

EDUARDO SALUSTINO FARO

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO HERPESVIRUS HUMANO
TIPO 6 (HHV-6)
EM CRIANÇAS RECÉM-NASCIDAS E SUAS RESPECTIVAS MÃES.**

EDUARDO SALUSTINO FARO

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO HERPESVIRUS HUMANO
TIPO 6 (HHV-6)
EM CRIANÇAS RECÉM-NASCIDAS E SUAS RESPECTIVAS MÃES.**

Tese (Doutorado) apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2008

EDUARDO SALUSTINO FARO

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO HERPESVIRUS HUMANO
TIPO 6 (HHV-6)
EM CRIANÇAS RECÉM-NASCIDAS E SUAS RESPECTIVAS MÃES.**

Tese (Doutorado) apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan / IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Edison Luis Durigon

São Paulo
2008

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Salustino, Eduardo Faro.

Epidemiologia molecular do herpesvirus humano tipo 6 (HHV-6) em crianças recém nascidas e suas respectivas mães / Eduardo Salustino Faro. -- São Paulo, 2007.

Orientador: Edison Luiz Durigon.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia EP/IPT/ICB/Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Virologia.

Versão do título para o inglês: Molecular epidemiology of the human herpesvirus type 6 (HHV-6) in newborn babies and their mothers.

Descritores: 1. Herpesvirus 6 humano 2. Recém-nascido 3. Transmissão 4. Parturiente I. Durigon, Edison Luiz II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

ICB/SBIB015/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Eduardo Salustino Faro.

Título da Tese: Epidemiologia molecular do herpesvirus humano tipo 6 (HHV-6) em crianças recém nascidas e suas respectivas mães.

Orientador(a): Edison Luiz Durigon.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, fonte de inspiração
e exemplo, que nunca me deixaram
fraquejar.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por não ter deixado fraquejar nas horas de solidão e falta de paciência, iluminando sempre os meus caminhos;

Ao meu amigo Edison Durigon, por ter confiado esta tarefa tão árdua que é uma pós-graduação; pelos momentos de conversas hipnóticas.

Aos meus familiares, que mesmo em outros estados, interagiram bastante. Fazendo consolidar o nome FAMÍLIA, dando o apoio fundamental em todas as horas.

A Andréa Lima Leal, cúmplice, sempre presente para auxiliar e apoiar durante as longas noites perdidas, escrevendo, corrigindo, imprimindo... até mesmo de longe, ajudando muito... abrandando os meus sentimentos...

Aos meus colegas: Cláudia Filoni, Miguel, Carol (Caroleixam), Adélia, Lília Mara, César Dinóla, Felipe (Felipeixam), Danibruna, Thereza, Juliana, Silvana, Angélica, Tatí Ommetto, Ariane, Hildener, Patrícia Bosso, Danila, Larissa Cuba, Leila, Pri Comone, César Filho, Maria Luíza Barbora, Viviane Botosso);

À tropa de elite: Dyana, Lilian, Jansen, Thomazelli, Maués, Larissa e Cláudia.

Aos colegas do ICB (Ju Marinheiro, Dani Carvalho, Jozelma (Jô), Patrícia Gasperini, Manuela, Misael, Fernanda, Veridiana, Cassiano, Ricardo, Cintia, Claudionor, Karina, Patrícia Garrafa, Luis e Tamura;

A Giovana que me levou para este "mundo" USP;

A minha família paulista, comandada por Tia/Mãe Maria Antônia;

Ao meu amigo, irmão e sócio de república Ciro, pelos bons momentos de desabafo.

Ao pessoal da secretaria da Biotec: Eliane, Fábria e Marcos.

A turma do ICB-II: "Seu" José Sergipano, chefiando a turma da sala de lavagem; A Jacinta, o Zezinho, a Anamaria, Naide e Alice; Ao pessoal da portaria e da manutenção; Ao Manezinho, patrimônio histórico do ICB II;

Ao Ricardo Gurgel, meu mentor sergipano, ao qual confiou o trabalho árduo e prazeroso de iniciar o funcionamento do laboratório de Biologia Molecular em Aracaju;

*Ao corpo médico do Hospital Santa Izabel nas pessoas da Dras. e colega
Daniela Góes e Cláudia Valéria;*

Ao Dr. Saulo Passos pelo apoio em Franco da Rocha.

Ao “anjos” da Biblioteca do ICB: Eva e Tereza.

“Nunca é tarde para você ser o que poderia ter sido.”

WINSTON CHURCHILL

RESUMO

SALUSTINO, E. F. **Epidemiologia molecular do Herpesvirus Humano tipo (HHV-6) em crianças recém-nascidas e suas respectivas mães**. 2008, 63 fls., Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

A infecção primária com o herpesvirus 6 humano (HHV-6) pode resultar no exantema súbito (roseola infantum), uma doença febril comum na infância. Tem sido descrito como causa da encefalite e recorrentes complicações. Investigações soropidemiológicas mostraram que muitas crianças obtêm os anticorpos contra o HHV-6 antes dos dois anos de idade. Embora a maioria das crianças infectadas apresente recuperação completa, o DNA do HHV-6 pode permanecer nos linfócitos, na saliva ou no líquido, sem causar sintomatologia (em estado de latência). Condições imunossupressivas reativam o HHV-6 causando várias complicações. Na população em geral, a infecção pelo HHV-6 é caracterizada por um baixo número de cópias do DNA viral em linfócitos. A reação de polimerase em cadeia (PCR) pode detectar o DNA do HHV-6 somente na fase aguda do exantema súbito e na reativação do HHV-6 por imunossupressão. A rota de transmissão permanece controversa. A liberação do HHV-6 em secreção de pessoas assintomáticas mais próximas das crianças parece ser a maior rota de transmissão, embora o contato com outras crianças possa ser outra possível rota. É também descrito que o HHV-6 pode ser transmitido durante o período perinatal, embora a transmissão por aleitamento materno seja desacreditada. Outra sugestão de transmissão é a intra-uterina, integrada no cromossomo. No nosso estudo foram colhidas 172 amostras, sendo metade de secreção cervical e a outra metade de aspirado de nasofaringe. Todas foram colhidas em parturientes e nos seus respectivos recém-nascidos. As coletas foram feitas na cidade de Franco da Rocha/SP e na cidade de Aracaju/SE. O processamento das amostras foi realizado no Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo, em São Paulo. Utilizamos a técnica de PCR, seguida de *nested* PCR para detecção do DNA viral do HHV-6. Obtivemos 8% de positividade em todas as amostras. Destas, 64% foram detectadas na secreção cervical, restando os outros 36% detectados no aspirado de nasofaringe. Das amostras positivas 14% eram do mesmo parto, ou seja, mãe e seu recém-nascido. Vale ressaltar que das amostras de nasofaringe positivas, 25% não tiveram pareamento de positividade com as secreções cervicais de suas mães. Com estes resultados sugerimos que está existindo uma passagem viral do HHV-6, da mãe para o seu recém-nascido antes do nascimento.

Palavras Chave: Herpesvirus 6 Humano, Passagem Viral, Parturiente, Recém-nascido.

ABSTRACT

SALUSTINO, E. F. **Molecular epidemiology of the Human Herpesvirus type 6 (HHV-6) in newborn babies and their mothers.** 63 pages, Thesis (Doctorate in Biotechnology) – Institute of Biomedical Sciences, São Paulo University, São Paulo, 2008.

The primary infection with the human herpesvirus type 6 (HHV-6) can result in exanthem subitum (roseola infantum), a common feverish disease in the childhood. It has been described as cause of the encephalitis and appealing complications. Investigations serum epidemiological showed that a lot of children obtain the antibodies against HHV-6 before the two years of age. Although most of the infected children presents complete recovery, DNA of HHV-6 can stay in the lymphocytes, in the saliva or in the central nervous system, without causing symptomatology (in latency state). Conditions immunosuppressive reactivate HHV-6 causing several complications. In the population in general, the infection for HHV-6 is characterized by a low number of copies of the DNA viral in lymphocytes. The polymerase reaction in chain (PCR) it can detect DNA of HHV-6 only in the acute phase of the exanthem subitum and in the reactivation of HHV-6 for immunosuppression. The transmission route stays controversial.

The liberation of HHV-6 in the children's people's closer asymptomatic secretion seems to be the largest transmission route, although the contact with other children can be another possible route. It is also described that HHV-6 can be transmitted during the period perinatal, although the transmission for maternal breast feeding is discredited. Another transmission suggestion is the intra-uterine, integrated in the chromosome. In our study they were obtained 172 samples, being half of cervical secretion and the other half of aspirated of nasopharyngeal. All were obtained in pregnant woman and in their respective newborn. The collections were made in the city of Franco of Rocha/SP and in the city of Aracaju/SE. The processing of the samples was accomplished at the Laboratory of Clinical and Molecular Virology of the Institute of Biomedical Sciences II of the University of São Paulo, in São Paulo. We used the technique of PCR, following by nested PCR for detection of the DNA viral of HHV-6. We obtained 8% of assertiveness in all of the samples. Of these, 64% were detected in the cervical secretion, remaining the other ones 36% detected in aspirated of nasopharyngeal. Of the positive samples 14% were of the same childbirth, in other words, mother and his/her newly born. It is worth to stand out that of the samples of positive nasopharyngeal, 25% didn't have assertiveness pairs with their mothers' cervical secretions. With these results we suggested that a viral transmission of HHV-6 exists, of the mother for his newborn before the birth.

Key Words: Hhv-6, Viral Transference, Parturient, Newborn.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** A: Partículas virais de HHV-6B acumuladas ao longo da membrana de protoplasma e dentro de uma vesícula (seta) em uma célula infectada. Zoom: Detalhe dos vírions de HHV-6B. B: Nucleocapsídeos tegumento-coberto de HHV-6 dentro do citoplasma e brotando aparentemente nas cisternas do Complexo de Golgi (seta) (Pellett & Dominguez, 2001).....22
- Figura 2.** O curso clínico de uma criança que teve dois episódios de ES. O HHV-6 foi isolado nesta criança no primeiro episódio de ES. Anticorpos para o HHV-6 aumentaram significativamente depois dos primeiro e segundos episódios de ES. Atribui-se o segundo episódio de ES ao HHV-7 (modificado de YAMANISHI, 2001 C).....23
- Figura 3.** Fases da história natural de infecção de HHV-6:
I. Infecção Primária acontece em crianças, pode resultar no ES, e dissemina pelos órgãos. Os pontos de interrogação demonstram os locais onde HHV-6 poderá se alojar.
II. Nas crianças saudáveis e adultos, o HHV-6 está presente em uma forma latente ou persistente em linfonodos e é produzido assintomaticamente nas glândulas salivares, sendo excretado pela saliva, a rota mais provável de transmissão. III. Infecção/reativação do HHV-6 acontece em pessoas que sofrem imunossupressão terapêutica depois de transplante de órgão ou em pacientes de AIDS (modificado de CAMPADELLI-FIUME *et al.*, 1999).....25
- Figura 4.** Imunoglobulina M (IgM; círculo fechado) e IgG (círculo aberto). Resposta do anticorpo em pacientes de ES. Os títulos dos anticorpos IgM e IgG foram testados através de anticorpo imunofluorescente (modificado de YAMANISHI, 2001 C).....28
- Figura 5.** Fluxograma de coletas das mães e seus recém-nascidos.....36

Figura 6. Arquitetura genética e genômica do HHV-6 (DOMINGUEZ, 1999).....	39
Figura 7. Frequência relativa de positividade por HHV-6, em mães e seus respectivos recém-nascidos, nas cidades de Aracaju/SE e Franco da Rocha/SP, 2004-07.....	42
Figura 8. Positividade do HHV-6, em mães e seus respectivos recém nascidos, nas cidades de Aracaju/SE e Franco da Rocha/SP, 2004-07.....	43
Figura 9. Positividade da secreção cervical da mãe e positividade do aspirado de nasofaringe do seu próprio recém-nascido.....	43
Figura 10. Positividade das amostras totais, evidenciando mães com secreções cervicais positivas, recém-nascidos com aspirados de nasofaringe positivos e mães e seus respectivos recém-nascidos com concomitância de positividade.....	44
Figura 11. Gel de agarose a 1,5% com as amostras positivas coradas com Brometo de Etídio.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Datas importantes na história do HHV-6 (Modificado de YAMANISHI, 2000).....	20
Tabela 2. Transmissão do Herpesvirus no período perinatal (Modificado de SCHLEISS, 2003).....	31
Tabela 3. Pares de <i>primers</i> para <i>nested</i> -PCR: HV3/HV4 e PCR: HV1/HV2 (HUANG <i>et al.</i> , 1992).....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius
µg/ml	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro
CD4+	Linfócito T CD4 positivo
CEPEMI	Centro de Pesquisas Materno-Infantil
cm	Centímetro
CMV	Citomegalovirus
DEPEC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxiribonucléico
dNTP	Deoxinucleosídeos trifosfato
DR	Terminal direct repeat
ES	Exantema Súbito
FISH	Fluorescent in situ hybridization
g	Gravidade
HBLV	Human B-lymphotropic vírus
HCFR-DIR IV	Hospital de Clínicas de Franco da Rocha, DIR-IV
HHV-6	Herpesvirus Humano tipo 6
HHV-6A	Herpesvirus Humano tipo 6 variante A
HHV-6B	Herpesvirus Humano tipo 6 variante B
HHV-7	Herpesvirus Humano tipo 7
HHV-8	Herpesvirus Humano tipo 8
HIV-1	Human Immunodeficiency Virus 1
ICB-II	Instituto de Ciências Biomédicas-II
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
kb	Kilobases
MCP	Proteína principal do capsídeo
mg/ml	Miligrama por mililitro
MgCl₂	Cloreto de Magnésio

MJF	Maternidade Dr. João Firpo
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
ORF	Open reading frame
pb	Pares de Base
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction – Reação em cadeia da polimerase
pK	Proteinase K
RN	Recém-nascido
SDS	Duodecil Sulfato de Sódio
Taq	Termus aquaticus
TBE	Tampão Tris-borato e EDTA
TNE	Tampão Tris HCl, EDTA e NaCl
U	Região central de gene específico
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
UTIN	Unidade de Tratamento Intensivo Neonatal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 HISTÓRICO.....	19
1.2 O VÍRUS.....	21
1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	23
1.4 EPIDEMIOLOGIA.....	24
1.4.1 Transmissão horizontal (saliva).....	28
1.4.2 Transmissão vertical (placenta/ integração no genoma).....	29
1.4.3 Transmissão nosocomial/ iatrogênica (transfusão/ transplante de órgãos).....	30
2 JUSTIFICATIVA.....	32
3 OBJETIVOS.....	33
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	34
4.1 POPULAÇÃO EM ESTUDO.....	34
4.1.1 Caracterização Geográfica e Sócio Econômica.....	34
4.1.1.1 Hospital de Clínicas de Franco da Rocha, DIR-IV.....	34
4.1.1.2 Maternidade Dr. João Firpo (MJF).....	34
4.2 AMOSTRAGEM.....	35
4.2.1. Período de Coleta.....	35
4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	35
4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	36
4.5 COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS.....	36
4.5.1 Coleta.....	36
4.5.2 Processamento.....	37
4.6 MÉTODO.....	37
4.7 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	38
4.7.1 Extração e Purificação do DNA da Secreção Cervical e Aspirado de Nasofaringe.....	38
4.7.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	38
4.7.3 Seleção dos Oligonucleotídeos Iniciadores (<i>Primers</i>).....	38

4.7.4 Amplificação do DNA Viral pela técnica de PCR.....	40
4.7.5 Segunda Amplificação (<i>Nested-PCR</i>).....	40
4.7.6 Detecção do Produto Amplificado.....	40
5 RESULTADOS.....	42
6 DISCUSSÃO.....	46
7 CONCLUSÕES.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
ANEXOS.....	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO

O Herpesvírus Humano tipo 6 (*Human Herpesvirus 6* - HHV-6) foi inicialmente isolado em células mononucleares de sangue periférico de pacientes com AIDS, e designado Vírus Linfotrópico B Humano (*Human B Lymphotropic Virus* - HBLV) devido a seu tropismo pelas células B (SALAHUDDIN *et al.*, 1986). Posteriormente, vários trabalhos mostraram que, durante a infecção aguda, o maior alvo dos vírus eram as células T, premissa que justificou a denominação ao vírus de HHV-6 (PELLETT *et al.*, 1992; ABLASHI *et al.*, 1993; WARD *et al.*, 2005).

Estudos têm estabelecido a existência de duas variantes distintas do vírus, HHV-6A e HHV-6B (SCHIRMER *et al.*, 1991; AUBIN, *et al.*, 1991; ABLASHI *et al.*, 1993; AUBIN, *et al.*, 1994). As duas variantes estão relacionadas, mas existem diferenças consistentes nas propriedades biológicas, imunológicas, epidemiológicas e moleculares (YAMANISHI, K. *et al.*, 1988). Ambas as variantes são prevalentes nos humanos, no entanto estudos epidemiológicos têm demonstrado o envolvimento da variante B na maioria das infecções sintomáticas por HHV-6 (DI LUCA *et al.*, 1992; DEWHURST *et al.*, 1993). O HHV-6B é o principal agente causador do Exantema Súbito (ES) (YAMANISHI, K. *et al.*, 1988), enquanto que o HHV-6A ainda não foi associada a nenhuma doença (YAMANISHI, K. *et al.*, 2001 C).

No Brasil, o primeiro estudo de soroprevalência do HHV-6 foi realizado em 1991, quando foram analisadas 689 amostras de soro de pessoas residentes na cidade do Recife, das quais 255 eram de imigrantes japoneses e 434 de não imigrantes. A soropositividade foi de 76,5% para o grupo de não imigrantes e 77,2% para os imigrantes japoneses (LINHARES *et al.*, 1991).

Na Tabela 1 observam-se as datas referentes aos fatos históricos importantes no estudo dos Herpesvirus.

Tabela 1. Datas importantes na história do HHV-6 (Fonte: modificado de YAMANISHI, 2000).

Data	Evento	Referência
1910	Descrição clínica definitiva do exantema súbito (<i>roseola infantum</i>)	Zahorsky, 1910.
1941	Estudo prospectivo do exantema súbito conduzindo à hipótese que um "vírus filtrável" é o agente causador	Breese, 1941.
1950-1951	Inoculação experimental do HHV-6 demonstrada em humanos	Kempe <i>et al.</i> , 1950. Hellstrom and Vahlquist, 1951.
1986	Novo vírus, nomeado vírus linfotrópico-B humano (<i>Human B-Lymphotropic Virus-HBLV</i>), isolado de pacientes com AIDS e outras alterações linfoproliferativas	Salahuddin <i>et al.</i> , 1986.
1987	HBLV renomeado Herpesvirus Humano tipo 6 (HHV-6)	Ablashi <i>et al.</i> , 1987.
1988	HHV-6 é identificado como agente causador do exantema súbito	Yamanishi <i>et al.</i> , 1988.
1990	Herpesvirus humano tipo 7 (<i>Human Herpesvirus 7- HHV-7</i>) isolado de linfócitos CD4+ de adultos saudáveis	Frenkel <i>et al.</i> , 1990.
	HHV-6 associado com mononucleose infecciosa em adultos	Steeper <i>et al.</i> , 1990.
1991	Soroprevalência da infecção por HHV-6 em populações brasileiras e japonesas no nordeste do Brasil	Linhares <i>et al.</i> , 1991.
1993	HHV-6 variantes A (HHV-6A) e B (HHV-6B) formalmente reconhecidos	Ablashi <i>et al.</i> , 1993.
1994	HHV-6 associado com estados febris	Hall <i>et al.</i> , 1994.
	Prevalência de anticorpo HHV-6 entre comunidades indígenas amazônicas no Brasil	Freitas <i>et al.</i> , 1994.
1995	Determinada a sequência genômica completa do HHV-6A	Gompels <i>et al.</i> , 1995.
	Associação da infecção por HHV-6 com exantema súbito em Belém, Brasil	Freitas <i>et al.</i> , 1995.
1996	Soroconversão do HHV-6 e HHV-7 entre crianças brasileiras com diagnóstico clínico de sarampo ou rubéola	Black <i>et al.</i> , 1996.
1999	Determinada a sequência genômica completa do HHV-6B	Dominguez <i>et al.</i> , 1999. Isegawa <i>et al.</i> , 1999.

Outro estudo avaliou a prevalência de anticorpos para o HHV-6 em 4 comunidades indígenas da região Amazônica, obtendo-se de 592 amostras de soro, 17,7% de positividade (FREITAS *et al.*, 1994). Os primeiros relatos de associação do HHV-6 com o ES no país foram feitos por FREITAS *et al.* (1995), utilizando amostras de soro de 2 crianças, uma com 10 meses e outra com 24 meses de idade, na cidade de Belém, estado do Pará.

Em 1996, Black *et al.*, analisaram crianças da cidade de São Paulo, com diagnóstico clínico de sarampo e/ou rubéola, e identificaram alta porcentagem de exantemas por HHV-6 e HHV-7, atentando para necessidade da melhor avaliação das etiologias virais das doenças exantemáticas no Brasil.

1.2 O VÍRUS

O HHV-6 é um vírus da família Hesperviridae, pertencendo ao gênero *Roseolovirus*, subfamília *β -herpesvirus* (KRUEGER & ABLASHI, 2003).

Os herpesvirus são compostos de três elementos estruturais: o genoma composto por DNA de fita dupla (SCHIRMER *et al.*, 1991; ABLASHI *et al.*, 1993), o nucleocapsídeo, que possui simetria icosaédrica, e o envelope no qual as glicoproteínas virais estão inseridas. Entre o nucleocapsídeo e o envelope existe um espaço que é preenchido por proteínas chamado de Tegumento. Após montagem e brotamento, o vírion passa a ter aproximadamente 200 nm de diâmetro (BIBERFELD *et al.*, 1987; YOSHIDA *et al.* 1989) (Figura 1).

O genoma contém 160-162 kilobases (kb), sendo que aproximadamente 144 kb constituem a região central de gene específico (U) a qual contém *open reading frames* (ORF) entre U1 e U100. Flanqueando as ORFs, existem de 8 a 9 kb de genes de repetição terminal (*terminal direct repeats-DR*) (GOMPELS *et al.*, 1995). Os segmentos terminais e de junção das DRs contém repetição de telômeros de função indeterminada (GOMPELS *et al.*, 1995), bem como contém 7 regiões de genes conservados entre todos os herpesvírus, um grupo

de genes descoberto somente em *β -herpesvirus* e alguns genes específicos para o gênero *Roseolovirus* (CLARK, 2000).

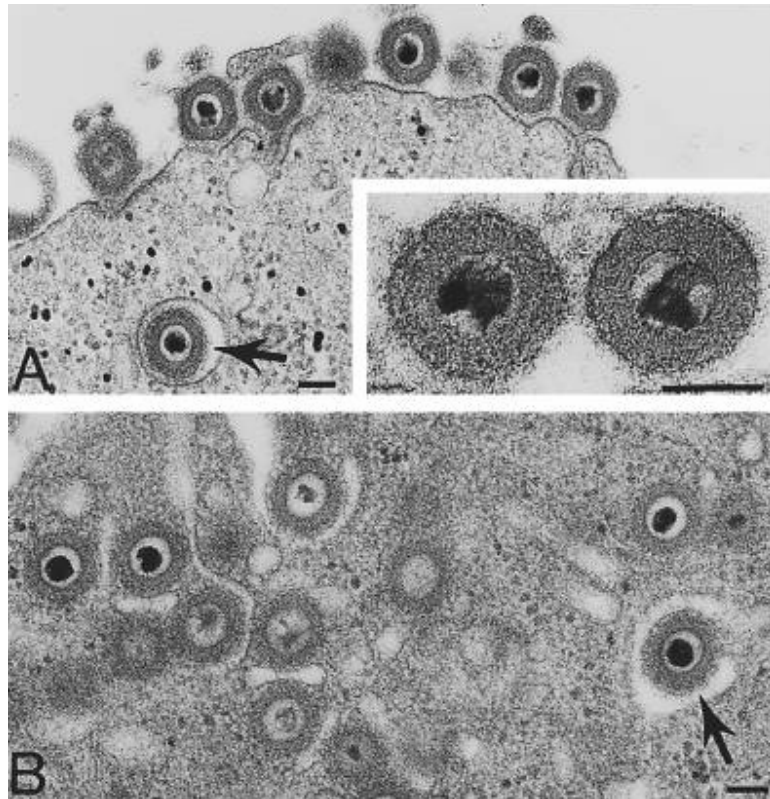


Figura 1. A: Partículas virais de HHV-6B acumuladas ao longo da membrana de protoplasma e dentro de uma vesícula (seta) em uma célula infectada. Zoom: Detalhe dos vírions de HHV-6B. B: Nucleocapsídeos tegumento-coberto de HHV-6 dentro do citoplasma e brotando aparentemente nas cisternas do Complexo de Golgi (seta) (Fonte: Pellett & Dominguez, 2001).

O HHV-6A (cepa U1102) (GOMPELS *et al.*, 1995) tem sido comparado com o HHV-6B (cepas Z29 e HST) (DOMINGUEZ *et al.*, 1999; ISEGAWA *et al.*, 1999). HHV-6B contém 119 ORFs e 97 genes únicos em comparação com 110 ORFs do HHV-6A. A similaridade da seqüência de nucleotídeos é de 90%, mas o DR e a região codificada entre U86 e U100 são muito divergentes (respectivamente 15% e 28% de divergência na seqüência de nucleotídeos) (DOMINGUEZ *et al.*, 1999). Triando 14 cepas diferentes, foram demonstradas

que as diferenças são em regiões conservadas durante a evolução viral como características específicas das variantes, porém são maiores para a cepa HHV-6A (ISEGAWA *et al.*, 1999). Além das diferenças genéticas, variações na reatividade com anticorpos monoclonais, tropismo celular e manifestações da doença demonstram que o HHV-6A e o HHV-6B são *β -herpesvirus* distintos (DOCKRELL, 2003).

1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

O HHV-6 é o agente etiológico do ES, uma doença comum na infância (ISEGAWA, *et al.*, 1999), causada por uma elevação abrupta na temperatura, febre de cerca de 40°C por dois a quatro dias, seguida por diminuição rápida de temperatura que coincide com o aparecimento de erupção cutânea (eritema maculopapular) (Figura 2).

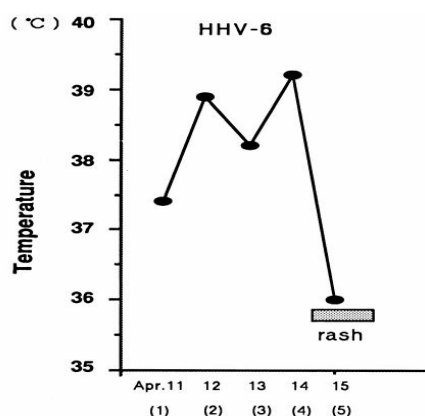


Figura 2. O curso clínico de uma criança que teve dois episódios de ES. O HHV-6 foi isolado nesta criança no primeiro episódio de ES. Anticorpos para o HHV-6 aumentaram significativamente depois dos primeiro e segundos episódios de ES. Atribui-se o segundo episódio de ES ao HHV-7 (Fonte: modificado de YAMANISHI, 2001 C).

A maioria dos casos de infecção primária pelo HHV-6 exibe aspectos clínicos de exantema súbito, porém existem raras ocorrências com aspectos clínicos atípicos incluindo *rash* cutâneo sem febre (ASANO *et al.*, 1989) ou febre sem *rash* cutâneo (YOSHIKAWA *et al.*, 1989).

1.4 EPIDEMIOLOGIA

A transmissão deste agente foi demonstrada no ano de 1950, a partir de sangue e secreção de garganta de pacientes com ES, sugerindo que esta doença seria causada por um vírus (HELLSTROM e VAHLQUIST, 1951), possivelmente um herpesvírus (KEMPE *et al.*, 1950).

HHV-6 é um vírus que está presente em todo o mundo e parece infectar a maioria das crianças até os dois anos de idade. O vírus pode ser achado na saliva de 70% de adultos assintomáticos. A transmissão acontece por meio de contato direto com secreções infecciosas que passam de adultos assintomáticos a crianças soronegativas, tipicamente da mãe para criança. O vírus foi identificado em saliva, secreções genitais e em autópsia de cérebro de adultos assintomáticos. Só é encontrado no sangue periférico durante a viremia, como na plenitude da febre durante a infecção primária (quando ocorre o ES) ou durante reativação em pacientes imunocomprometidos. No entanto, pode ser descoberto em forma latente através de técnicas como PCR (HAAHEIM, *et al.*, 2002).

A infecção com HHV-6 é muito comum, chegando a ter 100% de soroprevalência em algumas populações estudadas. Os títulos dos anticorpos são altos nas crianças recém-nascidas, e declina de 3 a 9 meses depois do nascimento, subindo rapidamente depois disso, permanecendo elevado até os 60 anos de idade ou mais. Este padrão indica que os recém-nascidos levam anticorpos maternos e a infecção primária acontece nos primeiros 3 anos de vida, frequentemente no primeiro ano de vida. As infecções por vias placentárias são muito infreqüentes, mas podem contribuir com a soropositividade do HHV-6 nos recém-nascidos (ADAMS *et al.*, 1998).

Três fases podem ser reconhecidas dentro da história natural de infecção de HHV-6 (Figura 3). A primeira é representada por uma infecção aguda primária em crianças. A segunda acontece em crianças e adultos saudáveis; o vírus se reproduzindo dentro das glândulas salivares, sendo, conseqüentemente, expelido pela saliva (CAMPADELLI-FIUME *et al.*, 1999;

WARD, 2005) sem induzir qualquer patologia óbvia, os vírus permanecem latentes nos linfócitos e monócitos, e persiste em vários tecidos, possivelmente com uma baixa replicação. A terceira fase acontece sem freqüência, tipicamente em pessoas de imunocomprometidas, e está ligada à reativação do vírus latente ou reinfecção. Outras patologias como esclerose múltipla, tumores, e SNC estão relacionadas ao HHV-6 (CAMPADELLI-FIUME *et al.*, 1999).

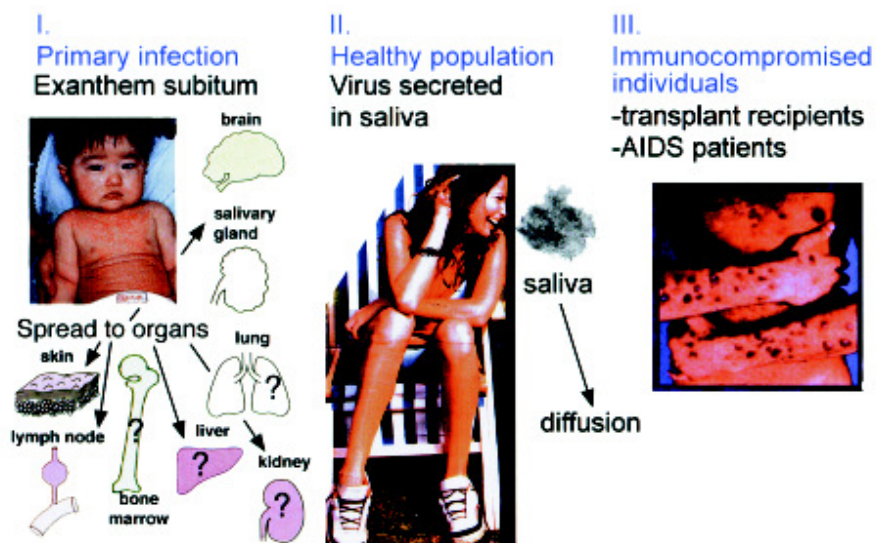


Figura 3. Fases da história natural de infecção de HHV-6: I. Infecção Primária acontece em crianças, pode resultar no ES, e dissemina pelos órgãos. Os pontos de interrogação demonstram os locais onde HHV-6 poderá se alojar. II. Nas crianças saudáveis e adultos, o HHV-6 está presente em uma forma latente ou persistente em linfonodos e é produzido assintomaticamente nas glândulas salivares, sendo excretado pela saliva, a rota mais provável de transmissão. III. Infecção/reactivação do HHV-6 acontece em pessoas que sofrem imunossupressão terapêutica depois de transplante de órgão ou em pacientes de AIDS. (Fonte: modificado de CAMPADELLI-FIUME *et al.*, 1999).

Pacientes que tiveram um período febril maior que quatro dias e vírus detectado no plasma apresentaram um número significativamente mais elevado de células mononucleares do que pacientes que tiveram febre por menos de três dias e ausência de vírus no plasma (ASANO *et al.*, 1989). A infecção primária pelo HHV-6 é comum nos primeiros anos de vida (YOSHIKAWA *et al.*, 1989; CHALLONER *et al.*, 1995). Após a primeira infecção, o HHV-6 persiste nas glândulas salivares e permanece latente nos monócitos e macrófagos. A

imunossupressão pode levar à reativação viral, causando várias complicações (GOMPELS, 2004; LUSSO e GALLO, 1995; SINGH e PATERSON, 2000), principalmente em pacientes transplantados de órgãos, medula e portadores de AIDS. A autópsia em pacientes com AIDS detectou o vírus no pulmão, baço, rim, sistema linfático e fígado (AMJAD *et al.*, 2001).

O DNA do HHV-6 não foi detectado em biópsia proveniente de sarcoma de Kaposi ou em clones de linhagens celulares de Kaposi (JAHAN *et al.*, 1989). Sabemos, no entanto, que o agente etiológico do sarcoma de Kaposi é o herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8).

Russler *et al.* (1991) descreveram um caso de pneumonite em adulto saudável causado por co-infecção de HHV-6 com *Legionella pneumophila*. O HHV-6 não foi encontrado na urina de adultos saudáveis e crianças (AKHYANI, *et al.* 2000), como também não foi encontrado em colostro (DUNNE & JEVON, 1993).

Pouco se conhece sobre as propriedades de latência do HHV-6. Não obstante, a reativação de outros herpesvírus é uma ocorrência comum em pessoas imunocomprometidas. Em pacientes transplantados, soroconversão ou aumento dos títulos de anticorpos e isolamento do vírus foram descritos depois de transplantes renal, cardíaco, hepático e de medula óssea (PELLETT *et al.*, 1992). O HHV-6 tem mostrado estar associado a várias patologias neurológicas, como Síndrome da Fadiga Crônica e Esclerose Múltipla, mas uma associação significativa não tem sido vista (AMJAD *et al.*, 2001).

Nestes transplantados, o vírus foi isolado, porém não ficou determinada se a atividade viral observada foi devida à reativação da infecção latente no receptor ou infecção exógena (PELLETT *et al.*, 1992).

Anticorpos IgG maternos específicos para HHV-6 são normalmente achados em neonatos, o que reflete a alta prevalência de infecção em adultos. Os anticorpos maternos declinam após os 6 meses, tempo pelo qual a maioria das crianças é soronegativa e suscetível à infecção. Em todo mundo, um elevado número de crianças é soropositiva para o HHV-6 aos 2 anos de idade (YOSHIKAWA *et al.*, 1989; WARD *et al.*, 1993A). A infecção às vezes pode, no

entanto, ocorrer mais cedo, como relatado em trabalho realizado por OLIVEIRA *et al.* (2003) em uma região tropical de Brasil. O HHV-6B é difundido nas crianças e adultos e é normalmente adquirido no segundo semestre de vida (PRUKSANANONDA *et al.*, 1992; DEWHURST *et al.*, 1993; HALL *et al.*, 1994). A Variante A era inicialmente identificada apenas em adultos imunocomprometidos (AUBIN *et al.*, 1991), mas foi descoberta desde então em crianças africanas (KASOLO *et al.*, 1997), americanas (HALL *et al.*, 1998) e britânicas (WARD *et al.*, dados não publicados). Em ambas as crianças britânicas (WARD *et al.*, dados não publicados) e americanas (HALL *et al.*, 1998), a prevalência da variante A em saliva é baixa, em torno de 2% e 3% de HHV-6 amostras positivas (WARD, 2005).

A alta soroprevalência e infecção em crianças de pouca idade indicam que o vírus está freqüentemente presente no meio familiar, onde a mais importante fonte de infecção pode ser a mãe (ou a pessoa que tenha um maior contato). No entanto, não foram encontradas diferenças significantes nos níveis de soropositividade entre mulheres grávidas e mulheres-controle com idades similares (BALACHANDRA *et al.*, 1989).

Yamanishi *et al.* (1998) isolaram HHV-6 de linfócitos de pacientes com exantema súbito durante a fase febril da doença e perceberam um aumento de quatro vezes nos níveis de IgG anti-HHV-6. A figura 4 demonstra como se comporta a levacção destes anticorpos. A atividade neutralizante do anticorpo contra o HHV-6 foi primeiramente detectada a partir do terceiro dia do surgimento do exantema súbito e foi relatada em 100% dos pacientes após 6 a 8 dias do quadro febril (SUGA *et al.*, 1990). Contudo, o desaparecimento do vírus nas células sanguíneas pode estar associado com a indução de imunidade específica ao vírus (KUSUHARA *et al.*, 1991). O nível de isolamento do vírus de células mononucleares de alguns pacientes foi de 100% entre os dias 0 e 2 imediatamente após o aparecimento das erupções cutâneas, baixando para 0% após o 5º dia (ASANO *et al.*, 1989).

Em 1990, YOSHIKAWA *et al.* descreveram que os anticorpos maternos parecem conferir proteção da infecção causada por HHV-6 em crianças jovens,

baseado na incidência de o ES coincidir com a diminuição de anticorpos maternos. Elevados títulos de anticorpos HHV-6, incluindo anticorpos neutralizantes em sangue de cordão umbilical, são vistos em sangue materno, indicando a presença de um mecanismo de transporte ativo de anticorpos HHV-6. Porém em 2004, o mesmo autor encontrou um resultado diferente, descrevendo que os anticorpos maternos não previnem a viremia por HHV-6 no neonato, demonstrado em um caso de infecção neonatal por HHV-6 com sinais clínicos atípicos (YOSHIKAWA *et al.*, 2004).

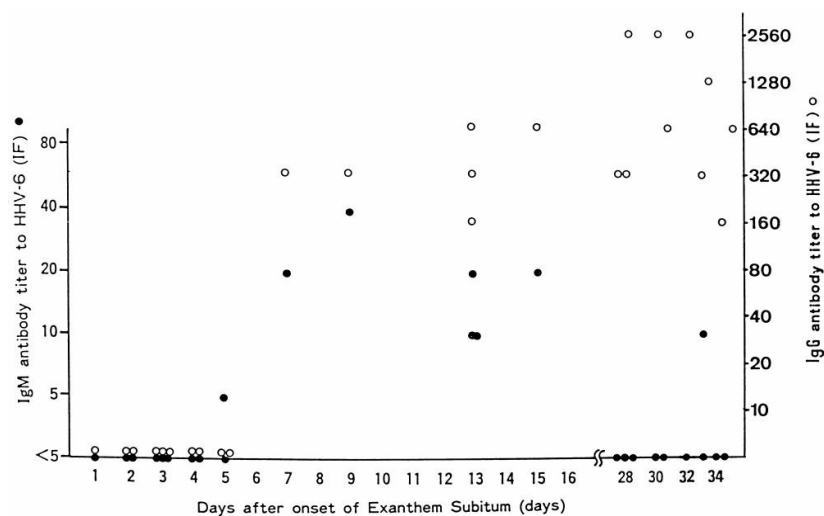


Figura 4. Imunoglobulina M (IgM; círculo fechado) e IgG (círculo aberto). Resposta do anticorpo em pacientes de ES. Os títulos dos anticorpos IgM e IgG foram testados através de anticorpo imunofluorescente (Fonte: modificado de YAMANISHI, 2001 C).

1.4.1 Transmissão horizontal (saliva)

Embora os modos de transmissão já tenham sido formalmente comprovados, a maioria das crianças adquire o HHV-6B provavelmente da saliva de irmãos ou familiares adultos (MUKAI *et al.*, 1994).

A aquisição do HHV-6B em jovens e a alta frequência de detecção de HHV-6 em saliva (LEVY, *et al.*, 1990) sugere ser este o modo de transmissão mais provável deste vírus (RHOADS, *et al.*, 2007).

A soroconversão do HHV-6 foi vista em crianças que não receberam leite materno (TAKAHASHI *et al.*, 1988), indicando a existência de outra forma de

transmissão. Esta transmissão por meio da secreção oral é uma hipótese recorrente em estudos que reportam o isolamento do HHV-6 por PCR (JARRETT *et al.*, 1990) em mais de 85% das amostras de saliva (HARNETT *et al.*, 1990), e a detecção das proteínas virais por imunohistoquímica e DNA por hibridização *in situ* em glândulas salivares (FOX *et al.*, 1990; KRUEGER *et al.*, 1991 B) e brônquios (KRUEGER *et al.*, 1991 B) também demonstraram este modo de transmissão. Entretanto, outros autores detectaram HHV-6 em menos de 10% de amostras de saliva, provenientes de isolamento em cultura celular ou PCR, incluindo mães de crianças com exantema súbito, no qual foi feito o isolamento do vírus em cultura celular (KIDO *et al.*, 1990; YOSHIYAMA *et al.*, 1990). Este fato pode ser devido ou à utilização de técnicas diferentes ou a variações na biologia do vírus (PELLETT, 1990). PELLET (1990) também sugeriu a transmissão viral pela urina, uma vez que o HHV-6 foi detectado, através de PCR, em 50% das amostras de tecido renal dos pacientes analisados.

1.4.2 Transmissão vertical (placenta/ integração no genoma)

Infecção congênita é caracterizada quando o vírus ultrapassa a barreira placentária ou pode ser hereditária se vírus for integrado ao cromossoma humano. O HHV-6 é o único herpesvirus conhecido que tem esta capacidade (WARD, 2005). O vírus pode ser transmitido à criança ou pelo cromossoma de um dos pais ou pelo cromossoma de ambos (DAIBATA *et al.*, 1999). TANAKA-TAYA *et al.* (2004) descreveram que a herança é achada em aproximadamente 0.2% (5/2332) de pacientes japoneses. Descobertas da infecção congênita com o DNA do HHV-6 em células do sangue de cordão têm sido descritas em 1.6% (ADAMS *et al.*, 1998) e 0.9% (DAHL *et al.*, 1999) dos nascimentos na Alemanha e na Suécia, respectivamente.

Ambas as variantes foram observadas nesta via de transmissão; sendo um caso de B (DAIBATA *et al.*, 1998), e um de A e quatro de B (TANAKA-TAYA *et al.*, 2004). Considerando outros possíveis modos de transmissão vertical, o

HHV-6 tem sido descrito no trato genital feminino (OKUNO *et al.*, 1995). No pós-parto, o colostro foi excluído para HHV-6 (BRAUN *et al.*, 1997).

1.4.3 Transmissão nosocomial/ iatrogênica (transfusão/ transplante de órgãos)

Uma vez que o HHV-6 permanece latente em células da medula óssea, ele pode ser transmitido também por transfusão de sangue ou transplante de órgãos, como foi descrito em dois casos de infecção primária (WARD *et al.*, 1989; LAU *et al.*, 1998). A superinfecção também poderá acontecer nos pacientes já soropositivos para o HHV-6 (WARD, 2005).

Muitos isolados de HHV-6 têm sido obtidos a partir de linfócitos de paciente com vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (Human Immunodeficiency Virus 1 - HIV-1). O alvo celular do HIV e HHV-6 *in vitro* e *in vivo* é o linfócito CD4+. PELLETT *et al.* (1992) sugeriram que o HHV-6 pode ter um papel de co-fator na progressão da AIDS (PELLETT *et al.*, 1992). Já BALACHANDRAN *et al.* (1991) descreveram trabalhos que apresentaram altas soroprevalências de HHV-6 e/ou aumento de títulos dos anticorpos em pacientes com AIDS. Ensaios de hibridização *in situ* em tecidos obtidos das autópsias de seis pessoas HIV soropositivas que morreram de forma violenta mostraram níveis de HHV-6 similares aos estabelecidos nos tecidos-controle (MADEA *et al.*, 1990). Estudos da atividade inibitória do HHV-6 sobre o HIV-1 demonstraram níveis reduzidos de transcriptase reversa (LOPEZ *et al.*, 1988), além da inibição da expressão do antígeno HIV-1 e a replicação em culturas de linfócitos co-infectados (LEVY *et al.*, 1990 B).

Todavia, Campadelli-Fiume *et al.* (1999) descreveram que crianças nascidas de mães com amostras de *swabs* cervicais positivos não adquiriram a infecção.

A elucidação da rota de transmissão viral é um importante passo para marcar o início da infecção. É necessária uma análise epidemiológica molecular para determinar a rota de transmissão viral (YOSHIKAWA *et al.*, 2004).

A Tabela 2 mostra a transmissão do *Herpesvirus* no período perinatal, entre os diversos membros da família *Herpesviridae*.

Tabela 2. Transmissão do Herpesvirus no período perinatal (Fonte: Modificado de SCHLEISS, 2003).

Vírus	Transmissão <i>In utero</i>	Transmissão <i>Intrapartum</i>	Transmissão Pós-natal	Conseqüências
Herpes simplex 1 e 2	+	+++	++	Falecimento fetal (aquisição <i>in utero</i>); herpes neonatal
Varicella zoster	+	++	++	Síndrome da varicela fetal (aquisição <i>In utero</i>)
Citomegalovirus	+++	+++	+++	Doença de inclusão citomegálica
Epstein-Barr	+/-	+/-	+	Não conhecido
HHV6 e HHV-7	+	+	+	Não conhecido
Sarcoma de Kaposi	?	+/-	+	Não conhecido; Sarcoma de Kaposi pediátrico?
Potencial e relativa frequência dos vários modos de transmissão indicando a potencial consequência. ? potencial para transmissão não conhecida; +/- potencial para transmissão teoricamente aceitável mas não comprovada; + descrita, mas relativamente rara; ++ ocorre frequentemente; +++ ocorre comumente.				

2 JUSTIFICATIVA

O Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas II da Universidade de São Paulo, chefiado pelo Prof. Dr. Edison Luiz Durigon, em parceria com o *Centers for Disease Control and Prevention* em Atlanta-Ga, USA, desenvolveu um projeto temático envolvendo doenças exantemáticas em crianças brasileiras. O trabalho desenvolvido nesta parceria teve como objetivo principal a associação de soroconversão do HHV-6 e HHV-7 com diagnósticos clínicos de sarampo ou rubéola (PELLET e BLACK, 1996 b).

Além desse, foram realizados outros trabalhos, tais como a detecção do HHV-6 em crianças com exantema máculo-papular pela PCR e *nested*-PCR (em vias de publicação), e a detecção do DNA viral do HHV-6 pela PCR e *nested*-PCR em transplantados de medula óssea (FAVRIN, 2000). Existe ainda, em andamento, uma Tese de Doutorado que visa analisar o HHV-6 em doadores assintomáticos de sangue.

Considerando a relevância de conhecer a incidência do HHV-6 em mães e seus respectivos recém-nascidos, julgou-se essencial ampliar o conhecimento sobre as manifestações desse vírus e suas formas de transmissão. A presença de DNA viral contribuirá para uma melhor compreensão da fisiopatologia dessa virose, bem como seu potencial de interpretação no genoma humano.

3 OBJETIVOS

- Descrever a via de transmissão do herpesvírus humano tipo 6 (HHV-6) entre as mães parturientes e seus recém-nascidos, no Hospital de Clínicas de Franco da Rocha, no estado de São Paulo e na Maternidade João Firpo, cidade de Aracaju, capital do estado de Sergipe.

- Contribuir para o meio científico sobre o esclarecimento da etiologia viral do HHV-6.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foi realizado um estudo transversal com uma amostra populacional de crianças nascidas no Hospital de Clínicas de Franco da Rocha, DIR-IV, cidade de Franco da Rocha, situada na região Metropolitana da Grande São Paulo e na Maternidade Dr. João Firpo, no Hospital Santa Isabel, na cidade de Aracaju, Capital de Sergipe.

4.1 POPULAÇÃO EM ESTUDO

4.1.1 Caracterização Geográfica e Sócio Econômica

4.1.1.1 Hospital de Clínicas de Franco da Rocha, DIR-IV

O DIR-IV é constituído por cinco municípios: Caieiras, Cajamar, Francisco Morato, Franco da Rocha e Mairiporã. Estes municípios possuem uma população de 423.953 habitantes (IBGE, 2000), sendo que a maior parcela, com cerca 94%, está situada na área urbana, com taxa de crescimento médio populacional de 18,12% ao ano, e apresenta elevados índices de mortalidade infantil. O município de Francisco Morato é considerado um dos municípios com menor renda per capita do Estado de São Paulo.

4.1.1.2 Maternidade Dr. João Firpo (MJF)

A MJF faz parte do Hospital Santa Isabel, localizada à Rua Recife s/nº- Bairro José Conrado de Araújo, zona oeste da capital. A maternidade presta serviços à comunidade de baixa renda de todos os municípios do Estado que contam com 1.817.301 habitantes (censo do IBGE/2001), distribuídos numa área de 21.994 km², como também a alguns municípios de Estados vizinhos (Bahia e Alagoas), realizando no ano de 2003, 6.248 atendimentos pelo SUS. A sua

estrutura de atendimento é composta de 308 leitos, 12 de UTI Neonatal; 04 leitos de UTIN externa e 06 leitos de Unidade Intermediária.

No referido ano, obteve 2.202 (35,24%) partos normais; 1.153 (18,45%) curetagens; 1.091 (17,46%) UTIN; 1.048 (16,77%) partos cesáreas; 456 (7,3%) tratamento clínico obstétrico; 161 (2,58%) pediátrico e 137 (2,19%) cirurgias.

4.2 AMOSTRAGEM

Foram coletadas amostras de 86 partos, que se distribuíram em 2 espécimes (secreção cervical da mãe e aspirado de nasofaringe do recém-nascido), totalizando 172 amostras.

4.2.1. Período de Coleta

A coleta nas mães e em seus respectivos recém-nascidos foi realizada diariamente nos dois Hospitais, pela equipe de auxiliares de enfermagem.

Em Franco da Rocha, o período foi de 23 de junho de 2004 a 26 de agosto do mesmo ano. Em Aracaju, a coleta foi realizada do dia 25 de setembro de 2006 se estendendo até o dia 5 de março de 2007.

4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos, diariamente, durante o período de estudo, as gestantes que procuraram o atendimento obstétrico do Hospital de Clínicas de Franco da Rocha e da maternidade Dr. João Firpo e aceitaram participar das coletas no período peri-parto. Foram selecionados somente os partos normais, independente do sexo do recém-nascido.

Os pais ou responsáveis receberam informações e esclarecimentos a respeito dos propósitos e forma de condução do trabalho, além dos eventuais riscos de estudo, dando o consentimento livre e individual, por escrito, para inclusão no projeto.

4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

1. Os bebês cujos pais não consentiram participar do estudo.
2. Os bebês cujas mães apresentavam história sugestiva ou diagnóstico de:
 - imunodeficiência congênita ou adquirida;
 - doenças oncológicas;
 - tratamentos com imunossupressor ou que tenham recebido imunoglobulina ou derivado sanguíneo num período inferior a três meses.

4.5 COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS

4.5.1 Coleta

Na sala de pré-parto, as entrevistas começaram a serem feitas com as parturientes. Após o consentimento das mesmas, foram realizadas as primeiras coletas (secreção cervical). As amostras de secreção cervical foram coletadas com swab hidrofílico e submersas em tubos Falcon com 3 mL de PBS (Phosphate Buffer Saline).

Após o parto, foram coletadas amostras de aspirado de nasofaringe do recém-nascido com um cateter e o mesmo foi colocado em tubos Falcon com 3 mL de PBS, como demonstrado na figura 5.

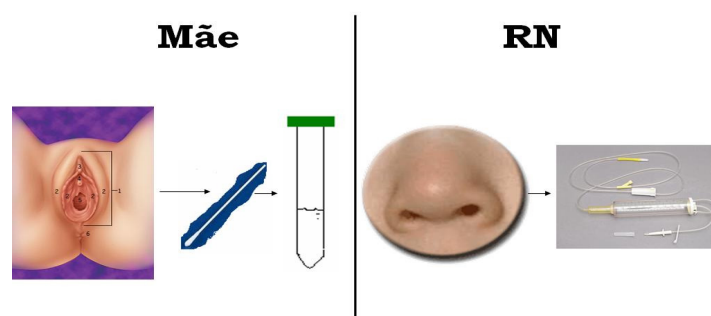


Figura 5. Fluxograma de coletas das mães e seus recém-nascidos.

As amostras foram levadas ao laboratório de CEPEMI (Centro de Pesquisas Materno-Infantil), em Franco da Rocha, e ao Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe em Aracaju, onde passaram pela primeira etapa do processamento.

4.5.2 Processamento

O tubo Falcon, contendo o fragmento de sonda do aspirado de nasofaringe do recém-nascido (RN) e PBS, foi centrifugado por 10 minutos a 4500 g a temperatura de 19°C para melhor aproveitamento da amostra.

Os swabs de secreção cervical foram forçados contra a parede dos tubos e desprezados. Os tubos com o material clínico foram centrifugados por 10 minutos a 4500 g a temperatura de 19°C. Estando hemorrágicos, foram lavados com PBS por 3 vezes. Feito isso, o sobrenadante foi desprezado e a porção celular armazenada em criotubos contendo meio de congelamento (10% de Glicerol, 50% de Soro Fetal Bovino e 40% de RPMI/Invitrogen) 1:1.

Posteriormente, todas as amostras foram encaminhadas ao Instituto de Ciências Biomédicas-II (ICB-II)/USP - São Paulo para a continuação do experimento.

4.6 MÉTODO

Antes do início do trabalho de campo, todos os membros da equipe de estudos e as Chefias Médicas dos Hospitais foram informados dos objetivos, cronogramas e metodologia do trabalho desenvolvido.

4.7 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

4.7.1 Extração e Purificação do DNA da Secreção Cervical e Aspirado de Nasofaringe

A alíquota do material em meio de congelamento foi lavada com PBS na proporção de 1:1. Logo após, foi feita uma centrifugação a 16100 g por 10 minutos e o sobrenadante foi desprezado. Vinte microlitros de linfócitos foram incubados por 30 minutos a 56°C em 150 µL de TNE (Tris HCl 10 mM, EDTA 10 mM e NaCl 10 mM, pH 8,0) acrescidos de 20 µL de SDS (Duodecil Sulfato de Sódio a 10%) e 10 µL de proteinase K (pK) a 10 mg/ml (Sigma Diagnostics).

Após esta fase, foi feita a extração do DNA viral pelo método do fenol / clorofórmio / álcool isoamílico (25:24:1) proposta por SAMBROOK *et al.*, 1989.

4.7.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR seguiu metodologia preconizada por Huang *et al.* (1992). Foi realizada a amplificação do segmento de DNA do HHV-6, referente à região que codifica a proteína principal do capsídeo viral, e em seguida, a amplificação (*nested*) da região interna do produto resultante (figura 6). Água Mili-Q, Milipore, isenta de inibidores que poderiam impedir a amplificação de produtos de PCR contaminantes, foi utilizada como controle negativo. O controle positivo consistiu de amostra da estirpe de referência U1102, variante A do HHV-6, cultivada na linhagem de células linfóides J.JHAN, ou amostra positiva.

4.7.3 Seleção dos Oligonucleotídeos Iniciadores (*Primers*)

As metodologias da PCR e *nested*-PCR, nos espécimes dos pacientes estudados, foram executadas utilizando 2 pares de *primers* [HV1/HV2 e HV3/HV4] (Life Technologies, Inc. Gibco BRL, Universidade de Kentucky, CA, USA) (HUANG *et al.*, 1992) derivados do gene que codifica a proteína principal

do capsídeo do HHV-6, demonstrado na figura 3 (LITLER *et al.*, 1990). A estirpe U1102 do HHV-6 foi cultivada em células linfóides J.JHAN, como estirpe de referência, para as reações de amplificação do DNA viral. A seqüência das bases, a localização no genoma e o tamanho do produto obtido pela PCR e *nested-PCR*, com seus respectivos pares de *primer*, estão listados na tabela 3.

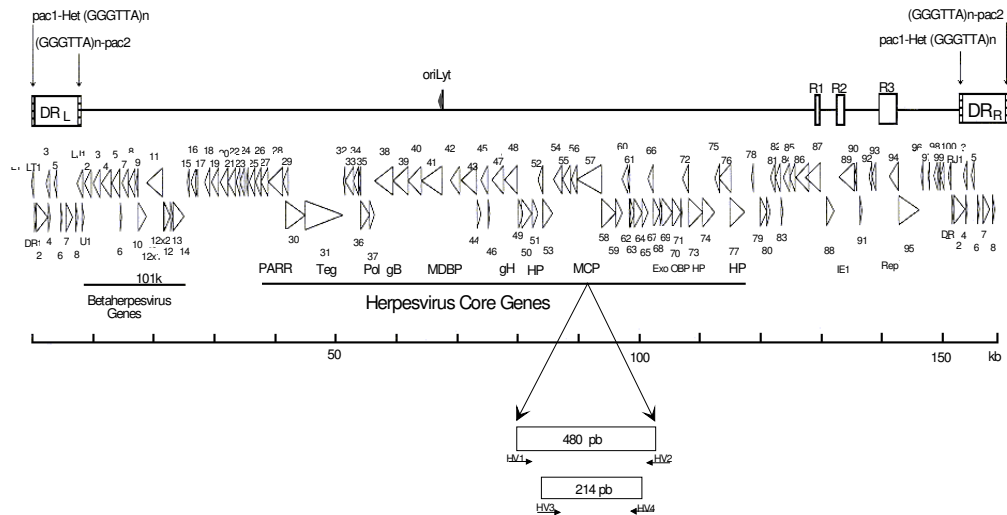


Figura 6. Arquitetura genética e genômica do HHV-6 (Fonte: DOMINGUEZ, 1999).

Tabela 3. Pares de *primers* para *nested-PCR*: HV3/HV4 e PCR: HV1/HV2 (Fonte: HUANG *et al.*, 1992).

<i>Primer</i>	Seqüência 5'-3'	Tamanho do produto (pb)	Região do genoma do HHV-6
HV1	CAATGCTTTTCTAGCCGCCTCTTC	480	Proteína principal do capsídeo (MCP)
HV2	ACATCTATAATTTTAGACGATCCC		
HV3	TTGTGCGGGTCCGTTCCCATCATA	214	Proteína principal do capsídeo (MCP)
HV4	TCGGGATAGAAAACCTAATCCCT		

4.7.4 Amplificação do DNA Viral pela técnica de PCR

O volume de reação para amplificação, tanto para PCR quanto para *nested* PCR, foi de 100 µL, contendo 53,5 µL de água DEPC, 10 µL de tampão de reação (10%), 16 µL dNTP (desoxiribonucleotídeo trifosfato) a 1,25 mM, 5 µL de cada um dos *primers* externos HV1 / HV2, 3 µL de MgCl₂, 0,5 µL enzima *Termus aquaticus* -Taq DNA polimerase (Amersham Pharmacia Biotech) e 10 µL de cada amostra extraída.

A amplificação foi desenvolvida em termociclador automático (GeneAmp PCR System 2400). As amostras foram primeiramente denaturadas a 94°C por 5 minutos, e submetidas a 40 ciclos de amplificação, sendo cada ciclo composto de 3 temperaturas: denaturação da amostra a 94°C (1 minuto), pareamento dos *primers* a 55°C (1 minuto) e extensão das fitas de DNA a 72°C (1 minuto e meio), seguida de uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Após o término, o termociclador manterá a temperatura de 4°C até o processamento das amostras amplificadas

4.7.5 Segunda Amplificação (*Nested*-PCR)

Do produto da primeira amplificação, 10 µL foram utilizados como molde para uma segunda amplificação com *primers* internos HV3/HV4 na técnica de *nested*- PCR, sob as mesmas condições da PCR.

4.7.6 Detecção do Produto Amplificado

Do produto amplificado nas reações (PCR e *nested*-PCR) foram submetidos 10 µL à eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Gibco BRL) em tampão TBE 0,5x (45 mM de Tris-borato e 1 mM de EDTA [pH 8,0]) acrescido de 2 µL de Loading Buffer e, corado pelo brometo de etídio (5 µg/ml), sendo observado sob um transluminador de luz ultravioleta. Foram consideradas negativas as amostras que não apresentaram bandas no gel e foram

consideradas positivas aquelas que apresentaram uma banda de 480 pb para o produto da amplificação pela PCR e uma banda de 214 pb na *nested*-PCR ou apenas a banda da *nested*-PCR. Em cada gel foi incluído um marcador de peso molecular de 100 pb, um controle positivo e um negativo para PCR e *nested*-PCR (descrito na extração do DNA).

Juntamente com as amostras amplificadas para este estudo, foram utilizados, na corrida eletroforética, os controles positivo e negativo para o HHV-6 e um padrão de peso molecular de 100 pb. A corrida eletroforética foi desenvolvida a 80 Volts. O tempo variou de acordo com o tamanho da cuba utilizada. Durante 30 minutos ou o tempo necessário para deslocar o marcador de corrida Azul de Bromofenol, que migra proporcionalmente a um segmento de DNA com 100 pb, cerca de 1 cm do ponto de aplicação da amostra.

5 RESULTADOS

Dos oitenta e seis partos, foram colhidas cento e setenta e duas amostras, sendo oitenta e seis amostras de secreção cervical e oitenta e seis amostras de aspirado de nasofaringe, durante o período de junho de 2004 a agosto de 2004 em Franco da Rocha/SP e em Aracaju/SE de setembro de 2006 a março de 2007. Estas amostras foram examinadas por *nested* PCR, encontrando-se uma positividade de 8% da totalidade das amostras estudadas, conforme mostra a Figura 7.

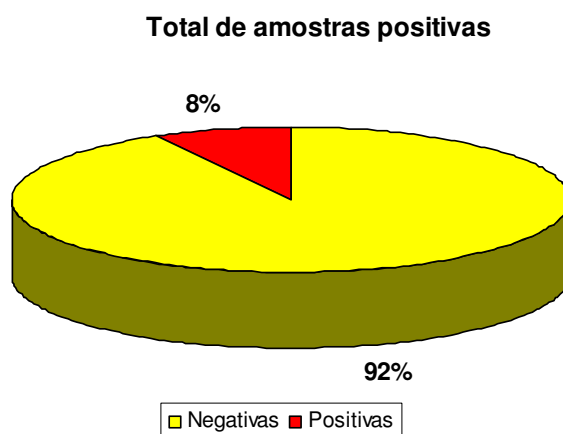


Figura 7. Frequência relativa de positividade por HHV-6, em mães e seus respectivos recém nascidos, nas cidades de Aracaju/SE e Franco da Rocha/SP, 2004-07.

A maior positividade de detecção do DNA viral do HHV-6 foi encontrado na secreção cervical perfazendo 64% das amostras positiva e 36% de positividade para as amostras de aspirado de nasofaringe (Figura 8).



Figura 8. Positividade do HHV-6, em mães e seus respectivos recém nascidos, nas cidades de Aracaju/SE e Franco da Rocha/SP, 2004-07.

Da totalidade das amostras positivas 14% apresentaram resultado positivo concomitantemente na mãe e recém-nascido, como mostrado na Figura 9.

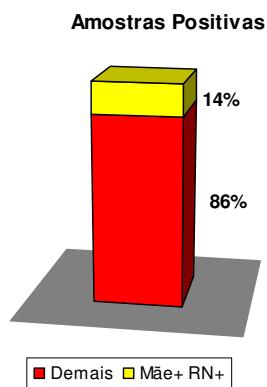


Figura 9. Positividade da secreção cervical da mãe e positividade do aspirado de nasofaringe do seu próprio recém-nascido.

A Figura 10 mostra que da totalidade das amostras positivas, 57% apresentaram positividade somente em secreção cervical das mães, 29% somente no aspirado de nasofaringe dos recém-nascidos e 14% apresentaram

positividade concomitante, tanto nas secreções cervicais das mães quanto no aspirado de nasofaringe dos recém-nascidos.

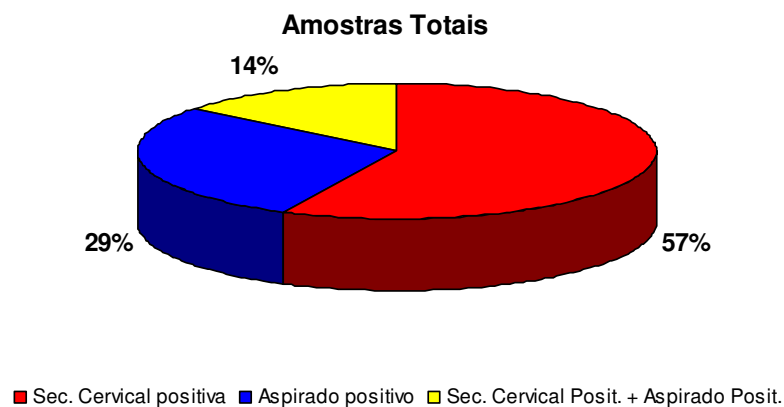


Figura 10. Positividade das amostras totais, evidenciando mães com secreções cervicais positivas, recém-nascidos com aspirados de nasofaringe positivos e mães e seus respectivos recém-nascidos com concomitância de positividade.

É demonstrado na Figura 11 um gel de agarose contendo 8 amostras positivas. Duas dos aspirados dos recém-nascidos (16R, 58R) e seis das secreções cervicais positivas (4M,45M,47M,54M,60M,61M).

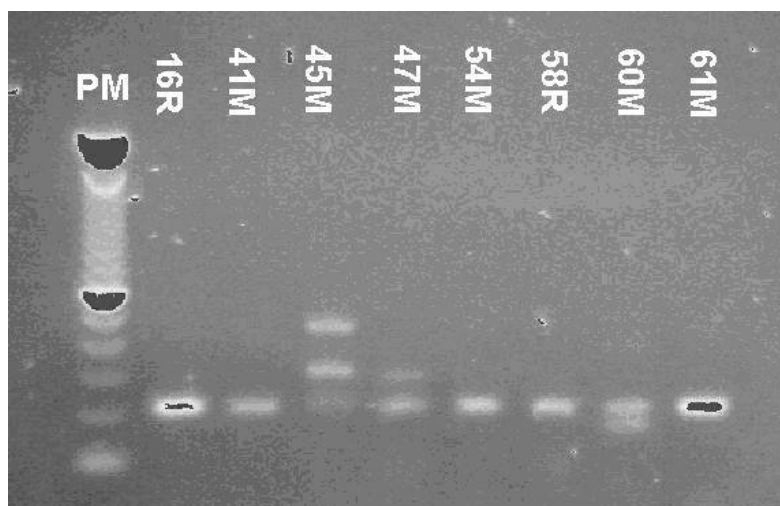


Figura 11. Gel de agarose a 1,5% com as amostras positivas coradas com Brometo de Etídio.

Na Tabela 4 é possível encontrar dados gerais sobre as amostras que apresentaram positividade para o DNA viral do HHV-6.

As amostras 16 (Aracaju), 58 (Aracaju), e 17 (Franco da Rocha) apresentaram positividade somente no aspirado de nasofaringe.

As amostras 41 (Aracaju), 45 (Aracaju), 47 (Aracaju), 54 (Aracaju), 60 (Aracaju), 61 (Aracaju) e 11 (Franco da Rocha), apresentaram positividade somente na secreção cervical.

Já as amostras 8 e 9, ambas de Franco da Rocha, apresentaram positividade tanto nas mães (secreção cervical), quanto nos seus respectivos recém-nascidos (aspirado de nasofaringe).

Tabela 4. Quadro de positividade do DNA viral do HHV-6, demonstrando a região geográfica e a data de onde foram colhidas as amostras.

Amostra	Procedência	Data	Aspirado	Sec. Cervical
16	Aracaju	3/10/2006	Positivo	-
41	Aracaju	18/10/2006	-	Positivo
45	Aracaju	25/10/2006	-	Positivo
47	Aracaju	26/10/2006	-	Positivo
54	Aracaju	4/11/2006	-	Positivo
58	Aracaju	8/11/2006	Positivo	-
60	Aracaju	8/11/2006	-	Positivo
61	Aracaju	5/3/2007	-	Positivo
8	Franco da Rocha	5/7/2004	Positivo	Positivo
9	Franco da Rocha	5/7/2004	Positivo	Positivo
11	Franco da Rocha	6/7/2004	-	Positivo
17	Franco da Rocha	13/7/2004	Positivo	-

6 DISCUSSÃO

De acordo com a literatura consultada, foram encontradas certas discordâncias em relação à transmissão do HHV-6. Este estudo demonstrou a detecção do DNA viral do HHV-6 em cento e setenta e duas amostras, das quais oitenta e seis foram coletadas de mães parturientes (secreção cervical) e oitenta e seis recém-nascidos (aspirado de nasofaringe).

Foram obtidos 8% de positividade para o DNA viral do HHV-6, sendo que destes positivos, 64% foram encontrados nas secreções cervicais e 36% nos aspirados de nasofaringe.

O DNA do HHV-6 tem sido detectado em secreções vaginais de mulheres que freqüentam as clínicas de doenças transmissíveis e em amostras cervicais de mulheres grávidas (LEACH, 1994; OKUNO, 1995 B; CAMPADELLI-FIUME, 1999).

Leach *et al.* (1994) sugeriram que a excreção viral no trato genital feminino poderia resultar em transmissão perinatal aos filhos e desenvolver a infecção neonatal. Quatro anos depois, DAIBATA *et al.* (1998) também sugeriram a mesma possibilidade, embora fosse incomum. CAMPADELLI-FIUME *et al.* (1999) afirmaram que crianças nascidas de mãe com secreção cervical positiva não adquirem a infecção.

Estes resultados demonstraram que 1,16% (2/172) da população estudada tinham positividade no aspirado de nasofaringe e a suas respectivas mães também tinham positividade na secreção cervical, embora sem apresentar a infecção.

Das oitenta e seis mulheres participantes do trabalho, 10,5% tiveram o swab com secreção cervical positivo para o DNA viral do HHV-6, corroborando com CASERTA *et al.* (2007) que identificaram 7,5% de gestantes com swabs cervicais positivos.

No entanto, alguns autores propõem a existência de uma forma latente do herpesvírus humano na qual o DNA proviral integrado cromossomalmente pode ser transmitido de geração a geração. A prevalência da integração cromossomal

do HHV-6 na população em geral tem sido estimada entre 1 e 2% (WARD *et al.*, 2007). Fazendo alusão a estes dados, foram obtidos 1,7% de resultado positivo para o DNA viral do HHV-6 somente no aspirado de nasofaringe do recém-nascido, sendo que as respectivas mãe apresentava secreção cervical negativa.

Em nosso trabalho, não foi realizada a análise cromossomal pelo método de hibridização (fluorescent in situ hybridization –FISH) e tão pouco a coleta serial em ocasiões diferentes para análise quantitativa de carga viral que poderiam validar nossos dados.

Para poder justificar este fato, as amostras deveriam apresentar em outras ocasiões o mesmo status de positiva, bem como altos níveis virais.

Casos prévios de doença associada ao HHV-6 podem ter sido diagnosticados erroneamente, quando baseados no DNA viral presente no sangue ou no líquido, pois, na verdade, isto poderia representar integração viral (WARD *et al.*, 2006).

A transmissão horizontal do vírus por adultos soropositivos (pais e equipe de saúde) para o neonato é a rota mais provável de infecção (YOSHIKAWA *et al.*, 2004; KOSUGE, H, ISEGAWA, Y, YAMANISHI, K.1997; MUKAI, T, *et al.* 1994).

7 CONCLUSÕES

Durante a realização deste trabalho, foi possível observar alguns itens importantes para pesquisas desta natureza.

Inicialmente foi possível notar que a alta porcentagem de positividade das secreções cervicais sugere que as chances do recém-nascido contrair o vírus no canal de parto durante o nascimento é alta; o que pode causar a infecção primária mais rápida.

Outro tópico observado foi alto número de aspirados de nasofaringe positivos para o DNA viral do HHV-6 e secreções negativas. Isto pode sugerir uma possível infecção cromosomal; uma vez que não houve outra via de transmissão.

Apesar destas observações, mais estudos são necessários para a descoberta do modo de transmissão do HHV-6.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABLASHI, D.; AGUT, H.; BERNEMAN, Z.; 29 other authors. Human herpesvirus-6 strain groups: a nomenclature. **Arch Virol.**, v.129, p.363–366, 1993.

ABLASHI, D.; SALAHUDDIN S. Z.; JOSEPHS S.F. *et al.* HBLV (or HHV-6) in human cell lines. **Nature**, v.329, p.207, 1987.

ADAMS, O.; KREMPE, C.; KOGLER, G.; WERNET, P.; SCHEID, A. Congenital infections with human herpesvirus 6. **J. Infect. Dis.**, v.178, p.544-6, 1998.

AKHYANI, N.; BERTI, R.; BRENNAN, M. B.; SOLDAN, S. S.; EATON, J. M.; MCFARLAND, H.F.; *et al.* Tissue distribution and variant characterization of human herpesvirus (HHV)-6: increased prevalence of HHV-6A in patients with multiple sclerosis. **J. Infect. Dis.**, v.182, p.1321-5, 2000.

AMJAD, M.; GILLESPIE, M. A.; CARLSON, R. M.; REZA-UL KARIM, M. Flow cytometric evaluation of antiviral agents against human herpesvirus 6. **Microbiol. Immunol.**, v.45(3), p.233-240, 2001.

ASANO, Y.; SUGA, S.; YOSHIKAWA, T.; URISU, A.; YAZAKI, T. Human herpesvirus type 6 infection (exantem subitum) without fever. **J. Pediatr.** 115:264-265, 1989.

AUBIN, J.T.; COLLANDRE, H.; CANDOTTI, D.; INGRAND, D.; ROUSIOUX, C.; BURGARD, M.; RICHARD, S.; HURAU, J.M.; AGUT, H. Several groups among human herpesvirus 6 strains can be distinguished by Southern blotting and polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v.29, p.367-72, 1991.

AUBIN, J.T.; ROBERT, C.; HURAU, J. M.; AGUT, H. Identification of human herpesvirus 6 variant A and B by amplicon hybridization with variant-specific oligonucleotides and amplification with variant-specific primers. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, p.2434-2440, 1994.

BALACHANDRA, K.; AYUTHAYA, P.; AUWANIT, W.; JAYAVASU, C.; OKUNO, T.; YAMANISHI, K.; TAKAHASHI, M. Prevalence of antibody to human herpesvirus 6 in woman and children. **Microbiol. Immunol.**, v.33, n.6, p.515-18, 1989.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALACHANDRAN, N.; TIRWATNAPONG, S.; PFEIFFER, B.; ABLASHI, D. V. & SALAHUDDIN, S. Z. Eletrophoretic analysis of human herpesvirus 6 polypeptides immunoprecipitated from infected cells with human sera. **J. Infect. Dis.**, v.163, p.29-34, 1991.

BERNSTEIN, D. I. Human herpesvirus-6 and exanthen subitum. **Adv. Pediatr. Infect. Dis.**, v.6, p.179-92, 1991.

BIBERFELD, P.; KRAMARSKY, B.; SALAHUDDIN, S.Z.; GALLO, R.C. Ultrastructural characterization of a new human B lymphotropic DNA virus (human herpesvírus 6) isolated from patients with lymphoproliferative disease. **J. Natl. Cancer Inst.** v.79, p.933-941, 1987.

BLACK, J.B.; DURIGON, E.; KITE-POWELL, K.; SOUZA, L.; CURLI, S.P.; AFONSO, A. M. S.; THEOBALDO, M.; PELLETT, P. E. Seroconversion to human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 among brazilian children with clinical diagnoses of measles or rubella. **Clin. Infec. Dis.**, v.23, p.1156-8, 1996.

BRAUN, D. K.; DOMINGUEZ, G.; PELLETT, P. E. Human herpesvirus 6. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.10, p.521-67, 1997.

BREESE B.B., Jr. Roseola infantum (exanthen subitum). **N. Y. State J. Med.**, v.41, p.1854-1859, 1941

CAMPADELLI-FIUME, G.; MIRANDOLA, P.; MENOTTI, L. Human herpesvirus 6: an emerging pathogen. **Emerg. Infect. Dis.**, v.5, n.3, p.353-66, 1999.

CASERTA, M. T.; HALL, C. B.; SCHNABEL, K.; LOFTHUS, G.; MCDERMOTT, M. P. Human Herpesvirus (HHV)-6 and HHV-7 infections in pregnant women. **J. Infec. Dis.**, v.196, p. 1296-303, 2007.

CHALLONER, P. B.; SMITH, K. T.; PARKER, J. D.; 12 OTHERS AUTHORS. Plaque-associated expression of human herpesvírus 6 in multiple sclerosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.92, p.7440-7444, 1995.

CLARK, D. A. Human herpesvirus 6. **Rev. Med Virol.** 10(3):155-73. 2000.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DAIBATA, M.; TAGUCHI, T.; SAWADA, T.; TAGUCHI, H.; MIYOSHI, I. Chromosomal transmission of human herpesvírus 6 DNA in acute lymphoblastic leukaemia. **The Lancet**, v.352, p.543-44, 1998.

DAIBATA, M.; TAGUCHI, T.; NEMOTO, Y.; TAGUCHI, H.; MIYOSHI, I. Inheritance of chromosomally integrated human herpesvirus 6 DNA. **Blood**, v.94, p.1545-9, 1999.

DALE, J. K.; STRAUSS, S. E.; ABLASHI, D. V.; SALAHUDDIN, Z. S.; GALLO, R. C.; NISHIBE, Y.; INOUE, Y. K. The Inoue-Melnick virus, human herpesvirus type 6, and the chronic fatigue syndrome. **Ann. Intern. Med.**, v.110, p.92-3, 1989.

DAHL, H.; FJAERTOFT, G.; NORSTED, T.; WANG, F. Z.; MOUSAVI-JAZI, M.; LINDE, A. Reactivation of human herpesvirus 6 during pregnancy. **J. Infect. Dis.**, v.180, p.2035-8, 1999.

DECLARACIÓN DE HELSINKI DE LA ASOCIACIÓN MÉDICA MUNDIAL – Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. **Boletines de La AMM**, 2000.

DEWHURST, S.; MC, K.; SHNABEL K.; HALL, C. B. Human herpesvírus 6 (HHV-6) variant B accounts for the majority of symptomatic primary HHV-6 infections in a population of U.S. infants. **J. Clin. Microbiol.**, v.31, p.416-418, 1993.

DI LUCA, D.; MIRANDOLA, P.; SECCHIERO, P.; CERMELLI, C.; ALEOTTI, A.; BOVENSI, P.; PORTOLANI, M.; CASSAI, E. Characterization of human herpesvírus 6 strains isolated from patients with exanthema subitum with or without cutaneous rash. **J. Infect. Dis.**, v.166, p.689, 1992

DOCKRELL, D. H. Human herpesvírus 6: molecular biology and clinical features. **J. Med. Microbiol.**, v.52, p.5-18, 2003.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DOMINGUEZ, G.; DAMBAUGH, T.R.; STAMEY, F.R. *et al.* Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A. **J. Virol.**, v.73, p.8040-8052, 1999.

DROBYSKI, W.; EBERLE, M.; MAJEWSKI, D.; BAXTER-LOWE, L. Prevalence of human herpesvirus 6 variant A and B infections in bone marrow transplant recipients as determined by polymerase chain reaction and sequence-specific oligonucleotide probe hybridization. **J. Clin. Microbiol.**, v.31, n.6, p.1515-20, 1993.

DUNNE, W. M.; JEVON, M. Examination of human breastmilk for evidence of human herpesvirus 6 by polymerase chain reaction. **J. Infect. Dis.**, v.168, p.250, 1993.

EFSTATHIOU, S.; GOMPELS, U. A.; CRAXTON, M. A.; HONESS, R. W.; WARD, K. DNA homology between a novel human herpesvirus (HHV-6) and human cytomegalovirus. **Lancet**, v.1, p.63-64, 1988.

FOX J. D.; BRIGGS M.; WARD P. A.; TEDDER R. S. Human herpesvirus 6 salivary glands. **Lancet**, v.336, p.590-93, 1990.

FREITAS, R. B.; LINHARES, M. I.; LINHARES, A. C. Prevalence of human herpesvirus 6 antibody among isolated Amazonian Amerindian communities in Brazil. **Trans. roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.88, p.167-169, 1994.

FREITAS, R. B.; LINHARES, A. C.; OLIVEIRA, C. S.; GUSMÃO R. H.; LINHARES, M.I. Association of human herpesvirus 6 infection with exanthem subitum in Belém, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.37(6), p.489-92, 1995.

FRENKEL N.; SCHIRMER E.C.; WYATTLS *et al.* Isolation of a newherpesvirus from human CD4+T cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.87, p.748-752, 1990.

GOLD, D.; BOWDEN, R.; SIXBEY, J.; RIGGS, R.; KATON, W.J.; ASHLEY, R.; OBRIGEWITCH, R. M.; COREY, L. Chronic fatigue. A prospective clinical and virologic study. **Am. Med. Assoc.**, v.264, p.48-53, 1990.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GOMPELS, U.A.; NICHOLAS, J.; LAWRENCE, G. *et al.* The DNA sequence of human herpesvirus-6: structure, coding content, and genome evolution. **Virology**, v.209, p.29-51, 1995.

GOMPELS, U. A. Roseolaviruses: human herpesviruses 6 and 7. *In* ZUCKERMAN, A. J.; BANATVALA, J. E.; PATTISON, J. R.; GRIFFITHS, P. D.; & SCHOUB B. D. (ed.), **Principles and practice of clinical virology**, 5th ed., London; United Kingdom, p.147–168, 2004.

GOPAL M. R.; THOMSON, B. J.; FOX, J.; TEDDER, R. S.; HONESS, R. W. Detection by PCR of HHV-6 and EBV DNA in blood and oropharynx of healthy adults and HIV-seropositives. **Lancet**, v.335, p.1598-99, 1990.

HAAHEIM, L. R.; PATTISON, J. R.; WHITLE R. J. **A Practical Guide to Clinical Virology**, 2ed, Edited by John Wiley & Sons, England, 2002.

HALL, C. B.; LONG, C. E.; SCHNABEL, K. C. *et al.* Human herpesvirus-6infection in children. Aprospective study of complications and reactivation. **N. Engl. J. Med.**, v.331, p.432-438, 1994.

HALL, C. B.; CASERTA, M. T.; SCHNABEL, K. C.; LONG, C.; EPSTEIN, L. G.; INSEL, R. A. *et al.* Persistence of human herpesvirus 6 according to site and variant: possible greater neurotropism of variant A. **Clin. Infect. Dis.**, v.26, p.132–7,1998.

HARNETT, G. B.; FARR, T. J.; PIETROBONI, G. R. & BUCENS, M. R. Frequent shedding of human herpesvirus 6 in saliva. **J. Med. Virol.**, v.30, p.128-30, 1990.

HELLSTROM, B.; VAHLQUIST, B. Experimental inoculation of roseola infantum. **Acta Paediatr.**, v.40, p.189-197,1951.

HUANG, L.M.; KUO, P.F.; LEE, C.Y.; CHEN, J.Y.; LIU, M.Y.; YANG, C.S. Detection of human herpesvirus-6 DNA by polymerase chain reaction in serum or plasma. **J. Med. Virol.**, v.38, p.7-10, 1992.

ISEGAWA, Y.; MUKAI, T.;NAKANO, K.; KAGAWA, M.; CHEN, J.; MORI, Y.; SUNAGAWA, T.; KAWANISHI, K.; SASHIHARA, J.; HATA, A.; ZOU, P.; KOSUGE, H.; YAMANISHI, K. Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvírus 6 variants A and B. **J. Virol.**, v.73, n.10, p.8053-63, 1999.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

JAHAN, N.; RAZZAQUE, A.; GREENSPAN, J.; CONANT, M. A.; JOSEPHS, S. F.; NAKAMURA, S.; ROSENTHAL, L. J. Analysis of human KS biopsies and cloned cell lines for cytomegalovirus, HIV-1, and other selected DNA virus sequences. **SIDA Res. Hum. Retroviruses**, v.5, p.225-31, 1989.

JARRETT, R. F.; CLARK, D. A.; JOSEPHS, S. F.; ONIONS, D. E. Detection of human herpesvirus-6 DNA in peripheral blood and saliva. **J. Med. Virol.**, v. 32, p.73-6, 1990.

JOSEPHS, S. F.; ABLASHI, D. V.; SALAHUDDIN, S. Z.; JAGODZINSKI, L. L.; WONG-STALL, F.; GALLO, R. C. Identification of human herpesvirus 6 glycoprotein H and putative large tegument protein genes. **J. Virol.**, v.65, 5597-604, 1991.

KADAKIA, M. P.; RYBKA, W. B.; STEWART, J. A.; PATTON, J. L.; STAMEY, F. R.; ELSAWY, M.; PELLETT, P. E.; ARMSTRONG, J. A. Human herpesvirus 6: Infection and disease following autologous and allogenic bone marrow transplantation. **Blood**, v.87, p.5341-54, 1996.

KONDO, K.; KONDO, T.; OKUNO, T. *et al.* Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages. **J. Gen. Virol.**, v.72, p.1401, 1991.

KASOLO, F. C.; MPABALWANI, E.; GOMPELS, U. A. Infection with AIDS-related herpesviruses in human immunodeficiency virus-negative infants and endemic childhood Kaposi's sarcoma in Africa. **J. Gen. Virol.**, v.78, p.847-55, 1997

KEMPE, C.; SHOW, E. B.; JACKSON, J. R.; SILVER H. K. Studies on the etiology of exanthem subitum (roseola infantum). **J. Pediatr.**, v.37, p.561-568, 1950.

KIDO, S.; KONDO, K.; KONDO, T.; MORISHIMA, T.; TAKAHASHI, M.; YAMANISHI, K. Detection of human herpesvirus 6 DNA in throat swabs by polymerase chain reaction. **J. Med. Virol.**, v.32, p.139-42. 1990.

KOSUGE, H., ISEGAWA, Y., YAMANISHI, K. Nucleotide sequence analysis of a 30-kilobase-pair region of human herpesvirus-6B (HHV-6B) genome and strain-specific variations in major immediate-early genes. **Virus Res.**, v.52, p.1-14, 1997.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

KRUEGER, G, R. F. & ABLASHI, D. V. Human Herpesvirus-6: A Short Review of Its Biological Behavior. **Intervirol**, v.46, p.257-269, 2003. (A)

KRUEGER, G, R. F.; WASSERMANN, K.; DE CLERCK, L. S.; STEVEN, W. J.; BOUGEOIS, N.; ABLASHI, D. V.; JOSEPHS, S. F.; BALACHANDRAN, N. Latent herpesvirus-6 in salivary and bronchial glands. **Lancet**, v.336, p.1255-56, 1990. (B)

KUSUHARA, K.; UEDA, K.; OKADA, K.; MIYAZAKI, C.; TOKUGAWA, K.; HIROSE, M. & TAKAHASHI, K. Do second attacks of exanthema súbito result from human herpesvirus 6 reactivation or reinfection? **Ped. Infect. Dis. J.**, v.10, p.468-70, 1991.

LANE, B. R.; LIU, J.; BOCK, P. J.; SCHOLS, D.; COFFEY, M. J., STRIETER, R. M.; POLVERINI, P. J.; MARKOVITZ, D, M. Interleukin-8 and growth-regulated oncogene alpha mediate angiogenesis in Kaposi's sarcoma. **J. Virol.**, v.76, n. 22, p.11570-83,2002.

LAWRENCE, G. L.; CHEE, M.; CRAXTON, M. A.; GOMPELS. U. A.; HONESS, R. W. *et al.*, Human herpesvírus 6 is closely related to human cytomegalovirus. **J. Virol.**, v.64, p.287-99, 1990.

LEACH, C.; NEWTON, E.; MCPARLIN, S.; JENSON, H. Human herpesvirus 6 infection of the female genital tract. **J. Infec. Dis.**, v.169, p.1281-3, 1994.

LEVY, J. A.; FERRO, F.; GREENSPAN, D.; LENNETTE, E. T. Frequent isolation of HHV-6 from saliva and high seroprevalence of the virus in the population. **Lancet**, v.335, p.1047-50, 1990. (A)

LEVY, J. A.; LANDAY, A.; LENNETTE, E. T. Human herpesvirus 6 inhibits human deficiency virus type 1 replication in cell culture. **J. Clin. Microbiol.**, v.28, p.2362-64, 1990. (B)

LINHARES, M. I.; EIZURU, Y.; TATENO, S.; MINAMISHIMA Y. Seroprevalence of human herpesvirus 6 infection in Brazilian and Japanese populations in the north-east of Brazil. **Microbiol. Immunol.**, v.35, n.11, p.1023-7, 1991.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

LAU, Y. L.; PEIRIS, M.; CHAN, G. C.; CHAN, A. C.; CHIU, D.; HA, S. Y. Primary human herpes virus 6 infection transmitted from donor to recipient through bone marrow infusion. **Bone Marrow Transplant**, v.21, p.1063–6, 1998.

LOCATELLI, G.; SANTORO, F.; VEGLIA, F.; GOBBI, A.; LUSSO, P.; MALNATI, M. Real-time quantitative PCR for human herpesvírus 6 DNA. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, n.11, p.4042-48, 2000.

LOPEZ, C.; PELLETT, P.; STEWART, J.; GOLDSMITH, C.; SANDERLIN, K.; BLACK, J.; WARFIELD, D.; FEORINO, P. Characteristics of human herpesvirus-6. **J. Infect. Dis.**, v.157,n.6, p.1271-3, 1988.

LUSSO, P.; GALLO, R. C. Human herpesvirus 6 in AIDS. **Immunol. Today**, v.16, p.67–71, 1995.

MADEA, B.; ROEWERT.; H. J.; KRUEGER, G. R.; ABLASHI, D. V.; JOSEPHS, S. F. Search for early lesions following human immunodeficiency virus type 1 infection. A study of six individuals who died a violent death after seroconversion. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v.114, p.379-82, 1990.

MUKAI, T.; YAMAMOTO, T.; KONDO, T.; KONDO, K.; OKUNO, T.; KOSUGUE, H. *et al.* Molecular epidemiological studies of human herpesvírus 6 in families. **J. Med. Virol.**, v.42, p.224-7. 1994

OHASHI, M.; YOSHIKAWA, T.; IHIRA, M.; SUZUKI, K.; SUGA, S.; TADA, S.; UDAGAWA, Y.; SAKUI, H.; IIDA, K.; SAITO, Y.; NISIYAMA, Y.; ASANO Y. Reactivation of human herpesvirus 6 and 7 in pregnant women. **J. Med. Virol.**, v.67, p.354-8, 2002.

OKUNO, T.; HIASHI, K.; YAMANISHI, K.; TAKAHASHI, M.; KOKADO, Y.; ISHIBASHI, M.; TAKAHARA, S.; SONODA, T.; TANAKA, K.; BABA, K.; YABUUCHI, H.; KURATA, T. Human herpesvirus 6 infection in renal transplantation. **Transplantation**, v.49, p.519-22, 1990.

OKUNO, T.; OISHI, H.; HAYASHI, K.; NONOGAKI, M.; TANAKA, K.; YAMANISHI, K. Human herpesvírus 6 and 7 in cervixes of pregnant women. **J. Clin. Microbiol.**, v.33, p.1968-70, 1995.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

OLIVEIRA, S. A.; TURNER, D. J.; KNOWLES, W.; NASCIMENTO, J. P.; BROWN, D. W.; WARD, K. N. Primary human herpesvirus-6 and -7 infections,

often coinciding, misdiagnosed as measles in children from a tropical region of Brazil. **Epidemiol. Infect.**, v.131, p.873-9, 2003.

PELLETT, P. E.; LINDQUESTER, G. J.; FEORINO, P. & LOPEZ, C.. Genomic heterogeneity of human herpesvirus 6 isolates. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.278, p.9-18, 1990.

PELLETT, P. E.; BLACK, J. B.; YAMAMOTO, M. Human herpesvirus 6: the virus and the search for its role as a human pathogen. **Adv. virus res.**, v.41, p.1-52, 1992.

PELLETT, P. E.; DOMINGUEZ, G. **Fields Virology**. 4 ed. by LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, 2001. 1 CD-ROM.

PRUKSANANONDA, P.; HALL, C. B.; INSEL, R. A.; MCLNTYRE, K.; PELLETT, P. E.; LONG, C. E. et al. Primary human herpesvirus 6 infection in young children. **N. Engl. J. Med.**, v.326, p.1445-50, 1992.

RHOADS, M. P. MARGARET, A. S., ZERR, D. M. Family saliva sharing behaviors and age of human herpesvirus-6B infection. **J. Infect.**, v.54, p.623-626, 2007.

RUSSLER, S. K.; TAPPER, M. A.; KNOX, K. K.; LIEPINS, A.; CARRIGAN, D. R. Pneumonitis associated with coinfection by human herpesvirus 6 and *Legionella* in an immunocompetent adult. **Am. J. Pathol.**, v.138, p.1405-11, 1991.

SALAHUDDIN, S.Z.; ABLASHI D. V.; MARKHAM P.D.; *et al.* Isolation of a new virus HBVL in patients with lymphoproliferative disorders, **Science**, v.234, p.596-601, 1986.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory., p. Apendix E.3, 1989.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SINGH, N.; PATERSON, D. L. Encephalitis caused by human herpesvirus-6 in transplant recipients: relevance of a novel neurotropic virus. **Transplantation**, v.69, p.2474–2479. 2000.

SCHIRMER, E. C., WYATT, L. S., YAMANASHI, K., RODRIGUEZ, W. J.; FRENKEL, N. Differentiation between two distinct classes of viruses now classified as human herpesvirus 6. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.88, p.5922–5926, 1991.

SCHLEISS, M. R. Vertically Transmitted Herpesvirus Infections. **HERPES**, v.10(1), 2003.

STEEPER, T. A.; HORWITZ, C. A.; ABLASHI, D. V. *et al.* The spectrum of clinical and laboratory findings resulting from human herpesvirus-6(HHV-6) in patients with mononucleosis-like illnesses not resulting from Epstein-Barr virus or cytomegalovirus. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.93, p.776-783, 1990.

SUGA, S.; YOSHIKAWA, T.; ASANO, Y.; YAZAKI, T. & OZAKI, T. Neutralizing antibody assay for human herpesvirus-6. **J. Med. Virol.**, v.30, p.14-9, 1990.

TAKAHASHI, K.; SONODA, S.; KAWAKAMI, K.; MIYATA, K.; OKI, T.; NAGATA, T.; YAMANISHI, K. Human herpesvirus 6 and exantem subitum. **Lancet**, p.1463, 1988.

TANAKA-TAYA, K.; SASHIHARA, J.; KURAHASHI, H.; AMO, K.; MIYAGAWA, H.; KONDO, K. *et al.* Human herpesvirus 6 (HHV-6) is transmitted from parent to child in an integrated form and characterization of cases with chromosomally integrated HHV-6 DNA. **J. Med. Virol.**, v.73, p.465–73, 2004.

WAKEFIELD, D.; LLOYD, A.; DWYER, J.; SALAHUDDIN, S. Z.; ABLASHI, D. V. Human herpesvirus 6 and myalgic encephalomyelitis. **Lancet**, p.1059, 1988.

WARD, K. N.; GRAY, J. J.; EFSTATHIOU, S. Brief report: primary human herpesvirus 6 infection in a patient following liver transplantation from a seropositive donor. **J. Med. Virol.**, v.28, p.69–72, 1998.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

WARD, K. N. The natural history and laboratory diagnosis of human herpesviruses-6 and -7 infections in the immunocompetent. **J. Clin. Virol.**, v.32, p.183–193, 2005

WARD, K. N. Human herpesviruses-6 and -7 infections. **Curr. Opin. Infect. Dis.**,v.18, p.247-52, 2005.

WARD, K. N.; LEONG, H. N.; NACHEVA, E. P.; HOWARD, J.; ATKINSON, C. E.; DAVIES N. W.; *et al.* Human herpesvirus 6 chromosomal integration in immunocompetent patients results in high levels of viral DNA in blood, sera, and hair follicles. **J. Clin. Microbiol.**, v.44, p.1571–4, 2006.

WARD, K.N., LEONG, H.N., THIRUCHELVAM, A.D., ATKINSON, C.E., CLARK D. A. Human herpesvirus 6 DNA levels in cerebrospinal fluid due to primary infection differ from those due to chromosomal viral integration and have implications for diagnosis of encephalitis. **J. Clin. Microbiol.**, v.45, p.1298–304, 2007.

YAMAMOTO, M.; BLACK, J.; *et al.* Identification of nucleocapsid protein as a specific serological marker of human herpesvirus 6 infections. **J. Clin. Microbiol.**,v.28, p.1957-62, 1990.

YAMANISHI, K.; OKUNO. T.; SHIRAKI, K.; TAKAHASHI, M.; KONDO, T.; ASANO, Y.; KURATA, T. Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. **Lancet**, p.1065-67, 1988. (B)

YAMANISHI, K. HHV-6: an Evolving Story. **HERPES.**, v.7(3), p.70-5, 2000.

YAMANISHI, K. **Fields Virology** Main TOC 4 ed. LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, 2001. (C). 1 CD-ROM.

YANAGI, K.; HARADA, S.; BAN, F.; OYA, A.; OKABE, N.; TOBINAI, K. High prevalence of antibody to human herpesvirus-6 and decrease in titer with increase in age in Japan. **J. Infect. Dis.**, v.161, 153-54, 1990.

YOSHIDA, M.; UNO, F.; BAI, Z.L.; YAMADA, M.; NII, S.; SATA, T.; KURATA, T.; YAMANISHI, K.; TAKAHASHI, M. Electrón microscopic study of a herpes-type virus isolated from a infant with exantem subitum. **Microbiol. Immunol.**, 33:147-154. 1989.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

YOSHIKAWA, T.; SUGA, S.; ASANO, Y.; YAZAKI, T.; OZAKI, T. Neutralizing antibodies to human herpesvirus-6 in healthy individuals. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, v.9, 589-90, 1990.

YOSHIKAWA, T.; SUGA, S.; ASANO, Y.; YASAKI, T.; KODAMA, H.; OZAKI, T. Distribution of antibodies to a causative agent exanthem súbito (human herpesvirus-6) in healthy individuals. *Pediatrics*, v.84, p.675-7, 1989.

YOSHIYAMA, H.; SUZUKI, E.; YOSHIDA, T.; YAMAMOTO, N. Role of human herpesvirus 6 infection in infants with exantema súbito. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, v.9, p.71-74, 1990.

YOSHIKAWA, T.; SUZUKI, K.; UMEMURA, K.; AKIMOTO, S.; MIYAKE, F.; USUI, C.; FUJITA, A.; SUGA, S.; ASANO, Y. Atypical clinical features of a human herpesvirus-6 infection in a neonate. *J. Med. Virol.*, 74:463-466, 2004.

ZAHORSKY, J. Roseola infantilitis. *Pediatrics*., v.22, p.60–64, 1910.

CARTA DE APRESENTAÇÃO AOS PAIS

Prezados Pais ou responsável

O Herpesvirus humano tipo 6 (HHV-6) é o vírus causador de uma doença chamada exantema súbito, podendo acometer desde recém-nascidos até criança de dois anos. Ocorre uma febre alta e vermelhão na pele sendo na maioria das vezes uma doença leve, mas podem ter complicações mais graves como convulsão, hepatites etc.

Não se sabe como a doença é transmitida, se é na hora do parto, leite materno ou pela saliva da mãe.

O principal objetivo deste trabalho é estudarmos nos recém-nascidos da Maternidade Dr. João Carlos Firpo a presença do HHV-6 e se este vírus está passando da mãe para o recém-nascido no momento do parto.

Para tornar possível esta investigação, serão coletados da mãe: secreção do canal de parto. E do recém-nascido secreção do nariz no momento do parto.

Nossa equipe está apta para a coleta e realização dos exames. Todo o material utilizado é descartável e o serviço prestado é inteiramente gratuito.

Agradecemos a sua colaboração em mais esta realização.

Prof. Dr. Ricardo Gurgel

Pediatra-UFS

Prof. Dr. Edison Durigon

Pesquisador responsável ICB-USP

Eduardo Salustino Faro

Doutorando ICB-USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
05508-900 - São Paulo - SP
Tel: (011) 3091-7200
Fax: (011) 3091-7354

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

EU,.....

RG..... Data de Nascimento ___/___/___

Responsável pelo (a) menor..... Data Nascimento ___/___/___

Nº Prontuário, abaixo assinado, declaro ter pleno conhecimento do que se segue, CONCORDO que meu filho(a) e eu participemos como voluntários na pesquisa: *"Epidemiologia Molecular do Herpesvírus Humano tipo 6 (HHV-6) em crianças recém-nascidas e suas respectivas mães"*.

- Entendo que o objetivo deste estudo é a passagem do vírus causador do exantema súbito em recém-nascidos na Maternidade Dr. João Firpo.
- Fui devidamente esclarecido (a) que serão necessárias a coleta de amostras secreção cervical e aspirado de nasofaringe para a realização dos exames laboratoriais a fim de comprovar a presença do vírus.
- Estou ciente que os exames não põem em risco a minha vida nem a do recém-nascido.
- Receberei respostas ou esclarecimentos a quaisquer dúvidas, antes e durante o curso da pesquisa, sobre tudo o que for feito, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa. Todo o material utilizado na coleta da pesquisa é esterilizado e descartável.
- Será mantido o caráter confidencial das informações relacionadas com a privacidade, proteção da minha imagem e do meu filho (a), garantindo que não serão utilizadas as informações em prejuízo de pessoas e/ou comunidade. Não haverá remuneração financeira de qualquer espécie pela nossa participação neste estudo.
- Estou ciente que as informações médicas resultantes da pesquisa farão parte do meu prontuário médico e do meu filho (a) e seguirão o regulamento de dados confidenciais e privacidade da Maternidade Dr. João Firpo.
- Estou ciente que caso os dados sejam utilizados em publicação médica ou de ensino, não serão utilizados nomes; dados de identificação como foto, áudio, videotape só serão utilizados com minha permissão por escrito.
- Estou ciente que serão respeitados nossos valores culturais, religiosos e morais; e deverei retornar para as avaliações nas datas agendadas.
- Estou ciente que como a minha participação e do meu filho é voluntária poderei retirar a qualquer tempo o consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem problema de qualquer ordem e sem prejuízo ao seu cuidado.
- Entendi que caso ocorra algum dano, ainda que improvável, resultando direta ou indiretamente a minha participação ou a do meu filho (a), se este dano for declarado, imediatamente haverá tratamento médico disponível, garantido o acesso a Maternidade Dr. João Firpo ou quando for necessário em ou outro Serviço Estadual de Saúde.
- Entendi que toda a minha participação que gerará custo ao hospital não será cobrada, pois a pesquisa é inteiramente gratuita.

Assinatura do responsável _____

Assinatura do Pesquisador (carimbo ou nome legível) _____

Av. Prof. Lineu Prestes, 1374

05508-900 - São Paulo - SP

Tel: (011) 3091-7200

Fax: (011) 3091-7354

Testemunhas: 1. _____ 2. _____

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS- ESCLARECIDO.

EU _____ RG _____

pai/mãe ou responsável pelo (a) menor _____ estou esclarecida

(o) da participação voluntária da parturiente e do recém-nascido, **CONFIRMO** que fui convenientemente esclarecido (a) pelo pesquisador e estou ciente de que serão colhidas amostras de secreção cervical e aspirado de nasofaringe, para exames laboratoriais para diagnóstico e identificação do vírus causador do exantema súbito; os procedimentos que farão em meu filho (a) e os possíveis riscos e desconforto, bem como os benefícios que poderá ter.

Comprometo-me, a comparecer para o acompanhamento ambulatorial se necessário, retornando nas datas marcadas previamente, por qualquer membro da equipe, para dar continuidade às avaliações, bem como comparecer aos exames complementares.

Eu li e compreendi este formulário de consentimento. Concordo que eu e meu filho (a) participemos como voluntário neste estudo Clínico.

Aracaju, ____ de _____ de 200__.

Assinatura do Responsável _____

Assinatura do Pesquisador (carimbo ou nome legível) _____

Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
05508-900 - São Paulo - SP
Tel: (011) 3091-7200
Fax: (011) 3091-7354

Testemunhas:

1. _____ 2. _____