE, MATSUI, SHU et al., 1994). Da mesma forma, uma associação dessa técnica com a metodologia de amplificação, utilizando sondas marcadas com biotina ou europium, para detectar os produtos amplificados pelos métodos de EIE ou FIA, aumenta a possibilidade de detecção desse agente em espécimens muito tóxicos para o isolamento, ou que

tenham pequena quantidade de vírus, como por exemplo amostras coletadas em uma fase tardia da doença. (HIERHOLZER, HALONEN, DAHLEN et al., 1993).

### 1.1.7.2 Isolamento Viral

As culturas de células de origem humana são as melhores para a detecção de adenovírus de espécimens clínicos. (MCSWIGGAN, DAROUGAR, RAHMAN et al., 1975; HIERHOLZER, 1995). Os adenovírus entéricos (40 e 41) são chamados de fastidiosos, por apresentarem um crescimento lento e necessitar de sistemas de cultivos especiais para o seu isolamento, como células transformadas por uma infecção prévia pelo Ad5 (célula 293), e células conjuntivais de Chang. (GARY et al., 1979; WIGAND et al., 1983; BROWN, 1990; KRAJDEN et al., 1990).

As células primárias HEK (rim embrionário humano) têm taxa de isolamento ótima para todos os tipos de adenovírus, exceto 40 e 41. Contudo, como não são freqüentemente disponíveis, outras linhagens de células epiteliais humanas contínuas, como HEp-2 (carcinoma de nasofaringe), HeLa (carcinoma de cérvix) e A549 (carcinoma de pulmão) são habitualmente utilizadas. Essas são células convenientes para o isolamento, porém difíceis de serem mantidas por tempos prolongados após a inoculação. Devem ser submetidas a vários subcultivos para permitir que o adenovírus desenvolva efeito citopático (ECP), que são alterações celulares morfológicas devido à replicação viral. Alternativamente, podem ser utilizadas as células de pulmão embrionário humano ou fibroblasto de prepúcio. Estas são menos sensíveis para o isolamento que as anteriores, mas são facilmente

mantidas por tempos prolongados e sem trocas freqüentes do meio de manutenção. Por conseqüência, há redução do risco de contaminação cruzada. Deve-se ressaltar que, independentemente do sistema de células usado, diferentes lotes celulares variam na sua sensibilidade aos adenovírus. (HIERHOLZER, 1995).

Diferentes espécimens clínicos podem ser inoculados, como aspirado de nasofaringe, urina, fezes, tecidos ou monócitos. Tais amostras devem ser processadas e previamente tratadas com antibióticos e antifúngicos, para diminuir a contaminação, obtendo assim altas taxas de isolamento. (KAJON, 1991).

O tempo para desenvolvimento do ECP é variável. Depende do subgrupo de adenovírus, da concentração do agente infeccioso no espécimen, e da sensibilidade da célula hospedeira. O ECP típico geralmente ocorre na segunda semana para os adenovírus 1-3 e 5-7. Para os outros, particularmente do subgênero A e D, o aparecimento das alterações celulares pode ocorrer após um período de 20 a 28 dias. (WHITE e FENNER, 1994). Técnicas de cultura com centrifugação têm demonstrado uma sensibilidade semelhante à cultura convencional, com a vantagem de acelerar o isolamento viral que se apresenta positivo, na maioria dos casos, em cinco dias, enquanto a cultura convencional leva em torno de 10 ou mais dias. (ESPY, HIERHOLZER e SMITH, 1987; MAHAFZAH e LANDRY, 1989).

A identificação dos isolados pode ser realizada por todos os testes utilizados para a detecção direta do adenovírus em espécimens clínicos. Para a identificação dos isolados por IFI, o ECP deve ter se estendido para aproximadamente 25,0% das células. Para identificação por outros testes, exceto PCR e RIA, o ECP deve ter se estendido por aproximadamente 100,0% das células, pois tais metodologias necessitam de grande quantidade de antígenos solúveis, hemaglutininas e vírus infecciosos. Os antígenos solúveis apresentam-se em alto

título nas células HEp-2, vírus infecciosos em células HEK para tipos 1-39, e células 293 para adenovírus 40-41. (HIERHOLZER, 1995).

A identificação do agente isolado pode ser gênero-específico, que se baseia nas reações que detectam os héxons solúveis produzidos durante a replicação viral, ou tipo-específico. O procedimento metodológico escolhido é determinado pelo nível de tipagem desejado. Em geral, IFI, EIE ou AL são empregados para classificarem um isolado na família *Adenoviridae*; aglutinação com hemáceas humanas, de macaco e de rato, para classificação em subgrupos; inibição da hemaglutinação, teste de neutralização e, mais recentemente, restrição enzimática, para classificação do vírus como tipo-específico. (HIERHOLZER, 1995). Desde as primeiras descrições da análise do genoma viral por restrição enzimática, esta vem sendo gradualmente aplicada para a tipagem do adenovírus, pois é um teste rápido, que permite a detecção de variantes genômicas, fornece importantes informações epidemiológicas e poucos resultados ambíguos quando comparados com as reações de soro neutralização. (FIFE et al., 1985).

### 1.1.7.3 Pesquisa de Anticorpos

A confirmação de uma infecção por adenovírus também pode ser feita por testes sorológicos. Para isso, deve-se demonstrar um aumento de quatro vezes na titulação e nos soros de fase convalescente, em relação ao soro de fase aguda. O diagnóstico pode ser gênero-específico, por meio de testes como EIE e fixação de complemento (FC), os quais utilizam reação héxon anti-héxon ou, tipo-específico,

que utiliza múltiplos sorotipos individuais em testes de inibição da hemaglutinação e de neutralização. Independente da metodologia utilizada, podem ocorrer resultados falso-negativos, devido às infecções persistentes ou insuficiente resposta sorológica na infância, e resultados falso-positivos devido à resposta anamnésica heterotípica. (HIERHOLZER, 1995).

### 1.1.8 Vacina

Não há vacinas disponíveis para o uso na comunidade geral. Em 1960, a regularidade de infecções por adenovírus em recrutas militares era tão alta, que levou à necessidade do desenvolvimento de uma vacina efetiva, para essa população em particular. Inicialmente, desenvolveu-se uma de uso parenteral, que foi retirada de circulação, após a descrição da atividade oncogênica desses agentes em mamíferos inferiores. Observou-se, também, que alguns lotes dessas vacinas estavam contaminados com outro vírus oncogênico, o SV40, que formava, junto com o adenovírus, um agente híbrido composto pela ligação parcial do ADN do adenovírus com o ADN do SV40, dentro do capsídio do adenovírus. Esse híbrido era defectivo, necessitando da coinfeção com adenovírus para se desenvolver, porém ainda retinha o potencial de oncogenicidade de ambos os vírus. A imunização com essa vacinação resultava em tumores humanos, e seu estudo tem contribuído muito na elucidação da biologia molecular, patogênese e atividade oncogênica de ambos os agentes. (BAUM, 1992).



Posteriormente, desenvolveu-se uma vacina para uso oral, que consistia em partículas virais virulentas, envolvidas em uma cápsula de gelatina. Assim, o agente passaria direto pela orofaringe e seria liberado no intestino. O contato do vírus com a mucosa intestinal leva à produção de imunoglobulinas e, devido à recirculação linfocitária, induz a imunidade da mucosa respiratória, assim como do trato intestinal. Posteriormente, observou-se que os dois sorotipos freqüentes, 4 e 7, associados em uma só vacina, desenvolviam-se no intestino, sem interferência mútua, e produziam imunidade altamente efetiva.

Esses estudos têm levado à intensificação das pesquisas sobre o possível uso de adenovírus recombinantes na indução de proteção a infecções, nas quais a imunidade de mucosa tem participação importante. Atualmente, essa vacina tem sido administrada apenas em recrutas militares, com resultados muito satisfatórios. (BAUM, 1992; WHITE e FENNER, 1994).

### **1.1.9 Tratamento**

Não há terapia clinicamente específica para infecções por adenovírus, sendo esta apenas de suporte. Em quase todos os pacientes, exceto os imunossuprimidos, habitualmente há uma melhora espontânea da infecção. (BAUM, 1992; HORWITZ, 1996).

## 1.2 ADENOVÍRUS EM PACIENTES IMUNOCOMPROMETIDOS

Infecções em hospedeiros imunossuprimidos constituem um problema relativamente novo e grave, considerando a epidemia da SIDA e o crescimento em grande escala dos transplantes de órgãos. Os adenovírus e os herpesvírus são potenciais patógenos para esses pacientes, pois estabelecem infecções latentes no hospedeiro após a infecção primária, e posteriormente reativam como infecção assintomática ou doença clínica, como pneumonia intersticial, hepatite, gastroenterite, cistite hemorrágica e meningoencefalite. (LANDRY et al., 1987). Essas são infecções difíceis de serem tratadas, tendem a ser de longa duração, levam a uma maior debilitação do paciente e, algumas vezes, rapidamente resultam em morte. (HIERHOLZER, 1992).

Os adenovírus estão envolvidos em infecções graves em diversos grupos de pacientes com imunodeficiência. São os responsáveis por aproximadamente 10,0% das doenças graves que os acometem. (HIERHOLZER, 1995). Estão associados a casos de fatalidade em 60,0% daqueles com pneumonia, e 50,0% com hepatite, comparados com 15,0% e 10,0%, respectivamente, em hospedeiro imunocompetente. Entre os pacientes imunossuprimidos, observa-se uma maior taxa de fatalidade para os pacientes de transplante de medula óssea (TMO), quando comparados com os portadores de imunodeficiências primárias, os receptores de outros transplantes, e os portadores do HIV. (HIERHOLZER, 1992).

LJUNGMAN, GLEAVES e MEYERS (1989) em investigação prospectiva de 78 pacientes imunossuprimidos para infecção por vírus respiratórios, também observaram uma alta prevalência de adenovírus nos isolados: cinco casos em 14 isolados, sendo um paciente com evolução disseminada fatal.

SHIELDS et al. (1985) revisaram 1051 pacientes submetidos a TMO no período de 1976 a 1982, dos quais 51 tiveram infecção por adenovírus. Destes, 46 foram tipados, e os mais freqüentemente encontrados foram os tipos 11, 34 e 35 do subgênero B (27,7%). Doença invasiva foi confirmada em 19,6% dos casos, com comprometimento renal, pulmonar e hepático. O único fator de risco identificado para o desenvolvimento da infecção e doença invasiva foi a presença de doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) moderada e grave.

A doença parece ocorrer por reativação viral endógena, pois essa é mais comum em pacientes soropositivos para adenovírus do que os soronegativos. Não há diferença na incidência entre os pacientes tratados em sala com ou sem fluxo laminar, e nem correlação com os adenovírus circulantes na comunidade. (SHIELDS et al., 1985). A infecção primária parece ser predominante nos pacientes pediátricos, como citado por WASSERMAN et al., 1988; MORRIS, CORBITT, BAILEY et al. em 1993 e CHARLES, CAUL, PORTER et al. em 1995.

WASSERMAN et al., em 1988, revisaram 96 pacientes pediátricos submetidos a TMO no período de 1979 a 1986, para determinar a evidência laboratorial de infecção viral. Os agentes virais mais comuns foram herpes simplex (20,0%), citomegalovírus (18,0%) e adenovírus (18,0%). Apenas para o CMV a DECH foi um fator de risco significativa.

Em crianças com imunodeficiência combinada severa, os sorotipos comuns dos subgêneros A, B e C podem causar quadros graves, como pneumonia ou meningoencefalite. Receptores de transplantes de rim, fígado, medula óssea e portadores da SIDA, com freqüência eliminam vírus do subgênero B (sorotipos 11, 34 ou 35) na urina por tempo prolongado e, em pacientes com SIDA, também tem sido descrita a presença do subgênero D (sorotipos 43 a 47) nas fezes (WHITE e

FENNER, 1994). Os sorotipos encontrados em pacientes imunossuprimidos não são os patógenos respiratórios geralmente prevalentes na comunidade. Alguns representam novos sorotipos, suportando o conceito de que as síndromes por adenovírus resultam da reativação de vírus latente. (HIERHOLZER, WIGAND, ANDERSON et al., 1988).

A imunossupressão provavelmente contribui para a diversidade dos sorotipos, como pode ser observada pela frequência incomum de cepas intermediárias encontradas no intestino dos pacientes com SIDA. Estes hospedeiros podem desenvolver doença crônica por mais de um sorotipo de adenovírus o que possibilita a recombinação genética entre eles e o surgimento de formas intermediárias. Outra explicação possível é que as manifestações clínicas mais graves observadas nesses pacientes leva a um maior esforço para a caracterização do agente infeccioso. (HIERHOLZER, 1992).

Adenovírus são uma causa comum de infecção em crianças e podem causar sérias infecções em pacientes imunossuprimidos, como colite, cistite hemorrágica, pneumonia, hepatite, nefrite e encefalite. Estudos têm citado a incidência de infecções por adenovírus em TMO variando de 4,9% a 20,9%, enquanto a incidência de doença invasiva é de 0,9% a 6,5%. (CHARLES et al., 1995; BERTHEAU, PARQUET, FERCHAL et al., 1996). O período de maior risco de reativação da infecção por adenovírus é de duas semanas a três meses pós-transplante. (LONDERGAN e WALZAK, 1994).

Em imunossuprimidos, a doença por adenovírus pode ocorrer como uma infecção primária ou por reativação de uma infecção latente. Há também algumas evidências de transmissão de infecção por adenovírus, dos doadores de órgão para os receptores (FLOMENBERG, DROBYSKI, ASH et al., 1994), contudo a relação

entre colonização e o subsequente desenvolvimento de doença sistêmica mantém-se controverso. BERTHEAU et al. (1996) observaram que a DECH, por requerer um terapia imunossupressora intensa, predisporia o paciente a infecção oportunista. SHIELD et al. (1985) também afirmaram em seu estudo que o único fator de risco para infecção por adenovírus foi a DECH aguda. FLOMENBERG et al. (1994) sugeriram que transplantes utilizando doadores idênticos ou não necessitam de um condicionamento mais intenso e seria também um possível fator de risco.

WEBB et al., em 1987, em uma revisão sistemática das infecções por adenovírus em um centro de TMO, demonstraram uma alta prevalência do tipo 5 (subgênero C), além do grupo intimamente relacionado Ad11, 34 e 35. Estudo por restrição enzimática do tipo 5 demonstrou a presença de variantes genômicas, e obteve achados sugestivos de disseminação hospitalar desse vírus nessa população, ressaltando a importância epidemiológica da caracterização genômica para investigar as infecções virais.

Segundo LANDRY et al. (1987), em pacientes transplantados não se tem demonstrado uma correlação direta de infecção por adenovírus e doença do enxerto contra o hospedeiro, ao contrário do grupo herpes. Observou-se, em estudo retrospectivo de pacientes de TMO, que os adenovírus foram mais frequentemente isolados de pacientes cuja doença de base eram tumores sólidos, e também, com uma maior frequência, do tipo 12, que é conhecido como altamente oncogênico em hamsters.

Estudos prospectivos de pacientes imunossuprimidos, com o objetivo de diagnóstico precoce das infecções virais, têm demonstrado que a frequência de eliminação viral assintomática é maior nesses pacientes. Portanto, uma vigilância

deve ser mantida para que a detecção e início da terapia sejam precoces. (WASSERMAN et al., 1988).

BLANKE, CLARK, BROUN et al. (1995), em um estudo sobre o desenvolvimento de novos patógenos em TMO, relatam a maior frequência que se tem observado de infecções grave por adenovírus. Acompanharam 74 pacientes submetidos a TMO com depleção de células T. Encontraram 10 casos de infecção por adenovírus (13,5%), dos quais seis morreram. Em cinco, nenhuma outra etiologia foi identificada, o que revela mortalidade de 50,0%. Não observou diferenças estatisticamente significativas com relação a idade, sexo, DECH, doadores HLA relacionados ou não, e infecções associadas como o citomegalovírus (CMV) para o desenvolvimento de doença. Segundo os autores, o aumento de incidência de infecção por adenovírus pode ser decorrente de um maior número de pacientes com regimes de condicionamento com depleção de células T, e também pelas atuais terapias efetivas realizadas para outros agentes então comuns, como o varicela zoster, herpes simplex e CMV.

### 1.3 CISTITE HEMORRÁGICA POR ADENOVÍRUS EM TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA

A cistite hemorrágica (CH) é uma complicação freqüente em pacientes de TMO. Ocorre com uma incidência que varia de 7,0% a 68,0% nos diferentes serviços. (SENCER, HAAKE e WEISDORF, 1993). Pode apresentar-se em qualquer fase pós-transplante, ser transitória ou de longa duração. Como regra geral, a CH

transitória e de início precoce ocorre devido à lesão tóxica direta do epitélio da bexiga pelos metabólitos da ciclofosfamida, droga utilizada no período de condicionamento para o transplante. Nesta, a doença tipicamente começa dentro de 48 horas da administração da droga e, incomumente, pode persistir por até dois meses. É prevenida por hiperhidratação, alcalinização da urina, diurese forçada e administração simultânea de 2-mercaptoetanol sulfonado (Mesna). Esta forma um componente adicional com a acroleína no trato urinário, evitando a sua toxicidade sobre a mucosa. (APPERLEY, RICE, BISHOP et al., 1987; RUSSEL, VOWELS e VALE, 1994). Essa conduta tem contribuído para uma redução da incidência de toxicidade de 7,0% para 0,5%. (LONDERGAN e WALZAK, 1994).

Um amplo estudo realizado por SENCER et al. (1993) demonstrou que a CH na população de TMO é de origem multifatorial. Nos casos precoces, ela é decorrente do regime de condicionamento, no entanto, as de início tardio têm outros fatores, como associação com adenovírus na urina e transplante tipo alogênico. A presença de DECH ainda é controversa.

A causa de CH de longa duração e de início tardio ainda mantém-se desconhecida. Foram realizados vários estudos para definir os prováveis agentes etiológicos. São descritas bactérias aeróbicas e fungos (SENCER et al., 1993), porém os vírus são os mais citados. (ARTHUR, SHAH, BAUST et al., 1986; RUSSEL et al., 1994).

ÖST, LÖNNQVIST, ERIKSSON et al. (1987) relataram que 20 de 125 pacientes com transplante alogênico desenvolveram CH tardia. Houve uma clara correlação entre a incidência de CH e DECH aguda. Outros estudos não confirmaram esses achados. (LANDRY et al., 1987).

Uma forte correlação tem sido feita entre CH com duração igual ou superior a sete dias, e a excreção do BK, um vírus ADN, do gênero poliomavírus, responsável por infecções na infância, que se manifestam com sintomas respiratórios discretos e, com menor frequência, podem fazer cistite mesmo em crianças imunocompetentes. Foi isolado pela primeira vez em 1971 em um paciente que desenvolveu estenose ureteral quatro meses após um transplante renal. (COLEMAN, RUSSEL, HODGSON et al., 1977; APPERLEY et al., 1987). Após a infecção primária, o vírus persiste de forma latente nos rins. A sua reativação, caracterizada por virúria, ocorre em diversas condições, como durante a gestação, em pacientes com SIDA e, com maior frequência, em pacientes submetidos a transplantes. (AZZI, FANCI, BOSI et al., 1994).

Tem-se observado, em pacientes de TMO, que a virúria BK coincide com o início da cistite, ou a precede em alguns dias, e que, a maior duração daquela correlaciona-se com CH prolongada. (APPERLEY et al., 1987). CH ocorreu em 80,0% dos casos de pacientes submetidos a TMO, com virúria que tenha durado sete dias ou mais e, em apenas 15,0% dos casos nos quais a virúria foi transitória ou não detectável. (ARTHUR et al., 1986).

Adenovírus tipo 11 são descritos como causa de CH em crianças imunocompetentes. (NUMAZAKI et al., 1973; MUFSON e BELSHE, 1976). Contudo, têm sido encontrados de uma forma inconsistente em pacientes de TMO. LONDERGAN e WALZAK (1994) relatam uma incidência de 16,0% de CH por adenovírus em TMO. SHIELDS et al. (1985), em sua revisão de 1051 pacientes de TMO por sete anos, detectaram apenas 22 adenovírus em urina, e não conseguiram correlacionar a excreção urinária do vírus com a CH. De modo semelhante, AMBINDER, BURNS, FORMAN et al. (1986) relataram que 20,0% de 502 pacientes



de TMO estudados em um período de oito anos tiveram CH, porém adenovírus tipo 11 foram isolados da urina de apenas quatro pacientes com CH, e um paciente assintomático. Outros adenovírus do subgênero B, tipos 34 e 35, também têm sido encontrados com maior frequência nos pacientes com CH. (WEBB et al., 1987).

KOGA, SHINDO, MATSUYA et al., (1993) revisaram 22 casos de CH por adenovírus em transplante renal, dos quais 15 foram tipados. Quatorze eram Ad11, e um Ad35. A maioria dos pacientes tiveram disfunção renal, porém em apenas dois foram detectados sinais de rejeição aguda, sugerindo que a alteração renal foi devida ao vírus propriamente dito. Em estudo realizado por MIYAMURA, TAKEYAMA, KOJIMA et al. (1989), no qual se acompanharam 50 pacientes submetidos a TMO alogênico, observou-se a incidência de CH em 12. Em oito deles, foi isolado Ad11 na urina. Os principais fatores de risco relacionados foram sexo (50,0% feminino versus 8,0% masculino), presença de anticorpo anti-adenovírus pré-transplante (37,0% soropositivo versus 6,0% soronegativo) e DECH aguda. Esses dados demonstraram que adenovírus é a principal causa de CH no Japão. Os autores sugerem que a discrepância com as observações dos dados americanos pode ser devido à influência ambiental ou racial entre os países.

ZALTZMAN et al., em 1994, descreveram dois casos de CH por adenovírus associados com infecção por CMV em transplante renal. Afirmaram que esse agente teria um efeito imunomodulador, predispondo o hospedeiro a superinfecção concomitante por agentes virais, bacterianos ou fúngicos.

Algumas complicações têm sido citadas, decorrentes da CH de causa viral. Observa-se, associada a infecções pelo vírus BK, a presença de disfunção hepática transitória (ARTHUR et al., 1986), e em pacientes com infecção por adenovírus, a evolução para quadros de estenose ureteral (HIRAOKA, TESHIMA,

MITSUI et al., 1989), insuficiência renal aguda e lesões tubulares degenerativas associadas com a formação de complexos imunes (UNO et al., 1991; YAGISAWA, TAKAHASHI, YAMAGUCHI et al., 1993; LILES, CUSHING, HOLT et al, 1993; ITO, HIRABAYASHI), e síndrome hemofagocítica. (LEVY, WODELL, AUGUST et al, 1990).

A presença de agentes virais em urina de pacientes imunossuprimidos é freqüente, o que dificulta a definição das prováveis causas da CH. Para melhor caracterização desta, tem-se sugerido que, associada às técnicas tradicionais de diagnóstico virológico, deve ser realizada, também, avaliação do esfregaço do sedimento urinário corado pelo método de Papanicolaou, para se observarem alterações morfológicas das células de descamação que sugiram infecção viral, ou, ainda, muito mais sensível, a detecção de partículas virais intracelulares nesses sedimentos, por meio da microscopia eletrônica. (COLEMAN et al., 1977; HIRAOKA, ISHIKAWA, KITAYAMA et al., 1991).

A utilização da técnica de PCR para a pesquisa de genoma viral, em material de biópsia de bexiga, também seria uma outra alternativa para o diagnóstico da infecção viral, apesar de a extração de ácido nucleico de material parafinado ser tecnicamente mais difícil, com possíveis resultados negativos. (HUKKANEN, HAARALA, NURMI et al., 1996).

A avaliação da mucosa por cistoscopia também pode ajudar na suspeita diagnóstica. Lesão por ciclofosfamida demonstra uma mucosa com telangiectasia difusa e, cistite viral, habitualmente, se apresenta como uma lesão ulcerada discreta, da qual deve ser feita biópsia para cultura, e, se possível, avaliação por microscopia eletrônica. (LONDERGAN e WALZAK, 1994). Comumente, a cistite hemorrágica por adenovírus é uma doença autolimitada, porém está associada a um

tempo prolongado de internamento hospitalar, significativo desconforto para o paciente e múltiplas transfusões sangüíneas. Além disso, há o risco importante de disseminação da doença com evolução para o óbito. (MURPHY, WOOD, MCROBERTS et al., 1993; LASZLO, BOSI, GUIDI et al, 1995).

Por tal motivo, muitas formas de tratamento têm sido descritas e estão sendo estudadas. De um modo geral, a terapia suportiva deve ser a primeira escolha, consistindo de hidratação, controle de diurese com irrigação vesical contínua, analgésicos e transfusão sangüínea, se necessário. O estado imunológico do paciente também é importante e, se possível, diminuir a administração dos imunossupressores pode ter benefícios. (LONDERGAN e WALZAK, 1994). Caso essas medidas não sejam efetivas, outras formas de terapia têm sido sugeridas. Entre elas, a instilação vesical de drogas como formalina, nitrato de prata, alumínio e prostaglandina E2 (PGE2). Alguns estudos têm demonstrado que a PGE2 pode ser benéfica na terapia da CH. O mecanismo de ação não é totalmente conhecido, contudo essa droga parece ter uma variedade de efeitos sobre o epitélio vascular, promove a agregação plaquetária, e induz a vasoconstrição. Também tem-se citado que a droga atua estimulando a contração da musculatura lisa dos vasos da mucosa e submucosa, controlando o sangramento. (LASZLO et al., 1995).

Outros autores questionam o tratamento tópico dessa doença, consideram que ela é sistêmica e com alta mortalidade. Afirmam que, quando o tratamento de suporte não é eficaz, a terapia com medicação sistêmica deve ser a alternativa. (MURPHY et al., 1993). Ribavirina é uma droga virustática de largo espectro, atua contra uma grande número de vírus ADN e ARN. O mecanismo de ação não é totalmente claro, mas parece estar relacionado com alteração das reservas celulares de nucleotídeos e com a formação de ARN mensageiro. Estudos em

animais têm demonstrado toxicidade importante, como teratogênese e embriotoxicidade e, em humanos, têm apresentado quadros de anemia macrocítica dose-dependente temporária. O uso parenteral dessa droga tem sido uma alternativa com resultados satisfatórios em alguns serviços. (CASSANO, 1991; MURPHY et al., 1993; LILES et al., 1993;). No entanto, o uso desse medicamento em pacientes submetidos a TMO com depleção de células T ou com doadores não consangüíneos não tem se mostrado eficaz, talvez porque a resposta ao adenovírus com e sem ribavirina seja dependente da imunidade celular T. (HROMAS, CLARK, BLANKE et al., 1994b).

HROMAS, CORNETTA, SROUR et al., (1994a) descreveram o uso da imunoterapia em um paciente, para o tratamento da CH por adenovírus com nefrite, por meio de transfusão de leucócitos do doador, sendo este o único sobrevivente de uma série de casos prévios. Segundo os autores, apesar dos riscos de desenvolvimento de DECH ou aplasia de medula por essa conduta, é uma alternativa que poderia ser utilizada.

KITABAYASHI, HIROKAWA, KUROKI et al. (1994) publicaram tratamento com sucesso de um caso de CH com vidarabina, um inibidor da ADN polimerase com atividade *in vitro* contra o adenovírus, com efeitos colaterais praticamente nulos, citando essa droga como mais um antiviral a ser avaliado nessas infecções.

## **2 OBJETIVOS**

Detectar adenovirus em pacientes com hematúria submetidos a TMO, correlacionando com a intensidade e fase de início da CH.

Comparar os diferentes métodos laboratoriais para a detecção de adenovirus em urina de pacientes com CH após o TMO.

Detectar doença invasiva por adenovirus em pacientes que evoluíram para o óbito durante a CH.

Observar a frequência de hematúria em pacientes submetidos a TMO.

Correlacionar a presença de hematúria com o tipo de transplante realizado.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 CASUÍSTICA

Foram estudadas amostras de urina de pacientes do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR) submetidos a TMO, no período de julho de 1996 a julho de 1997. As amostras de urina foram coletadas no período pré-transplante e, depois, aproximadamente três amostras mensais até o dia + 100 pós-transplante. Foram excluídos os pacientes pediátricos que utilizavam fraldas, por não ter completo controle de esfíncter vesical, o que dificultava a colheita da urina sem contaminação. A monitorização para detectar presença de hemáceas na urina foi feita por meio de análise microscópica do sedimento urinário.

Toda a urina coletada na fase pré-transplante e apenas aquelas que apresentassem hematúria no período pós-transplante foram processadas para a pesquisa de adenovírus por meio de cultura, ensaio imunoenzimático (EIE) e reação de polimerização em cadeia (PCR). Nesse período, foram realizados 101 TMO. Destes, 75 foram incluídos neste estudo. Os pacientes estudados foram submetidos a diferentes tipos de TMO: Alogênico consangüíneo - doador familiar HLA compatível; alogênico não consangüíneo - doador não familiar HLA compatível; autogênico - doador é o próprio paciente; singênico - doador é irmão gemelar, univitelinico, HLA idêntico.

### 3.1.1 Definição de Cistite Hemorrágica

Cistite hemorrágica foi definida como a presença de hematúria macroscópica, que correspondia a mais que 100 hemáceas por campo ao exame microscópio com aumento de 400X, com ou sem sintomas de disúria dor e disúria dificuldade, polaciúria ou dor suprapúbica. (RUSSEL et al., 1994).

A cistite hemorrágica foi classificada como de início precoce, quando ocorreu dentro de 48 horas após a administração da ciclofosfamida, e de início tardio quando os sinais ou sintomas iniciaram após 48 horas da administração da ciclofosfamida. (RUSSEL et al., 1994).

Para analisar a possibilidade de virúria assintomática, optou-se também por estudar os pacientes que apresentassem apenas hematúria microscópica.

De acordo com a gravidade, a cistite hemorrágica foi classificada em: grau 1, hematúria microscópica; grau 2, hematúria macroscópica; grau 3, hematúria macroscópica com coágulos; e grau 4, hematúria macroscópica com coágulos e aumento de creatinina sérica secundária à obstrução. (ARTHUR et al., 1986)

### 3.1.2 Amostras

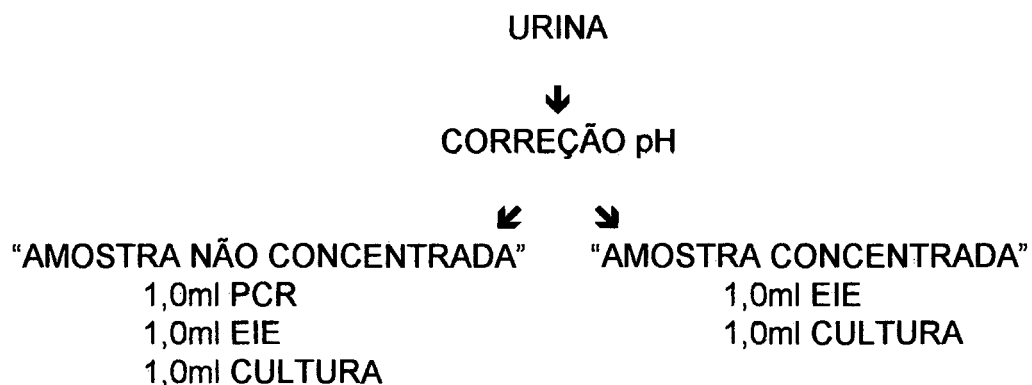
As amostras de urina coletadas foram encaminhadas à seção de urinálise para a realização do exame parcial de urina automatizado (Combur<sup>10</sup> Test<sup>®</sup>M,

Boehringer Mannheim), com análise microscópica do sedimento corado. Na presença de hematúria, os pacientes eram orientados para coletarem novas amostras de aproximadamente 30ml, com técnica asséptica, em tubo novo, esterilizado, encaminhando-as imediatamente ao laboratório de virologia para processamento.

Inicialmente, ajustava-se o pH da urina com solução de bicarbonato de sódio 8,8%, esterilizada, procurando mantê-lo entre 6,5 e 7,0, medido em fita (pH-Indikatorpapier Neutralit® pH 5,5 - 9,0, Merck). Posteriormente, a amostra era separada, para análise em duas formas (vide esquema): sem centrifugação, aliqüotada em três tubos: 1,0ml para a realização da PCR; 1,0ml para cultura e 1,0ml para EIE, estas duas últimas identificadas como “não concentradas”; e com centrifugação, em que se separava 20ml de urina em dois tubos, e centrifugava-se a 270 g por 20 minutos em temperatura ambiente, desprezava-se o sobrenadante, e em um tubo ressuspendia-se o sedimento com 1,0ml de meio mínimo essencial de Eagle (MEM)(Sigma Chemical), identificado como cultura “concentrada”. O sedimento do outro tubo era ressuspenso com 1,0ml de solução tampão fosfato (PBS) pH 7,2, e identificado como EIE “concentrado”. Às amostras separadas para cultura, adicionaram-se 200µl/ml de antibióticos, penicilina cristalina 1.000.000U e estreptomicina 1,0g diluídos em 100ml de água destilada estéril, e 200µl/ml de antifúngico anfotericina B 50mg diluída em 50ml de água destilada estéril. (HIERHOLZER, 1995). Essas amostras foram armazenadas a -80°C, até serem testadas ou inoculadas.



## ESQUEMA DE PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS CLÍNICAS



### 3.2 MÉTODOS

#### 3.2.1 Isolamento

As amostras de urina “concentradas” e “não concentradas” foram inoculadas em células de carcinoma da nasofaringe (HEp-2), mantidas a 37°C com subcultivo na segunda semana, e posteriormente acompanhadas por mais duas semanas. Em dias alternados, realizou-se leitura em microscópio invertido para a detecção de alterações morfológicas sugestivas de replicação viral (efeito citopático - ECP), e troca do meio de manutenção, MEM com 2,0% de soro bovino fetal (Sigma Chemical). Durante o período de observação, realizou-se imunofluorescência indireta para pesquisa de antígeno de adenovírus, com o objetivo de confirmar o isolamento viral das amostras que apresentassem ECP ou, ao final de quatro semanas, das amostras sem ECP, antes de serem descartadas.

### 3.2.2 Imunofluorescência Indireta

Após raspagem com pipeta Pasteur para soltar as células dos tubos, centrifugou-se o sobrenadante do meio de cultura a 230 g por 10 minutos. O sedimento foi ressuspensão e as células fixadas em lâminas com acetona PA, a 4°C, por 10 minutos. A coloração foi realizada incubando-se a amostra com anticorpo monoclonal anti-adenovírus produzido em camundongo (Chemicon International) diluído 1:200 em soro albumina bovina 1,0% (Sigma Chemical) por 30 minutos, a 37°C. Após três lavagens sucessivas com PBS 0,01M ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 1\text{xH}_2\text{O}$ ; NaCl), pH 7,2, incubou-se com o anticorpo anti-camundongo produzido em cabra, conjugado com fluoresceína (Sigma Chemical), diluído 1:100 em PBS, por 30 minutos, a 37°C. Posteriormente, fez-se a leitura em microscópio de epifluorescência com lâmpada de halogênio e aumento de 400X.

### 3.2.3 Ensaio Imunoenzimático (EIE)

Realizou-se a pesquisa de antígenos virais do adenovírus, utilizando-se o kit de ensaio imunoenzimático produzido pelo laboratório de Bio-Manguinhos da Fundação Oswaldo Cruz. (PEREIRA et al., 1985).

O teste consiste no método de sanduíche duplo. Inicialmente, fazia-se a sensibilização da placa com soro anti-adenovírus e soro normal, ambos produzidos em cabra, diluídos 1:100 em tampão próprio, incubando a 4°C por 20 horas. Posteriormente, adicionava-se a amostra de urina “concentrada” e “não

concentrada”, pura e diluída 1:2 em tampão diluente de amostra, em duplicata (1 poço marcado com soro anti-adenovírus e outro com soro normal de cabra). Incubava-se por 30 minutos a 40°C em banho-maria. Após 5 lavagens sucessivas da placa, adicionava-se o soro detector, que consiste em soro hiperimune de cobaia anti-adenovírus, diluído 1:100 em tampão próprio e incubava-se a 40°C, por 30 minutos, em banho-maria. Após 5 lavagens sucessivas da placa, adicionava-se o conjugado anti-imunoglobulina de cobaia marcado com peroxidase, diluído 1:100 em tampão próprio, e incubava-se a 40°C por 30 minutos em banho-maria. Posteriormente, realizava-se 5 lavagens sucessivas da placa, adicionava-se a solução de revelação, o tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio, diluídos 1:100 em tampão próprio, e incubava-se por 20 minutos em temperatura ambiente no escuro. Em seguida, parava-se a reação adicionando-se ácido sulfúrico. Todos os testes foram realizados com controle positivo para adenovírus que acompanhava o kit, controles de substrato e conjugado. Realizava-se, então, a leitura da intensidade de coloração em espectrofotômetro com filtro de 450 nm. Foram consideradas positivas para adenovírus, as amostras que apresentassem densidade óptica (DO) do poço marcado com soro anti-adenovírus duas vezes maior que a DO do poço marcado com soro normal de cabra.

#### **3.2.4 Detecção de Ácido Nucleico**

A detecção do ácido nucleico de adenovírus em urina foi realizada pelo método de amplificação por PCR. Utilizou-se o protocolo aplicado pela seção de

Vírus Respiratórios do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, Atlanta, EUA). (McDONOUGH, KEW e HIERHOLZER, 1993). A amplificação foi realizada de um segmento do ADN do adenovírus que codifica as proteínas do héxon, uma porção bastante conservada nesse agente, produzindo um produto de 134 pares de base (pb).

#### 3.2.4.1 Preparo das Amostras de Urina para a PCR

Para evitar resultados falso-positivos decorrentes da contaminação da PCR pelo produto amplificado, estabeleceu-se o critério de processar 10 amostras de cada vez, sendo um controle negativo. Como controle negativo, foi utilizada a água empregada para o preparo dos reagentes. Como controle positivo, um adenovírus que foi cultivado e identificado por IFI na urina de um dos pacientes estudados. O controle positivo foi processado isoladamente e apenas colocado junto com as amostras quando estas foram preparadas com a solução de mistura para a amplificação. Todas as amostras positivas foram confirmadas, sendo retestadas em todos os passos: extração de DNA, amplificação e detecção, porém sem a adição de controle positivo.

#### 3.2.4.2 Extração do ADN Viral

##### **CONTROLE POSITIVO**

A extração do ácido nucleico viral foi realizada com a adição de 20µl de

sobrenadante de cultura de urina positiva para adenovírus a 150µl de solução tampão TNE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 10mM NaCl, pH 8,0), 20µl de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10,0% e 10µl de proteinase K 10mg/ml (Sigma Chemical). Submeteu-se essa solução a aquecimento a 50°C, por 60 minutos, e posteriormente a 70°C, por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 200µl de fenol saturado pH 7,6, agitou-se por 2 minutos, e centrifugou-se a 12.000 g por 3 minutos, a 4°C. Do sobrenadante, transferiu-se 150µl para outro tubo, adicionou-se a este 75µl de fenol e 75µl de clorofórmio - isoamilálcool (24:1) e agitou-se por 1 minuto. Centrifugou-se a 12.000 g por 3 minutos, a 4°C. Após a centrifugação, 100µl do sobrenadante foi transferido para um novo tubo, e adicionou-se 100µl clorofórmio - isoamilálcool (24:1). Centrifugou-se a 12.000 g por 3 minutos, a 4°C, removeu-se 40µl do sobrenadante, evitando-se o clorofórmio, e armazenou-se o DNA extraído a -20°C, até ser realizada a amplificação.

### **AMOSTRAS DE URINA**

A extração do ácido nucleico viral foi realizada com a adição de 200µl de urina, a 60µl de solução tampão TNE 5X (50mM Tris-HCl, 5mM EDTA, 50mM NaCl, pH 8,0), 30µl de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10,0%, e 10µl de proteinase K 10mg/ml (Sigma Chemicals). Essa solução foi submetida a aquecimento a 50°C, por 60 minutos, e posteriormente a 70°C, por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 300µl de fenol saturado pH 7,6, agitou-se por 1 minuto, e centrifugou-se a 12.000 g por 3 minutos, a 4°C. Do sobrenadante transferiu-se 150µl para outro tubo, e adicionou-se a este 75µl de fenol e 75µl de clorofórmio - isoamilálcool (24:1), e agitou-se por 1 minuto. Centrifugou-se a 12.000 g por 3 minutos, a 4°C. Após a

centrifugação, 100µl do sobrenadante foi transferido e adicionou-se 100µl clorofórmio - isoamilálcool (24:1). Centrifugou-se a 12.000 g por 3 minutos, a 4°C, removeu-se 40µl do sobrenadante, evitando-se o clorofórmio, e armazenou-se o DNA extraído a -20°C até ser realizada a amplificação.

### 3.2.4.3 Seleção dos Oligonucleotídeos Sintéticos (*Primers*)

Para a realização da metodologia de PCR, foi utilizado um par de *primers* (Gibco BRL) derivados do gene que codifica as proteínas do héxon dos adenovírus. A seqüência destes foi obtida do protocolo de PCR para adenovírus utilizado pelo CDC. Os oligonucleotídeos sintéticos foram denominados: *primer 1* (A2: 5' - TTT GAG GTG GAT CCC ATG GA) e *primer 2* (A2: 5' - AGA AGG GCG TGC GCA GGT). Analisando essas seqüências de *primers* no banco de genes, observou-se que o *primer 1* detecta 100,0% do Ad2 (subgênero C), 100,0% Ads 7, 3 e 16 (subgênero B), 95,0% Ads 40 e 41 (subgêneros F e G), 95,0% Ad 12 (subgêneros A), 95,0% Ad 48. O *primer 2* detecta 100,0% do Ad 2 (subgênero C), 100,0% do Ad 12 (subgênero A), 100,0% do Ad 3 porcino, 94,0% do Ad 4 (subgênero E), 89,0% do Ad 41 (subgênero G), 89,0% do Ad 3, 7 e 16 (subgênero B). Os dados demonstram que esses oligonucleotídeos amplificam uma parte altamente conservada dos adenovírus. Portanto, possivelmente detecta todos os diferentes subgêneros.

#### 3.2.4.4 Amplificação do ADN Viral pela Técnica de PCR

Para a reação de amplificação, foi preparada solução contendo 28,25 $\mu$ l de água Mili-Q, 8 $\mu$ l de dNTPs 1,25mM (dATP, dTTP, dGTP e dCTP) (Perkin Elmer,), 20 $\mu$ M de *primers* 1 e 2, 5 $\mu$ l de solução tampão 10x (Perkin Elmer), 1,5 $\mu$ l de cloreto de magnésio (Gibco, BRL), 1 $\mu$ l de *taq* DNA polimerase (Perkin Elmer) e 5 $\mu$ l do ADN extraído.

A amplificação foi realizada em um termociclador automático (Perkin Elmer/Cetus). As amostras foram inicialmente denaturadas a 94°C por 5 minutos, e submetidas a 35 ciclos de amplificação, sendo cada ciclo composto de três temperaturas: denaturação da amostra a 94°C por 1 minuto, pareamento a 56°C por 1 minuto, e extensão da fita de ADN a 72°C por 1 minuto, seguida de uma extensão final a 72°C por 4 minutos.

#### 3.2.4.5 Detecção do Produto Amplificado

Os produtos das reações foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 2,0% (Sigma Chemical) em tampão de corrida: 1000ml de TBE 1X (Tri-borato 0,09M e EDTA 0,002M) (Gibco BRL)) pH 8,0 + 50 $\mu$ l de brometo de etídio 10 mg/ml (Sigma Chemical), e visualizados sob luz ultravioleta. Foram consideradas negativas as amostras que não apresentavam banda no gel, e positivas aquelas que apresentavam uma banda de 134 pb. Utilizou-se na corrida eletroforética, juntamente com as amostras e os controles positivo e negativo, um marcador de

peso molecular(*DNA Molecular Weight Marker V*, 8 - 587 bp, 22 fragmentos, 250 $\mu$ /ml, Boehringer Mannheim). A corrida desenvolveu-se a 120 V, por aproximadamente 60 minutos.

### 3.2.5 Imunohistoquímica

As lâminas de cortes de pulmão, fígado e rim dos pacientes que evoluíram para o óbito no período em que apresentaram cistite hemorrágica com adenovírus isolado nas culturas foram analisadas por imunohistoquímica (IH), para detectar a presença de antígenos de adenovírus nesses locais.

A imunohistoquímica foi padronizada por adaptação das técnicas descritas por CHANDLER e GORELKIN, 1983; BARTH, MAJEROWICZ, MENASCE et al., 1988; ROSMAN, MISTCHENKO, LADENHEIM et al., 1996; MEZEY e HUNYADY, 1998; SERFAS, 1998.

As lâminas para a reação foram inicialmente tratadas com poli-L-lisina 1,0% (Sigma Chemical), que consistia em mergulhar a lâmina nessa solução e posteriormente secá-las em temperatura ambiente. Em seguida, realizava-se o corte do tecido parafinado (em torno de 5 a 10 micrômetros), transferindo-o para a lâmina, mantendo-a a 37°C por 24 horas.

Posteriormente, procedeu-se a desparafinização do tecido com 3 banhos sucessivos de xilol (Merck), e hidratação com a série alcoólica, etanol absoluto (Merck) diluído em água destilada, 100,0%, 95,0%, 70,0%, 50,0% e 30,0%, 5 minutos cada passo, e PBS pH 7,4 por 5 minutos.



Posteriormente, incubou-se o corte com solução de tripsina 0,1% (Sigma Chemical) e CaCl 0,1%, (Merck) pH 7,8, a 37°C, em câmara úmida por 2 horas. Lavou-se em PBS por 5 minutos. Em seguida, incubaram-se os cortes com uma solução diluente composta de soro albumina bovina 1,0% (Sigma Chemical), TRITON X-100 0,6% (Sigma Chemical) diluídos em PBS pH 7,4, por 30 minutos, em temperatura ambiente, lavou-se com PBS por 5 minutos, e incubou-se novamente com solução tampão composta por soro albumina bovina 0,5%, soro bovino fetal 2,0% (Sigma Chemical) e PBS pH 7,4, por 5 minutos em temperatura ambiente.

A imunomarcação foi realizada incubando-se a lâmina com o anticorpo primário anti-adenovírus, produzido em camundongo (Chemicon International), diluído 1:200 em solução diluente, por 16 horas, em câmara úmida a 4°C. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS pH 7,4 por 3 vezes, 5 minutos cada, sob agitação lenta e novamente incubadas com o anticorpo secundário anti-camundongo, desenvolvido em cabra, marcado com biotina (Sigma Chemical), diluído 1:500 em solução diluente, por 1 hora, em temperatura ambiente e em câmara úmida. Lavou-se em PBS pH 7,4 por 3 vezes, 5 minutos cada, sob agitação lenta. Em seguida, aplicou-se sobre os cortes o complexo ExtraAvidina-FITC (Sigma Chemical), diluído 1:100 em PBS pH 7,4 e azul de Evans 0,001% (SIGMA), por 1 hora, em câmara úmida, à temperatura ambiente. Lavou-se em PBS pH 7,4 por 3 vezes, 5 minutos cada, sob agitação lenta, e enxaguou-se em água destilada. As lâminas foram montadas com solução de montagem (Sigma Chemical) e observadas em microscópio de epifluorescência, com lâmpada de halogênio e aumento de 400X. Toda a reação foi realizada utilizando-se como controle positivo um corte de pulmão que apresentava pneumonite por adenovírus. Para controle da coloração

inespecífica de fundo, corou-se a mesma lâmina teste, empregando-se apenas a solução diluente sem o anticorpo primário na primeira incubação.

### 3.2.6 Método Estatístico

Recorreu-se à análise descritiva dos dados através de tabelas e quadros.

Para a comparação dos dados foram utilizados os testes não-paramétricos “Qui-Quadrado, com correção de Yates”, “Exato de Fisher” e “Comparação entre duas Proporções” (através do *software “Primer of Biostatistics”*), para amostras independentes. O nível de significância (ou probabilidade de significância) mínimo adotado foi de 5,0%.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 DADOS DEMOGRÁFICOS

No período do estudo foram acompanhados 75 pacientes do Serviço de Transplante de Medula Óssea (STMO) da UFPR. A maioria dos pacientes submeteu-se a transplante do tipo alogênico (78,6%), 64,0% dos pacientes eram masculinos e com idade média de 22,9 +/- 12,6 anos (mediana de 21 anos). No período de acompanhamento 10 pacientes (13,3%) evoluíram para o óbito antes de completar a investigação, ou seja 100 dias de seguimento, observando-se uma maior mortalidade no grupo submetido a transplante não consangüíneo (27,3%) (Tabela 5 e 6).

**TABELA 5 - DADOS GERAIS DO SEXO, IDADE E MORTALIDADE POR TIPO DE TMO**

DADOS	ALOGÊNICO CONSANGÜÍNEO (n = 59)		ALOGÊNICO NÃO CONSANGÜÍNEO (n = 11)		AUTOGÊNICO (n = 04)		SINGÊNICO (n = 01)		TOTAL (n = 75)	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<b>SEXO</b>										
• Masculino	37	62,7	07	63,6	03	75,0	01	100,0	48	64,0
• Feminino	22	37,3	04	36,4	01	25,0	-	-	27	36,0
<b>IDADE</b>										
• Média		24,1		13,4		25,5		-		22,9
• Desvio Padrão		<sup>(1)</sup> 3,0		<sup>(1)</sup> 7,1		<sup>1</sup> 10,0		-		<sup>(1)</sup> 12,6
• Mínima		3,0		6,0		16,0		44,0		3,0
• Máxima		54,0		27,0		36,0		-		54,0
• Mediana		22,0		11,0		25,0		-		21,0
<b>MORTALIDADE</b>										
	07	11,9	03	27,3	-	-	-	-	10	13,3

(1) Desvio padrão muito elevado, recomenda-se utilizar a mediana.

TABELA 6 - DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS DOS PACIENTES SUBMETIDOS À TMO

Nº	SEXO	IDADE (ANOS)	DOENÇA	TIPO TMO	CAUSA DO OBITO (<100 dias)	CONDICIONAMENTO
1	M	5	AAS	ALOG.		CFA 200
2	M	37	LMC	ALOG.		CFA 120 + BUS 16
3	M	32	LMC	ALOG.		CFA 120 + BUS 16
4	F	44	MIELODISPLASIA	ALOG.	SEPSIS ABDOMINAL	CFA 120 + BUS 16
5	M	12	AF	ALOG.	HEMORRAGIA PULMONAR	CFA 100
6	M	36	LMC	ALOG.		CFA 120 + ICT 1320
7	F	11	AAS	ALOG.	SEPSIS: S. viridans; S. aeruginosa	CFA 200 + ICT 800 (2º TMO)
8	M	34	AAS	ALOG.	ASPERG. DISS + NEFRITE INTERST + SARA	CFA 120 + BUS12
9	F	9	AF	NP	BPN + I. RESP. A	CFA 120 + BUS12
10	M	28	AAS	ALOG.		CFA 120 + BUS12
11	M	14	LMC	NP		CFA 120 + ICT 1440 + BOOST TEST 400
12	M	3	AF	ALOG.		CFA 140
13	F	31	LMA	ALOG.		CFA 120 + BUS 16
14	M	20	AAS	ALOG.		CFA 120 + BUS 12
15	M	17	AAS	ALOG.		CFA 200
16	M	37	LMC	ALOG.		CFA 120 + BUS 16
17	M	7	AF	ALOG.		CFA 100
18	M	9	AF	NP		CFA 40 + RXT 400
19	F	30	AAS	ALOG.	DECH + SEPSIS FUNGO + FALHA DE PEGA	CFA 120 + BUS 12
20	M	6	LLA	NP		CFA 120 + ICT 1440
21	M	32	MIEL. MÚLTIPLO	AUTOL.		ICT 1440 + MEL 140
22	M	20	AAS	NP		CFA 120 + BUS 16
23	F	36	LMC	ALOG.		CFA 120 + BUS 16
24	M	16	AAS	ALOG.		CFA 200
25	M	44	LMC	SING.		CFA 120 + BUS 16
26	F	18	LMA -M3	AUTOL.		MEL 140 + BUS 16
27	F	38	AAS	ALOG.		CFA 120 + BUS 12
28	F	27	LMC	NP	IRA + PNEUMONITE INTERSTICIAL	CFA 120 + ICT 1320
29	M	15	LMC	ALOG.		CFA 120 + BUS 16
30	F	5	AAS	ALOG.		CFA 200 (2º TMO)
31	F	28	AAS	ALOG.		CFA 120 + BUS 12
32	F	12	LMC	ALOG.		CFA 120 + BUS 16
33	M	11	AAS	ALOG.		CFA 200 + GAL (2º TMO)
34	M	21	LMA - M3	ALOG.		CFA 120 + BUS 12
35	F	8	AF	ALOG.		CFA 100
36	F	43	MIEL. MÚLTIPLO	ALOG.		CFA 120 + BUS 16 + MEL 140
37	M	17	AAS	ALOG.		CFA 200
38	M	21	LMA-M3	ALOG.		CFA 120 + BUS 16
39	M	32	AAS	ALOG.		CFA 120 + BUS 12
40	M	6	AF	ALOG.		CFA 100
41	M	36	LMC	ALOG.		CFA 120 + BUS 16
42	M	17	AAS	ALOG.		CFA 120 + BUS 16 + MEL 140 (2º TMO)
43	M	32	LMA	ALOG.		CFA 120 + BUS 16
44	F	14	AAS	ALOG.		CFA 200
45	M	37	LMC	ALOG.		CFA 120 + BUS 16
46	F	41	LMC	ALOG.		CFA 120 + BUS 16
47	F	18	LLA	ALOG.		CFA 120 + ICT 1440
48	F	34	LMC	ALOG.		CFA 120 + BUS 16
49	M	10	AAS	ALOG.		CFA 200
50	F	14	AAS	ALOG.	BPN (ESTAFILO C, ENTEROCOCCO, CMV+) CH+24+32	CFA 120 + BUS 12?
51	M	48	LMC	ALOG.		CFA 120 + BUS 16
52	F	11	AF	NP	FALHA DE PEGA + HEMORRAGIA IC	CFA 140 + GAL 150 + ICT 460
53	F	10	AAS	ALOG.		CFA 120 + BUS 12
54	M	32	LMC	ALOG.		CFA 120 + BUS 16
55	M	35	AAS	ALOG.		CFA 200
56	M	36	LMA	AUTOL.		BUS 16 + MEL 140
57	M	7	LMA -M5	NP		CFA 120 + ICT 1440+BOOST TEST 400
58	M	18	AA S + DISC. CONG.	ALOG.		CFA 200
59	M	29	MIELODISPLASIA	ALOG.		CFA 120 + BUS 16
60	F	28	LMC	ALOG.		CFA 120 + BUS 16
61	F	24	LLA	NP		CFA 120 + ICT 1320
62	M	22	LMC	ALOG.		CFA 120 + BUS 16
63	M	17	AAS	ALOG.	SEPSIS MRSA + VOD + HEMORRAGIA IC	CFA 120 + BUS 12
64	F	30	LMC	ALOG.		CFA 120 + BUS 16
65	F	22	LMC	ALOG.		CFA 120 + BUS 16
66	M	26	LMC	ALOG.		CFA 120 + BUS 16
67	M	11	AF	NP		CFA 40 + GAL 75 + ICT 460
68	F	6	AF	ALOG.		CFA 100
69	M	10	AAS	ALOG.		CFA 120 + BUS 12
70	F	12	AAS	ALOG.		CFA 200
71	M	48	LMC	ALOG.		CFA 120 + BUS 16
72	M	32	AAS	ALOG.		CFA 120 + BUS 12
73	M	9	LLA	NP		ICT 1440 + BOOST TEST
74	M	16	LMA	AUTOL.		BUS 16 + MEL 140
75	M	54	LMA	ALOG.		CFA 120 + BUS 16

AAS: anemia aplástica severa; LMC: leucemia mielóide crônica; AF: anemia de Fanconi; LMA: leucemia mielóide aguda; LLA: leucemia linfóide aguda; MIEL.: mieloma; DISC. CONG.: disceratose congênita; ALOG.: alôgênico consangüíneo; NP: alogênico não consangüíneo; AUTOL.: autogênico; SING.: singênico; SEPSIS: septicemia; SARA: síndrome da angústia respiratória do adulto; BPN: broncopneumonia; I. RESP. A. insuficiência respiratória aguda; DECH: doença do enxerto contra o hospedeiro; I.R.A.: insuficiência renal aguda; C -: coagulase negativo; IC: intra-craniano; VOD: doença veno-oclusiva; MRSA: *staphylococcus aureus* metilicina resistente; CFA: ciclofosfamida; BUS: bussulfan; ICT: irradiação corporal total; RXT: radioterapia regional; MEL: melfalan; GAL: globulina anti-linfocítica; TEST : testículos; BOOST: reforço

## 4.2 PERÍODO DE COLETA DE MATERIAL E DETECÇÃO DE HEMATÚRIA

Foram analisadas amostras de urina de 75 pacientes do período pré-transplante que apresentaram ou não hematúria. A primeira coleta da amostra de urina ocorreu em média de 2,3 dias no período pré-transplante (Tabela 7).

**TABELA 7 - PERÍODO DA COLETA DE URINA POR TIPO DE TMO NO PERÍODO PRE-TRANSPLANTE**

TIPO DE TMO	Nº. DE COLETAS	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIANA
Alogênico	59	2,5	<sup>(1)</sup> 2,4	0,0	8,0	2,0
Consangüíneo						
Alogênico não Consangüíneo	11	1,7	<sup>(1)</sup> 1,7	0,0	4,0	1,0
Autogênico	04	1,8	<sup>(1)</sup> 2,4	0,0	5,0	1,0
Singênico	01	-	-	0,0	-	-
TOTAL	75	2,3	<sup>(1)</sup> 2,3	0,0	8,0	2,0

(1) Desvio padrão muito elevado, recomenda-se utilizar a mediana.

No período pós-transplante foram coletadas 612 amostras de urina para análise pelo exame parcial de urina. Na Tabela 8 estão distribuídos esses resultados, com relação à detecção de hematúria nos diferentes meses do período pós-transplante. Demonstrou-se que, para o transplante alogênico consangüíneo, no 1º. mês pós-transplante, houve uma maior freqüência de hematúria (60,7%) ( $p < 0,0001$ ).

**TABELA 8 - Nº DE AMOSTRAS ANALISADAS COM RELAÇÃO À PRESENÇA DE HEMATÚRIA NOS MESES PÓS-TRANSPLANTE**

HEMATÚRIA	TIPO DE TRANSPLANTE												TOTAL
	ALOGÊNICO CONSANGÜÍNEO (n = 485)			ALOGÊNICO NÃO CONSANGÜÍNEO (n = 82)			AUTOGÊNICO (n = 36)			SINGÊNICO (n = 09)			
	1º MÊS	2º MÊS	3º MÊS	1º MÊS	2º MÊS	3º MÊS	1º MÊS	2º MÊS	3º MÊS	1º MÊS	2º MÊS	3º MÊS	
PRESENTE	34	11	11	06	03	02	01	-	-	-	-	-	68
AUSENTE	133	149	147	26	23	22	11	12	12	03	03	03	544

### 4.3 HEMATÚRIA EM PACIENTES DE TMO

Na Tabela 9 estão distribuídos os dados referentes à presença e intensidade de hematúria no período pré-transplante. Detectou-se hematúria em 11,9% dos pacientes submetidos a transplante alogênico consangüíneo e 9,1% dos alogênico não consangüíneos, porém apenas de grau leve e moderado. Em nenhuma das amostras foi isolado adenovírus.

**TABELA 9 - PRESENÇA E INTENSIDADE DE HEMATÚRIA POR TIPO DE TMO NO PERÍODO PRÉ-TRANSPLANTE**

ACHADOS LABORATORIAIS	ALOGÊNICO CONSANGÜÍNEO (n = 59)		ALOGÊNICO NÃO CONSANGÜÍNEO (n = 11)		AUTOGÊNICO (n = 04)		SINGÊNICO (n = 01)		TOTAL (n = 75)	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
HEMATÚRIA										
• Não	52	88,1	10	90,9	04	100,0	01	100,0	67	89,3
• Sim	07	11,9	01	9,1	-	-	-	-	08	10,7
• Grau I	06	10,2	01	9,1	-	-	-	-	07	9,4
• Grau II	01	1,7	-	-	-	-	-	-	01	1,3
• Grau III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
• Grau IV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

No período pós-transplante, dos 75 pacientes estudados 29 apresentaram hematúria. Observou-se uma maior freqüência de hematúria nos pacientes submetidos a transplante alogênico não consangüíneo (54,5%). De alguns pacientes foram coletadas mais de uma amostra de urina, num total de 68 (Tabela 10).

**TABELA 10 - FREQUENCIA, NÚMERO DE EPISÓDIOS DE HEMATÚRIA E URINAS COLETADAS POR TIPO DE TMO NO PERÍODO PÓS-TRANSPLANTE**

TIPO DE TMO	PÓS-TRANSPLANTE			
	Pacientes com hematúria / Total estudados	%	Nº. de episódios de hematúria	Urinas analisadas
Alogênico Consangüíneo	22 / 59	37,2	33	56
Alogênico não Consangüíneo	6 / 11	54,5	08	11
Autogênico	1 / 4	25,0	01	01
Singênico	0 / 1	0,0	0	-
TOTAL	29/75	38,6	42	68

Na Tabela 11, correlaciona-se as 68 urinas analisadas com a intensidade de hematúria. Observa-se que, no período pós-transplante, 89,7% das hematúrias foram de grau leve e moderado, e os episódios mais graves foram observados apenas nos pacientes do transplante alogênico consangüíneo.

**TABELA 11 - INTENSIDADE DE HEMATÚRIA POR TIPO DE TMO NO PERÍODO PÓS-TRANSPLANTE**

ACHADOS LABORATORIAIS	ALOGÊNICO CONSANGÜÍNEO (n = 56)		NÃO CONSANGÜÍNEO (n = 11)		AUTOGÊNICO (n = 01)		TOTAL (n = 68)	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
HEMATÚRIA								
• Sim	56	100,0	11	100,0	01	100,0	68	100,0
• Grau I	36	64,3	09	81,8	01	100,0	46	67,6
• Grau II	13	23,2	02	18,2	-	-	15	22,1
• Grau III	06	10,7	-	-	-	-	06	8,8
• Grau IV	01	1,8	-	-	-	-	01	1,5

#### 4.4 CULTURA, EIE E PCR PARA ADENOVÍRUS

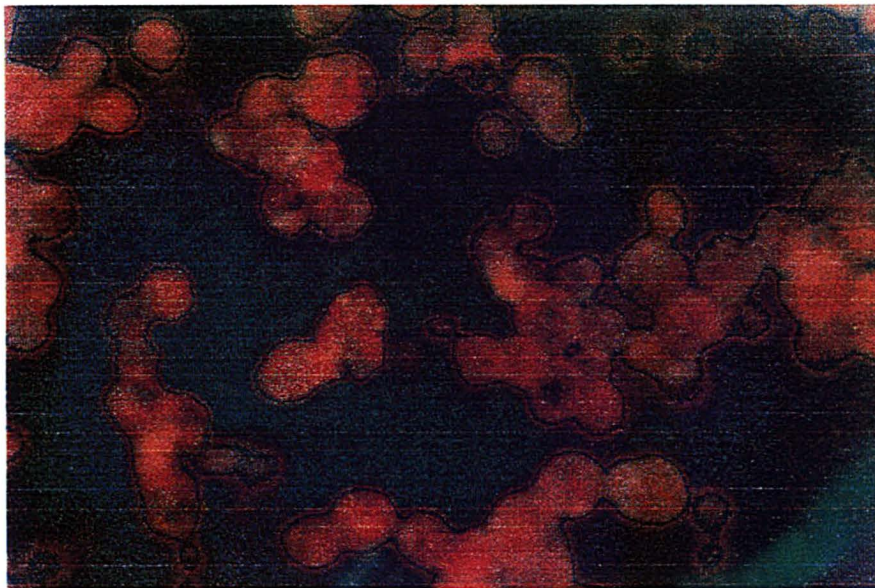
No período pré-transplante, adenovírus foi isolado na cultura de urina de 1/75 (1,3%) paciente, sendo que este não apresentava hematúria. No período pós-transplante, adenovírus foi isolado em 3 pacientes (10,3%) dos 29 que apresentaram cistite hemorrágica: **paciente 2** com quatro amostras positivas coletadas entre os dias +40 até +77; **paciente 8** com duas amostras positivas coletadas entre os dias +77 a +83 e **paciente 50** com 3 amostras positivas coletadas entre os dias +27 a +55. Estes apresentavam hematúria moderada e grave. Todos submeteram-se a transplante do tipo alogênico consangüíneo. Os pacientes 8 e 50 foram a óbito com múltiplas infecções, no período em que apresentavam CH (Tabela 12).

**TABELA 12 - ADENOVÍRUS ISOLADOS EM URINAS DOS PACIENTES COM E SEM HEMATÚRIA NO PERÍODO PRÉ E PÓS TRANSPLANTE**

PERÍODO DE TRANSPLANTE	COM HEMATÚRIA		SEM HEMATÚRIA		TOTAL	
	Com Ad	Sem Ad	Com Ad	Sem Ad	Urinas analisadas	Pacientes estudados
Pré	-	08	01	66	75	75
Pós	03	65	*	*	68	29

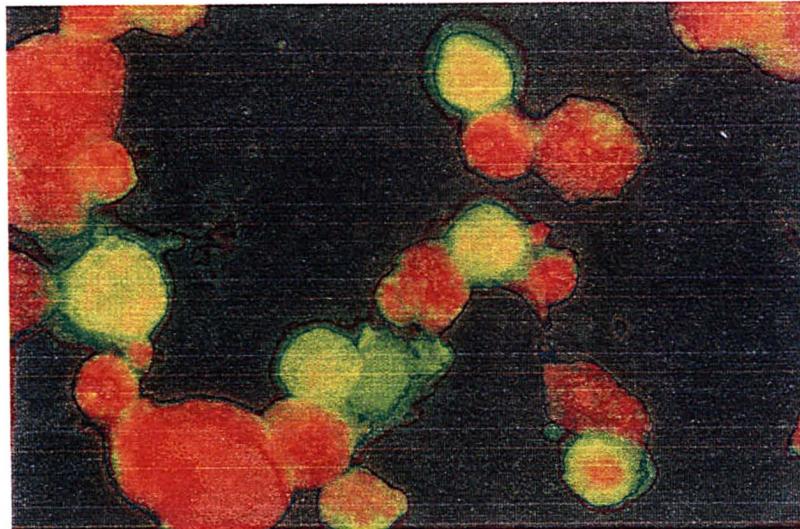
Comparação entre duas proporções  $z = 1,579 \rightarrow p = 0,114$ ; Não Significativo  
 Nota: Ad – adenovírus. \* = não coletado.

As culturas foram mantidas por um período de até 4 semanas, sendo realizado imunofluorescência indireta para detecção de adenovírus quando apresentassem efeito citopáticos ou antes de serem descartadas. Nas Figuras 4A e 4B observa-se o resultado da imunofluorescência indireta de uma cultura de urina.



**FIGURA 4A - IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA DE CÉLULAS HEp-2 NÃO INFECTADAS. CONTROLE NEGATIVO. 400X.**





**FIGURA 4B** - IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA DE CÉLULAS HEp-2 INOCULADAS COM URINA COM INCLUSÕES INTRANUCLEARES DE ADENOVÍRUS. 400X.

Na Tabela 13 estão os resultados das análises das urinas pelas técnicas de EIE, cultivo celular e PCR, de acordo com a presença de hematúria, no período pré-transplante. Comparando-se os resultados das diferentes metodologias de exames, observou-se que, para as amostras com e sem hematúria, não há diferença significativa entre os resultados reagente e não reagente do EIE e os resultados positivo e negativo da cultura. Em relação ao PCR, quando comparado com o EIE e cultura, nota-se uma diferença estatisticamente significativa entre os resultados, com uma maior proporção de exames positivos para o PCR.

**TABELA 13 - ACHADOS LABORATORIAIS E ESTATÍSTICOS DA ANÁLISE DAS URINAS NO PERÍODO PRÉ-TRANSPLANTE**

HEMATÚRIA	EIE			CULTURA		PCR		EIE X CULTURA	EIE X PCR	CULTURA X PCR
	R	NR	IND	P	N	P	N			
Com Hematúria	-	08	-	-	08	05	03	p = 0,7481	32,43	32,90
									p < 0,00001	p < 0,00001
Grau 1	-	07	-	-	07	05	02			
Grau 2	-	01	-	-	01		01			
Grau 3	-	-	-	-	-		-			
Grau 4	-	-	-	-	-		-			
Sem Hematúria	01	65	01	01	66	30	37	-	p = 0,0128	p = 0,0128
TOTAL	01	73	01	01	74	35	40	-		

NOTA: R: reagente; NR: não reagente; IND: indeterminado; P: positivo; N: negativo;

EIE X CULTURA (c/ hematúria) → Fisher; Não Significativo; EIE X CULTURA (s/ hematúria) → Não Aplicado; EIE X PCR (c/ hematúria) → Qui-Quadrado; Significativo; EIE X PCR (s/ hematúria) → Fisher. Significativo; CULTURA X PCR (c/ hematúria) → Qui-Quadrado; Significativo. CULTURA X PCR (s/ hematúria) → Fisher. Significativo;

Na Tabela 14 estão os achados laboratoriais correlacionados com a intensidade de hematúria. Observa-se que o isolamento do adenovírus ocorreu apenas nas amostras com maior intensidade de hematúria, enquanto os resultados do EIE e PCR foram positivos em todos os graus.

**TABELA 14 - ACHADOS LABORATORIAIS DAS ANÁLISES DAS URINAS DE ACORDO COM A INTENSIDADE DE HEMATÚRIA NO PERÍODO PÓS-TRANSPLANTE**

HEMATÚRIA	EIE			CULTURA		PCR	
	R	NR	IND	P	N	P	N
Grau 1	01	45	-	-	46	14	32
Grau 2	01	14	-	04	11	10	05
Grau 3	01	05	-	04	02	03	03
Grau 4	01	-	-	01	-	01	-
TOTAL	04	64	-	09	59	28	40

NOTA: R: reagente; NR: não reagente; IND: indeterminado; P: positivo; N: negativo.

Na Tabela 15 comparamos os resultados dos EIEs de amostra “concentrada” e “não concentrada”. Observou-se que o maior índice de concordância na amostra pelo método EIE foi obtido no resultado não reagente ( $p < 0,0001$ ). Não há diferença estatisticamente significativa entre os resultados das amostras “concentradas” e “não concentradas” para pesquisa de antígenos virais pelo método de EIE ( $p = 0,6546$ ).

**TABELA 15 - COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DE EIE DE AMOSTRA CONCENTRADA E NÃO CONCENTRADA**

EIE	AMOSTRA		CONCORDÂNCIA	
	Concentrada	Não Concentrada	Nº	%
Reagente	03	03	01	33,3
Não reagente	140	139	137	97,9
Indeterminado	-	01	-	-
<b>TOTAL</b>	<b>143</b>	<b>143</b>	<b>138</b>	<b>96,5</b>

Concentrada x Não Concentrada  $\rightarrow p = 0,6546$  ; Não Significativo;  
Índice de Concordância  $\rightarrow z = 4,464$ ;  $p < 0,0001$  ; Significativo.

Na Tabela 16 comparam-se os resultados das culturas de amostra “concentrada” e “não concentrada”. Observou-se que o maior índice de concordância na amostra foi obtido para o resultado negativo. Não há diferença estatisticamente significativa entre os resultados das amostras “concentradas” e “não concentradas” para o isolamento viral ( $p = 0,8076$ ).

**TABELA 16 - COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DE CULTURA DE AMOSTRA CONCENTRADA E NÃO CONCENTRADA**

CULTURA	AMOSTRA		CONCORDÂNCIA	
	Concentrada	Não Concentrada	Nº	%
Positivo	09	09	08	88,9
Negativo	134	134	133	99,3
<b>TOTAL</b>	<b>143</b>	<b>143</b>	<b>141</b>	<b>98,6</b>

Concentrada x Não Concentrada  $\rightarrow \chi^2_c = 0,06$ ;  $p = 0,8076$  ; Não Significativo;  
Índice de Concordância  $\rightarrow z = 1,123$ ;  $p = 0,261$  ; Significativo.

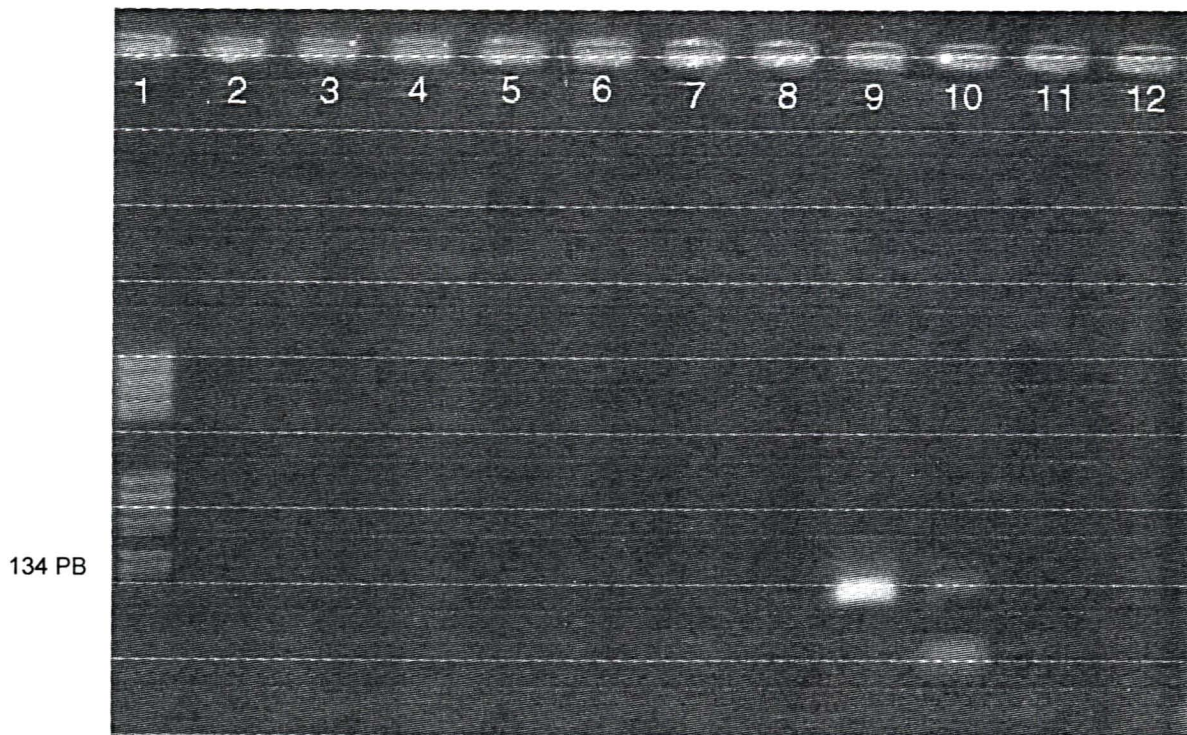
Quando se comparam os resultados de cultura e de EIE, Tabela 17, observa-se que o índice de concordância entre os dois métodos para o resultado negativo foi mais significativo ( $p < 0,0001$ ). Considerando-se a cultura como teste padrão-ouro, a sensibilidade do EIE foi de 30,0% e a de especificidade de 98,5% para a detecção de adenovírus em urina.

**TABELA 17 - COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS DE EIE E CULTURA**

RESULTADO	EIE	CULTURA	CONCORDÂNCIA	
			Nº	%
Positivo	05	10	03	30,0
Negativo	137	133	130	97,7
Indeterminado	01	-	-	-
TOTAL	143	143	133	93,0

ELISA x CULTURA  $\rightarrow \chi^2_c = 1,10$ ;  $p = 0,2950$ ; Não Significativo;  
Índice de Concordância  $\rightarrow z = 7,433$ ;  $p < 0,0001$ ; Significativo.

Na Tabela 18, comparando-se os resultados de PCR e cultura, observa-se uma taxa de concordância de 80,0% entre os resultados positivos. O índice de concordância entre os métodos PCR e cultura para o resultado negativo não foi significativo ( $p = 0,318$ ). A sensibilidade do teste PCR foi de 80,0%, e especificidade de 58,6%. Na Figura 5 demonstra-se o gel de algumas amostras clínicas submetidas à PCR.



**FIGURA 5** - ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DOS PRODUTOS DO DNA DO ADENOVÍRUS DAS AMOSTRAS AMPLIFICADAS PELA REAÇÃO DE PCR. LINHA 1: MARCADOR DE PESO MOLECULAR. LINHAS 2, 3, 4, 5, 6, 7 E 8: AMOSTRAS NEGATIVAS; LINHAS 9 E 10 AMOSTRAS POSITIVAS, LINHA 11 E 12: CONTROLE NEGATIVO.

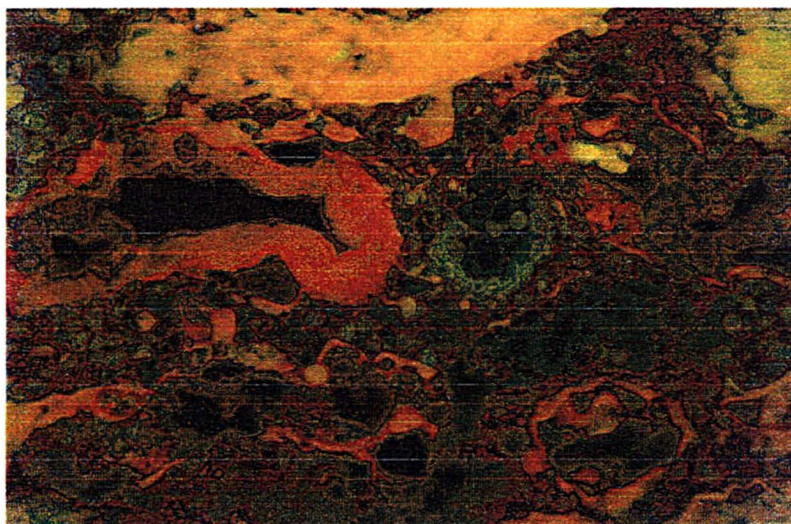
**TABELA 18** - COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS DE PCR E CULTURA

RESULTADO	PCR	CULTURA	CONCORDÂNCIA	
			Nº	%
Positivo	63	10	08	80,0
Negativo	80	133	78	58,6
TOTAL	143	143	86	60,1

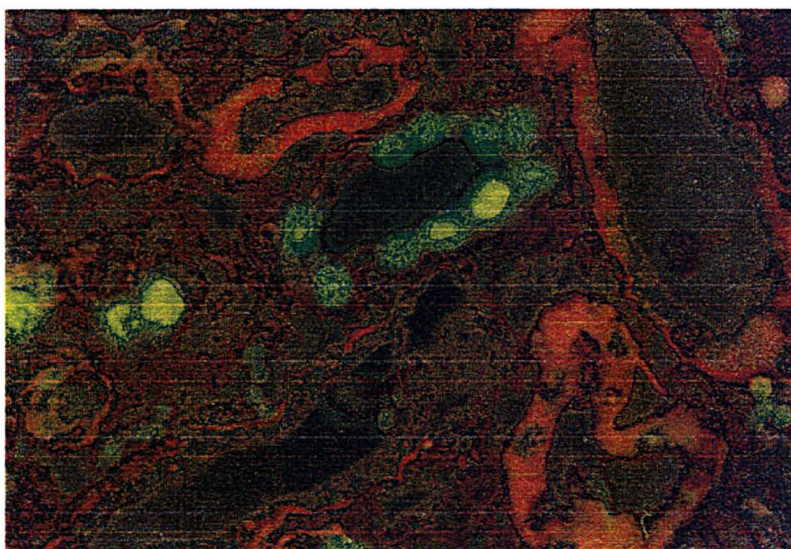
Índice de Concordância →  $z = 0,998$ ;  $p = 0,318$  ; Não significativo.

Na Tabela 19 estão os achados laboratoriais das análises de urina nos diferentes tipos de transplante, no período pós-transplante. Observa-se que, para o transplante alogênico, há uma maior chance de isolamento de adenovírus nas urinas com hematúria mais graves (12,4%) ( $p < 0,0001$ ).

A análise dos cortes de biopsia de pulmão, fígado e rins dos dois pacientes que evoluíram para o óbito, demonstrou a presença de grande número de células infectadas em túbulos renais (Figuras 6A e 6B). Não foi observada presença de antígenos virais nos cortes de pulmão e fígado.



**FIGURA 6A** - CONTROLE NEGATIVO DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA PARA DETECÇÃO DE ADENOVÍRUS EM TECIDO RENAL. PACIENTE 2. 400X.



**FIGURA 6B** - IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA PARA DETECÇÃO DE ANTÍGENO DE ADENOVÍRUS EM CÉLULAS TUBULARES DE TECIDO RENAL. PACIENTE 2. 400X.

**TABELA 19 – ACHADOS LABORATORIAIS POR TIPO DE TMO E INTENSIDADE DE HEMATÚRIA NO PERÍODO PÓS-TRANSPLANTE**

ACHADOS LABORATORIAIS	ALOGÊNICO CONSANGÜÍNEO (n = 56)								AUTOGÊNICO (n = 01)		ALOGÊNICO NÃO CONSANGÜÍNEO (n = 11)				TOTAL (n = 68)							
	Grau I	%	Grau II	%	Grau III	%	Grau IV	%	Grau I	%	Grau I	%	Grau II	%	Grau I	%	Grau II	%	Grau III	%	Grau IV	%
<b>EIE CONCENTRADO</b>																						
• Não Reagente	39	69,7	09	16,1	05	8,9	-	-	01	100,0	09	81,8	02	18,2	49	72,1	11	16,2	05	7,3	-	-
• Reagente	-	-	01	1,8	01	1,8	01	1,8	-	-	-	-	-	-	-	-	01	1,5	01	1,5	01	1,5
<b>EIE NÃO CONCENTRADO</b>																						
• Não Reagente	38	67,9	09	16,1	06	10,7	01	1,8	01	100,0	09	81,8	02	18,2	48	70,6	11	16,2	06	8,8	01	1,5
• Reagente	01	1,8	01	1,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	1,5	01	1,5	-	-	-	-
<b>CULTURA CONCENTRADA</b>																						
• Negativo	37	66,1	08	14,3	03	5,4	-	-	01	100,0	09	81,8	02	18,2	47	69,1	10	14,7	03	4,4	-	-
• Positivo	02	3,6	02	3,6	03	5,3	01	1,8	-	-	-	-	-	-	02	3,0	02	3,0	03	4,4	01	1,5
<b>CULTURA NÃO CONCENTRADA</b>																						
• Negativo	37	66,1	08	14,3	02	3,6	-	-	01	100,0	09	81,8	02	18,2	47	69,1	10	14,7	02	2,9	-	-
• Positivo	02	3,6	02	3,6	04	7,1	01	1,8	-	-	-	-	-	-	02	3,0	02	3,0	04	5,9	01	1,5
<b>PCR</b>																						
• Negativo	25	44,7	04	7,2	03	5,4	-	-	-	-	07	63,6	01	9,1	32	47,1	05	7,4	03	4,4	-	-
• Positivo	14	25,0	06	10,7	03	5,3	01	1,8	01	100,0	02	18,2	01	9,1	17	25,0	07	10,3	03	4,4	01	1,5

Alogênico  $\Rightarrow \chi^2_c = 31,50; \chi^2_{tab} = 10,83; p < 0,0001$  (para uma amostra)

## 5 DISCUSSÃO

Com a maior sobrevida dos pacientes transplantados, e o uso de imunossuppressores e antibióticos mais potentes, tem-se observado um crescente aumento de episódios de cistite hemorrágica nos serviços de TMO.

A intensidade de alguns desses episódios contribui para um maior tempo de internamento dos pacientes, expondo-os a situações de risco, como necessidade de múltiplas transfusões, uso de antibióticos de largo espectro, instilação vesical contínua, associados à utilização de diversos procedimentos com objetivos diagnósticos e terapêuticos. Esses dados justificam o maior número de pesquisas que têm sido descritas, na tentativa de definição etiológica laboratorial dessa doença.

Diversos podem ser os fatores associados à CH, porém, quando ela ocorre em uma fase tardia do transplante, os vírus são os mais comumente encontrados. Inicialmente, na urina de pacientes com CH, descreveu-se o isolamento de CMV, um dos primeiros vírus descritos como associados a essa doença. Posteriormente, relatou-se que a presença desse vírus na urina poderia ocorrer independente da doença vesical. (ARTHUR et al., 1986).

Concluem os autores que, sendo o CMV um agente relacionado à supressão da imunidade celular, poderia levar à superinfecção com outros agentes, que resultariam em CH. (ZALTZMAN et al., 1993). Concomitantemente, começou a ser observada uma maior frequência de detecção de outros agentes virais capazes de fazer doença vesical, como o poliomavírus BK e o adenovírus. (ARTHUR et al., 1986; AMBINDER et al., 1986; MIYAMURA et al., 1989; HIRAOKA et al., 1991).



As infecções pelo vírus BK são mais freqüentes e de evolução mais benigna. (ARTHUR et al., 1986). As infecções associadas aos adenovírus ocorrem com freqüência variável nos diferentes serviços, porém com maior gravidade e com possibilidade de evoluir para uma forma disseminada. (BLANKE et al., 1995).

Esses dados nos estimularam a procurar definir qual a freqüência da associação de adenovírus em nossa população de pacientes submetidos a TMO que apresentem CH, e qual a contribuição das diferentes metodologias disponíveis em nosso meio para a sua detecção.

Em nosso Serviço, previamente ao TMO, a hematúria microscópica e moderada ocorreu em torno de 10% dos pacientes, independente do tipo de transplante a que foram submetidos, sendo provavelmente decorrente de fatores pertinentes à doença de base presente, assim como toxicidade às drogas utilizadas.

No período pós-transplante, foram detectados 42 episódios de hematúria em 38,6% (29/75) dos pacientes acompanhados, provavelmente a maioria devido à toxicidade do condicionamento e plaquetopenia que sobrevêm nessa fase. Muitos destes episódios poderiam corresponder na realidade a hematúria de origem glomerular, que ocorrem com freqüência nesses pacientes por toxicidade a drogas ou por infecções graves, que são observados comumente no período pós-transplante. Na maioria dos casos, as hematúrias ocorreram no primeiro mês, e foram transitórias. Os episódios tardios e mais prolongados de hematúria (duas ou mais coletas subseqüentes) ocorreram em 9,3% (7/75) dos pacientes.

Ao comparar esses achados aos da literatura médica, observa-se que é relatada uma freqüência variável de CH nos diferentes serviços. ÖST et al., (1987), descreveram uma incidência de CH tardia em 16% dos pacientes submetidos a TMO alogênico. SENCER et al., (1993), publicaram revisão demonstrando que a CH

ocorre com uma incidência que varia de 7% a 68% nos diferentes serviços de TMO, pode apresentar-se em qualquer fase pós-transplante, ser transitória ou de longa duração. Esse foi um estudo amplo que demonstrou também que a CH na população de TMO é de origem multifatorial. Nos casos precoces, ela é decorrente do regime de condicionamento, no entanto, as de início tardio têm outros fatores, como associação com adenovírus na urina e transplante tipo alogênico.

Dos 29 pacientes de nosso Serviço que apresentaram CH, adenovírus foi isolado em dois, a partir do segundo mês, e em outro paciente, a partir do terceiro mês após o TMO, com uma incidência de 10,3%. Todos apresentaram cistite hemorrágica grave e submeteram-se a TMO tipo alogênico consangüíneo. Isolou-se adenovírus, também, em um paciente no período pré-transplante que estava assintomático e não apresentou CH no pós-transplante.

Os estudos mais amplos que visam a detecção de agentes etiológicos virais na CH tardia em pacientes de TMO têm claramente demonstrado a associação do poliomavírus BK e do adenovírus com essa doença.

ARTHUR et al., (1986), monitorou prospectivamente a excreção urinária do vírus BK, realizando ensaios imunoenzimáticos de sobrenadante urinário e hibridização de ADN de células urinárias. Observaram que a CH de longa duração (> 7 dias) estava associada à virúria pelo poliomavírus BK. A doença ocorreu quatro vezes mais freqüentemente em pacientes que excretavam esse vírus, que foi detectado em 55% das urinas durante episódios de cistite contra 8 a 11 % das urinas sem evidência de cistite. Nesse estudo foram detectados com menor freqüência outros vírus como adenovírus, CMV, vírus herpes simplex e vírus JC.

APPERLEY et al., (1987), publicaram relato de três casos de CH de início tardio associada à excreção urinária do vírus BK após o TMO. Demonstraram a

presença desse agente no interior das células uroteliais, reforçando o seu envolvimento na etiologia da CH tardia após o TMO.

AMBINDER et al., (1986), publicaram acompanhamento retrospectivo para detecção de adenovírus tipo 11 em urina, com o objetivo de determinar a associação da eliminação viral com CH em pacientes submetidos a TMO, no período de 1977 a 1984. Foram acompanhados 502 pacientes. Isolou-se adenovírus em urina de 10 deles, sendo tipo 11 em cinco, (quatro com CH e um sem CH), tipo 30 em dois com CH, tipo 1 em dois, sem CH, e tipo 5 em um paciente, também sem CH. Observou-se uma incidência de CH em 100 casos (20%).

Segundo esses autores, o reconhecimento de uma origem viral da CH pode explicar a sua ocorrência em uma fase tardia, independente das intervenções terapêuticas realizadas para a prevenção dessa doença associada ao uso da ciclofosfamida. Como se observa, é possível o isolamento de adenovírus na ausência de CH, como ocorreu em um caso de nossa série. Este pode apenas corresponder a um agente que estivesse sendo eliminado pela via urinária. Com a sua tipagem, poderíamos definir melhor o risco de apresentar CH.

SHIELDS et al., (1985), publicaram revisão de 1051 pacientes acompanhados para detecção de infecção por adenovírus no período de 6 anos. Obtiveram isolamento desse agente em 4,9% (51/1051). CH foi uma manifestação clínica presente em 1,5% (16/1051) dos pacientes. Isolou-se adenovírus do subgênero B na urina de 13 pacientes, oito com CH. Em dois destes foram detectadas, em tecido renal, alterações histológicas de infecção por adenovírus, consistindo de inclusões virais associadas a necrose epitelial tubular, inflamação intersticial e hemorragia. Em revisão de diversos estudos, MURPHY et al., (1993),

relataram que a incidência de CH associada ao adenovírus varia de 2 a 16% nos diferentes serviços.

RUSSEL et al., (1994), estudaram a frequência de CH em uma população pediátrica submetida a TMO, no período de 1988 a 1991, quando 65 crianças foram avaliadas. Em 11 (17%) delas ocorreu um total de 19 episódios de CH tardia, com a identificação de um agente infeccioso em 89% dos episódios (17/19). Poliomavírus foram isolados em 63,2% (12/19) das urinas, seguidos por bactérias 15,8% (3/19), adenovírus 10,5%(2/19) e CMV em 5,3% (1/19).

Mais recentemente, outros autores, como FLOMEMBERG et al., (1994), têm demonstrado um aumento na incidência de infecções por adenovírus em pacientes submetidos a TMO. Publicaram revisão retrospectiva de infecções por adenovírus em 201 receptores de medula óssea num período de quatro anos, nos quais observaram uma positividade de 20,9% (42/201), sendo 8,4% (17/201) em urina. A incidência de doença por adenovírus em todos os pacientes foi de 6,5% (13/201), com uma mortalidade de 3,5% (7/201), tendo a CH ocorrido em apenas 1 deles.

Esse estudo demonstrou uma diferença entre a população pediátrica e adulta, pois houve uma maior incidência de infecções por adenovírus em pacientes pediátricos (31,3% vs. 13,6%) e também, o início da infecção viral foi mais cedo nas crianças (< 30 dias) do que nos adultos (>90 dias). Afirmam os autores que essa incidência alta pode ser decorrente da maior sobrevivência dos pacientes, com o uso de antibióticos mais potentes, e o controle das infecções por CMV com as metodologias para diagnóstico e tratamento precoce.

No estudo realizado em nosso Serviço, a mediana de idade foi de 21 anos. Os pacientes pediátricos foram excluídos, pela dificuldade de coleta periódica de

urina sem contaminação. Além disso, as coletas foram interrompidas no dia +100. Esses fatores podem ter contribuído para uma possível taxa de isolamento inferior à realidade de nossa população.

Relata-se também que fatores raciais podem influenciar na etiologia viral da CH. Desde o relato inicial de NUMAZAKI et al., em 1968 e em 1973, correlacionando o adenovírus tipo 11 com a CH em crianças imunocompetentes, têm sido publicados diversos estudos no Ocidente, encontrando uma frequência inferior aos afirmados pelos autores acima (MUFSON et al., 1971; MUFSON et al., 1976). O mesmo pôde ser observado no estudo realizado por MIYAMURA et al., em 1989, no Japão, em que se acompanharam 50 pacientes que receberam TMO alogênico, e avaliou-se a presença de CH e excreção urinária de adenovírus tipo 11. A CH ocorreu em 24% (12/50) dos pacientes, tendo sido isolado adenovírus no início da CH em oito dos 12 pacientes (66%), uma frequência muito superior à observada pelos autores Ocidentais.

No estudo realizado em nosso Serviço, observou-se que os episódios de hematúria mais severos foram detectados apenas nos transplantes alogênicos consangüíneos. Apesar da alta frequência de hematúria nos pacientes de transplante alogênico não consangüíneo, adenovírus não foi isolado em nenhum dos casos, provavelmente devido ao pequeno número de pacientes acompanhados e à alta mortalidade na fase inicial do transplante. À medida que aumenta a sobrevivência desses, há uma maior chance de complicações virais.

LANDRY et al., (1987), BLANKE et al., (1995), em estudos sobre o desenvolvimento de novos patógenos em TMO, relatam um aumento na frequência de infecções graves por adenovírus. Segundo esses autores, isso pode ser devido ao maior número de pacientes com regimes de condicionamento mais intensos, e

também às atuais terapias efetivas realizadas para outros agentes então comuns, como o varicela zoster, herpes simplex e CMV

Em nossos pacientes com cistite hemorrágica grave, observou-se uma relação entre a excreção de adenovírus com o tempo e intensidade da hematúria, tendo sido detectada maior taxa de isolamento em pacientes com hematúria mais grave e prolongada. O mesmo foi observado por ARTHUR et al., 1986; AMBINDER et al., 1986; APPERLEY et al., 1987; MIYAMURA et al., 1989; MURPHY et al., 1993; RUSSEL et al., 1994 e LONDERGAN et al., 1994.

Adenovírus foram isolados da urina dos pacientes até a data do óbito. O paciente que sobreviveu teve negatização da cultura com a resolução da cistite hemorrágica. Isso pode reforçar a correlação entre isolamento de adenovírus em urina e cistite hemorrágica.

O isolamento do adenovírus em cultivos celulares é considerado o método mais sensível e específico para o diagnóstico laboratorial desse agente (HIERHOLZER, 1995). Diversos sistemas celulares apresentam uma sensibilidade variável ao seu isolamento. As linhagens mais sensíveis ao adenovírus são a HeLa (carcinoma de cérvix), HEK (rim embrionário humano) e WI38 (fibroblasto fetal humano), no entanto essas são incomuns e de difícil manutenção em laboratórios (MCSWIGGAN et al., 1975). A linhagem HEP-2 (carcinoma de nasofaringe) é contínua, de fácil manutenção *in vitro* e também sensível à detecção de adenovírus (HIERHOLZER, 1989). Foi utilizada nos isolamentos realizados nos estudos de MUFSON et al., 1971; SHIELDS et al., 1985; FLOMEMBERG et al., 1994 e também em nossa monitorização.

Com relação aos resultados da cultura, não se observou diferença estatisticamente significativa entre os resultados das amostras "concentradas" e

“não concentradas”, podendo optar-se por apenas um tipo de processamento para essa técnica. Esperava-se que as amostras “concentradas” obtivessem maior número de resultados positivos, devido à concentração de partículas virais durante a centrifugação, porém, mesmo em urina não concentrada, observou-se que há uma quantidade suficiente de partículas virais, não alterando a sensibilidade do método. No presente estudo, todas as amostras de urina foram mantidas, após o processamento, à temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ . Apesar de o adenovírus ser um agente que tolera bem alguns ciclos de congelamento e degelo sem perder a infectividade, NUMAZAKI et al., (1973), observaram que há uma menor taxa de isolamento de adenovírus após o congelamento das amostras de urina.

Realizou-se a IFI de todas as culturas, com ou sem ECP, para confirmar o isolamento viral. As amostras positivas para adenovírus apresentavam intensa fluorescência citoplasmática e nuclear das células infectadas. (KAJON, 1991).

A cultura celular para o isolamento viral mantém-se como a técnica “padrão-ouro”, com a qual todos os novos métodos devem ser comparados (WHITE e FENNER, 1994). Diversos estudos têm demonstrado que, para o adenovírus, a cultura celular apresenta uma sensibilidade superior às metodologias de pesquisa direta de antígenos, como IFI, AL e EIE. (GRANDIEN et al., 1985, LEHTOMAKI et al., 1986). No entanto, apresenta algumas desvantagens, como necessidade de equipamento adequado, pessoal treinado e disponível para a sua execução e um tempo prolongado de incubação (até quatro semanas). (HIERHOLZER, 1995).

A técnica de EIE, nos trabalhos publicados sobre CH, tem sido empregada apenas como teste confirmatório de resultado de cultura. É realizada com o sobrenadante desta, que contém grande quantidade de antígenos e partículas virais. (AMBINDER et al., 1986; HIERHOLZER, 1995).

Em amostras fecais de pacientes com diarreia, a técnica de EIE para a detecção de adenovírus entérico tem mostrado resultados exuberantes, principalmente por serem esses agentes de difícil isolamento. (PEREIRA et al., 1985).

Entre as vantagens do EIE são citados a sensibilidade, facilidade de execução, possibilidade de automação, uso de soluções padronizadas e, principalmente, a rapidez de liberação do resultado, permitindo uma intervenção terapêutica mais precoce (HIERHOLZER, 1995). Não há relatos na literatura, do emprego dessa técnica para a detecção direta de adenovírus em urina. No entanto, observando as vantagens desse ensaio, associado ao fato dele permitir detectar adenovírus de diferentes tipos, optou-se por realizar neste estudo a análise da urina por esse método.

O EIE utilizado neste estudo foi desenvolvido para a detecção de adenovírus em fezes de pacientes com diarreia. Nesse ensaio, os soros hiperimunes de cabra captam na fase sólida o antígeno viral de grupo do adenovírus. Inicialmente, empregou-se as diluições 1:4 e 1:12 das amostras de urina, conforme padronizado para as fezes. Quando houve uma cultura de urina positiva para adenovírus, testou-se novamente a amostra na procura da melhor diluição. Constatou-se que houve melhor correlação culturas/EIE quando a urina pura e diluída 1:2 era utilizada. Foram analisadas novamente todas as amostras até então estudadas, e empregou-se esta diluição em todo o ensaio restante.

Observou-se uma sensibilidade muito baixa dos EIE (30%), quando comparados com os resultados positivos das culturas, semelhante ao que é citado por outros autores quando investigam adenovírus em amostras clínicas, como secreção respiratória. Essa baixa sensibilidade ocorre, provavelmente, pela



pequena quantidade de partículas virais na amostra, tornando-se não detectável pelas técnicas de pesquisa de antígenos e, ao mesmo tempo, por serem agentes com alta virulência, são mais facilmente recuperados em cultivo celular. (WIGAND et al., 1983; LEHTOMAKI et al., 1986). O teste apresentou uma alta especificidade (98,5%), como descrito por PEREIRA et al., em 1985. Também observou-se uma concordância muito baixa para os resultados reagentes dos EIE para amostras “concentradas” e “não concentradas” (33,3%), sugerindo que, para maior positividade do teste, deve-se realizar o ensaio com as amostras submetidas aos dois processamentos.

A PCR constitui-se no maior avanço da Biologia Molecular desde o advento da tecnologia do ADN recombinante. Essa técnica permite que uma única cópia de qualquer seqüência gênica seja amplificada *in vitro* a no mínimo um milhão de vezes em poucas horas. Esse segmento de ADN, amplificado de um pequeno número de vírions ou células infectadas, pode ser prontamente identificado utilizando-se sondas marcadas em ensaios de hibridização.

Sua maior contribuição está na detecção de infecções latentes e detecção de vírus com isolamento não satisfatório, por exemplo, em espécimens com vírus inativado por estoque prolongado ou transporte inadequado. Contudo, a alta sensibilidade dessa técnica está aliada à análise de situações novas e inesperadas, como a detecção de ADN de papilomavírus carcinogênico em uma alta proporção de mulheres saudáveis, a maioria das quais nunca desenvolveram carcinoma de cérvix. (WHITE e FENNER, 1991).

Com o intuito de aumentar a sensibilidade das técnicas laboratoriais, para se observar a freqüência de adenovírus na urina, realizou-se PCR em todas as amostras analisadas neste estudo. Confirmou-se a alta sensibilidade dessa técnica,

porém houve uma baixa especificidade (59%), pois essa reação foi positiva em muitos pacientes independente da presença de hematúria no período pré-transplante, e houve pouca correlação com os resultados da cultura.

A alta positividade da PCR, quando comparada com a cultura, tem sido relatada em análises de amostras de líquido cefalorraquiano em pacientes com meningite viral (TORFASON et al., 1998) e em fezes de pacientes com ou sem doença diarreica. (ALLARD et al., 1992). No estudo realizado neste Serviço, procurou-se descartar a possibilidade de contaminação da técnica, repetindo-se todos os exames, sem a adição de controle positivo. O grande número de amostras positivas pode ter ocorrido devido à característica da própria técnica, que é capaz de detectar mesmo partes incompletas de um ADN que pode estar sendo eliminado por essa via.

Uma alternativa para maior correlação desse exame com a etiologia da cistite hemorrágica seria a pesquisa direcionada dos sorotipos mais comumente envolvidos com essa doença, realizando-se neles um segundo PCR *nested* com a utilização de oligonucleotídeos que amplificam seqüências específicas dos adenovírus do subgrupo B1 (Ad11, 34 e 35), que são os mais freqüentemente envolvidos com a CH. Esse procedimento foi sugerido por ALLARD et al., (1992), para investigar adenovírus entérico em fezes de adultos e crianças, visto também serem as fezes um meio de eliminação de agentes não correlacionados com a diarreia. Entretanto, uma limitação para o seu emprego em CH ocorre devido ao fato de os adenovírus que mais freqüentemente estão relacionados a essa doença ainda não estarem completamente seqüenciados. Outra forma de identificação dos adenovírus pertencentes ao subgênero B1, e que possibilitaria confirmar a presença

desses agentes, seria a tipagem com enzimas de restrição dos vírus isolados. (WADELL, 1984).

A detecção da virúria por isolamento, EIE ou PCR, é um fator sugestivo do envolvimento causal do adenovírus com a CH. Contudo, somente a demonstração de alterações citopatológicas compatíveis com inclusão viral ou a visualização da partícula viral no interior da célula urotelial por meio de avaliação citológica ou microscopia eletrônica confirmam essa correlação, como sugerido por COLEMAN et al. em 1977 e HIRAOKA et al., em 1991. Realizamos algumas análises de sedimento urinário corado pelo método de Papanicolaou, para detectar alterações celulares morfológicas e inclusões intracelulares compatíveis com infecção viral. Os pacientes submetidos a TMO, porém, recebem uma série de medicações anti-neoplásicas e imunossupressoras, que provocam inúmeras alterações celulares por citotoxicidade, impossibilitando essa análise. As amostras de urina deste trabalho não foram fixadas para análise por microscopia eletrônica, sendo as células lisadas quando mantidas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , o que impossibilitou essa avaliação.

Neste estudo, as lâminas dos cortes de tecido renal, hepático e pulmonar foram analisadas pelo Serviço de Anatomia Patológica. Não foram observadas alterações morfológicas sugestivas de infecção viral. A IH, para obter uma maior sensibilidade, deve ser realizada preferencialmente sobre os cortes de tecido que apresentem alterações histopatológicas compatíveis com inclusões virais. Realizou-se, entretanto, a análise imunohistoquímica nos dois pacientes que foram a óbito e demonstrou-se a presença de antígenos virais nas células tubulares renais, confirmando assim o comprometimento do aparelho urinário pelo adenovírus.

O comprometimento renal pelo adenovírus em pacientes de TMO com CH por esse agente tem sido descrito por alguns autores. SHIELDS et al. (1985)

observaram o comprometimento renal em dois dos cinco pacientes com CH por adenovírus. LILLES et al. (1993) descreveram um caso de nefrite intersticial progressiva, grave, secundária ao adenovírus 11 em paciente submetido a TMO. ITO et al., em 1991, publicaram revisão de 10 autópsias de nefrite tubular intersticial induzida por adenovírus em pacientes de TMO. Em alguns deles, infecção histologicamente confirmada foi observada também na bexiga e/ou próstata. Mais da metade desses pacientes apresentaram CH tardia. Não foi observado comprometimento glomerular.

Segundo esses autores, a presença de CH e a localização de infecção invasiva apenas em órgãos urogenitais sugerem que a infecção renal ocorra mais provavelmente por via ascendente do que por via hematogênica. YUZAWA et al., em 1993, relataram o desenvolvimento de insuficiência renal aguda e lesões tubulares distais degenerativas relacionadas ao adenovírus, associada a depósitos de complexos imunes ao longo da membrana basal destes. Esses achados são consistentes com a interpretação de que os adenovírus são responsáveis não apenas pela CH, mas também pelo dano renal.

As análises imunohistoquímicas realizadas em tecido pulmonar e hepático neste trabalho não demonstraram presença de antígenos do adenovírus, sugerindo que os óbitos não foram relacionados com doença disseminada por esse agente. Porém, os pacientes com CH e adenovírus na urina que evoluíram para óbito apresentavam disfunção renal importante e evidências de múltiplas infecções, o que tem sido descrito por alguns autores, sugerindo que as infecções virais atuariam como imunomoduladores, tornando o paciente mais susceptível a superinfecções. (ZALTZMAN et al., 1994). BLANKE et al. (1995) observaram também que em

pacientes com depleção de células T, a infecção por adenovírus de tracto urinário foi preditivo de maior mortalidade.

A CH é uma doença freqüente em pacientes submetidos a TMO, e contribui para um acentuado aumento no tempo de internação, sofrimento do paciente e maior mortalidade. Devem ser aplicados todos os esforços possíveis com o intuito de um diagnóstico etiológico precoce, permitindo assim uma intervenção imediata e, conseqüentemente, uma maior sobrevida.

## 6 CONCLUSÕES

Adenovírus foram isolados na urina de 3 (10,3%) pacientes dos 29 que apresentaram CH após o TMO. Estes apresentavam hematúria grave e de início tardio (após o primeiro mês de transplante).

O isolamento de adenovírus pela técnica de cultivo celular apresentou maior correlação com a intensidade de hematúria do que as técnicas de EIE e PCR.

O comprometimento renal viral em pacientes com CH por adenovírus foi demonstrada pela técnica de imunohistoquímica. Não foi detectado o antígeno viral nas análise de cortes de pulmão e fígado dos pacientes que evoluíram para o óbito.

A hematúria ocorreu em 38,6% dos pacientes submetidos a TMO, sendo na maioria das vezes de grau leve a moderado.

A hematúria ocorreu em 54,5% dos pacientes submetidos a TMO alogênico não consangüíneo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADENOVIRUSES, <http://www-micro.msb.le.ac.uk/335/Adenoviruses.html>, 1997.

ADRIAN, TH.; BEST, B.; WIGAND, R. A proposal for naming adenovirus genome types, exemplified by adenovirus type 6. **Journal of General Virology**, Cambridge, v.66, p.2685-2691, 1985 a.

ADRIAN, TH.; WIGAND, R.; HIRHOLZER, J.C. Immunological and biochemical characterization of human adenoviruses from subgenus B . II. DNA restriction analysis. **Archives of Virology**, Vienna, v.84, p.79-89, 1985 b.

ADRIAN, TH.; WADELL, G.; HIRHOLZER, J.C.; WIGAND, R. DNA restriction analysis of adenovirus prototypes 1 to 41. **Archives of Virology**, Vienna, v. 91, p. 277-290, 1986.

ADRIAN, TH.; SASSINEK, J.; WIGAND, R. Genome type analysis of 480 isolates of adenovirus types 1, 2 and 5. **Archives of Virology**, Vienna, v.112, p.235-248, 1990.

ALLARD, A.; GIRONES, R.; JUTO, P.; WADELL, G. Polymerase chain reaction for detection of adenoviruses in stool samples. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v.28, p.2659-2667, Dec. 1990.

ALLARD, A.; ALBINSSON, B.; WADELL, G. Detection of adenoviruses in stools from healthy persons and patients with diarrhea by two-step polymerase chain reaction. **Journal of Medical Virology**, New York, v.37, p.149-157, 1992.

AMBINDER, R.F.; BURNS, W.; FORMAN, M.; CHARACHE, P.; ARTHUR, R.; BESCHORNER, W.; SANTOS, G.; SARAL, R. Hemorrhagic cystitis associated with adenovirus infection in bone marrow transplantation. **Archives of Internal Medicine**, Chicago, v.146, p.1400-1401, July 1986.

APPERLEY, J.F.; RICE, S.J.; BISHOP, J.A.; CHIA, Y.C.; KRAUSZ, T.; GARDNER, S.D.; GOLDMAN, J.M. Late-onset hemorrhagic cystitis associated with urinary excretion of polyomaviruses after bone marrow transplantation. **Transplantation**, Baltimore, v.43, n.1, p.108-112, 1987.

ARTHUR, R.R.; SHAH, K.V.; BAUST, S.J.; SANTOS, G.W.; SARAL, R. Association of BK viruria with hemorrhagic cystitis in recipients of bone marrow transplantation. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v.315, n.4, p.230-236, July 1986.

- AZZI, A.; FANCI, R.; BOSI, A.; CIAPPI, S.; ZAKRZEWSKA, K.; SANTIS, R.; LASZLO, D.; GUIDI, S.; SACCARDI, R.; VANNUCCHI, A. M.; LONGO, G.; ROSSI-FERRINI, P. Monitoring of polyomavirus BK viruria in bone marrow transplantation patients by DNA hybridization assay and by polymerase chain reaction: an approach to assess the relationship between BK viruria and hemorrhagic cystitis. **Bone Marrow Transplantation**, London, v.14, p.235-240, 1994.
- BARTH, O.M.; MAJEROWICZ, S.; MENASCE, L.P.; SCHATZMAYR, H.G. Detection of viral infection by immunofluorescence in formalin-fixed tissues, pretreated with trypsin. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.83, n.2, p.207-212, Abr./June 1988.
- BAUM, S. G. Adenoviruses. In: GORBACH, S.L.; BARTLETT, J.G.; BLACKLOW, N.R. **Infectious diseases**, Philadelphia : W. B. Saunders, 1992, p.1663-1667.
- BAUM, S. G. Adenovirus. In: MANDELL, G. L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. **Principles and practice of infectious diseases**. 4.ed. New York : Churchill Livingstone, 1997. CD Rom.
- BECROFT, D.M.O. Bronchiolitis obliterans, bronchiectasis, and other sequelae of adenovirus type 21 infection in young children. **Journal of Clinical Pathology**, London, v.24, p.72-82, 1971.
- BELL, S. D.; MCCOMB, D.E.; MURRAY, E.S.; CHANG, R.S-M. Adenoviruses isolated from Saudi Arabia. I. Epidemiologic features. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Lawrence, v. 8, p. 492-500, July 1959.
- BELL, S. D.; ROTA, T.R.; MCCOMB, D.E. Adenoviruses isolated from Saudi-Arabia. III. Six new serotypes. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Lawrence, v.9, p. 523-526, Sept. 1960.
- BERGE, T.O.; ENGLAND, B.; MAURIS, C.; SHUEY, H. E.; LENNETTE, H. E. Etiology of acute respiratory disease among service personnel at Fort Ord, California. **American Journal of Hygiene**, Baltimore, v.62, p.283-94, Nov. 1955.
- BERTHEAU, P.; PARQUET, N.; FERCHAL, F.; GLUCKMAN, E.; BROCHERIOU, C. Fulminant adenovirus hepatitis after allogeneic bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, London, v.17, p. 295-298, 1996.
- BLACKLOW, N.R.; HOGGAN, M.D.; AUSTIN, J.B.; ROWE, W.P. Observations on two new adenovirus serotype with unusual antigenic characteristics. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 90, p. 501-505, Dec. 1969.



- BLANKE, C.; CLARK, C.; BROUN, R.; TRICOT, G.; CUNNINGHAM, I.; CORNETTA, K.; HEDDERMAN, A.; HROMAS, R. Evolving pathogens in allogeneic bone marrow transplantation: increased fatal adenoviral infections. **The American Journal of Medicine**, Newton, v.99, p.326-328, Sept. 1995.
- BOURSNELL, M.E.G.; MAUTNER, V. Recombination in adenovirus: crossover sites in intertypic recombinants are located in regions of homology. **Virology**, New York, v.112, p.198-209, 1981.
- BROWN, M. Laboratory identification of adenoviruses associated with gastroenteritis in Canada from 1983 to 1986. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 28, p.1525-1529, July 1990.
- BROWN, M.; SHAMI, Y.; ZYWULKO, M.; SINGH-NAZ, N.; MIDDLETON, P.J. Time-resolved immunoassay for enteric adenoviruses using the europium chelator 4,7-bis(chlorosulphophenyl)-1,10-phenanthroline-2,9-dicarboxylic acid. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 28, p. 1398-1402, June 1990.
- CASSANO, W.F. Intravenous ribavirin therapy for adenovirus after allogeneic bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, London, v.7, p.247-248, 1991.
- CEPKO, C.L; WHETSTONE, C.A.; SHARP, P.A.. Adenovirus hexon monoclonal antibody that is group specific and potentially useful as a diagnostic reagent. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v.17, p.360-364, Feb 1983.
- CHANDLER, F.W.; GORELKIN, L. Immunofluorescence staining of adenovirus in fixed tissue pretreated with trypsin. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v.17, p. 371-373, Feb 1983.
- CHARLES, A.K.; CAUL, E. O.; PORTER, H. J.; OAKHILL, A. Fatal Adenovirus 32 Infection in a Bone Marrow Transplant Recipient. **Journal of Clinical Pathology**, London, v.48, p.779-781, 1995.
- COLEMAN, D. V.; RUSSEL, W. J. I.; HODGSON, J.; PE, T., MOWBRAY, J. F. Human papovavirus in Papanicolaou smears of urinary sediment detected by transmission electron microscopy.; **Journal of Clinical Pathology**, London, v.30, p.1015-1020, 1977.
- DE JONG, J.C.; WIGAND, R.; WADELL, G.; KELLER, D.; MUZERIE, C.J.; WERMENBOL, A.G.; SCHAAP, G.J.P. Adenovirus 37: identification and characterization of a medically important new adenovirus type of subgroup D. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 7, p. 105-118, 1981.

- DE JONG, J.C.; WIGAND, R.; KIDD, A.H.; WADELL, G.; KAPSENBERG, J.G.; MUZERIE, C.J.; WERMENBOL, A.G.; FIRTZLAFF, R-G. Candidate adenoviruses 40 and 41: fastidious adenoviruses from human infant stool. **Journal of Medical Virology**, New York, v. 11, p. 215-231, 1983.
- DE JONG, J.C.; WIGAND, R.; ADRIAN, T.; HIERHOLZER, J.C.; KAPSENBERG, J.G.; MUZERIE, C.J.; WERMENBOL, A.G. Adenovirus 38: a new human adenovirus species of subgenus D. **Intervirology**, Basel, v. 22, p. 164-9, 1984.
- DEVRIES, C.R.; FREIHA, F.S. Hemorrhagic cystitis: a review. **The Journal of Urology**, Baltimore, v.143, p.1 - 9, Jan 1990.
- ENDERS, J.F.; BELL, F.A.; DINGLE, J.H.; FRANCIS, T.JR; HILLEMANN, M.R.; HUEBNER, R.J.; PAYNE, A.M.M. "Adenoviruses": group name proposed for new respiratory-tract viruses. **Science**, Washington DC, v.124, p.119-120, 1956.
- ESPY, M.J.; HIERHOLZER, J.C.; SMITH, T.F. The effect of centrifugation on the rapid detection of adenovirus in shell vials. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia, v.88, p.358-360, Sept. 1987.
- FIFE, K.H.; ASHLEY, R.; SHIELDS, F.; SALTER, D.; MEYERS, J.D.; COREY, L. Comparison of neutralization and DNA restriction enzyme methods for typing clinical isolates of human adenovirus. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 22, p. 95-100, July 1985.
- FLOMENBERG, P.R.; CHEN, M.; HORWITZ, M.S. Characterization of a major histocompatibility complex class I antigen-binding glycoprotein from adenovirus type 35, atType associated with immunocompromised hosts. **Journal of Virology**, Washington DC, v.61, n.12, p.3665-3671, Dec 1987.
- FLOMENBERG, P.; BABBITT, J.; DROBYSKI, W. R.; ASH, R. C.; CARRIGAN, D. R.; SEDMAK, G. V.; MCAULIFFE, T.; CAMITTA, B.; HOROWITZ, M. M.; BUNIN, N.; CASPER, J. T. Increasing incidence of adenovirus disease in bone marrow transplant recipients. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v.169, p.775-781, 1994.
- GARY, G.W., JR; HIERHOLZER, J.C.; BLACK, R.E. Characteristics of noncultivable adenoviruses associated with diarrhea in infants: a new subgroup of human adenoviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v.10, p.96-103, July 1979.
- GOMES, S.A.; NASCIMENTO, J.P.; SIQUEIRA, M.M.; KRAWCZUK, M.M.; PEREIRA, H.G., RUSSEL, W.C. In situ hybridization with biotinylated DNA probes: a rapid diagnostic test for adenovirus upper respiratory infections. **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.12, p.105-110, 1985.

- GRANDIEN, M.; PETTERSSON, C-A.; GARDNER, P.S.; LINDE, A.; STANTON, A. Rapid viral diagnosis of acute respiratory infections: comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and the immunofluorescence technique for detection of viral antigens in naso pharyngeal secretions. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v.22, p.757-760, Nov. 1985.
- GREEN, M.; DAESCH, G.E. Biochemical studies on adenovirus multiplication. II. Kinetics of nucleic acid and protein synthesis in suspension cultures. **Virology**, New York, v. 13, p.169-76, 1961.
- HAMMOND, G.W.; MAUTHE, G.; JOSHUA; J. et al. . Examination of uncommon clinical isolations of human adenoviruses by restriction endonucleases analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 21, n.4, p.611-16, 1985.
- HIERHOLZER, J.C.; BARME, M. Counterimmuno-electrophoresis with adenovirus type-specific anti-hemagglutinin sera as a rapid diagnostic method. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.112, p.987-995, Mar. 1974.
- HIERHOLZER, J.C et al.. New human adenovirus isolated from a renal transplant recipient: description and characterization of candidate type 34. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 1, p. 366-76, 1975.
- HIERHOLZER, J.C.; KEMP, M.C.; GARY, W.JR.; SPENCER, H.C. New human adenovirus associated with respiratory illness: candidate adenovirus type 39. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC ,v. 16, p. 15-21, July 1982.
- HIERHOLZER, J.C.; JOHANSSON, K.H.; ANDERSON, L.J.; TSOU, C.J.; HALONEN, P.E. Comparison of time-resolved fluoroimmunoassay with monoclonal capture biotinylated detector enzyme immunoassay for adenovirus antigen detection. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 25, p. 1662-1667, Sept. 1987.
- HIERHOLZER, J.C.; WIGAND, R.; ANDERSON, L.J.; ADRIAN, T.; GOLD, J.W.M. Adenovirus from AIDS patients: plethora of serotypes and description of new 5 serotypes of subgenus D (types 45-47). **Journal of Infectious diseases**, Chicago, v. 158, p.804-813, Oct. 1988.
- HIERHOLZER, J.C. Adenoviruses in the Immunocompromised Host. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington DC, v. 5, n.3, p. 262-74, July 1992.
- HIERHOLZER, J.C.; HALONEN, P.E.; DAHLEN, P.O.; BINGHAM, P.G.; MCDONOUGH, M.M. Detection of adenovirus in clinical specimens by polymerase chain reaction and liquid-phase hybridization quantitated by time-resolved fluorometry. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v.31, p.1886-1891, July 1993.

- HIERHOLZER, J. C.; Adenoviruses. In: LENNETTE, E.H.; LENNETTE, D.A.; LENNETTE, E.T. **Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections**. 7.ed. Washington, DC: APHA - American Public Health Association, 1995, p.169-188.
- HILLEMANN, M. R.; WERNER, J. H. Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness. **Proceedings of the Society for Experimental Biology Medicine**, Baltimore, v.85, p.183-8, 1954.
- HIRAOKA, A.; TESHIMA, H.; MITSUI, H.; OHSUGA, Y.; NAKAGAWA, M.; NAKAMURA, H.; SHIBATA, H.; MASAOKA, T.; ISHIGAMI, S. Ureteric obstruction after allogeneic bone marrow transplantation: an unusual complication. **Bone Marrow Transplantation**, London, v.4, p.449-451, 1989.
- HIRAOKA, A.; ISHIKAWA, H.J.; KITAYAMA, H.; YAMAGAMI, T.; TESHIMA, H.; NAKAMURA, H.; SHIBATA, H.; MASAOKA, T.; ISHIGAMI, S.; TAGUCHI, F. Hemorrhagic cystitis after bone marrow transplantation: importance of a thin sectioning technic on urinary sediments for diagnostic. **Bone Marrow Transplantation**, London, v.7, n.1, p.107-111, 1991.
- HORWITZ, M.S.; Adenoviridae and their replication. In: FIELDS, N.; KNIPE, D.M. **Fundamental virology**. 2.ed., New York: Raven Press, 1990. p. 771-816.
- HORWITZ, M.S.; Adenoviruses. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Virology**, Philadelphia: Raven Publisher, 1996. p.2149-2171.
- HROMAS, R.; CORNETTA, K.; SROUR, E.; BLANKE, C.; BROUN, E.R.. Donor leukocyte infusion as therapy of life-threatening adenoviral infections after T<sub>h</sub> cell-depleted bone marrow transplantation. **Blood**, Duluth, v.84, n.5, p.1689-1690, Sept. 1994a.
- HROMAS, R.; CLARK, C.; BLANKE, C.; TRICOT, G.; CORNETTA, K.; HEDDERMAN, A.; BROUN, E. R. Failure of ribavirin to clear adenovirus infections in T cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, London, v.14, n.4, p.663-4. Oct. 1994b.
- HUEBNER, R. J.; ROWE, W. P.; WARD, T. G.; PARROT, R. H.; BELL, J. A. Adenoidal pharyngeal-conjunctival agents: a newly recognized group of common viruses of the respiratory system. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v.251, p. 1077-86, Dec. 1954.
- HUKKANEN, V.; HAARALA, M.; NURMI, M.; KLEMI, P. KIIHOLMA, P. Viruses and interstitial cytitis: adenovirus genomes cannot be demonstrated in urinary bladder biopsies. **Urological Research**, Berlin, v.24, n.4, p.235-238, 1996.

- ITO, M.; HIRABAYASHI, N.; UNO, Y.; NAKAYAMA, A.; ASAI, J. Necrotizing Tubulointerstitial Nephritis Associated with Adenovirus Infection. **Human Pathology**, Philadelphia, v. 22, n.12, p.1225-1231, Dec. 1991.
- JAWETZ, E.; KIMURA, S. J.; NICHOLAS, A. N.; THYGESON, P.; HANNA, L. New type of APC virus from epidemic keratoconjunctivitis. **Science**, Washington DC, v.122, p.1190-1, Dec. 1955.
- JURADO, M.; NAVARRO, J. M.; HERNÁNDEZ, J.; MOLINA, M. A.; DEPABLOS, J. M. Adenovirus-associated hemorrhagic cystitis after bone marrow transplantation successfully treated with intravenous ribavirin. **Bone Marrow Transplantation**, London, v.99, n.3, p.326-8, Sept. 1995.
- KAJON, A.E. Familia adenoviridae. In: CARBALLAL, G.; OUBIÑA, J.R. **Virologia medica**. Buenos Aires : El Ateneo, p.273-280, 1991.
- KAJON, A.E.; SUÁREZ, M.V.; AVENDAÑO, L.F.; HORTAL, M.; WADELL, G. Genome type analysis of South American adenoviruses of subgenus C collected over a 7-year period. **Archives of Virology**, Vienna, v.132, p.29-35, 1993.
- KAJON, A.E.; M.; WADELL, G. Genome analysis of South American adenoviruses strain of serotype 7 collected over a 7-year period. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v.32, p.2321-2323, Sept. 1994.
- KAJON, A.E. **Molecular epidemiological studies of adenoviruses associated with severe and fatal respiratory infections of children in the south cone of South America**. Umea, Sweden, 1995. Tese (Doutorado) - Departament of Virology, Umea University.
- KIBRICK, S.; MELENDEZ, L.; ENDERS, J. F. Clinical associations of enteric viruses with particular reference to agents exhibiting properties of the ECHO group. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.67, p.311-25, Apr. 1957.
- KITABAYASHI, A.; HIROKAWA, M.; KUROKI, J.; NISHINARI, T.; NIITSU, H.; MIURA, M.B. Successful vidarabine therapy for adenovirus type 11-associated acute hemorrhagic cystitis after allogeneic bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, London, v.14, p.853-854, 1994.
- KOGA, S.; SHINDO, K. MATSUYA, F.; MATSUYA, F.; HORI, T.; KANDA, S.; KANETAKE, H. Acute hemorrhagic cystitis caused by adenovirus following renal transplantation: review of literature. **The Journal of Urology**, Baltimore, v.149, p.838-839, Apr. 1993.

- KRAJDEN, M.; BROWN, M.; PETRASEK, A.; MIDDLETON, P.J. Clinical features of adenovirus enteritis: a review of 127 cases. **Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v.9, p.636-641, 1990.
- LANDRY, M.L.; FONG, C.K.Y.; NEDDERMANN, K.; SOLOMON, L.; HSIUNG, G.D. Disseminated adenovirus infection in an immunocompromised host. **The American Journal of Medicine**, Newton, v. 83, p. 555-559, Sept. 1987.
- LASZLO, D.; BOSI, A.; GUIDI, S.; SACCARDI, R.; VANNUCCHI, A.M.; LOMBARDINI, L.; LONGO, G.; FANCI, R.; AZZI, A.; DE SANTIS, R.; FERRINI, P.R. Prostaglandin E2 bladder instillation for the treatment of hemorrhagic cystitis after allogeneic bone marrow transplantation. **Haematologica**, Roma, v.80, p.421-425, Sept./Oct. 1995.
- LEHTOMAKI, K.; JULKUNEN, I.; SANDELIN, K.; SALONEN, J.; VIRTANEN, M.; RANKI, M.; HOVI, T. Rapid Diagnosis of respiratory adenovirus infection in young adult men. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 24, p. 108-111, July 1986.
- LEVY, J.; WODELL, R.A.; AUGUST, C.S.; BAYEVER, E. Adenovirus-related hemophagocytic syndrome after bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, London, v.6, p.349-352, 1990.
- LI, Q-G, **Molecular epidemiology and genetic variability of certain human adenoviruses**. Umea, Sweden, 1988. Tese (Doutorado) - Departament of Virology, Umea University.
- LI, Q-G.; HAMBRAEUS, J.; WADELL. Genetic relationship between thirteen genome types of adenovirus 11, 34, and 35 with different tropisms. **Intervirology**, Basel, v.32, p.338-350, 1991.
- LILES, W. C.; CUSHING, H.; HOLT, S.; BRYAN, C.; HACKMAN, R. C. Severe adenoviral nephritis following bone marrow transplantation: successful treatment with intravenous ribavirin. **Bone Marrow Transplantation**, London, v.12, p.409-412, 1993.
- LJUNGMAN, P.; GLEAVES, C.A.; MEYERS, J.D. Respiratory virus infection in immunocompromised patients. **Bone Marrow Transplantation**, London, v.4, p.35-40, 1989.
- LONDERGAN, T.A ; WALZAK, M.P. Hemorrhagic cystitis due to adenovirus infection following bone marrow transplantation. **The Journal of Urology**, Baltimore, v.151, p.1013-1014, Apr. 1994.

- MAHAFZAH, A.M.; LANDRY, M.L. Evaluation of immunofluorescent reagents, centrifugation, and conventional cultures for the diagnosis of adenovirus infection. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, New York, v.12, p.407-411, 1989.
- MATSUSE, T.; MATSUI, H.; SHU, C-Y.; NAGASE, T.; WAKABAYASHI, T.; MORI, S.; INOUE, S.; FUKUCHI, Y.; ORIMO, H. Adenovirus pulmonary infections identified by PCR and in situ hybridization in bone marrow transplant recipients. **Journal of Clinical Pathology**, London, v.47, p.973-977, 1994.
- MEZEY, E.; HUNYADY, B. Immunohistochemical Protocols. [Http://intramural.nimh.nih.gov/lcmr/snge/Protocols/IHH/immuno.html](http://intramural.nimh.nih.gov/lcmr/snge/Protocols/IHH/immuno.html). p.1-7, 1998.
- McDONOUGH, M.; KEW, O.; HIERHOLZER, J. PCR detection of human adenoviruses. In: PERSING, D. H.; SMITH, T. F.; TENOVER, F. C.; WHITE, T. J. **Diagnostic molecular microbiology: principles and applications**. Washington, DC: American Society of Microbiology, 1993. p.389-393.
- McSWIGGAN, D.A.; DAROUGAR, S.; RAHMAN, A.F.M.S.; GIBSON, J.A. Comparison of the sensitivity of human embryo kidney cells, HeLa cells and WI38 cells for the primary isolation of viruses from eye. **Journal of Clinical Pathology**, London, v.28, p. 410-413, 1975.
- MIYAMURA, K.; TAKEYAMA, K.; KOJIMA, S.; MINAMI, S; MORISHIMA, Y.; KODERA, Y. Hemorrhagic cystitis associated with urinary excretion of adenovirus type 11 following allogeneic bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, London, v.4, p.433-435, 1989.
- MORAES, M.T.B. Caracterização genômica de adenovírus sorotipo 7 isolados no Brasil de pacientes com infecção respiratória aguda durante o período de 1980-1991. Rio de Janeiro, 1992. Tese (Doutorado) - Departamento de Virologia da Fundação Oswaldo Cruz.
- MORRIS, D.J.; CORBITT, G.; BAILEY, A.S.; NEWBOULD, M.; SMITH, E.; PICTON, S.; STEVENS, R.F. Fatal disseminated adenovirus type 2 infection following bone marrow transplantation for Hurler's syndrome: a primary infection. **Journal of Infection**, London, v.26, p.181-184, Mar. 1993.
- MUFSON, M.A ; ZOLLAR, L.M.; MANKAD, V.; MANALO, D. Adenovirus infections in acute hemorrhagic cystitis. A study in 25 children. **The American Journal of Disease Children**, v.121, p.281-, 1971.

- MUFSON, M.A ;BELSHE, R.B. A Review of adenoviruses in the etiology of acute hemorrhagic cystitis. **The Journal of Urology**, Baltimore, v.115, p.191-194, Feb. 1976.
- MURPHY, G.F.; WOOD, D.P.; MCROBERTS, J.W.; HENSLEE-DOWNEY, P. J. Adenovirus-associated hemorrhagic cystitis treated with intravenous ribavirin. **The Journal of Urology**, Baltimore, v.149, p.565-566, 1993.
- MURRAY, E. S. et al.. Agents recovered from acute conjunctivitis cases in Saudi Arabia. **American Journal of Ophthalmology**, Chicago, v. 43, p. 32, 1957.
- NIEL, C.; MORAES, M.T.B.; MISTCHENKO, A.S.; LEITE, J.P.G., GOMES, S.A. Restriction site mapping of four genome types of adenovirus types 3 and 7 isolated in South America. **Journal of Medical Virology**, New York, v.33, p.123-127, 1991.
- NUMAZAKI, Y.; SHIGETA, S.; KUMASAKA, T.; MIYAZAWA, T.; YAMANAKA, M.; YANO, N.; TAKAY, S.; ISHIDA, N. Acute hemorrhagic cystitis in children. Isolation of adenovirus type 11. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 278, p. 700-, 1968.
- NUMAZAKI, Y.; KUMASAKA, T.; YANO,N.; YAMANAKA, M.; MIYAZAWA, T.; TAKAY, S.; ISHIDA, N. Further study of acute hemorrhagic cystitis due to adenovirus type 11. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 289, p. 344-347, Aug. 1973.
- ÖST, L.; LÖNNQVIST, B.; ERIKSSON, L.; LJUNGMAN, P., RINGDEN, O. Hemorrhagic cystitis - a manifestation of graft versus host disease? **Bone Marrow Transplantation**, London, v.2, p.19-25, 1987.
- PEREIRA, M. S.; PEREIRA, H.G.; CLARKE, S.K.R. Human adenovirus type 31: a new serotype with oncogenic properties. **Lancet**, London, v.1, p.21-3, Jan. 1965.
- PEREIRA, H.G.; AZEREDO, R.S.; LEITE, J.P.G.; ANDRADE, Z.P.; CASTRO, L. A combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA). **Journal of Virological Methods**, Amsterdam, v.10, p.21-28, 1985.
- ROSEN, L.; BARON, S.; BELL, J.A. Four newly recognized adenoviruses. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Baltimore, v. 107, p. 437-7, 1961.
- ROSEN, L.; HOVIS, J.F.; BELL, J.A. Further observation on typing adenoviruses and a description of two possible additional serotypes. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Baltimore, v. 110, p. 710-3, 1962.



- ROSMAN, F.C.; MISTCHENKO, A.S.; LADENHEIN, H.S.; NASCIMENTO, J.P., OUTANI, H.N.; MADI, K.; LENZI, H.L. Acute and chronic human adenovirus pneumonia: cellular and extracellular matrix components. **Pediatric Pathology & Laboratory Medicine**, Bristol, v.16, p.521-541, 1996.
- ROWE, H. P.; HUEBNER, R.J.; GILMORE, L.K.; PARROT, R.H.; WARD, T.G. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Baltimore, v.84, p.570-573, 1953.
- ROWE, H. P.; HARTLEY, J.W.; HUEBNER, R.J. Additional serotypes of the APC virus group. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Baltimore, v. 91, p. 260-262, 1956.
- ROWE, H. P.; HARTLEY, J.W.; HUEBNER, R.J. Serotype composition of the adenovirus group. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Baltimore, v. 97, p. 465-70, 1958.
- RUSSEL, S. J.; VOWELS, M. R.; VALE, T. Hemorrhagic cystitis in pediatric bone marrow transplant patients: an association with infective agents, GVHD and prior cyclophosphamide. **Bone Marrow Transplantation**, London, v.13, p.533-539, 1994.
- SANEKATA, T. TANIGUCHI, K.; DEMURA, M.; FUJINAGA, K. Detection of adenovirus type 41 in stool samples by a latex agglutination method. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 127, p. 235-239, 1990.
- SARKKINEN, H.K.; HALONEN, P.E.; ARSTILA, P.P., SALMI, A.A. Detection of respiratory syncytial, parainfluenza type 2, and adenovirus antigens by radioimmunoassay and enzyme immunoassay on nasopharyngeal specimens from children with acute respiratory disease. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v.13, p.258-265, Feb. 1981.
- SCHNURR, D.; DONDERO, M.G. Two new candidates adenovirus serotypes. **Intervirology**, Basel, v.36, p. 79-83, 1993.
- SENCER, S.F.; HAAKE, R.J.; WEISDORF, D.J. Hemorrhagic cystitis after bone marrow transplantation. **Transplantation**, Baltimore, v.56, p.875-879, Oct. 1993.
- SERFAS, M. Basic immunohistochemistry Protocol. [Http://icar.us.uic.edu/~azathoth/ihc.html](http://icar.us.uic.edu/~azathoth/ihc.html). p.1-3, 1998.

- SEVERINSSON, L.; MARTENS, I.; PETERSON, P.A. Differential association between two human MHC class I antigens and an adenoviral glycoprotein. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v.137, p.1003-1009, Aug. 1986.
- SHIELDS, A.F.; HACKMAN, R.C.; FIFE, K.H.; COREY, L. MEYERS, J.D. Adenovirus infections in patients undergoing bone-marrow transplantation. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 312, p.529-533, Feb. 1985.
- SINGH-NAZ, N.; ROGRIGUEZ, W.J.; KIDD, A.H.; BRANDT, C.D. Monoclonal antibody enzyme-linked immunoabsorbent assay for specific identification and typing of subgroup F adenoviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v.26, p.297-300, Feb. 1988.
- STALDER, H.; HIERHOLZER, J.C.; OXMAN, M.N. New human adenovirus (candidate adenovirus type 35) causing fatal disseminated infection in a renal transplant recipient. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v.6, p.257-65, Sept. 1977.
- TAKIFF, H.E.; SELDLIN, M.; KRAUSE, P.; ROONEY, J.; BRANDT, C.; RODRIGUEZ, W.; YOLKEN, R.; STRAUS, S.E. Detection of enteric adenoviruses by dot-blot hybridization using a molecularly cloned viral DNA probe. **Journal of Medical Virology**, New York, v.16, p.107-118, Jun. 1985.
- TORFASON, E.G.; GUÔNADÓTTIR, S.; ELEFSEN, S.; EINARSDÓTTIR, B. Polymerase chain reaction for detection of epidemics of adenoviral central nervous system infections. <http://www.peace.is/~quasido/EGT/aths.htm>.
- TRENTIN, J.J.; YABE, Y.; TAYLOR, G.. The quest for human cancer viruses. **Science**, Washington DC, v.137, p.835-49, Jul.-Sept. 1962.
- VAN DER VEEN, J.; KOK, G. Isolation and typing of adenoviruses recovered from military recruits with acute respiratory disease in the Netherlands. **The American Journal of Hygiene**, v. 65, p. 119-29, Mar. 1957.
- VOLLER, A.; BARTLETT, A.; BIDWELL, D.E. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. **Journal of Clinical Pathology**, London, v.31, p.507-520, 1978.
- WADELL, G.; HAMMARSKJÖLD, M-L, WINBERG, G.; VARSANYI, T.M.; SUNDELL, G. Genetic variability of adenoviruses. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.354, p.16-42, 1980.
- WADELL, G. Molecular epidemiology of human adenoviruses. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, Berlin, v.110, p.191-220, 1984.

- WADELL, G.; COONEY, M.K.; LINHARES, A.C.; SILVA, L.; KENNETT, M.L.; KONO, R.; GUI-FANG, R.; LINDMAN, K.; NASCIMENTO, J.P.; SCHOUB, B.D.; SMITH, C.D. Molecular epidemiology of adenoviruses: global distribution of adenovirus 7 genomes types. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v.21, p.403-408, Mar. 1985.
- WASSERMAN, R.; AUGUST, C.S.; PLOTKIN, S.A. Viral infections in pediatric bone marrow transplant patients. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v.7(2), p.109-115, feb, 1988.
- WEBB, D.H.; SHIELDS, A.F.; FIFE, K.H. Genomic variation of adenovirus type 5 isolates recovered from bone marrow transplant recipients. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v.25, n.2, p.305-308, feb. 1987.
- WHITE, D.O.; FENNER, F.J.; Adenoviridae. In: WHITE, D.O.; FENNER, F.J. **Medical Virology**. 4.ed. San Diego : Academic Press, 1994. p.306-315.
- WIGAND, R.; GELDERBLOM, H.; WADELL, G. New human adenovirus (candidate adenovirus type 36), a novel member of subgroup D. **Archives of Virology**, Vienna, v. 64, p. 225-33, 1980.
- WIGAND, R.; BARTHA, A.; DREIZIN, R.S.; ESCHE, H.; GINSBERG, H.S.; GREEN, M.; HIERHOLZER, J.C.; KALTER, S.S., MCFERRAN, J.B. Adenoviridae: second report. **Intervirology**, Basel, v.18, p. 169-76, 1982.
- WIGAND, R.; BAUMEISTER, H.G.; MAASS, G.; KÜHN, J.; HAMMER, H.J. Isolation and identification of enteric adenoviruses. **Journal of Medical Virology**, New York, v.11, p. 233-240, 1983.
- WIGAND, R.; ADRIAN, TH.; BRICOUT, F. A new human adenovirus of subgenus D: candidate adenovirus type 42. **Archives of Virology**, Vienna, v. 94, p. 283-286, 1987.
- YAGISAWA, T.; TAKAHASHI, K.; YAMAGUCHI, Y.; TERAOKA, S.; HORITA, S.; TOMA, H.; AGISHI, T.; OTA, K. Adenovirus induced nephropathy in kidney transplant recipients. **Transplantation Proceedings**, Norwalk, v. 21, n.1, p.2097-2099, Feb, 1989.
- YUZAKA, Y.; AOI, N.; FUKATSU, A et al.. Acute renal failure and degenerative tubular lesions associated with in situ formation of adenovirus immune complexes in a patients with allogeneic bone marrow transplantation. **Transplantation**, Baltimore, v. 55, p.67-72, Jan. 1993.

ZALTZMAN, S. J.; HONEY, J. D'A.; STRUTHERS, N.W. Adenovirus-induced hemorrhagic cystitis in association with cytomegalovirus Infection in Renal Allograft Recipients. **Transplantation**, Baltimore, v.57, n.9, p.1404-1405, 1994.