

JULIANA PASQUOTTO

**DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO VÍRUS
EPSTEIN-BARR PELA REACÇÃO EM CADEIA DA
POLIMERASE EM TEMPO REAL (REAL TIME PCR)
EM PACIENTES TRANSPLANTADOS DE
CÉLULAS HEMATOPOÉTICAS E
COINFECÇÃO COM O CITOMEGALOVÍRUS**

CAMPINAS

UNICAMP

2008

JULIANA PASQUOTTO

**DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO VÍRUS
EPSTEIN-BARR PELA REACÇÃO EM CADEIA DA
POLIMERASE EM TEMPO REAL (REAL TIME PCR)
EM PACIENTES TRANSPLANTADOS DE
CÉLULAS HEMATOPOÉTICAS E
COINFECCÃO COM O CITOMEGALOVÍRUS**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Cecília Botelho Costa

CAMPINAS

Unicamp

2008

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

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

P265d Pasquotto, Juliana
“Detecção e quantificação do vírus Epstein-Barr pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (real time PCR) em pacientes transplantados de células hematopoéticas e infecção com o citomegalovírus” / Juliana Pasquotto. Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Sandra Cecília Botelho Costa
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Vírus Epstein-Barr. 2. Herpesvirus humano.
3. Vírus linfoproliferativos. I. Costa, Sandra Cecília Botelho. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

Título em inglês: “Detection and quantification of Epstein-Barr virus by real time polymerase chain reaction in hematopoietic stem cell transplantation patients and coinfection with cytomegalovirus”

Keywords: • Epstein-Barr vírus
• Herpesvirus 4, Human
• Gammaherpesvirinae

Titulação: Mestre em Farmacologia:

Banca examinadora:

Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa

Profa. Dra. Maria Lourdes Ribeiro Bargas Castro

Prof. Dr. Fernando Lopes Alberto

Data da defesa: 31 - 01 - 2008



Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa

Membros:

Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa

Sandra Costa

Profa. Dra. Maria de Lourdes Rios Barjas Castro

Maria de Lourdes Rios Barjas Castro

Prof. Dr. Fernando Lopes Alberto

Fernando Lopes Alberto

Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 31/01/2008

Aos meus pais,
Eliane e Achilles
que sempre estiveram ao meu lado....
que com muito sacrifício
proporcionaram mais um sonho e
objetivo alcançado.

E
acima de tudo
pelo grande incentivo e
imenso amor.

Ao meu irmão
Renan
pela força e
incentivo...

Ao
meu futuro marido
Dionis
pela compreensão e
paciência...

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À

Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa,
pela oportunidade de realização do mestrado e
pela confiança em meu trabalho.

**A todos os pacientes que participaram deste estudo, seus doadores e familiares...
meu muito obrigada!!!!**

A minha querida avó Augusta, minha tia Helena e Ederly pelo incentivo e orações em horas difíceis.

A Dra. Sandra Helena Alves Bonon, sinceros agradecimentos pela grande ajuda na realização deste trabalho, pelos ensinamentos durante estes anos e pela amizade.

A Dra. Dulcinéia pela inestimável ajuda, compreensão, paciência durante este trabalho e pela amizade.

A Maira pelos ensinamentos e principalmente pela amizade... obrigada.

A Daniela C. Parola pela ajuda, paciência e amizade..... obrigada.

A Carla Tavares e Telma Barbosa pelas dicas e muitas risadas.

Ronaldo Luis Thomasini pela ajuda e amizade.

Aos amigos do laboratório: Bruna Maria Roësler, Cristiane Mudinutti, Débora Dieamant, Susana e Inah pela amizade e confiança....

A Valderez e a Sandra do Laboratório de Imunologia/Unicamp pelos ensinamentos.

A Mara Lúcia do Departamento de Medicina Nuclear/Unicamp pela compreensão.

As amigas do Departamento de medicina nuclear/Unicamp pela compreensão, incentivo e amizade.

Ao Drº Fernando Costa pela ajuda.

A Dra Silvia e ao Drº Cláudio pela atenção.

Ao amigo Jhony pela ajuda e paciência.

A Dra Telma Okay do Laboratório de Virologia da USP/SP e a Lucy do Laboratório do Profº Pannuti USP/SP pela atenção.

E, aos participantes da banca de qualificação (Drº Heitor Moreno, Drª Malu, Drº José Vassalo) realizada dia 21/11/2007, agradeço as dicas, correções e principalmente por terem compreendido aquele momento.

Trabalho realizado no Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular e Antigenemia, do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) com a colaboração do Serviço de Transplantes de Medula Óssea do Centro de Hematologia e Hemoterapia (HEMOCENTRO/UNICAMP).

	Pág.
RESUMO.....	xxxv
ABSTRACT.....	xxxix
1- INTRODUÇÃO.....	43
1.1- Histórico do Epstein-Barr (EBV).....	45
1.2- Histórico do Citomegalovírus (HCMV).....	45
1.3- Classificação.....	46
1.3.1- Classificação do EBV.....	46
1.3.2- Classificação do HCMV.....	48
1.4- Epidemiologia e Transmissão.....	49
1.4.1- EBV.....	49
1.4.2- HCMV.....	52
1.5- Manifestações Clínicas.....	54
1.5.1- EBV.....	54
1.5.2- HCMV.....	54
1.6- Ciclo de Replicação.....	55
1.6.1- EBV.....	55
1.6.2- HCMV.....	60
1.7- Doença Linfoproliferativa (PTLD).....	61
1.8- Resposta Imune Celular ou Humoral à Infecção pelo EBV.....	63
1.9- Diagnóstico Laboratorial.....	66

1.9.1- Testes Diagnósticos para o EBV.....	67
1.9.2- Testes Diagnósticos para o HCMV.....	70
1.9.3- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	70
1.10- Tratamento.....	72
1.10.1- Tratamento da Infecção Ativa pelo EBV.....	72
1.10.2- Tratamento da Infecção Ativa pelo HCMV.....	73
1.11- Gravidade da Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro (GVHD)	
Aguda.....	74
2- OBJETIVOS.....	77
3- CASUÍSTICA.....	81
4- MÉTODOS.....	87
4.1- Lise de Hemácias.....	89
4.2- Lise de Leucócitos.....	89
4.3- Extração de DNA no Soro.....	90
4.4- Verificação da qualidade da amostra pela PCR.....	91
4.4.1- Detecção do DNA do citomegalovírus humano (HCMV) pela reação em cadeia da polimerase.....	92
4.5- Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR).....	94
4.5.1- Quantificação Absoluta pela PCR em Tempo Real.....	95
4.5.2- Clonagem e Seqüenciamento.....	95
4.5.3- Seqüenciamento.....	96
4.5.4- Padronização da PCR em Tempo Real.....	98
4.5.5- Normas de Biossegurança utilizadas para evitar a contaminação nas amostras.....	99
4.5.6- Determinação de anticorpos IgM e IgG ANTI-EBV utilizando a técnica de ELISA.....	100

5- RESULTADOS.....	101
5.1- Total de Exames Realizados Durante Monitoração.....	103
6- DISCUSSÃO.....	111
7- CONCLUSÃO.....	117
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	121
9- APÊNDICE.....	143

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
µg	Microgramas
5' → 3'	Sentido da transcrição
a	Alfa
AA	Anemia Aplástica
AAG	Anemia Aplástica Grave
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ATG	Globulina anti-timocítica
ACV	Aciclovir
b	Beta
CCD	Câmara que forma imagens através de uma lente convergente.
CMV ou HCMV	Citomegalovírus
CO₂	Dióxido de Carbono (Gás Carbônico)
CPP	Célula Periférica Progenitora
Ct	Threshold cycle “ciclo de amplificação”
dATP	Desoxirribonucleotídeo Adenina Trifosfato
dCTP	Desoxirribonucleotídeo Citosina Trifosfato
DEAFF	Detection of early antigen fluorescent foci
DECH ou GVHD	Doença do enxerto contra hospedeiro ou graft versus host disease
dGTP	Desoxirribonucleotídeo Guanina Trifosfato
DNA	Ácido Desoxirribonucleico

dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifostato
dTTP	Desoxirribonucleotídeo Timidina Trifostato
EA	Antígenos precoces
EBNAs	Proteínas nucleares
EBV	Vírus Epstein-Barr ou Herpervírus Humano 4
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
EX2	Iniciador EX2 (primer)
g	Gamma
Hcl	Ácido Clorídrico
HCV	Vírus da hepatite C
HHV4	Vírus Epstein-Barr
HEMOCENTRO	Centro de Hematologia e Hemoterapia
IEA	Antígenos imediatamente precoces
Ig	Imunoglobulina
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
IL	Interleucina
kb	Quilobases
kg	Quilogramas
LH	Linfoma de Hodgkin
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LMA	Leucemia Mielóide Aguda

LMC	Leucemia Mielóide Crónica
LMPs	Proteínas de membrana
LNH	Linfoma não Hodgkin
M	Molar
mg	Miligramas
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
MI	Mononucleose infecciosa
ml	Mililitros
MM	Mieloma Múltiplo
mM	Micromol
MO	Medula óssea
n	Número de Indivíduos (estatístico)
NaCl	Cloreto de Sódio
Nested-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase tipo “nested” ou PCR dupla
P53	Gene regulador do ciclo celular
PBS	Solução Salina Fosfatada Tamponada
PCR	Polymerase Chain Reaction ou Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Logaritmo da recíproca da concentração de íons Hidrogênio presentes em uma dada solução
PTLD	Doença linfoproliferativa pós transplante
qPCR	PCR quantitativa
RNA	Ácido ribonucléico
RNA_m	Ácido ribonucléico mensageiro ou ARN mensageiro
RPM	Rotações por minuto

SDS	Duodecil Sulfato de Sódio
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SG	Sarcoma Granulocítico
SST	Solução Salina com Fosfatos
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCPH	Transplante de Células Progenitoras Hematopoéticas
TGI	Trato Gastrointestinal
TGO	Transaminase glutâmico oxalacética (Enzima hepática)
TGP	Transaminase glutâmico pirúvica (Enzima hepática)
TMO	Transplante de Medula Óssea
U/mL	Unidade por miliLitro
VCA	Antígeno do capsídeo viral

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 Tipos de expressão dos genes latentes do vírus Epstein-Barr.....	57
Tabela 2 Doenças associadas ao EBV e a porcentagem de ocorrência.....	63
Tabela 3 Protocolo de tratamento precoce de infecção ativa pelo CMV.....	73
Tabela 4 Representa a graduação e estágio da GVHD aguda.....	75
Tabela 5 Sequência de primers utilizados para a reação da betaglobina humana.....	91
Tabela 6 Sequência de primers utilizados para a reação da Nested-PCR para CMV.....	93
Tabela 7 Sequência de primers para a reação de PCR em Tempo Real para o EBV.....	98
Tabela 8 Total de exames realizados.....	103
Tabela 9 Características gerais dos pacientes.....	104
Tabela 10 Resultados da detecção do DNA-EBV pela PCR em Tempo Real e do DNA-CMV pela Neste-PCR.....	105
Tabela 11 Casos de EBV positivos em relação a infecção ativa pelo CMV.....	106
Tabela 12 Casos de EBV e CMV positivos em relação à ocorrência de GVHD.....	106
Tabela 13 Casos de co-infecção em relação à ocorrência de GVHD.....	106
Tabela 14 Pacientes que apresentaram doença por CMV e resultados de testes.....	108
Tabela 15 Média de números de cópias do DNA do EBV encontrado nas amostras.....	109
Tabela 16 Representação dos resultados de todos os pacientes.....	110

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Tipos de expressão dos genes latentes do vírus Epstein-Barr.....	47
Figura 2	Genoma do Citomegalovírus.....	48
Figura 3	Estrutura dos Herpesvírus.....	49
Figura 4	Mecanismo de infecção primária no hospedeiro.....	51
Figura 5	Modelo sugerido para o desenvolvimento da proteína p53 no reparo do DNA e a perda desta atividade mediada pela proteína p53 mutante.....	59
Figura 6	Esquema do diagnóstico da mononucleose infecciosa causada pelo EBV.....	68
Figura 7	Padrão de anticorpos no soro para o EBV antes do contato com o vírus no período de incubação da doença, convalescença e de recuperação.....	69
Figura 8	Esquema da reação em cadeia da polimerase (PCR).....	71
Figura 9 A	Curva de amplificação das amostras e padrão.....	107
Figura 9 B	Curva padrão e eficiência da reação.....	108

LISTA DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfico 1 Resultados obtidos dos pacientes estudados.....	105
Gráfico 2 Representação dos resultados positivos para EBV (qPCR), e números de cópias detectadas por μl	109

RESUMO

O Vírus Epstein-Barr (EBV) e o Citomegalovírus (HCMV) são membros da família Herpesvírus. São encontrados em aproximadamente 90% dos indivíduos em idade adulta. A infecção ocorre, geralmente, na infância e é assintomática na maioria dos casos, persistindo de forma latente durante toda a vida do indivíduo. A transmissão destes vírus ocorre principalmente pela saliva, sangue e órgãos transplantados.

O EBV está relacionado com a mononucleose infecciosa, doença linfoproliferativa (PTLD), leucemia de células pilosas em pacientes com imunodeficiência congênita ou adquirida e doença de Hodgkin. O risco de um paciente transplantado desenvolver linfoma é 28 a 50 vezes maior do que os indivíduos da população geral.

Um dos fatores de risco para o desenvolvimento da PTLD são a variedade e intensidade da imunossupressão utilizada no paciente pós-transplante, idade do receptor e sorologia viral (EBV, CMV). Dependendo da idade do receptor, do tipo de transplante e dos fatores de risco, a prevalência da PTLD pode variar de 0.5% a 22%. Em transplantados pediátricos renais a prevalência chega a atingir 37%.

A principal medida terapêutica para o controle da PTLD é a diminuição ou mesmo a retirada total da imunossupressão. Portanto a rejeição do enxerto se torna um problema bastante comum, que compromete a qualidade e/ou expectativa de vida dos pacientes.

A introdução de testes laboratoriais rápidos e precoces permite aos clínicos detectar a replicação viral do EBV e diagnosticar, consequentemente, a infecção ativa antes do início da doença. Isso proporciona a oportunidade de iniciar o tratamento específico precocemente.

Foram estudadas amostras de sangue e soro de 46 pacientes submetidos a transplantes de células hematopoéticas, acompanhados no Serviço de Transplante de Medula Óssea (STMO) do Hospital das Clínicas da UNICAMP/HEMOCENTRO.

Trabalhamos no estudo para diagnosticar a infecção ativa e quantificar a carga viral do vírus Epstein-Barr (EBV) em pacientes transplantados de células hematopoéticas. Relacionar infecção ativa do vírus Epstein-Barr com o Citomegalovírus (CMV) e verificar a incidência da Doença linfoproliferativa e a Doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD) nos pacientes estudados.

Diagnosticamos infecção ativa pelo EBV em 22 (47,8%) pacientes que apresentaram uma carga viral muito baixa (média de 29 cópias/ul). Co-infecção entre EBV e CMV ocorreu em 15/46 pacientes (32,6%). Doença por CMV ocorreu em 7/46 (15,2%) pacientes no trato gastrointestinal. Todos estes doentes apresentaram infecção ativa pelo CMV e 4/7 (57%) apresentaram infecção ativa pelo EBV. Um destes pacientes foi a óbito por doença por CMV. Verificamos que nenhum dos pacientes apresentou doença linfoproliferativa relacionada ao EBV.

Os casos de co-infecção ativa EBV+CMV em relação à ocorrência de GVHD foram estatisticamente significantes ($p=0.001$).

Concluimos que a infecção pelo CMV ainda é a maior causa de morbidade e mortalidade nos pacientes após o transplante. A qPCR é uma ferramenta útil para verificar os pacientes que reativaram pelo EBV após o transplante e pode auxiliar na prevenção da doença linfoproliferativa causada pelo EBV juntamente com a identificação dos fatores de risco associados. Verificamos a ocorrência e significância do GVHD e infecção ativa pelo CMV, mas não observamos esses mesmos resultados comparados ao EBV.



ABSTRACT

Epstein-Barr Virus (EBV) and Cytomegalovirus (CMV) are members of herpesvirus family. They are found in approximately 90% of the individuals in adult age. The infection generally occurs subclinically during the childhood in the major of the cases persisting in latent form during all the life of the individual. The transmission of these viruses occurs mainly for the saliva, blood and transplanted organs. EBV is related with mononucleose infectious, lymphoproliferative disease (PTLD), leukemia of hairy cells in patients with congenital or acquired immunodeficiency and Hodgkin's disease. The risk of a transplanted patient to develop lymphoma is 28 to 50 % more than other individuals of the general population.

One of the risk factor for the development of the PTLD is the variety and intensity of the immunosuppression used in the patient after-transplant, age of the recipient and viral serology (EBV, CMV). Depending on the age of the recipient, the type of transplant and the risk factor, the prevalence of the PTLD can vary of 0.5% 22%. In renal pediatric transplantation, the prevalence can arrives to reach 37%. The main therapeutical measure for the control of the PTLD is the reduction or total withdrawal of the immunosuppression. Therefore the lost of graft is a common problem, that compromises the quality and/or life expectancy of the patients.

The introduction of early and rapid laboratorial tests can permit to the physicians to detect the viral response and detect the active EBV infection before the disease. This provides the chance to initiate the specific treatment.

We studied samples of blood and serum of 46 patients submitted to hematopoietic stem cell transplantation at the Bone Marrow Transplant unit of the University Hospital of the UNICAMP/HEMOCENTRO.

We worked in the study to diagnosis the active infection and quantify the viral load of the Epstein-Barr virus (EBV) in transplanted patients of hematopoietic stem cells, to relate active EBV infection with active CMV infection and to verify the incidence of the lymphoproliferative disease and graft versus host disease (GVHD) in the studied patients.

Active EBV infection detected by Real-Time PCR occurred in 22 patients (47,8%). The viral load found was very low (range 29 copies/ul). Co-infection between EBV and CMV occurred in 15/46 patients (32,6%). CMV disease occurred in 7/46 (15,2%) patients in the gastrointestinal tract. All these patients had active CMV infection and 4/7 patients (57%) had active EBV infection. One of these patients died by CMV disease. No patient presented lymphoproliferative disease related to the EBV.

The cases of active EBV and CMV (co-infection) infection in relation to the occurrence of GVHD had been statistically significant ($p=0.001$).

We conclude that the active CMV infection is already the most cause of morbidity and mortality of the patients after the transplant.

The qPCR is a useful tool to verify the patients who had active EBV infection after the transplant and the identification of the risk factors associates prevention the development of the lymphoproliferative disease caused by the EBV. We verify the occurrence and significance of the GVHD and active CMV infection, but we do not observe these same results related to the EBV.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Histórico do Epstein-Barr (EBV)

O Epstein-Barr (EBV) foi descoberto em 1964 a partir de um estudo de microscopia eletrônica utilizando cultura de células obtidas de linfoma de Burkitt (Epstein *et al*; 1964). Quatro anos após, em 1968, demonstrou-se que o EBV era o agente etiológico da mononucleose infecciosa (Epsten et al, 1964; Henle, *et al*; 1968).

Nos anos 70, o DNA do EBV foi identificado em tecidos de pacientes com carcinoma de nasofaringe (Zur Hausen *et al*; 1970) e, posteriormente nos anos 80, demonstrou-se que o EBV estaria relacionado à doença linfoproliferativa e leucemia de células pilosas em pacientes com imunodeficiência congênita ou adquirida (Ziegler, et al; 1982; Greespan., et al; 1985) assim como à doença de Hodgkin (Weiss et al; 1989). Desde então, o EBV tem sido identificado em vários tumores, incluindo as síndromes linfoproliferativas de células B, o linfoma de células T e a doença de Hodgkin (Jones et al; 1988; Weiss et al; 1999). Em 1997, o EBV foi classificado pela *Agência Internacional de Pesquisa*, como carcinógeno de grau I que, comprovadamente, causa neoplasias em humanos (Niedobitek, 1999).

Também existem evidências de que o EBV possa estar associado a outros tumores malignos, como o carcinoma gástrico, mamário, de glândulas salivares, pulmão, timo, células hepáticas e esôfago (Vortmeyer et al; 1998; Chen et al; 2003). O papel do EBV, na etiopatogênese dessas neoplasias, particularmente em relação aos carcinomas mamário e hepatocelular, necessita melhor bem investigado (Herrman & Niedobitek, 2003).

1.2- Histórico do Citomegalovírus (HCMV)

O Citomegalovirus Humano (HCMV) foi inicialmente identificado por Ribbert (1904), que observou a presença de grandes inclusões celulares no rim de um natimorto com sífilis em 1881. Em 1921, Goodpasture & Talbot (1921) foram os primeiros a sugerir que as alterações celulares observadas eram similares às lesões de pele causadas pela varicela e que a citomegalia poderia ser provocada pelo efeito indireto de um agente

similar. Esses pesquisadores também observaram que as inclusões nucleares estavam algumas vezes associadas com inclusões no citoplasma.

Lipschutz (1921) também descreveu inclusões similares, que foram associadas com lesões em humanos e coelhos infectados com herpes simples. Farber & Wolbach (1932) foram os primeiros a usar o termo doença do vírus das glândulas salivares, devido à propensão do vírus em induzir inclusões nucleares características em linhagens celulares de epitélio do ducto de glândulas salivares (Hanshaw et al, 1985).

O isolamento do citomegalovírus humano (HCMV) ocorreu nos anos de 1956 e 1957, de maneira quase simultânea, a partir dos experimentos de três pesquisadores. Smith (1956) isolou o agente a partir de material procedente de duas crianças, tendo uma delas falecido com a Doença de Inclusão Citomegálica generalizada. Rowe e colaboradores (1956) isolaram o vírus de tecidos de adenóides, após adenoidectomia; Weller et al (1957) recuperou o vírus de fígado e urina de crianças com Doença de Inclusão Citomegálica generalizada.

Em 1960, com o progresso ocorrido na área dos transplantes, a infecção pelo HCMV passou a ser considerada uma entidade de grande importância clínica (Rubbin, 1990). Nesta mesma época, a denominação citomegalovírus foi proposta por Weller e colaboradores (1960), substituindo as denominações anteriores de “vírus das glândulas salivares” ou “vírus da doença de inclusão citomegálica”, entre outras utilizadas. A partir desta fase, o HCMV foi pela primeira vez reconhecido como o principal patógeno em hospedeiros imunossuprimidos. (Costa, 1999; Riley, 1997).

1.3- Classificação

1.3.1- Classificação do EBV

O EBV é membro da família Herpes (HHV-4), sendo um dos mais sete herpesvírus patogênicos para o homem. O genoma viral encontra-se dentro de um envelope e consiste de uma molécula de DNA linear, de 172 quilobases que codifica,

aproximadamente, 100 proteínas virais. Durante a replicação, essas proteínas são importantes para a regulação da expressão gênica, para a replicação do DNA viral, para a formação da estrutura de componentes estruturais do vírion e para controlar a resposta imune do hospedeiro (Bauforth., et al, 1999).

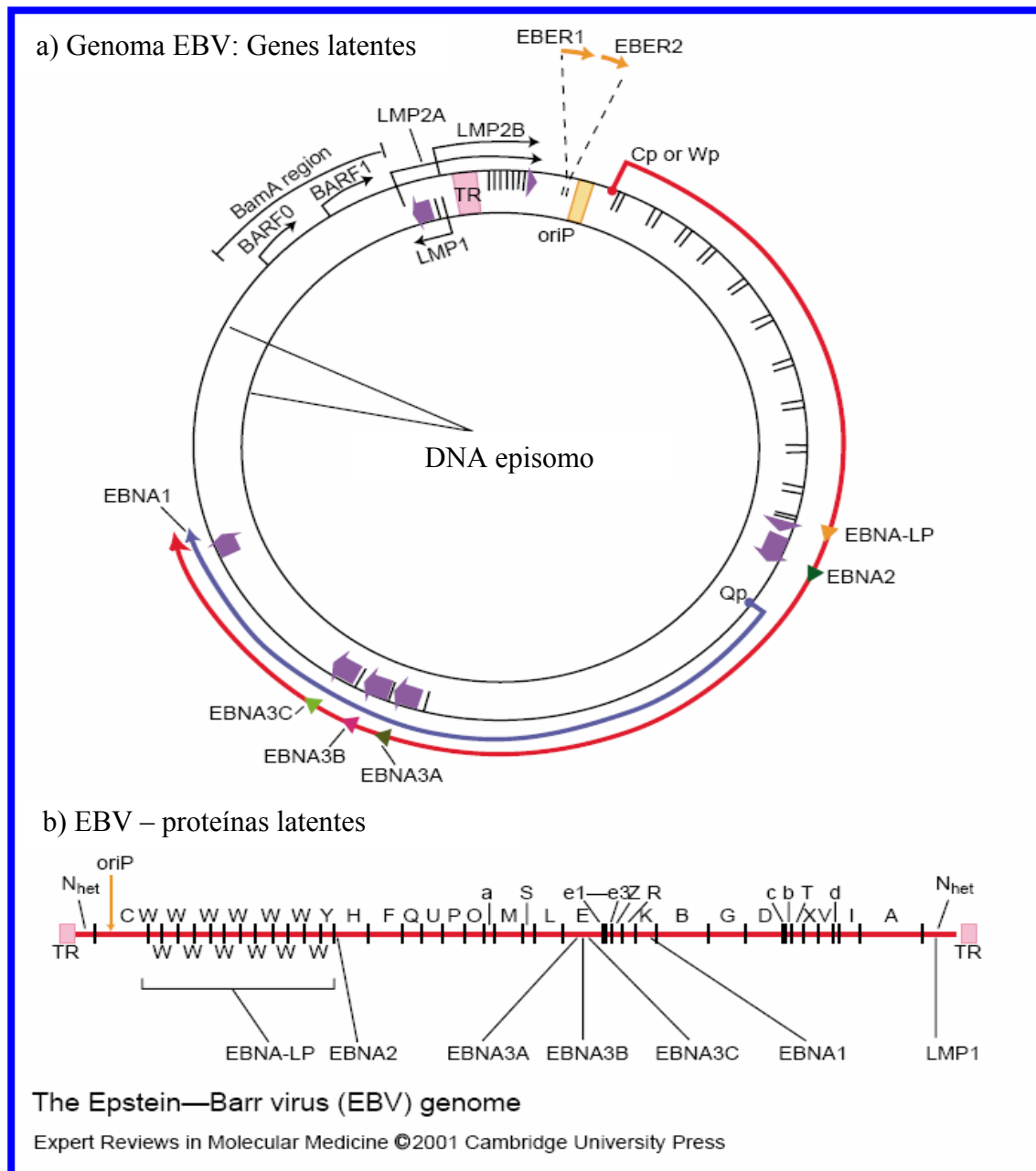


Figura 1- **A)** Genoma do EBV: genes latentes. **B)** Mapa linear do genoma do EBV, demonstrando a leitura aberta para a maioria das proteínas latentes.

1.3.2- Classificação do HCMV

O HCMV foi originalmente classificado como um betaherpesvírus, com base em critérios morfológicos e bioquímicos. A morfologia dos vírus do grupo herpes era desconhecida até 1960, quando foi observado o formato icosaédrico através de microscopia eletrônica. Devido à semelhança morfológica e à presença do DNA de fita dupla, o citomegalovírus foi considerado um membro do grupo herpes. O citomegalovírus humano ficou classificado como Herpesvírus Humano 5 (HHV-5).

O genoma do HCMV possui aproximadamente 230 Kilobases (229.354 pares de bases – GeneBank NC001347) com massa molecular relativa de $150-155 \times 10^6$ e densidade de $1.716-1.717 \text{ g/cm}^3$, correspondente a 58% de guanosina e citosina, figura 2.

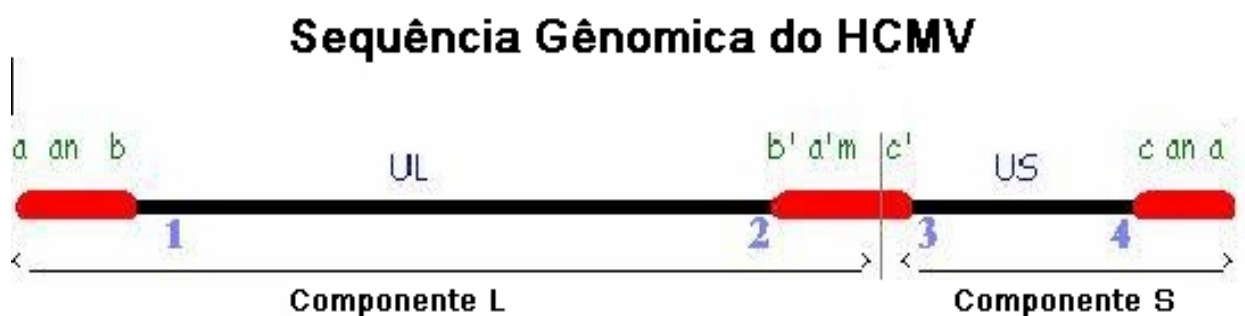


Figura 2- Organização do genoma do HCMV.

Fonte: (<http://www.science.mcmaster.ca/Biology/Virology>)

Estrutura Viral dos Herpesvirus: (Representado na figura 3)

Todos os Herpesvirus, apresentam 4 elementos estruturais principais (Brennan, 2001):

- (1) Um nucleocapsídeo icosaédrico com capsômeros protéicos;
- (2) Uma estrutura protéica eletrodensa contendo o DNA viral;
- (3) Um envelope derivado da membrana celular e contendo glicoproteínas virais e proteínas;
- (4) Um tegumento, localizado entre o nucleocapsídeo e o envelope.

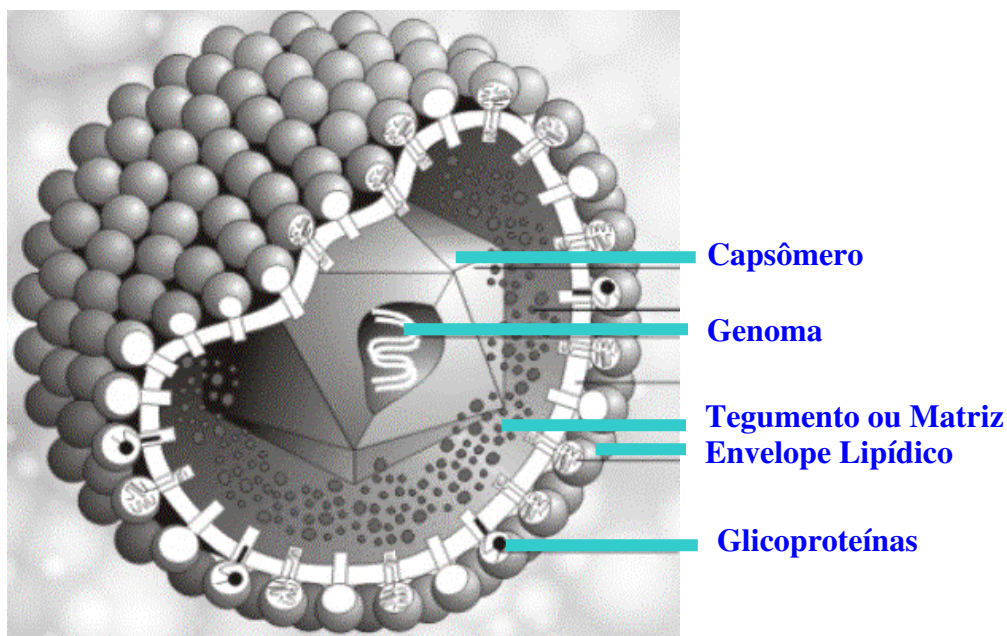


Figura 3- Estrutura dos Herpesvírus Humanos.

Fonte: Copyright 1994 – 97 Marko Reschke

1.4- Epidemiologia e transmissão

1.4.1- Vírus Epstein-Barr

O EBV é um vírus extremamente comum, e aproximadamente 90% dos indivíduos na idade adulta apresentam anticorpos contra o mesmo. A infecção ocorre, geralmente, na infância e é assintomática na maioria dos casos, persistindo de forma latente durante toda a vida do indivíduo. Nos países desenvolvidos, a infecção primária, muitas vezes, ocorre na adolescência, ou mesmo na fase adulta, causando uma doença linfoproliferativa, denominada *mononucleose infecciosa* (Evans, 1972; Silva et al; 2003).

A taxa de endemicidade para o vírus Epstein-Barr varia conforme a região geográfica, sendo extremamente elevada nos países do Norte da África (Argélia e Tunísia) e extremamente baixa no Norte da Europa (Dinamarca e Holanda). O Brasil é considerado

um país de endemicidade intermediária entre aquelas duas regiões (Crawford, 2001). Estudos realizados em São Paulo, onde aproximadamente 80% da população tem anticorpos para o EBV aos 12 anos de idade (Candeias & Pereira, 1970, Carvalho *et al*; 1975), mostraram que a mononucleose infecciosa clássica também ocorre em países em desenvolvimento, só que em uma faixa etária mais baixa daquela observada nos países desenvolvidos (Carvalho *et al*; 1981). A explicação destes achados estaria provavelmente no fato de que, embora a infecção pelo EBV em crianças seja assintomática ou não característica, a pequena porcentagem destas infecções que se expressam clinicamente como mononucleose infecciosa típica representaria, em termos absolutos, um número razoavelmente grande de casos (Fica, 2003).

Observou-se que o número de casos na infância, em países em desenvolvimento, é maior do que o número de casos em adolescentes e adultos jovens (Pannuti; 1981), contrastando nitidamente com o que se observa nos países desenvolvidos.

A transmissão pelo EBV ocorre principalmente pela saliva, embora hemoderivados e órgãos transplantados também possam ser fontes de infecção (Evans, 1972; Thorleu, 1988; Cohen, 2000). Transmissões pelo sangue e ar, no entanto, não podem ser descartadas (Lennette, 1995). Após a infecção primária que, geralmente, ocorre na adolescência e causa em aproximadamente 30 a 50% dos casos a mononucleose infecciosa, o vírus pode estabelecer uma infecção persistente nos indivíduos contaminados, (Faulkner *et al*; 2000). Nas regiões sem saneamento básico e alta densidade populacional, a infecção primária ocorre nos primeiros anos de vida (Evans, 1972; Kafuko *et al*; 1972).

Para o vírus entrar na célula B o envelope glicoprotéico gp350 liga-se ao receptor viral (molécula CD21) na superfície da célula B. Além disso, moléculas da classe II do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) servem como cofator para a infecção das células B. Cerca de 100 genes virais são expressos durante a replicação, sendo seis proteínas nucleares (EBNAs), duas proteínas de membrana (LMPs) e dois tipos de RNA não traduzado (EBERs) (Silva & Zucoloto, 2003).

As EBNAs desempenham um papel central na manutenção da infecção latente pelo EBV, sendo necessárias para a replicação do genoma viral e regulam a transcrição dos genes latentes, de infecção (Leight & Sugden, 2000). O EBNA1 inibe a resposta imune do

hospedeiro ao EBV, e a relação do EBNA1 com carcinomas prediz um pior prognóstico. O EBNA2 aumenta a expressão das proteínas de membrana latente 1 e 2 (LMP1 e LMP2) contribuindo para o aumento das células B. O EBNA3 tem por função regular a expressão de genes celulares, aumentando a habilidade do EBNA2 em regular o LMP1 (Silva & Zucoloto., 2003). (Figura 4).

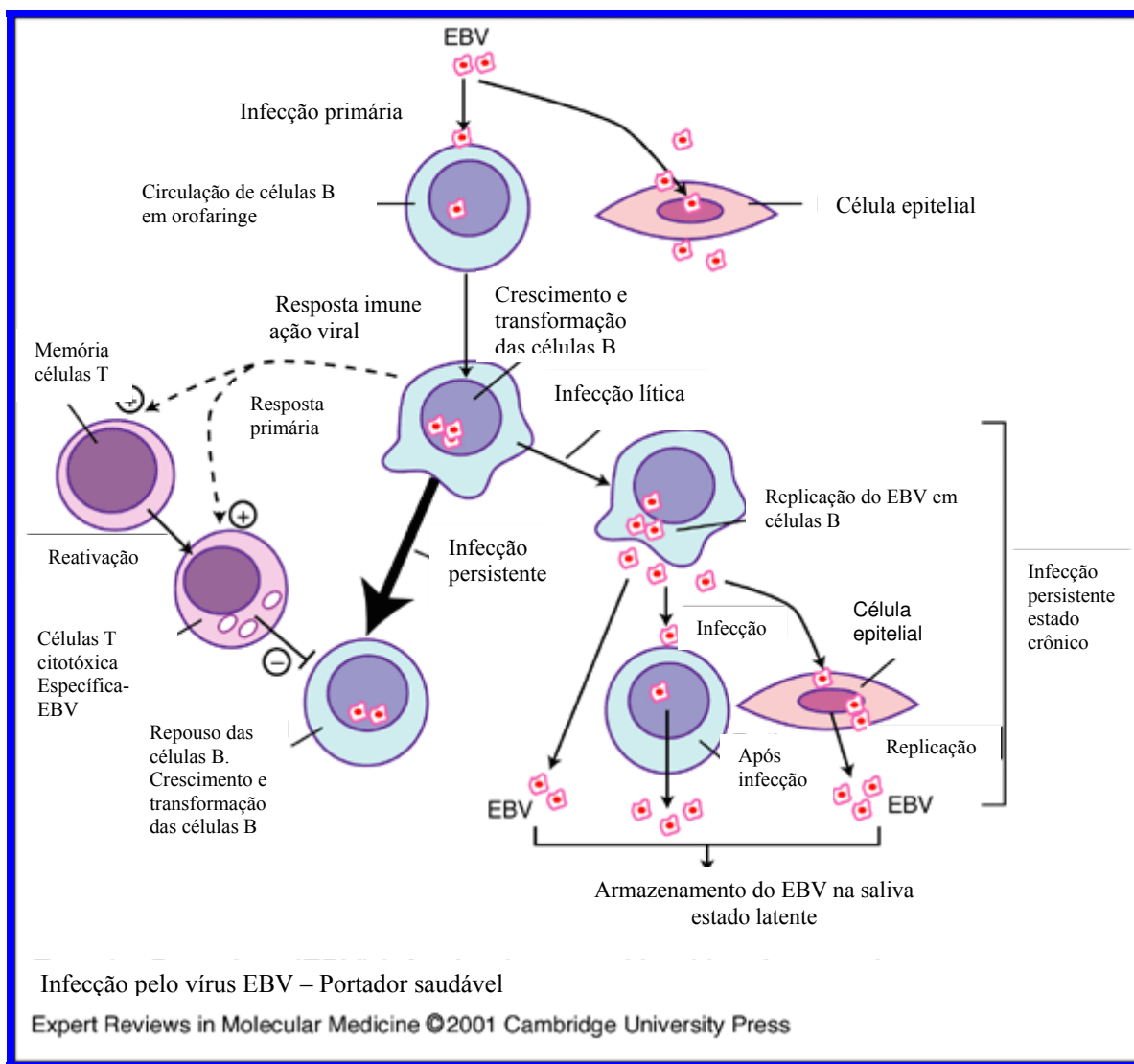


Figura 4- Mecanismo de infecção primária no hospedeiro

1.4.2- Citomegalovírus (HCMV)

A infecção pelo HCMV ocorre comumente na maioria da população, sendo que o vírus infecta de 0,5 a 1,0% dos recém-nascidos e aproximadamente 50% dos adultos em países desenvolvidos. É de baixa prevalência em países europeus, na Austrália e na América do Norte (40 a 60% dos indivíduos são infectados), enquanto que em populações de nível sócio-econômico mais baixo, a prevalência é significativamente maior, variando entre 80 a 100%. A prevalência de anticorpos contra o HCMV (anti-HCMV) eleva-se com a idade, atingindo níveis máximos após os 25 anos (Pannuti, 1984; Hardy *et al.*, 1985).

No Brasil, os dados epidemiológicos disponíveis são restritos a algumas áreas urbanas, tais como o estado de São Paulo. Estudos utilizando amostras de soro coletadas de indivíduos saudáveis de diferentes grupos de idade em São Paulo e testadas para anticorpos anti-HCMV mostraram que em crianças de 0 a 4 anos de idade, a soroprevalência é de 60%, com um lento aumento após os 15 anos. Para indivíduos com idade entre 51 e 60 anos, a soroprevalência encontrada é de 80% (Almeida *et al.*, 2001). A incidência nos Estados Unidos e no norte da Europa é de 50 a 60% e no Brasil é de 93% (Nichols & Boeckh, 2000; Costa, 1999).

Aproximadamente 10% das infecções primárias em pacientes imunocompetentes estão associadas com a síndrome da mononucleose, caracterizada principalmente com mal-estar, febre e linfocitose atípica sendo que maioria das infecções primárias passam despercebida. O vírus permanece latente no endotélio e em células mononucleares do sangue periférico, durante todo o tempo de vida do hospedeiro e é controlado pela imunovigilância mediada por células (Nichols & Boeckh, 2000).

O HCMV é transmitido por: a) via parenteral, através de sangue ou seus derivados; b) contato inter-humano; c) via materno-fetal, através do canal de parto, contágio pós-parto ou transmissão intra-uterina e, d) transplantes de órgãos (Veronesi, 1991).

Existem três padrões epidemiológicos da infecção por HCMV em receptores de órgãos transplantados: *infecção primária*, *reativação de infecção latente* e *reinfeção* (Rubin, 1990).

- ❖ Na infecção primária, a fonte viral pode ser pré-natal (transmissão transplacentária) (Epps *et al.*, 1995), transfusão intrauterina (Vilmer & Pérol, 1984), perinatal (secreção cervical) e pós-natal (urina infectada, saliva, leite materno) (Epps *et al.*, 1995), transfusão de sangue e transplante de órgãos (Tegtmeier, 1989; Forman & Zaia, 1994).
- ❖ Após a infecção primária, o HCMV permanece em uma condição de infecção latente, porém, ocasionalmente, torna-se reativado e os vírions infecciosos aparecem na saliva e/ou urina. Essas *reativações* temporárias são assintomáticas, mas permitem que o vírus se espalhe horizontalmente e, ainda, verticalmente se a reativação ocorrer durante a gestação (Drago *et al.*, 2000).
- ❖ A reativação é induzida pela alteração no relacionamento parasita-hospedeiro devido a mecanismo fisiológico, tal como ocorre na gravidez, por um decréscimo natural das defesas imunológicas; nas doenças debilitantes ou no emprego de drogas imunossupressoras e procedimentos cirúrgicos (Drago *et al.*, 2000).
- ❖ A reinfeção é devida a um vírus novo com um diferente tipo antigênico (Tegtmeier, 1989). Embora seja epidemiologicamente importante distinguir *reinfeção* e *reativação*, ambas são clinicamente similares. O termo infecção *recorrente*, portanto, é freqüentemente usado para descrever ambas as possibilidades. Em adultos normais, a infecção por HCMV pode ser também considerada uma doença sexualmente transmissível sendo mais prevalente em mulheres com infecção gonocócica anterior ou atual (Leshner, 1988).

Com relação à epidemiologia em grupos de alto risco, sabe-se que pacientes imunossuprimidos, como os transplantados, os portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e aqueles que são submetidos à quimioterapia têm maiores risco de desenvolver a doença por HCMV (Costa, 1999).

1.5- Manifestações Clínicas

1.5.1- Epstein-Barr

Quando a infecção primária ocorre na infância, esta se apresenta, geralmente, assintomática ou com sintomas brandos indistinguíveis de viroses comuns. Entretanto, quando a infecção pelo EBV ocorre na adolescência e idade adulta se apresenta com o quadro típico de mononucleose febre alta, calafrios, linfonodomegalia principalmente cervical, placas acinzentadas em orofaringe e amígdalas, intensa prostração e mialgia. (Niederman & Evans, 1997). Associação entre idade e desenvolvimento da mononucleose infecciosa não está clara, sendo sugerido como principal fator a carga viral de contágio. As doses virais ingeridas por crianças em contato com objetos contaminados seriam muito menores do que as ingeridas por adultos jovens através do beijo. Além disso, o EBV foi detectado em secreções do trato genital feminino e masculino, justificando a possibilidade da infecção pelo contato sexual (Rickinson & Kieff, 1996).

As manifestações clínicas da doença pelo EBV geralmente são febre, garganta seca, linfonodomegalias. Às vezes, a esplenomegalia e hepatomegalia podem acompanhar a infecção. Mais de 50% dos pacientes com mononucleose infecciosa apresentam febre, linfadenopatia e faringite. Menos de 10% apresentam esplenomegalia, petéquias no palato e hepatomegalia. Normalmente, a doença é autolimitada. Raramente, prolonga-se por mais de seis meses, quando passa a ser denominada infecção crônica, ativa, pelo EBV (Evans, 1972; Silva & Zucoloto, 2003).

No hemograma podemos encontrar leucocitose com linfocitose acentuada na segunda e terceira semanas, durante 2 a 6 semanas, linfócitos de Downey (linfócito atípico com citoplasma aumentado e núcleo condensado). Trombocitopenia leve pode aparecer em aproximadamente metade dos casos.

1.5.2- Citomegalovírus

A doença por HCMV em imunocompetentes, quando se manifesta, assume forma semelhante à mononucleose infecciosa, classicamente caracterizada por febre de duração prolongada, fraqueza, sudorese, mialgia, hepatomegalia, esplenomegalia,

ou ambos, e adenopatia. Linfonodomegalia e exsudato amigdaliano são pouco encontrados, ao contrário do que se verifica na mononucleose infecciosa causada pelo vírus Epstein-Barr. Icterícia e exantema maculopapular podem ser eventualmente observados. Em relação aos exames laboratoriais, o hemograma pode apresentar linfocitose relativa e absoluta e presença de grande número de linfócitos atípicos. As enzimas hepáticas (TGO e TGP) podem estar moderadamente elevadas em cerca de 80% dos casos (Weller, 1971; Pannuti *et al*, 1987; Pannuti, 2001).

1.6- Ciclo de Replicação

1.6.1- Epstein-Barr

O vírus inicialmente se replica nas células epiteliais da orofaringe do hospedeiro e, subsequentemente, infecta e se replica em linfócitos B presentes nos tecidos linfóides adjacentes (Cohen, 2000; Niedobitek *et al*; 1997).

O genoma do EBV consiste de uma molécula de DNA linear, a qual codifica cerca de 100 proteínas virais, representada na figura 1. Durante a replicação viral, estas proteínas são importantes na regulação da expressão de genes do vírion e na modulação da resposta imunológica do hospedeiro (Niedobitek *et al*; 1997).

A infecção de células epiteliais pelo EBV *in vitro* resulta em replicação ativa e lise da célula infectada. Por outro lado, infecção *in vitro* do EBV, em células B, resulta em infecção latente com imortalização das células infectadas (Sixbey., *et al*, 1983). Sendo assim, há dois tipos celulares que são alvo do EBV, linfócitos B e as células epiteliais (Pegtél *et al*; 2004).

Para o vírus entrar na célula B, o envelope glicoprotéico gp350 liga-se ao receptor viral (molécula CD21) na superfície da célula B. Além disso, moléculas da classe II do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) servem como cofator para a infecção das células B (LI *et al*; 1997). Pacientes com agamaglobulinemia ligada ao X não possuem células B maduras o que impede a infecção pelo vírus *in vitro* e *in vivo* (Faulkner *et al*; 1999).

Após infectar os linfócitos B, o genoma linear do EBV se torna circular, formando um epíssomo, característico da forma latente do vírus. Assim, o linfócito B de memória é considerado o sítio de infecção latente para o EBV.

Portanto, acredita-se que os locais de persistência do EBV, nos indivíduos, sejam as células B de memória. Em adultos normais, e com IgG-positiva para o EBV, de 01 a 50 células B por milhão estão infectadas pelo EBV e, em cada indivíduo, o número de células infectadas latentes permanece estável por anos (Babcock *et al*; 1998).

A infecção dos linfócitos B se dá pela adsorção do vírus à molécula CD21 na superfície celular. A ligação é feita por uma glicoproteína do envelope viral (gp350/220) que também é responsável pela interiorização do vírus através de endocitose (Maruo, *et al*; 2001). No interior celular, o DNA viral migra para o núcleo onde é circularizado formando um epíssomo (Rickinson & Kieff; 1996). Esse processo *in vitro* transforma linfócitos B em linhagem linfoblastóide de crescimento permanente, que começam a expressar uma variedade de genes do ciclo latente (Rickinson & Kieff; 1996).

Cerca de 100 genes virais são expressos durante a replicação, mas apenas 10 são expressos *in vitro* nas células B, infectadas, latentes: seis proteínas nucleares (EBNA), duas proteína de membrana (LMPs) e dois tipos de RNA não translados (EBERs). Essa diminuição no número de proteínas virais limita o reconhecimento das células infectadas pelas células T, citotóxicas (Cohen, 2000).

A proteína do antígeno nuclear 1 do EBV (EBNA 1) liga-se ao DNA viral, fazendo com que o genoma viral permaneça na célula infectada como um epíssomo circular (Yates *et al*; 1984). Desempenha, portanto, um papel central na manutenção da infecção latente pelo EBV. O EBNA 1 é necessário para a replicação do genoma viral e é um fator regulador chave, na transcrição dos genes latentes, de infecção (Leight & Sugden; 2000). A proteína transcrita do EBNA 1 é separada em um domínio N-terminal e em um domínio C-terminal, por uma sequência repetitiva de glicina e alanina. Essa sequência inibe a apresentação do antígeno ao complexo maior de histocompatibilidade, inibindo a resposta imune do hospedeiro ao EBV. Além disso, essa sequência aumenta em carcinomas, correlacionando com um pior prognóstico (Murray *et al*; 2003).

Podem ser reconhecidos três tipos de latência dependendo da variedade de expressão dos genes. A latência III esta presente em linhagens celulares linfoblastóides, sendo as outras duas formas associadas à neoplasias.

O antígeno nuclear 2 do EBV (EBNA 2) aumenta a expressão das proteínas de membrana latente 1 e 2 (LMP 1 e LMP 2), assim como das proteínas celulares que contribuem para o crescimento das células B (Johannsen et al; 1995). O antígeno nuclear 3 do EBV (EBNA 3) também regula a expressão de genes celulares, aumentando a habilidade do EBNA 2 em regular o LMP 1 (Lin et al; 2002).

Através da análise gênica é possível distinguir os tipos A e B do EBV, porque as seqüências dos genes EBNA-2, EBNA-3a, EBNA-3b e EBNA 3-c são diferentes entre si (Caldewell et al; 1998). O tipo A do EBV é muito mais eficiente em imortalizar as células B dos linfócitos do que o tipo B (Rickinson & Kieff; 1987), mas acredita-se que o tipo B só é capaz de transformar células B, em indivíduos imunodeficientes (Shibata et al; 1993). No Brasil e nos países ocidentais, o tipo A é o prevalente, enquanto, na África Equatorial, o tipo B é o mais frequentemente detectado (Chen et al; 1996).

A detecção dos marcadores de infecção latente varia de doença para doença, seguindo 4 tipos de expressão, conforme especificada na Tabela 1 (Cohen, 2000).

Tabela 1- Tipos de expressão dos genes latentes, do vírus Epstein-Barr.

Latência	EBNA1	EBNA2	EBNA3	LMP1	LMP2	EBER	Doença
Tipo 1	+	-	-	-	-	+/-	Linfoma de Burkitt. Carcinoma mamário.
Tipo 2	+	-	-	+	+	+	Carcinoma de nasofaringe. Doença de Hodgkin . Linfoma T.
Tipo 3	+	+	+	+	+	+	Doenças linfoproliferativas Mononucleose infecciosa.
Tipo 4	-	-	-	+	+	+	Portador saudável.

Legenda: EBNA, antígeno nuclear do vírus Epstein-Barr; LMP, proteína latente de membrana; EBER RNA, codificado do vírus Epstein-Barr. + expressa o gene, - não expressa o gene, +/- pode ou não expressar o gene.

Fonte: Medicina, Ribeirão Preto, 36: 26-23, jan/mar. 2003.

As células com infecção latente podem perder o controle de proliferação por mecanismos ainda pouco conhecidos, provavelmente relacionados a disfunções do sistema imunológico (Knecht et al; 2001). Há evidências de que o EBNA-1 possa atuar diretamente, como um oncogene. O EBNA-1 é expresso em todos os tecidos neoplásicos, associados ao EBV, mas a taxa de expressão varia entre os tumores (Wilson et al; 1996; Oudejans et al; 1996). O EBNA-2, por sua vez, induz a ativação do ciclo replicativo do EBV e sua expressão é essencial para a transformação neoplásica, de linfócitos B (Fujiwara, 2001). Finalmente o EBNA-3c é essencial para a transformação neoplásica de linfócitos B, porque regula a transcrição de genes envolvidos no processo de imortalização dessas células. Em 2001, verificou-se que o EBNA-3c inibe, especialmente, a proteína supressora de metástases Nm23, favorecendo a progressão maligna, com metástases das neoplasias associadas ao EBV. A inibição do Nm23 é mais acentuada nos carcinomas mamários e nos linfomas de Burkitt quando associado ao EBV (Subramanian et al; 2001).

O gene do antígeno nuclear 4 do EBV (EBNA-4) está frequentemente mutado na doença de Hodgkin, no carcinoma gástrico e em linfomas associados ao EBV, sugerindo que possa ter algum papel na etiopatogenia dessas neoplasias (Chu et al; 1999).

Uma deleção característica de 30 pares de base foi identificada na extremidade 3' do gene que codifica a proteína latente de membrana 1 (LMP 1). Essa deleção foi, inicialmente, detectada em carcinomas de nasofaringe, sendo associada a maior agressividade do tumor (Chen et al; 1996). O LMP 1 atua como um oncogene e a expressão dessa proteína, em camundongos transgênicos, resulta em linfoma de células B (Kulwichit et al; 1998). O mesmo efeito não é verificado em linfócitos T, sugerindo que o EBV promove linfomas de células T por mecanismos que não dependem do LMP 1 (Xu et al; 2002).

Durante o processo de transformação neoplásica, o LMP 1 ativa os receptores do fator de necrose tumoral, com ativação de alguns genes; levando à proliferação de linfócitos com supressão da capacidade de formar centros germinativos, formando linfomas (Knecht et al; 2001). Porém, o LMP 1, geralmente, não é mais expresso quando o tumor já está muito avançado, sugerindo que não desempenha papel relevante na manutenção da neoplasia (Ohshima et al; 1999).

O p53 é um gene regulador do ciclo celular e, em condições normais, impede que células com lesão no DNA sofram divisões mitóticas, além de induzir a apoptose, (Figura 5). Quando mutado, o gene perde sua ação regulatória, favorecendo o desenvolvimento de neoplasias malignas (Hollstein et al; 1991). Mutações no p53 foram detectadas no linfoma de Burkitt e nos carcinomas gástrico e de cabeça e pescoço associados ao EBV, sendo o carcinoma da nasofaringe mais fortemente associado ao EBV, raramente apresentando mutações no p53 (Chan et al; 2001; Yang et al; 2001; Crook et al; 2000).

Esses dados sugerem que o vírus Epstein-Barr pode ter vários mecanismos de ação, cuja importância varia conforme o tecido alvo.

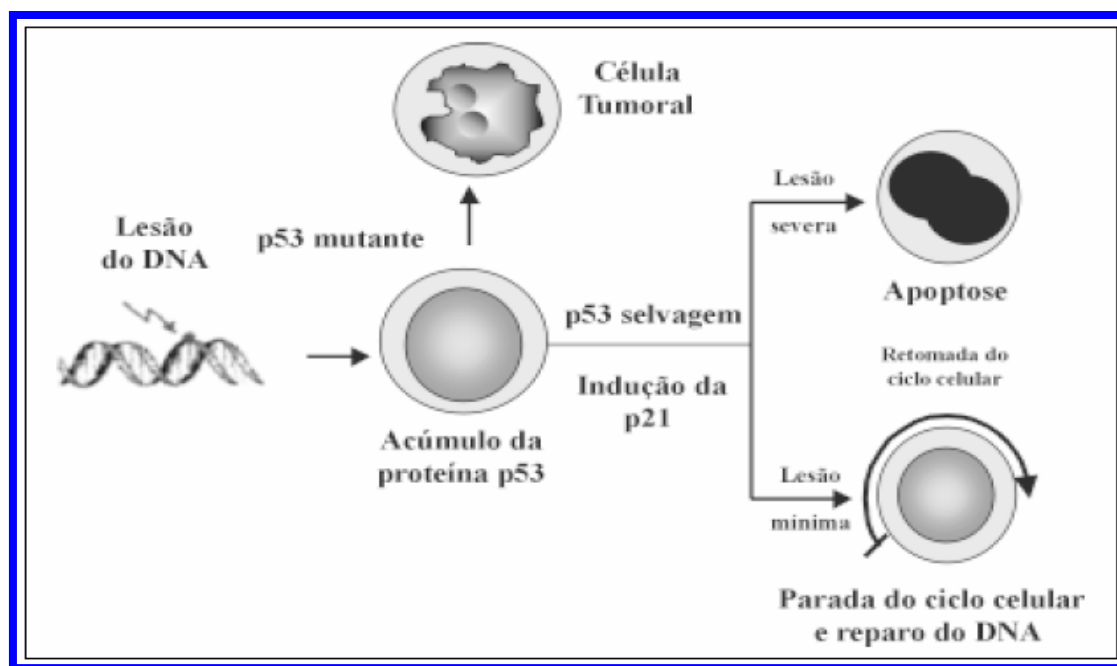


Figura 5- Modelo sugerido para o desenvolvimento da proteína p53 no reparo da DNA e a perda desta atividade mediada pela proteína p53 mutante.

Fonte: Revista Brasileira de Cancerologia, 2001, 47(3): 291-01.

1.6.2- HCMV

O ciclo de replicação do HCMV é lento em cultura celular e rápido no hospedeiro (Emery *et al*, 1999), no qual persiste latente por muitos anos, sendo um agente oportunista quando diminuem as defesas do organismo infectado. O HCMV é citopático, podendo produzir destruição tecidual em vários tecidos, como, por exemplo, do trato gastrointestinal, pulmões, cérebro, etc (Alford & Britt, 1990).

O ciclo replicativo do HCMV apresenta padrão similar ao dos demais herpesvírus, e após infecção e incorporação do material genético, um pequeno número de genes é transcrito, codificando proteínas que regulam sua expressão; estas proteínas são denominadas antígenos imediatamente precoces (IEA) e estimulam a produção de proteínas denominadas de antígenos precoces (EA). Os antígenos são expressos nas membranas celulares e, em seguida, nas nucleares. Antígenos tardios (LA) têm função constitucional e são expressos após replicação do DNA (Straus, 1990; Colimon & Michelson, 1990).

O Citomegalovírus Humano e outros tipos de CMV que infectam outras espécies de animais são altamente espécie-específica, mas apresentam características de replicação e síndromes da doença similares (Alford & Britt, 1990; HO, 1991; Pannuti, 1984). Muitas cepas de HCMV circulam continuamente na população em geral (Van Der Merr *et al*, 1996).

Fases do ciclo replicativo do Citomegalovírus (HCMV)

- ❖ α (IE) – nesta fase os genes são transcritos através de enzimas nucleares; os RNAm são transportados para o citoplasma e são traduzidos, ocorrendo a produção de certas proteínas regulatória que são transportadas para o núcleo e que permitem ao vírus ter controle da síntese macromolecular da célula hospedeira. Os genes transcritos nessa fase podem ter influência na expressão de outros genes virais, nos seus próprios genes e, possivelmente, nos genes celulares;

- ❖ β (E) – inicia-se após o período IE e é caracterizada pela replicação do DNA viral, produção de proteínas nas células infectadas e produção da progênie;
- ❖ γ (L) – fase em que componentes estruturais ou de maturação dos vírus produzidos e o vírus infectante são eliminados da célula (Mustafa, 1994).

1.7- Doença Linfoproliferativa Pós-Transplante (PTLD)

As doenças linfoproliferativas pós-transplante são o segundo tipo de neoplasias que mais se desenvolvem nesses pacientes (Buell & Woodle, 2004; Hanaway *et al*, 2004).

Pacientes pós-transplantados de órgão sólidos ou de medula óssea recebendo terapia imunossupressora, portanto tem grande risco de desenvolver PTLD associada ao EBV. A maioria dos casos se apresenta durante o primeiro ano após o transplante. Na apresentação da PTLD pode haver predominância de células T e células B com padrão monomórfico ou polimórfico (Imashuku *et al*, 2004; Baudouin *et al*, 2004). A doença pode ocasionar febre e adenopatias podendo rapidamente levar a um curso fatal, não responde à redução da imunossupressão. A PTLD acomete cerca de 25% dos pacientes transplantados (Asa, G., *et al*, 2000). A frequência do acometimento ganglionar e amigdaliano varia de 33 a 66% à semelhança da síndrome de mononucleose infecciosa (Dror *et al*, 1999; Nalesnik, *et al*, 2000) As manifestações clínicas da PTLD se sobrepõem às de processos infecciosos ou à rejeição aguda do enxerto, o que dificulta, muitas vezes, a intervenção precoce. O envolvimento do enxerto pelo linfoma é comum e depende do tipo de transplante (Malatack *et al.*, 1991; Dror *et al*, 1999; Nalesnik, 2000).

Um dos fatores de risco para o desenvolvimento da PTLD são a variedade e intensidade da imunossupressão apresentadas pelo paciente pós-transplante, a idade do receptor e a sorologia viral (EBV, HCMV, HCV). Dependendo da idade do receptor e do tipo de transplante, a incidência da PTLD pode variar de 0.8% a 32% (Timuragaoglu *et al*; 2006), transplantados pediátricos chegam atingir cerca de 37% (Haque *et al*; 1996; Axelrod *et al*; 2003).

Gartner observou que receptores de medula óssea desenvolveram PTLT principalmente durante os primeiros seis meses após o transplante e esta incidência variou, consideravelmente, dependendo dos fatores de risco relacionados: infecções primárias após o transplante, o uso de globulina anti timócitos ou anticorpos monoclonais anti-CD3, durante a terapia de imunossupressão, e também a infecção primária ou reativação do HCMV (Gartner., *et al*, 2002). Observou-se também que em transplante de órgãos sólidos, a carga viral do EBV pode ser encontrada em níveis mais baixos comparados com transplantes de medula óssea, demonstrando a não uniformidade da correlação de aumento da carga viral e o diagnóstico clínico da PTLA. Deste modo, a correlação entre a carga viral do EBV e PTLT ocorridos em transplantados de órgão sólidos não é claramente compreendida quando correlacionados ao transplante de medula óssea (Orentas, *et al*, 2003).

A classificação histológica da PTLT mais aceita divide a doença em três categorias: 1) hiperplasia linfóide policlonal, 2) doença linfoproliferativa polimórfica e 3) doença monoclonal maligna (Harris et al; 1997). Nesta última, estão incluídos os linfomas não-Hodgkin de origem B (maioria dos casos), os linfomas de células NK, os plasmocitomas, o mieloma múltiplo e a doença de Hodgkin. Esta classificação tem a vantagem de incorporar todas as formas de doenças linfoproliferativas pós-transplante em uma nomenclatura acessível e descomplicada.

Os linfomas (tabela 2) representam o terceiro câncer mais comum em crianças correspondendo a 12% de todas as neoplasias nos Estados Unidos, sendo o Linfoma de Hodgkin's o mais frequente (cerca de 60% dos linfomas) (klumb, 2001)

Tabela 2- Doenças associadas ao EBV e a porcentagem de ocorrência.

Doença	Porcentagem
Patologias benignas	
Mononucleose infecciosa	>99%
Leucoplaquia pilosa, oral	>95%
Pseudotumor inflamatório	40%
Linfomas não Hodgkin e neoplasias associadas a imunodeficiências	
Linfoma não Hodgkin (todos os subtipos)	5%
Linfoma não Hodgkin, relacionado a AIDS	40%
Linfoma cerebral (relacionado a AIDS)	95%
Linfoma cerebral (pacientes imunocompetentes)	5%
Desordem linfoproliferativa pós-transplante	95%
Linfoma de Burkitt (África)	>95%
Linfoma de Burkitt (América do Norte)	20%
Linfoma de Burkitt (relacionado a AIDS)	30%
Linfoma (imunodeficiência primária)	Maioria
Granulomatose linfomatóide	Maioria
Linfoma T periférico	40%
Linfoma T/NK nasal	>95%
Tumor de músculo liso, relacionado a AIDS	>95%
Doença de Hodgkin	
Doença de Hodgkin (todos os subtipos)	40%
Doença de Hodgkin (celularidade mista)	70%
Doença de Hodgkin (esclerose nodular)	20%
Doença de Hodgkin (predominância linfocitária)	<5%
Doença de Hodgkin (depleção linfocitária)	50%
Doença de Hodgkin (relacionada a AIDS)	>95%
Carcinomas	
Carcinoma de nasofaringe (Ásia)	>95%
Carcinoma de nasofaringe (América do Norte)	75%
<i>Linfoepitelioma-like</i>	Maioria
Adenocarcinoma gástrico	7%
Carcinoma mamário	0 a 51%

Fonte: Medicina, Ribeirão Preto, 36: 26-23, jan/mar. 2003. Gulley ML, 2001.

1.8- Resposta Imune Celular ou Humoral à infecção pelo EBV

A infecção pelo EBV desencadeia tanto resposta imune do tipo humoral quanto resposta do tipo celular. A detecção de anticorpos contra estruturas virais protéicas é de fundamental importância para o diagnóstico laboratorial da infecção. Entretanto, a resposta

celular mediada por linfócitos T parece ser a responsável pelo controle da infecção. Células NK (*Natural killer*) e linfócitos T CD4 e CD8-específicos contra proteínas de fase lítica e contexto de imunossupressão (adquirida ou congênita), o sistema imune pode falhar no controle da replicação destes linfócitos B infectados levando ao surgimento de células geneticamente instáveis, facilitando a transformação maligna (Hanto et al; 1985).

Nos transplantes de órgãos sólidos, o uso de medicamentos imunossupressores tem como objetivo prevenir a rejeição do enxerto à custa, porém, da redução da resposta citotóxica (Hopwood & Crawford, 2000). Esta perda da resposta citotóxica permite que linfócitos B infectados expressem o fenótipo de latência tipo III e se repliquem, levando ao acúmulo destas células. Este cenário é chamado de infecção pelo EBV reativada, porém sem sinais clínicos de doença. Entretanto, em alguns casos de pacientes transplantados, esta proliferação de linfócitos B leva ao surgimento da doença linfoproliferativa (PTLD) pós-transplante (Ambinder et al; 1999, Hopwood & Crawford, 2000).

Estudos sugerem que os polimorfismos gênicos nas regiões promotoras da Interleucina 6 e 10 (IL-6 e IL-10) - (são produzidos por monócitos, linfócitos e macrófagos, agindo como fator de crescimento para linfócitos B), com a conseqüente produção diferenciada destas citosinas, podem ter influência no desenvolvimento da PTLD (Durandy, 2001; Nepomuceno et al; 2003). Por exemplo, os haplótipos associados com a maior produção destas citosinas estão estreitamente relacionados com a proteção contra episódios de rejeição aguda e maior sobrevivência do enxerto (Zheng et al, 2004).

A interação do EBV com os linfócitos B do hospedeiro, imortalizando-os, e o seu papel como catalisador da proliferação descontrolada destes linfócitos na PTLD ainda são pouco conhecidos. O EBV é um potente transformador da atividade das células-B e é ocasionalmente associado com várias doenças malignas de células-B, como o linfoma de Burkitt's, linfoma de Hodgkin's, carcinoma nasofaríngeo e a PTLD pós-transplante – Tabela 2 (Landais *et al*; 2005). Estudos constataram altos títulos de anticorpos contra o antígeno do capsídeo viral (VCA) e o antígeno precoce (EA) do EBV em casos de linfoma de Hodgkin's (Mendonça *et al*, 1999).

O risco de um paciente transplantado desenvolver linfoma é 28 a 50 vezes maior do que os indivíduos da população geral. O linfoma pós-transplante representa 16% de todos os tipos de neoplasias diagnosticadas nesta população, enquanto a doença

linfoproliferativa em geral representa apenas 5% das neoplasias em indivíduos não-transplantados (Craig et al; 1993).

O risco do desenvolvimento da PTLN varia muito, dependendo do tipo de transplante, da imunossupressão administrada ao paciente, contribuindo significativamente para a morbidade e mortalidade deste grupo de risco (Bakker et al; 2007; Svoboda et al; 2006). A incidência da PTLN varia de 0,8% a 20% após transplante de órgão sólido e medula óssea, sendo 1 a 4% pós-transplante renal (Swinnen, 1999; Capello et al, 2005). Essa incidência pós-transplante renal é baixa, refletindo o menor grau de imunossupressão a que estes pacientes são submetidos para evitar episódios de rejeição do enxerto (Lacerda, 1999).

Outros fatores de risco para o desenvolvimento da PTLN como a infecção pelo Citomegalovírus (CMV) e o polimorfismo dos genes responsáveis pela redução de algumas citocinas, como a IL-6 e IL-10, estão sob investigação e ainda necessitam ser comprovados (Soler et al; 2003; Zheng et al; 2004).

Com o melhor controle dos processos infecciosos nos pacientes pós-transplante, devido, em parte, às novas técnicas diagnósticas e aos novos antibióticos, houve diminuição considerável da morbi-mortalidade destes pacientes. Assim, a PTLN tornou-se uma das principais causas de óbito na maioria dos centros de transplante (Craig et al; 1993; Muti et al; 2003; Reams et al; 2003; Birkeland & Hamilton-Dutoit, 2003). A partir de 1979, quando o uso de imunossupressores como a ciclosporina-A tornou-se mais difundido, foi observado aumento expressivo na incidência da PTLN, fenômeno também observado com o uso da globulina anti-timocítica (ATG) e, com o uso do anticorpo anti-CD3 (OKT3) e do FK 506 (Tracolumus) no tratamento de episódios de rejeição aguda ou crônica do enxerto (Leblond et al; 2001). Em 2003 foi demonstrado que a Rapamicina, antimicrobiano da classe macrolídeos com potente ação imunossupressora e eficácia clínica comprovada contra episódios de rejeição, parece ter ação protetora contra a proliferação desenfreada de linfócitos B no paciente imunossuprimido. A Rapamicina bloqueia eficazmente a sinalização para a produção de IL-10, levando à apoptose dos linfócitos infectados pelo EBV. Esta característica peculiar da Rapamicina faz com que ela seja considerada até o momento o único imunossupressor capaz de promover imunossupressão sem, contudo, levar à proliferação de linfócitos B infectados pelo EBV (Nepomuceno et al; 2003).

A utilização de medicamentos antivirais cada vez mais potentes como o aciclovir, ganciclovir e valganciclovir; vem significando redução do risco de doença por CMV e PTLD relacionada ao EBV (Li et al; 2007; Wiltshire et al; 2005; Paya et al; 2004). Por outro lado, observa-se, a incidência de PTLD aumentar, principalmente em pacientes no pós-transplante tardio (Birkeland & Hamilton-Dutoit, 2003; Funch et al; 2005).

A principal medida terapêutica para o controle da PTLD é a diminuição ou mesmo a retirada total da imunossupressão (Swinen, 1999). Portanto a rejeição do enxerto se torna um problema bastante comum, que compromete a qualidade e/ou expectativa de vida dos pacientes. Cerca de 30 a 50% dos pacientes apresentam resposta apenas com a retirada da imunossupressão. Porém, o uso isolado dessa medida apresenta altas taxas de recidiva da PTLD tornando necessária alguma abordagem terapêutica complementar. (Penn, 1998).

Infelizmente, apesar de todas as medidas terapêuticas descritas acima, o prognóstico da PTLD permanece sombrio, com até 80% de letalidade. A forma histológica com o melhor prognóstico é a hiperplasia policlonal, com sobrevida geral de 5 anos em torno de 50% (Muti et al; 2003).

1.9- Diagnóstico Laboratorial

A maioria das complicações ocasionadas pela reativação do EBV e HCMV pode usualmente ser evitada com um monitoramento do DNA viral ou antígeno viral (Scheinberg *et al*; 2007), sendo essencial para o diagnóstico da PTLD para a diferenciação entre a rejeição do enxerto e a PTLD. (Bakker *et al*, 2007; Walker *et al*, 1995; Opelz & Dohler; 2004).

Consequentemente, para o sucesso do transplante é essencial o monitoramento das viroses para um diagnóstico precoce (Kaoru *et al*; 2007).

1.9.1- Testes diagnósticos para EBV

Os testes sorológicos para diagnosticar as infecções por EBV permitem detectar respostas imunitárias características em função do tempo. Sob o ponto de vista sorológico, há uma infecção primária por EBV quando se tem o aparecimento precoce de IgM anti-VCA circulante e, a seguir, uma diminuição até níveis não detectáveis. Quase ao mesmo tempo, observa-se uma elevação dos níveis de IgG anti-VCA. A maior parte (>80%) dos doentes sintomáticos afetados pela mononucleose infecciosa apresenta níveis muito elevados de IgG e de IgM anti- VCA no primeiro teste. A IgM anti-VCA desaparece da circulação no decorrer de dois a três meses após o início da doença, ao passo que a IgG permanece de maneira indefinida nos indivíduos normais.(BULA KIT IgG E IgM - DIASORIN-EBV).

Nos doentes sintomáticos afetados pela mononucleose infecciosa, a detecção da IgG anti-EBNA, em combinação com a da IgM anti-VCA é útil para diferenciar o estágio precoce da convalescença da fase aguda da doença. Uma elevação dos níveis da IgG anti-EBNA pode indicar uma passagem da mononucleose infecciosa de convalescença precoce a avançada. Uma elevação dos níveis de IgG anti-VCA indica a fase aguda da infecção, assim como uma elevação dos níveis de IgM anti-VCA pode indicar a passagem da fase de incubação à fase aguda da doença (BULA KIT IgG E IgM - DIASORIN-EBV). Sendo muito importante a detecção precoce do vírus e sua replicação em pacientes imunossuprimidos para que possamos efetuar um tratamento precoce e eficaz antes que ocorram os sintomas mais severos apresentados pelo desenvolvimento do vírus no hospedeiro. Esquema esta representado na figura 6 e 7.

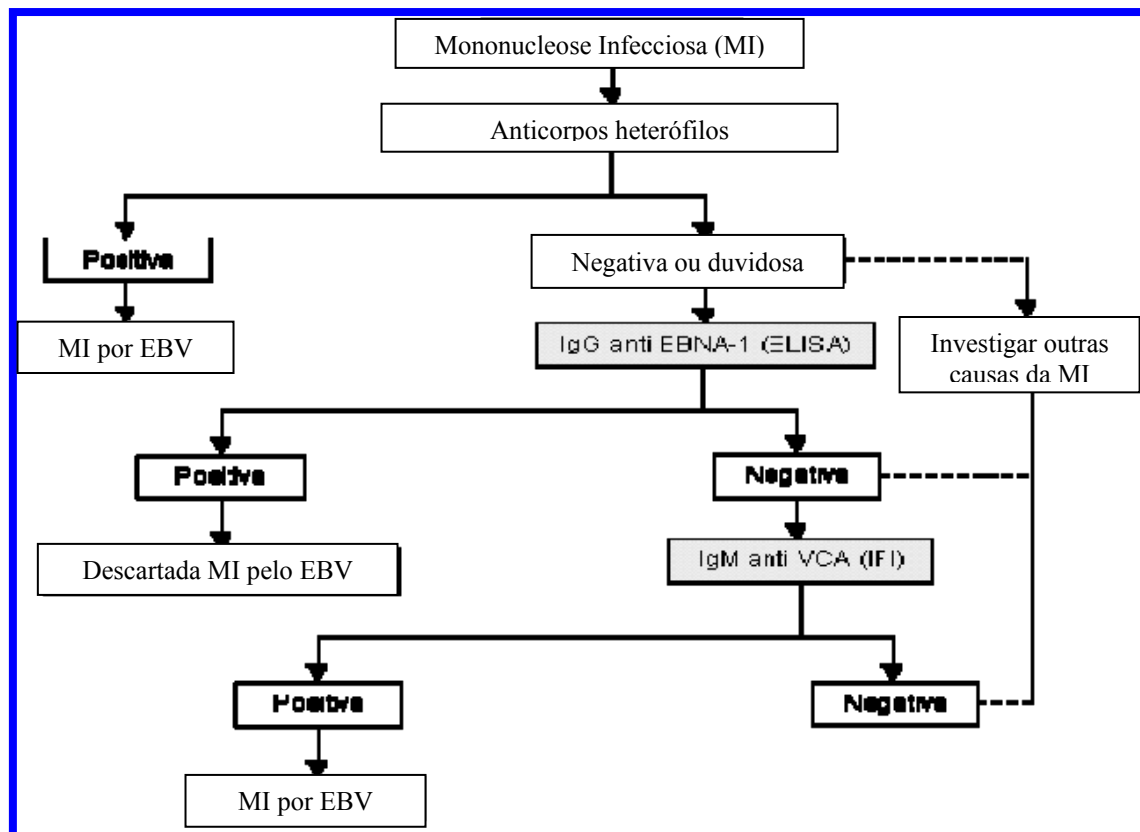


Figura 6- Esquema do diagnóstico da mononucleose infecciosa.

Fonte: Ver. Chil Infect, 2003.

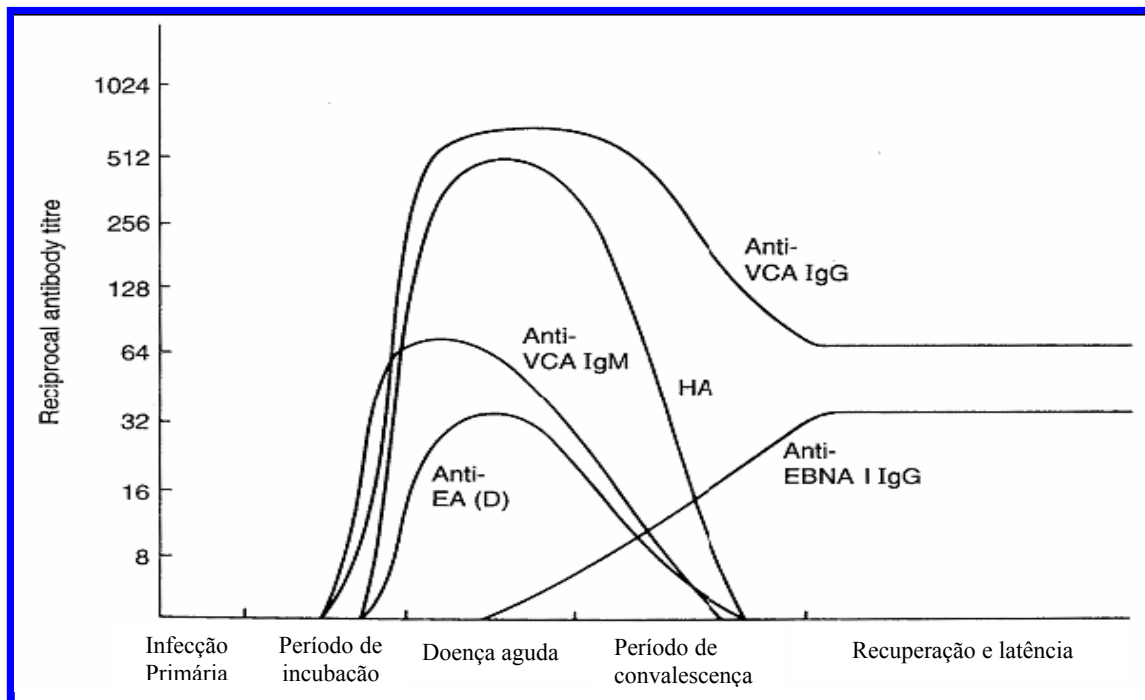


Figura 7- Padrão dos anticorpos no soro para o EBV antes do contato com o vírus, no período de incubação da doença aguda, de convalescença e de recuperação.

Fonte: John & Sons, 2004.

Aspectos Sorológicos – EBV (Figura 7)

Período de incubação do EBV é de 4 a 6 semanas.

- O anticorpo do capsídio viral e os antígenos nucleares são úteis para confirmar o diagnóstico de mononucleose infecciosa (MI)
- IgG e IgM do antígeno viral do capsídeo (VCA) são detectáveis precocemente durante a fase aguda.
- VCA IgG está presente durante a fase aguda
- IgG aos antígenos nucleares de EBV (EBNA) torna-se detectável tardiamente nos pacientes em convalescença.

Em virtude das relações complexas que existem entre a reação do hospedeiro ao vírus EBV e a sintomatologia, o acompanhamento da evolução dos níveis de anticorpos anti-EBV pode ser útil para o diagnóstico de infecção por EBV (BULA KIT IgG E IgM - DIASORIN-EBV).

1.9.2- Testes diagnósticos para HCMV

O diagnóstico precoce da infecção pelo HCMV pode ser realizado por: imunocitoquímica de fibroblastos humanos infectados, o DEAFF (detection of early antigen fluorescent foci) ou “shell vial” (Griffiths et al, 1984); por antigenemia, com a expressão da fosfoproteína de 65 kDa (pp65) da matriz do HCMV em leucócitos do sangue periférico (van der Bij *et al.*, 1988a, van der Bij *et al.*, 1988b); pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação de seqüências de ácidos nucleicos virais (Demmler *et al.*, 1988; Shibata *et al.*, 1988; Jiwa *et al.*, 1989; Einsele *et al.*, 1995) e por outros métodos moleculares, tais como a PCR quantitativa, Nuclisens *pp67* Nasba, e Captura híbrida (Recommendations of CDC, 2000).

1.9.3- Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método de biologia molecular que permite a produção de grande quantidade de fragmentos específicos de DNA a partir de substratos complexos e em concentrações diminutas (Pozo & Tenório, 1999).

O procedimento consiste de repetidos ciclos de síntese de DNA por meio de dois “primers” ou oligonucleotídeos iniciadores, com orientações opostas, isto é, dois segmentos de aproximadamente 20 nucleotídeos com seqüências complementares às duas extremidades do fragmento-alvo e levados a efeito por uma reação enzimática mediada pela polimerase de atividade em elevadas temperaturas (Taq polimerase).

Cada ciclo de reação de amplificação é constituído por três fases distintas: (Figura 8).

- Desnaturação: separação da dupla fita do DNA a ser amplificado;
- Anelamento: ligação complementar entre os iniciadores (primers) e o DNA;
- Extensão: síntese do DNA pela enzima Taq-polimerase, que é utilizada para replicar as fitas do DNA.

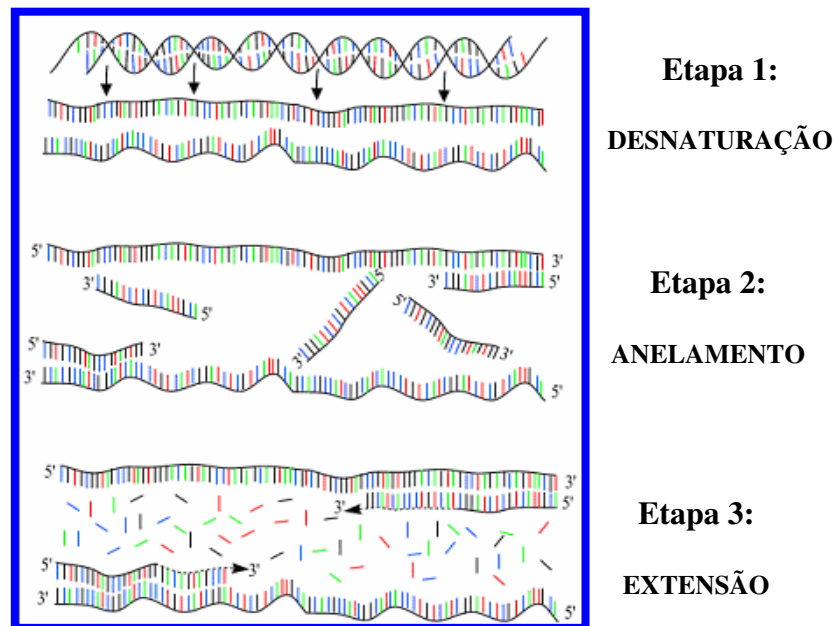


Figura 8- Esquema da reação em Cadeia da polimerase (Andy Vierstraete, 1999).

Fonte: (<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>) – com modificações

Várias técnicas de PCR já foram utilizadas na quantificação da carga do EBV, como a PCR semi-quantitativo, a PCR competitivo quantitativo e a PCR em tempo real (qPCR) (Baldani et al; 2000; Wagner et al; 2001; Muti et al; 2003).

Estudos demonstraram que a PCR em tempo real parece ser a mais eficiente para o uso rotineiro, devido à sua rápida execução, fácil interpretação e baixo risco de contaminação (Wagner et al; 2001; Berger et al; 2001; Stevens et al; 2001).

A PCR em tempo real (qPCR), é uma técnica baseada na detecção do produto de amplificação através da medida do aumento da fluorescência, detectada por câmara CCD (amplitude de detecção de 530 a 580 nm), causado pela ligação do *SyberGreen* a fita dupla de DNA, o que causa aumento de emissão de luz em até 100 vezes para uma mesma concentração de *SyberGreen* livre em solução. Essa intensidade de luz vai aumentando ao longo do tempo à medida que são gerados produtos na reação de PCR é registrado pelo equipamento no curso da reação. Assim é utilizada para quantificar os vírus em circulação no hospedeiro (Lai *et al*; 2005).

A PCR em tempo real é considerada superior a outros métodos de PCR quantitativos existentes, devido à acurácia, simplicidade, rapidez e reprodutibilidade (Yoshida *et al*; 2001). O valor resultante do número de partículas virais é utilizado como ferramenta para o monitoramento do tratamento antiviral, um determinante da adequação do tratamento, e como preceptor para a doença. Assim sendo de grande ajuda para o diagnóstico e monitoramento das infecções ocasionadas por este vírus (Kimura *et al*; 1999)

1.10- Tratamento

1.10.1- Tratamento da Infecção Ativa pelo EBV

Para o tratamento da infecção ativa pelo EBV são utilizadas as drogas antivirais, que podem atuar quando o paciente ainda se encontra na fase de hiperplasia linfóide policlonal. Já nos casos de receptor soronegativo para o EBV, é necessária a administração profilática de aciclovir, valganciclovir ou Ganciclovir por pelo menos três meses pós-transplante (Muti, 2003).

A profilaxia antiviral com aciclovir, ganciclovir, e mais recentemente valganciclovir, tem significativamente reduzido o risco de doença por HCMV e a incidência do EBV relacionado a PTLN (Li *et al*; 2007).

Atualmente o uso do rituximab (anticorpo monoclonal quimérico anti-CD20), associado ou não à poliquimioterapia, parece ser o tratamento de escolha em pacientes com PTLT (Birkeland *et al*, 2003; Dotti *et al*, 2001; Entz-Werle *et al*, 2003).

1.10.2- Tratamento da Infecção ativa pelo CMV

O tratamento (Tabela3) da infecção ativa causada por este vírus está limitado no Brasil a pacientes imunocomprometidos e restrita a dois agentes antivirais: ganciclovir e foscarnet, ambos com ação inibidora da replicação viral (Balfour, 1990).

A terapia precoce (*terapia pré-emptiva*), refere-se ao programa que dá início à terapia com ganciclovir a partir dos testes de monitorização com resultados positivos para infecção ativa por HCMV em pacientes assintomáticos (Avery *et al*, 2000).

Após a implantação do protocolo de diagnóstico e monitorização da Infecção ativa por HCMV nos pacientes do Serviço de Transplante de Medula Óssea da UNICAMP/HEMOCENTRO a partir do trabalho de Bonon e col. (2005), o STMO passou a utilizar a terapia precoce (pré-emptive therapy) como estratégia de prevenção da doença por HCMV após o transplante utilizando a PCR e Antigenemia para a monitorização da infecção ativa por HCMV (Bonon *et al*; 2005).

Tabela 3- Protocolo de Tratamento Precoce de Infecção Ativa pelo HCMV e doença guiada pela posituação dos testes de monitorização.

<i>ESQUEMA</i>	<i>DOSE</i>
❖ Tratamento da Infecção Ativa	10 mg/kg/dia, por 7 dias + manutenção
❖ Manutenção	5 mg/kg/dia, 3 vezes por semana até 12 doses
❖ Tratamento da Doença	10 mg/kg/dia, por 21 dias + manutenção
❖ Manutenção	5 mg/kg/dia, 3 vezes por semana até 12 doses

1.11- Gravidade da Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro (GVHD) Aguda

A GVHD é uma das principais complicações associadas aos pacientes transplantados. Geralmente a GVHD aguda se manifesta nos primeiros 5 meses após o transplante. As manifestações podem acometer um único órgão ou ser disseminada, possibilitando conseqüências da perda da visão, insuficiência respiratória e mortalidade associada a imunossupressão (Pond *et al.*, 2006).

A graduação clínica da doença do enxerto contra o hospedeiro aguda foi baseada no estadiamento clínico, onde se levou em consideração, a percentagem da superfície corporal que apresentava envolvimento cutâneo com confirmação histológica, os níveis sanguíneos de bilirrubinas e o volume diário de diarreia (PZEPIORKA et al, 1995).

Baseado então neste estadiamento clínico, a graduação desta reação pode ser dividida em graus que variam de 0 a IV. O grau zero significa ausência de GVHD; o grau I (leve) compreende apenas envolvimento cutâneo, variando de menos do que 25% a 50% de comprometimento da superfície corpórea; no grau II (moderado) a alteração da pele pode variar de menos do que 25% até a eritrodermia generalizada, o nível sérico de bilirrubinas entre 2 e 3 mg/dl e o volume diarreico até 1.000 ml ao dia; o grau III (grave) compreende o envolvimento cutâneo de 25% da superfície corporal até a eritrodermia generalizada, níveis séricos de bilirrubinas entre 3 a 15 mg/dl, e o volume de diarreia de 1.000 ou mais de 1500 ml ao dia; o grau IV representa uma situação de extremo risco de vida, onde o comprometimento cutâneo pode variar de 25% da superfície do corpo até a eritrodermia generalizada com descamação e formação de bolhas cutâneas, o nível de bilirrubinas pode variar de 3 até mais de 15 mg/dl, e o volume diário de diarreia acima de 1.000 ml, até o aparecimento de dor abdominal e de íleo paralítico (Dulley, 1997).

A graduação deste tipo de reação apresenta interesse tanto para definir a conduta terapêutica, como para se avaliar as porcentagens de sobrevida e as incidências de infecções. A Tabela 4 ilustra a graduação e o estadiamento clínico desta reação (Thomas et al, 1975; Pzepiorka et al, 1995).

Tabela 4- Representa a graduação e estágio clínico da GVHD aguda.

Graduação Clínica da GVHD aguda					
	Pele	Fígado	Intestino		
+	Eritema máculopapular <25% SAC*	Bilirrubina 2-3mg/dl	Diarréia 500-1000ml/dia		
++	Eritema máculopapular 25-50% SAC*	Bilirrubina 3-6mg/dl	Diarréia 1000-1500ml/dia		
+++	Eritrodermia generalizada	Bilirrubina 6-15mg/dl	Diarréia >1500ml/dia		
++++	Descamação e bolhas	Bilirrubina >15mg/dl	Dor abdominal ou íleo paralítico		
*SAC	Superfície de área corpórea				
Estádio Clínico da GVHD aguda					
Graduação	Estágio				Dano Funcional
	Pele	Fígado	Intestino		
0 (nenhum)	0	0	0		0
I (leve)	+ a ++	0	0		0
II (moderado)	+ a +++	+	+		+
III (grave)	++ a +++	++ a +++	++ a +++		++
IV (risco de vida)	++ a ++++	++ a ++++	++ a ++++		+++

(Thomas *et al.*, 1975)

Escolhemos a nested PCR e a PCR em tempo real como métodos a serem utilizados no diagnóstico precoce e na monitorização da infecção ativa por EBV e HCMV no grupo de pacientes transplantados estudados, por serem métodos rápidos e sensíveis para esta finalidade.

As introduções de testes laboratoriais rápidos e precoces permitem aos clínicos detectar a replicação viral e diagnosticar, consequentemente, a infecção ativa por HCMV e EBV antes do início da doença. Isso proporciona a oportunidade de iniciar o tratamento antiviral precocemente (Sia & Patel, 2000).

A possibilidade de se fazer diagnóstico precoce é o melhor indicativo para um tratamento também precoce mais eficiente (May & Azulay, 2000).

2- OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

- Diagnosticar a infecção ativa e quantificar a carga viral do Vírus Epstein-Barr (EBV) em pacientes transplantados de células progenitoras hematopoéticas;
- Relacionar infecção ativa do vírus Epstein-Barr com infecção ativa pelo Citomegalovírus (CMV);
- Verificar a incidência da Doença Linfoproliferativa (PTLD) e Doença do enxerto contra o hospedeiro (GVHD) nos pacientes estudados.

3- CASUÍSTICA

O presente estudo foi aprovado e acompanhado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil.

Foram estudados prospectivamente, 46 pacientes submetidos a transplantes alogênicos de medula óssea (MO) e/ou de célula periférica progenitora (CPP), acompanhados no Serviço de Transplante de Medula Óssea (STMO) do Hospital das Clínicas da UNICAMP/HEMOCENTRO.

A monitorização teve início no dia zero do transplante e foi realizada até 150 dias após este (ou até o óbito), quinzenalmente.

Foram coletadas amostras de sangue em tubos contendo como anticoagulante EDTA e amostras de soro em tubo estéril seco, de todos os pacientes submetidos ao transplante durante o período de estudo para detecção do vírus Epstein-Barr e Citomegalovírus.

3.1- Protocolo de acompanhamento para a realização das coletas

O protocolo de acompanhamento para a realização das coletas de sangue periférico foi:

- ❖ No dia do transplante: foram coletadas amostras de sangue total e de soro do receptor;
- ❖ Coletas quinzenais subsequentes foram realizadas no receptor a partir do dia +0 até o dia +150 após o transplante sempre que possível ou até o óbito ou a perda do enxerto, ocorridos após o primeiro mês de seguimento regular;
- ❖ As amostras foram coletadas durante o período de internação na Enfermaria de Transplante de Medula Óssea do HC/UNICAMP e durante os retornos dos pacientes ao Ambulatório de Transfusão e Quimioterapia do HEMOCENTRO/UNICAMP, pela equipe de enfermagem especializada;

- ❖ As amostras de sangue e de soro foram enviadas após a coleta ao Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular/FCM/UNICAMP, onde foi realizada a nested PCR para detecção do HCMV e a qPCR para detecção e quantificação do EBV. A sorologia através da técnica de Elisa (IgM/IgG) foi realizada para o EBV.

PÓS – TRANSPLANTE

(até dia + 150 - receptor)

- ❖ *PCR quinzenal (sangue periférico) para detecção do HCMV*

- ❖ *PCR quinzenal (soro) para detecção do EBV*

3.2- Controle para o estudo molecular do EBV

Foi utilizado como controle para a reação de PCR em tempo real cepa do vírus Epstein-Barr previamente cultivado em soro fetal bovino, sendo fornecido pelo Laboratório de Vírus da Universidade de São Paulo-USP, pela gentil doação do Prof^o Cláudio Sérgio Pannuti e a Prof^a Thelma Suely Okay.

3.3- Pacientes transplantados

Participaram do protocolo de monitorização 46 receptores alogênicos de medula óssea e/ou de células progenitoras periféricas, sendo que 25 foram receptores do sexo masculino e 21 do sexo feminino. A idade mediana dos receptores foi de 38 anos (variação 22 - 63 anos). Os pacientes não fizeram profilaxia universal para HCMV e sim terapia precoce a partir da positividade dos testes de vigilância laboratorial (PCR e AGM).

O protocolo foi seguido de acordo com os requerimentos para pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil e, foi aprovado pelo Comitê de Ética Institucional da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (Parecer Projeto

Nº 019/2006). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi assinado pelo paciente ou por seu responsável após todas as dúvidas terem sido esclarecidas e, somente então, foram incluídos neste estudo.

Sangue periférico foi obtido dos pacientes no dia do transplante e em média quinzenalmente até o final do estudo (150 dias). Leucócitos de sangue periférico foram separados para Nested-PCR para HCMV conforme metodologia já padronizada no laboratório. Amostras de soro foram separadas para a realização da PCR em tempo real e sorologia para o EBV. A evolução clínica dos pacientes e a informação sobre “status sorológico” dos doadores e receptores foram baseadas nos dados coletados a partir dos prontuários médicos dos pacientes e de dados obtidos junto à equipe médica da Unidade de Transplante de Medula Óssea. Consideramos resultados positivos para o EBV a partir de uma cópia do vírus detectada pela qPCR, para o CMV consideramos 2 resultados positivos consecutivos para N-PCR.

4- MÉTODOS

4.1- Lise de Hemácias

Foram coletados de 5 a 10 mL de sangue em tubo contendo como anticoagulante EDTA. Este material foi transferido para tubos de prolipropileno de 15 mL (tipo Falcon). Os leucócitos foram separados por sedimentação com dextran a 5% diluído em PBS, pH 7,4 (sangue/dextran na proporção 4:1), homogeneizando-se gentilmente as amostras por inversão e colocando-as em estante inclinada para tubos em ângulo de 45 graus por 30 minutos, sendo mantidas em estufa à temperatura de 37° C. Após esse período, usando Pipeta tipo Pasteur, o sobrenadante, rico em leucócitos, foi transferido para outro tubo de plástico de 15 mL e centrifugado 10 minutos a 1200 rpm. A seguir, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento celular foi agitado em vórtex vigorosamente. Para remoção das células vermelhas persistentes, o sedimento celular foi suspenso em 10 mL de solução de cloreto de amônio gelado, pH 7,4, homogeneizado e mantido à temperatura de 4°C por 10 minutos, sendo realizada a centrifugação a 1200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado novamente e o sedimento celular lavado com PBS e centrifugado 10 minutos a 1200 rpm, sendo esse procedimento realizado por duas ou três vezes. O sedimento celular foi então ressuspenso em volume de 200 µL a 1000 µL de PBS.

4.2- Lise de Leucócitos

O precipitado de leucócitos foi centrifugado e o “pellet” lisado em solução de TKM1 (Tris - HCl 10 mM (pH 7,6); KCl 10 mM; MgCl₂ 10 mM e EDTA 20 mM), centrifugado por 10 minutos a 2500 rpm, por duas vezes consecutivas, quando foram adicionadas 3 gotas de Nonidet P-40 na primeira lavagem. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionada uma solução de TKM2, 8 mL de solução contendo Tris - HCl 10 mM (pH 7,6); NaCl 0,4 M; MgCl₂ 10 mM; KCl 10 mM; EDTA 2 mM e 0,025 mM de duodecil sulfato de sódio (SDS) 20%. Em seguida, o material foi incubado por 40 minutos a uma temperatura de 56°C e, após a incubação foi adicionado um volume de 0,3 mL de NaCl 5 M, descartando-se o sobrenadante e transferindo o precipitado para outro tubo.

Depois da transferência da fase aquosa para outro tubo, foi realizada a precipitação do ácido nucléico pela adição de acetato de sódio 3M pH 5.3 (10% do volume) e etanol absoluto gelado (3 vezes o volume).

O DNA foi solubilizado em água destilada, deionizada e estéril e deixado em banho-maria a 37°C por 8 horas.

4.3- Extração de DNA de soro

A extração de DNA do soro foi realizada pela forma clássica com fenol/clorofórmio.

O material biológico (soro) foi incubado em tubos tipo Eppendorf por 2 horas a 56°C com Proteinase K-Tampão (composto por Tampão Tris HCl pH 8,3 10mM, NaCl 150mM, EDTA 1 mM, DODECIL sulfato de sódio (SDS)10%, Proteinase K 10mg/ mL) na seguinte proporção:

- Material Biológico 200 ul

- Proteinase K - Tampão 100 ul

Adicionaram-se 200 uL de uma solução de fenol-clorofórmio (na proporção de 1:1), homogeneizando-se a mistura por 15 segundos em agitador mecânico e centrifugando-se a 15000 rpm por 10 minutos em centrífuga refrigerada à 10°C.

Removeu-se o sobrenadante para outro tubo, sendo este processo realizado por mais duas vezes.

Ao sobrenadante, adicionaram-se 25 uL de Acetato de Sódio 3M gelado e 900 uL de etanol absoluto. Agitou-se bem e incubou-se em banho de gelo por 10 minutos. Centrifugou-se a 15000 rpm por 10 minutos, descartando-se o sobrenadante e sendo o precipitado seco com os tubos invertidos e protegidos da exposição aos contaminantes por 8 horas. O precipitado foi ressuspendido em 25 uL de Tampão Tris-EDTA-Borato. O DNA, assim obtido, foi mantido congelado até o momento da análise (Secchiero et al, 1995).

4.4- Verificação da qualidade da amostra pela PCR

A amplificação de um fragmento do gene da Beta-Globina (β -Globina) humana foi utilizada a fim de verificar a qualidade do DNA em todas as amostras de sangue total utilizada no estudo. A mesma reação foi utilizada também para as amostras de soro para certificarmos que as mesmas não estavam contaminadas. O produto obtido, de 110 pares de bases indicou principalmente a presença de DNA nas amostras (**sangue total**) e a qualidade do DNA extraído, mostrando que não há substâncias inibidoras da reação e, garantindo assim, um controle interno de qualidade do experimento, indispensável à segurança dos resultados obtidos.

Nas amostras de DNA extraído do **soro** não foi obtido nenhum produto da reação, certificando assim que não há contaminação do material.

A reação em cadeia da polimerase para detecção do gene da beta globina humana seguiu o método descrito por Saiki e col. (1988).

Foram realizados 40 ciclos de amplificação para cada amostra em termociclador (“DNA Thermal Cycler” Perkin Elmer/Cetus, Norwalk, Conn, EUA), cada ciclo foi constituído de 3 etapas: a) separação das hélices de DNA por aquecimento a 94°C durante 1 minuto; b) ligação complementar entre os “primers” e o DNA em temperatura de 55°C por 1 minuto (anelamento) e c) síntese do DNA pela Taq polimerase, em temperatura de 72°C por 1 minuto (extensão). Assim, obedecendo-se às seguintes temperaturas e seus respectivos tempos: desnaturação inicial a 94° C por 5 minutos, desnaturação a 94° C por 30 segundos, anelamento a 55° C por 1 minuto, extensão a 72° C por 2 minutos e, para finalizar, extensão final a 72° C por 8 minutos.

Foram utilizados os primers PCO3 e PCO4, obtendo-se um produto final de amplificação de 110 pares de bases. (Tabela 5)

Tabela 5- Demonstra-se em seguida a sequência de primers utilizados, que flanqueiam uma região conservada do gene da betaglobina humana.

Primer	Sequência (5' → 3')	Sentido
PCO3	ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC	Sense
PCO4	CAA CTT CAT CCA CGT TTC ACC	Antisense

4.4.1- Detecção do DNA do citomegalovírus humano (HCMV) pela reação em cadeia da polimerase

A reação de amplificação com volume final de 200µl continha 0,5 a 1µg do DNA, 1x tampão da enzima (50mM de cloreto de potássio, 10mM de Tris pH 8,4), 2,5mM de cloreto de magnésio, 0,1mM de cada “primer”, 200mM da mistura desoxirribonucleotídeo (d ATP...) e cada reação de amplificação utilizou de 0,5 a 1 µg do DNA (obtido pelo método de extração de DNA anteriormente descrito) em volume total de 20 µL, contendo 50 mM de cloreto de potássio, 10 mM de Tris (pH 8.4), 2,5 mM de cloreto de magnésio, 0,1 mM de cada “primer”, 200 mM da mistura desoxirribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e 2 unidades de Taq DNA polimerase (Invitrogen®).

Os ciclos foram realizados automaticamente em equipamento apropriado (“DNA Thermal Cycler” - Perkin Elmer Cetus, Norwalk, Conn, EUA), sendo as amostras aquecidas inicialmente a 94°C por 7 minutos, para inativação de qualquer atividade de proteases que pudesse interferir com a reação enzimática. Após o último ciclo, o período de extensão final 72°C foi de 7 minutos.

Foram usados dois pares de iniciadores que flanqueiam uma região conservada nas diversas cêpas do HCMV, não amplificando o DNA de outros herpesvírus. (Tabela 6)

Tabela 6- Demonstra-se em seguida a sequência dos primers externos e internos que flanqueiam uma região conservada do genoma do HCMV, utilizados na PCR e na nested PCR

Primers externos *	Seqüência (5' 3')
MIE 4	CCA AGC GGC CTC TGA TAA CCA AGC C
MIE 5	CAG CAC CAT CCT CCT CTT CCT CTG G
Primers internos *	Seqüência (5' 3')
IE1	CCA CCC GTG GTG CCA GCT CC
IE2	CCC GCT CCT CCT GAG CAC CC

*MIE=Principal antígeno imediatamente precoce - Human cytomegalovirus (Towne) major immediate-early antigen (MIE) gene, exon 4. (GeneBank HS5MIE4).

*IE=antígeno imediatamente precoce - Human cytomegalovirus (Towne) immediate-early antigen (IE) gene, exon 4. (GeneBank HS5MIE4).

O par de primers denominados “primers MIE” amplificam uma sequência de 435 pares de bases do DNA do HCMV que codifica uma porção do antígeno “major immediate-early” (MIE) do HCMV (cêpa Towne). A porção do gene MIE que é amplificada está contida no exon 4 deste gene (Demmler et al., 1988).

O par de primers denominados “primers IE” amplificam uma sequência de 159 pares de bases do DNA do HCMV que codifica uma porção do antígeno “immediate-early” (IE) do HCMV (cêpa Towne). A porção do gene IE que é amplificada está contida no éxon 4 deste gene (Stenberg et al.,1984).

Utilizando-se uma alíquota do DNA amplificado na primeira reação, o fragmento foi reamplificado com o uso de um par de “primers” interno, nas mesmas condições da primeira reação de amplificação (PCR).

Após essas 2 reações, 5 µL do produto da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, para visualização do fragmento sob luz ultravioleta. Nas amostras positivas foi observado um fragmento de DNA de 159 pares de bases ao passo que, nas amostras negativas, não foi observado nenhum fragmento.

Em todos os experimentos realizados houve o uso de um controle positivo da reação, a cêpa AD-169 do HCMV, e um controle negativo.

4.5- Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

O método de quantificação pela PCR quantitativa em tempo real é baseado no uso de uma sonda fluorescente (Taq Man) ou utilizando-se moléculas intercalantes fluorescentes (SYBR® green). O SYBR green é um corante de ácido nucléico, verde fluorescente que demonstra uma afinidade excepcional pela dupla fita de DNA. Um sistema de lentes capta a fluorescência emitida pela reação, que teve anteriormente a excitação por uma luz halógena. A fluorescência aumenta conforme o aumento das ligações dos nucleotídeos com a fita molde, em uma reação de PCR. Esta técnica consiste em monitorar em tempo real a quantidade de DNA em estudo. Por este motivo, as amostras quantificadas deverão ter como padrão, fragmentos originais quantificados anteriormente, obtidas através da inserção do DNA alvo em plasmídeos. Além disso, apresenta vantagens como baixa emissão de fluorescência na ausência de fita dupla de DNA, representando uma técnica sensível e de fácil utilização.

O momento da reação, no intervalo de ciclos de PCR, em que a fluorescência de determinada amostra é detectada inequivocamente acima do ruído de fundo (background), é determinado CT (threshold cycle – Ciclo de amplificação). Durante a fase de acúmulo exponencial do produto amplificado em experimentos de qPCR há eficiência ótima de reação, permitindo quantificação mais precisa. O CT é estabelecido em função da quantidade de fluorescência considerada ruído de fundo e é traçado em um ponto no qual o sinal gerado a partir de uma amostra é significativamente maior que o ruído de fundo. (Ginzinger, 2002). Por meio da análise das curvas de amplificação, tendo como parâmetros a intensidade de fluorescência (eixo y) versus o número de ciclos de PCR (eixo x), a linha de base (baseline) é definida como os ciclos de PCR nos quais um sinal é acumulado, mas está abaixo dos limites de detecção do instrumento. O sinal de fluorescência medido durante estes ciclos de PCR é usado para a escolha manual do CT em cada experimento. Os parâmetros baseline e CT podem ser ajustados para cada gene,

mas devem ser idênticos para todas as amostras na mesma corrida, tornando-as comparáveis. Um sinal detectado acima do CT é considerado um sinal real que, novamente, pode ser usado para definir o CT para uma amostra.

4.5.1- Quantificação absoluta pela PCR em tempo real

Para realizar quantificações absolutas, é preciso ter amostras padrão previamente quantificadas, ou seja, com quantidades conhecidas de cópias do fragmento alvo. Tal amostra padrão foi conseguida através da clonagem do fragmento interno da PCR dupla da região do DNA do vírus Epstein-Barr, para assim produzirmos a curva padrão, com 8 pontos de diluição (escala logarítmica). O produto da PCR selecionado para a clonagem foi obtido a partir da cêpa do vírus EBV.

Na quantificação absoluta do DNA do EBV em amostras de soro, utilizamos o método SYBR® green.

4.5.2- Clonagem e seqüenciamento

Realizou-se a reação de ligação, onde foi utilizado o Kit PROMEGA p GEM – T Easy Vector Systems, onde ao volume de reação de 10 µl, mistura-se 1µl do plasmídeo (50ng/µl), 250ng (1µl) do produto da PCR dupla, 5 µl da solução tampão (2x) e 1µl da T4 DNA ligase, homogeneiza e deixa a 4°C de um dia para outro. Adiciona-se, então, cerca de 5µl dessa reação a 200 µl da cultura de células competentes d H5d (E. coli), levando esta mistura por 20 minutos no gelo seguindo de choque térmico por 1min e 30 segundos a 42°C e 2 min no gelo. Adicionou-se este produto à 800 µl de meio SOC, deixando-se incubar por 1 hora a 37°C, agitando-se em termomix (Thermomixer Comfort - Eppendorf). Após centrifugação a 3000 rpm por 1 minuto, foi descartado aproximadamente 600µl do meio, sendo o restante ressuspensionado e distribuído em placa de petri contendo meio sólido LB.. A placa foi mantida em estufa a 37°C de um dia para outro.

Colônias brancas, ou seja, aquelas que possuem o inserto, foram coletadas em placa de 96 poços contendo meio Circle Grow (Pharmacia), deixando crescer a 37°C a 120 rpm, de um dia para outro. Realizou-se a PCR para amplificação do inserto utilizando-se primers do vetor (M13) para posterior seqüenciamento. A PCR segue o seguinte protocolo para uma reação de 15 µl: 2µl da cultura do plasmídeo, 1,5 µl de solução tampão (1x); 0,125nM de dNTP aproximadamente 1,7nM de MgCl₂, 0,12nM do iniciador sense e 0,12nM do iniciador antisense, 0,2µl de Taq 0,7U DNA polimerase, 8,6 µl de água estéril, submetidos ao seguinte ciclo de amplificação: desnaturação inicial: 2 minutos a 94°C, seguidos de 30 ciclos: 94 °C por 20 segundos, 58 °C por 15 segundos, 72°C por 1 minuto.

O produto da PCR foi então submetido à eletroforese e visualizado em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio, para a confirmação do inserto.

Após a confirmação do inserto pelo sequenciamento, realizou-se a quantificação das amostras em espectrofotômetro (Nanodrop®).

4.5.3- Seqüenciamento

O MegaBACE 1000, é um sistema de análise de DNA de 96 capilares com a tecnologia Amersham Biosciences. As reações de seqüenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000. A amplificação para seqüenciamento automatizado foi realizada com o DYEnamic™ Terminator Cycle Sequencing Kit (MegaBACE™) (Amersham Pharmacia Biotech, Inc Cleveland, Ohio, USA).

Para esta reação foi utilizado 1,2 µl do produto de PCR; 0,3 µM de primer (M13) sense ou antisense; 3,0 µl da solução DYEnamic ET Reagent Premix e 9,8 µl de água deionizada estéril (volume final de 15,0 µl). A reação, distribuída em placa própria para seqüenciamento, foi protegida da luz com papel de alumínio. Em termociclador (GeneAmp® PCR System 9600 – Applied Biosystems), as amostras foram submetidas à desnaturação inicial de 96°C por 2 minutos seguido do ciclo:

- Desnaturação: 96°C - 20 segundos
 - Anelamento: 57°C - 15 segundos;
 - Extensão: 60°C - 1 minuto
- } 30 vezes

Ao produto da reação de seqüenciamento foi adicionado 2,0µl de acetato de amônio 7,5M e 50,0µl de etanol absoluto para precipitação, seguido de incubação por 15 minutos em temperatura ambiente protegido da luz, e centrifugação a 4000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi removido por inversão. Foram adicionados 100,0 µl de etanol 70% e posteriormente o material foi centrifugado a 4.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado por inversão para completa remoção do etanol. Para a eletroforese, foi adicionado em cada amostra, 10,0µl de loading buffer, uma mistura de formamida deionizada, 25mM EDTA (pH 8,0), figura 7. As amostras foram homogeneizadas, aquecidas a 65°C por 3 minutos e submetidas à eletroforese em seqüenciador automatizado.

O gel para a eletroforese é o MegaBACE Long Read Matrix com poliacrilamida linear (LPAAs), as condições de eletroforese foram as seguintes: voltagem de injeção da amostra-KV, tempo de injeção da amostra-80 segundos, voltagem de corrida-9 KV, tempo de corrida 90 minutos, potência do Laser - 40 mW.

Após eletroforese, o Software MegaBACE analisou as seqüências e as amostras foram alinhadas e comparadas com a seqüência do gene depositada em banco de dados.

Tabela 7- Demonstra-se em seguida a sequência dos primers externos e internos que flanqueiam uma região conservada do genoma do EBV, utilizados na PCR real time.

1ª Reação	Seqüência (5' 3')
EBV-ext 2F	GAG CAA GGT CCA GAT CAA ATG
EBV-ext 2R	CGT TAT AGC CGT AGT CGG AC
2ª Reação	Seqüência (5' 3')
EBV-ext 2R	CGT TAT AGC CGT AGT CGG AC
EBV-ext 1F	AAA TGT TTG AGG TGC AGC

4.5.4- Padronização da PCR em tempo real

Foi padronizada a concentração ótima dos iniciadores a serem utilizados na PCR quantitativa, que deveria ser a mínima o suficiente para permitir a duplicação de todas as cópias da sequência alvo presentes na amostra. Utilizando a mesma quantidade de amostra (uma das diluições do produto clonado amplificado) foram feitas reações com concentrações finais de iniciadores com 150nM, 300nM, 600nM, 900nM. Considerando-se que foi utilizada a mesma quantidade de amostra em todas as reações, os CTs não deveriam variar. A concentração ótima escolhida foi a mínima, associada ao menor CT, que no caso foi de 600nM.

Utilizando a concentração ótima do iniciador, foi determinada a eficiência da reação. Para isso, foram utilizadas reações com o produto clonado diluídos em escala logarítmica, cujos resultados geraram uma curva padrão CT versus quantidade de amostra. A eficiência da amplificação é obtida a partir da fórmula $E=10^{(-1/\text{slope})}$, onde slope corresponde ao coeficiente de inclinação da reta (Pffalf MW, 2001), dado pelo programa Gene Amp® SDS (Applied Biosystems).

Cada amostra submetida a esta técnica foi quantificada em espectrofotômetro (Nanodrop®), sendo a concentração utilizada de 2ng/μl de DNA concentração final na reação: 50Ng/μl de concentração DNA. Na reação de 25μl, 12,5μl corresponde ao máster

mix contendo a molécula fluorescente Sybr Green, 6,25µl refere-se ao mix de iniciadores e 6,25µl ao mix de amostra, ou seja, a quantidade de DNA equivalente à concentração de 2ng/µl, completando-se com o volume de água.

As condições de temperatura da PCR em tempo real foram: **1ª etapa:** 2 minutos a 50°C; **2ª etapa:** desnaturação por 10 minutos a 95°C; **3ª etapa:** 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

4.5.5- Normas de biossegurança utilizadas para evitar a contaminação nas amostras

Durante todos os procedimentos e técnicas utilizados para o desenvolvimento da presente pesquisa foram tomados diversos cuidados a fim de evitar qualquer tipo de contaminação das amostras e mesmo dos pesquisadores do laboratório. Abaixo encontram-se relacionados os principais cuidados:

- a-) manipulação em locais diferentes para extração do DNA; preparo das amostras e amplificação;
- b-) reagentes e materiais preparados e utilizados em ambientes diferentes daquele destinado à amplificação da sequência alvo;
- c-) uso de bancadas com fluxo laminar e ultra-violeta para manipulação das amostras a serem amplificadas;
- d-) antes da abertura dos tubos tipo “eppendorf” contendo as amostras, estes foram passados no vórtex e centrifugados a fim de se evitar a dispersão por aerossóis;
- e-) todos os materiais plásticos utilizados no preparo das amostras para amplificação, incluindo as ponteiros e os tubos “eppendorf”, eram novos e estéreis;
- f-) trocas constantes de luva durante todo o processo de manipulação;
- g-) uso de hipoclorito a 10% e etanol a 70% nos períodos anteriores e posteriores ao uso das bancadas;

- h-) uso de ponteiros com filtro;
- i-) uso de jogos de pipetas diferentes para cada local;
- j-) uso de luvas, máscara, avental, óculos e capacete de proteção;
- k-) prática laboratorial meticulosa.

4.5.6- Determinação de anticorpos IgM E IgG ANTI-EBV utilizando a técnica de ELISA

Para as reações sorológicas foram coletados 8 ml de sangue em tubo estéril seco. Após centrifugação, os soros foram separados, aliquotados, etiquetados e armazenados a -20°C até sua utilização.

A detecção de anticorpos das classes IgM e IgG anti-EBV foi realizada utilizando kits comerciais (ETI-VCA-G VCA IgG EIA e ETI-VCA-M VCA IgM EIA) da marca Dia sorin, seguindo as instruções e especificações do fabricante.

5- RESULTADOS

5.1- Resultados das 350 amostras analisadas através das técnicas de qPCR, PCR, Elisa

Nos 46 pacientes monitorizados foram realizados os testes de Nested-PCR para o HCMV, PCR- REAL TIME (qPCR) e os testes sorológicos para EBV (IgM e IgG). Os pacientes tiveram um acompanhamento quinzenal desde o dia do transplante até 150 dias após o transplante; totalizando uma média de 08 amostras por paciente.

Das 350 amostras de sangue submetidas à extração do genoma viral, 46 (13,1%) foram positivas para EBV através da PCR-RT; 96 (27,4%) foram positivas para CMV através da PCR qualitativa. E encontramos uma positividade de 100% das amostras no teste de ELISA (anti-VCA IgG) para o EBV, representada na tabela 8.

Tabela 8- Total de exames realizados nos pacientes monitorizados durante o período de 150 dias após-transplante

	Números de amostras	Positivos
PCR- RT (EBV)	350	46 (13,1%)
Nested-PCR (CMV)	350	96 (24,4%)
Sorologia IgG – EBV	350	350 (100%)
Sorologia IgM - EBV	350	0 (0%)

Relacionamos também as características dos pacientes estudados e o tipo de enxerto recebido. (tabela 9)

Tabela 9- Características gerais dos pacientes estudados, incluindo idade, sexo, sorologia, doença de base que motivou o transplante e tipo de enxerto

Características	N = 46
Idade Mediana	38 anos (22-63)
Sexo (Masculino/Feminino)	25/21
Doenças de Base	
Leucemia Mielóide Crônica (LMC)	18 (39,2%)
Leucemia Mielóide Aguda (LMA)	9 (24%)
Mieloma Múltiplo (MM)	6 (13%)
Leucemia Linfóide Aguda (LLA)	4 (6,6%)
Linfoma Não Hodgkin (LNH)	2 (4,3%)
Anemia Aplástica Grave (AA)	4 (6,6%)
Sarcoma Granulocítico (SG)	1 (2,1%)
Linfoma de Hodgkin (LH)	1 (2,1%)
Hemoglobinúria Paroxística Noturna (HPN)	1 (2,1%)
Tipo de Enxerto	
Células Periféricas Progenitoras (CPP)	28 (60,8%)
Medula Óssea (MO)	18 (39,2%)

Com a realização qPCR verificamos que 22 (52,2%) dos pacientes apresentaram positividade para o EBV. E 26 (56,5%) pacientes para o CMV através da PCR qualitativa. (Tabela 10)

No total de 46 pacientes 36 (78,3%) apresentaram resultados positivos para o DNA do EBV e DNA do CMV. Porém dos 22 (47,8%) que apresentaram resultados positivos para o EBV, 15 (68,2%) também apresentaram positividade para o CMV. (Gráfico 1)

Tabela 10- Resultados da detecção do DNA-EBV pela técnica de RT-PCR e do DNA-CMV pela N-PCR

	Positivo	Negativo
PCR-RT (EBV)	22/46 (47,8%)	24/46 (52,2%)
N-PCR (CMV)	26/46 (56,5%)	20/46 (43,5%)

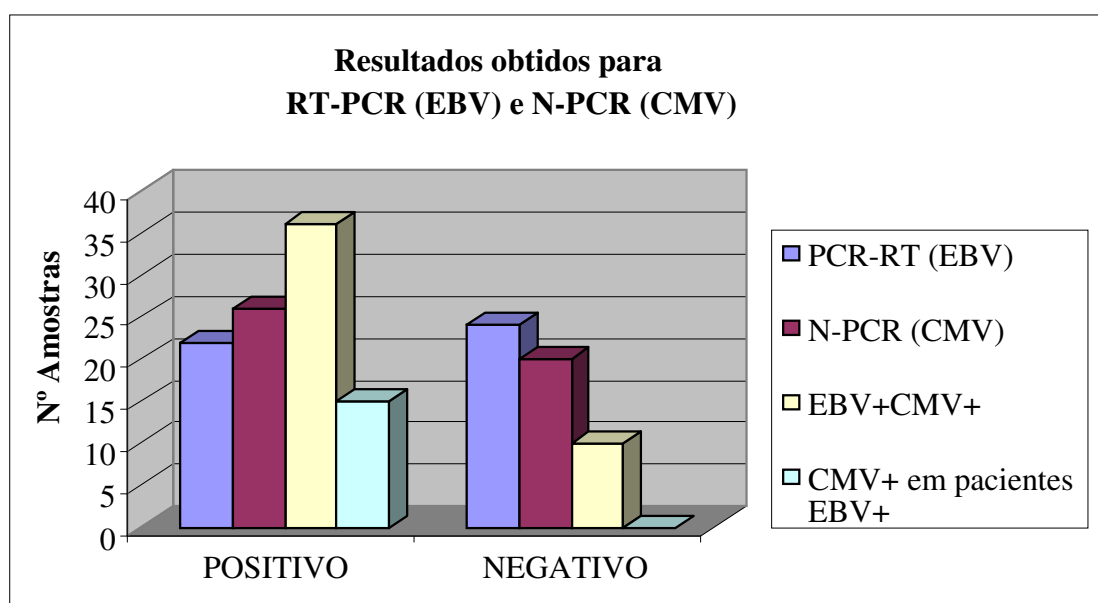


Gráfico 1- Resultados obtidos dos 46 pacientes estudados

Analizamos estatisticamente a associação dos vírus EBV e CMV nos 46 pacientes. Sendo que 15 pacientes apresentaram positividade para EBV e CMV tendo um *p* significativo de 0,01. Dos 46 pacientes 11 apresentaram positividade apenas ao CMV sendo o resultado também significativo ($p=0,01$); representado na tabela 11.

Tabela 11- Resultados do estudo da análise estatística da associação entre os vírus estudados

N = 46	CMV positivo	CMV negativo	P*
EBV positivo	15/46	7/46	0,01
EBV negativo	11/46	10/46	0,01

*Teste de Fisher

Foi verificada a ocorrência do GVHD nos pacientes, mas, não foi encontrada significância estatística. (Tabela 12)

Tabela 12- Apresentação dos testes do EBV e CMV em relação à ocorrência do GVHD

	GVHD presente	GVHD ausente	P*
EBV positivo	4/22	18/22	NS
EBV negativo	8/24	16/24	NS
CMV positivo	16/26	20/26	NS

*Teste de Fisher

Encontramos resultados significantes ($p=0,001$) para a ocorrência do GVHD relacionado à co-infecção. (Tabela 13)

Tabela 13- Casos de co-infecção em relação à ocorrência de GVHD

	GVHD presente	GVHD ausente	P*
Co-infecção - positivo	15/36	21/36	0,001
Co-infecção - negativo	3/10	7/10	NS

*Teste de Fisher

Foi relacionado e aplicado o teste de Fisher nas doenças de base apresentadas pelos pacientes, mas não encontramos significância entre os resultados.

Utilizamos a PCR-RT para quantificar a carga viral do EBV nos pacientes. Realizamos a curva padrão para a análise das amostras. **(Figura 9a, 9b)**

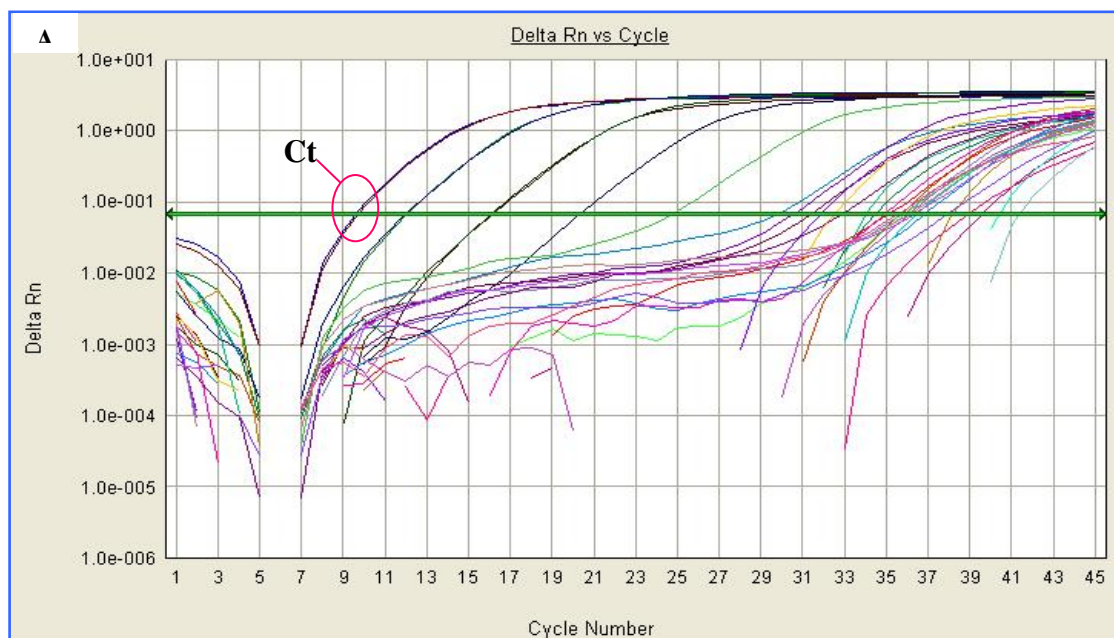


Figura 9- (A) Curva de amplificação das amostras e padrão



Figura 9-(B) Curva padrão e eficiência da reação, dada pela fórmula: $E=10^{-1/\text{slope}}$; $2=100\%$ eficiência ou $E=10^{-1/\text{slope}} - 1=1=100\%$. Então temos $E=99,8\%$; r =linearidade do método; $\text{intercept}=\text{Ct}$ onde detectamos uma partícula viral

Sete pacientes apresentaram doença por CMV no trato gastrointestinal, destes, 4 foram também positivos para o EBV apresentando uma carga viral baixa. (Tabela 14)

Tabela 14- Pacientes que apresentaram doença por CMV e resultados dos testes

*Pacientes	HCMV (N-PCR)	EBV (PCR-RT)	Nº cópias (PCR-RT)	Tipo de doença
5	+	+	1	TGI
7	+	+	15	TGI
8	+	-	-	TGI
33	+	+	2	TGI
19	+	-	-	TGI
22	+	+	15	TGI
40	+	-	-	TGI

*Pacientes positivos para HCMV e/ou EBV; correlacionando positividade; nº de cópias na RT-PCR e doença encontrada.

Pela PCR-RT quantificamos a carga viral do EBV que se apresentou baixa sendo em média de 29 cópias/ul. Representado na tabela 15 e gráfico 2.

Tabela 15- Média de número de cópias do DNA do EBV encontrado nas amostras.

Nº cópias/ul	Pacientes (N = 22)	%
1 - 5	8/22	36
6 - 10	5/22	23
11 - 15	4/22	18
16 - 30	2/22	9
31 - 61	3/22	14

Média 29 cópias/ul

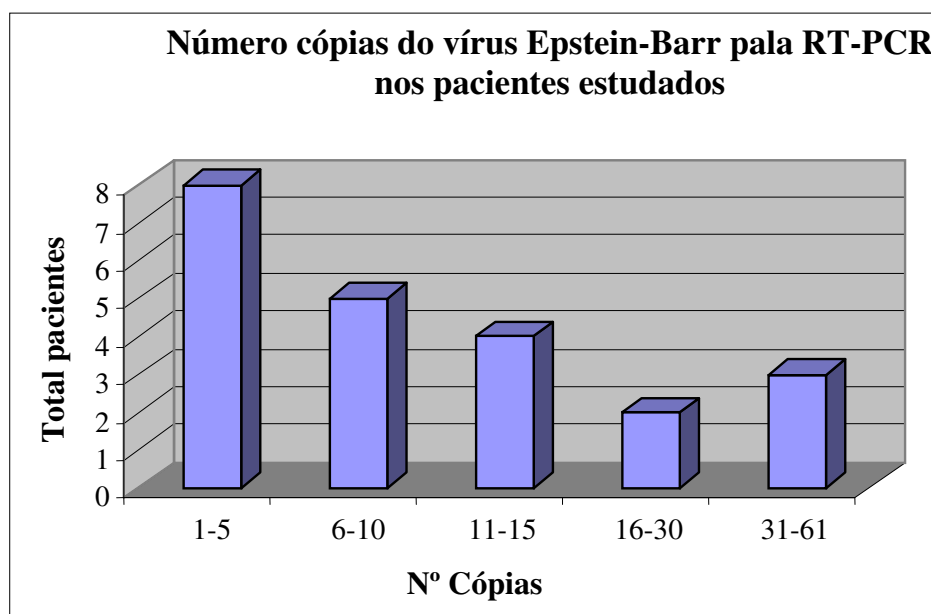


Gráfico 2- Representação dos resultados positivos para EBV (RT-PCR), e número de cópias detectadas

Tabela 16- Representação dos resultados de todos os pacientes

Paciente	Infecção ativa pelo EBV Detectada pela RT-PCR (soro)	Infecção ativa pelo CMV Detectada pela N-PCR (sangue)
1	Todas negativas	43,57
2	Todas negativas	68
3	<u>51</u>	<u>51,65</u>
4	0, 49, 145	68, 138
5*	0, 16, <u>63, 86</u> , 109	<u>63, 86</u> , 98, 109, 128
6	Todas negativas	35
7	54, 119, 140	19
8*	Todas negativas	0,14,26
9	Todas negativas	46, 67
10*	52	21, 33
11	Todas negativas	2, 36
12	<u>21</u>	0, 16, <u>21</u>
13*	Todas negativas	64
14	15,30	30, 60
15*	Todas negativas	12, 47, 62, 69
16*	Todas negativas	40, 54
17	28	40, 54, 68, 89, 102, 124
18	Todas negativas	63, 82
19	0, 147	Todas negativas
20	0, 196	71, 115, 154, 170
21*	105	32, 46
22*	28	42, 58
23*	0, 133	28, 42, 57
24	35, 49, <u>84</u>	68, <u>84</u>
25	Todas negativas	33, 56
26	<u>91</u>	33, 47, 68, 82, <u>91</u>
27	Todas negativas	21, 42, 56
28*	Todas negativas	56, 68, 82
29	72	Todas negativas
30*	41, 77	93, 114, 135
31	37, 101	37
32*	12	40, 55, 68
33*	Todas negativas	33, 48, 63, 77, 91, 133
34*	<u>40</u> , 68	<u>40</u> , 54
35*	0, <u>133</u>	28, 42, 93, <u>133</u>
36*	<u>136</u>	120, <u>136</u>

Sendo 10 pacientes negativos para EBV e CMV.

*Pacientes que utilizaram Ganciclovir.

6- DISCUSSÃO

Infecções ativas causadas por herpesvírus, tais como o vírus Epstein-Barr (EBV) são causa de importantes síndromes clínicas em pacientes imunossuprimidos. Estes vírus causam doenças, principalmente em pacientes transplantados, resultando em significativa morbidade e mortalidade (Gerstenkorn *et al*, 2000). Pacientes recebendo terapia imunossupressora após o transplante de órgãos ou de células progenitoras hematopoéticas têm um alto risco de desenvolver doença linfoproliferativa (PTLD) associada ao EBV no período pós-transplante (Nanesnik *et al*, 1988; Orazi *et al*, 1997).

Neste trabalho, monitorizamos prospectivamente, receptores de transplantes alogênicos de células progenitoras hematopoéticas, com HLA- idênticos, relacionados, desde o transplante até 150 dias após o mesmo, com coletas de sangue realizadas quinzenalmente, utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase quantitativa no soro (PCR em tempo real ou “Real-Time PCR”) com o objetivo de detectar e quantificar a infecção ativa pelo EBV.

Verificamos também, pelo teste sorológico tipo ELISA IgM/IgG anti-EBV, que todos os doadores e receptores deste estudo eram soropositivos para o EBV (100%), comprovando que a incidência deste vírus é muito alta na nossa população (Pannuti, 1981).

A infecção ativa pelo citomegalovírus (CMV), que é considerado como fator de risco para o desenvolvimento de doença pelo EBV, foi também monitorizada neste trabalho. Para tanto, utilizamos a Nested-PCR no sangue periférico dos pacientes transplantados para verificar a presença do DNA do CMV (Bonon *et al*, 2005).

Como resultados, encontramos o DNA do EBV no soro em 22/46 pacientes (47,8%). Estes resultados estão concordantes com os encontrados na literatura (Torre-Cisneros *et al*, 2004; Curtis & Kaplan, 2004). Observamos que há uma freqüente reativação do vírus do EBV após o transplante de células progenitoras hematopoéticas, e isso ocorre precocemente (mediana 42 dias pós-transplante) (Kinch *et al*, 2007; Van Esser *et al*, 2001; Clave *et al*, 2004; Cesaro *et al*, 2005).

Consideramos a presença de 1 ou mais gEq/ml do DNA-EBV como resultado positivo para infecção ativa pelo EBV (Gartner *et al*, 2002) e para caracterizar infecção ativa pelo CMV pela Nested-PCR, consideramos a presença de 2 ou mais resultados positivos consecutivos (Bonon *et al*, 2005).

Co-infecção entre EBV e CMV ocorreu em 15/46 pacientes (43,5%). Há evidências de que essa dupla replicação ocorra frequentemente em TMO e está relacionada ao estado de intensa imunossupressão nestes pacientes (Lin *et al*, 2002).

Doença por CMV ocorreu em 7/46 (15,2%) pacientes, no trato gastrintestinal. Todos estes doentes apresentaram infecção ativa prévia pelo CMV e 4 destes (57%) apresentaram também infecção ativa pelo EBV. Um paciente com dupla infecção ativa foi a óbito por doença por CMV no trato gatrointestinal.

A incidência da doença causada pelo EBV pode variar de acordo com os fatores de risco, tais como carga viral da infecção ativa pelo EBV, tipo de terapia de imunossupressão utilizada ou infecção ativa pelo CMV (Curtis *et al*, 1999). Transplantes não-relacionados também são associados a um risco aumentado de PTLT. Em pacientes sem nenhum destes fatores de risco, a incidência de PTLT é de 0,5%, mas em pacientes com três ou mais fatores de risco, a incidência pode aumentar para 22% (Curtis *et al*, 1999). O tratamento para a PTLT inclui a redução da imunossupressão, uso de anticorpos anti-CD20 e células T ou quimioterapia, porém, a prevenção é a melhor opção (Gross *et al*, 2003; Loren *et al*, 2003).

A utilização de métodos de diagnóstico quantitativos, tais como a PCR em tempo real utilizada neste trabalho, pode apresentar resultados mais confiáveis do que a PCR qualitativa, para prever a ocorrência da PTLT (Van Esser *et al*, 2001; Gartner *et al*, 2002).

Os casos de infecção ativa pelo EBV em relação à ocorrência de infecção ativa pelo CMV foram estatisticamente significantes ($p=0.01$), confirmando que a ocorrência da infecção ativa pelo CMV é um dos mais importantes fatores de risco para doença por EBV. Os casos de co-infecção ativa EBV+CMV em relação à ocorrência de GVHD também foram estatisticamente significantes ($p=0.001$).

Neste estudo, não observamos a ocorrência de PTLT, o que pode ser explicado pela baixa carga viral do EBV observada nos pacientes com infecção ativa pelo EBV (média 29 gEq/ml), o que foi observado também no trabalho de Torre-Cisneros *et al*, 2004. Numerosos estudos têm demonstrado que o risco de desenvolvimento de PTLT é proporcional à intensidade da replicação pelo EBV (Van Esser *et al*, 2001; Gartner *et al*, 2002).

Estudo recentemente realizado por Kinch e colaboradores em 2007, utilizou a PCR em Tempo Real no sangue e plasma para identificar pacientes com infecção ativa pelo EBV e encontrou resultados superiores a 100 gEq/ml em 41 pacientes transplantados de células progenitoras hematopoéticas, com mediana de 34 dias após o transplante. Doença pelo EBV somente ocorreu em pacientes com alto risco, ou seja, receptores com doadores relacionados, mas com HLA-não-idêntico, doador não-relacionado ou pacientes recebendo condicionamento com intensidade aumentada. Segundo Kinch et al (2007), carga viral com valor de cut-off de 1000 gEq/ml realizada no plasma, diferencia melhor os pacientes com doença por EBV daqueles com infecção ativa assintomática (Kinch *et al*, 2007).

Outro fator de risco que estava ausente em nossos pacientes é o transplante de doador não-relacionado (Baker *et al*, 2003).

Doença do enxerto *versus* hospedeiro (GVHD) estava presente principalmente nos pacientes com co-infecção, e é outro fator de risco encontrado em pacientes transplantados de células progenitoras hematopoéticas (Cohen *et al*, 2000).

Há evidências de que a replicação conjunta do EBV e CMV é freqüente em transplantados de medula óssea (Maeda *et al*, 1999; Maeda *et al*, 2000) e que a utilização da terapia precoce para controlar a infecção ativa pelo CMV minimize seu papel como fator de risco para a replicação do EBV.

Nenhum dos pacientes com infecção ativa pelo EBV apresentou PTLN relacionada ao EBV durante o período de monitorização. Pacientes com baixo risco de desenvolver PTLN, tais como os receptores de transplantes HLA-idênticos, relacionados, têm reativação do EBV sem desenvolvimento de doença. Nossos resultados e estudos anteriores na literatura mostram que não há necessidade de monitorização para a infecção ativa pelo EBV nestes pacientes (Curtis *et al*, 1999; Kinch *et al*, 2007)

Concluimos que a infecção pelo CMV ainda é a maior causa de morbidade e mortalidade nos pacientes após o transplante. A RT-PCR é uma ferramenta útil para verificar a carga viral dos pacientes com infecção ativa pelo EBV após o transplante e poderá auxiliar na prevenção da doença linfoproliferativa causada pelo EBV.

7- CONCLUSÃO

- Com a técnica da RT-PCR foi possível diagnosticar a infecção ativa pelo EBV e quantificar a carga viral dos pacientes;
- A carga viral pelo EBV foi muito reduzida nos pacientes estudados;
- Nenhum paciente apresentou doença pelo EBV;
- A técnica de RT-PCR diagnosticou com eficiência, os casos de infecção ativa pelo EBV, porém, o CMV foi o maior causador de infecção e doença neste grupo de pacientes;
- A infecção ativa pelo EBV e pelo CMV ocorreu quase que ao mesmo tempo. A utilização do ganciclovir precoce poderia ter sido um antiviral contra a ação do EBV, evitando o aparecimento da doença;
- Verificamos a ocorrência e significância do GVHD em relação à co-infecção;
- Concluimos que não seja necessária a monitorização da infecção ativa pelo EBV nos pacientes que apresentarem menos de 2 fatores de risco para PTLD;
- A monitorização laboratorial da Infecção Ativa pelo CMV ainda continua sendo extremamente necessária.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alford C A & Britt W J. Cytomegalovirus in: Fields, B.N. & Knipe, D.M. Virology 2 ed., Nova Iorque, Raven Press: 1990, 1981-2010.

Allday MJ, Crawford DH. Role of epithelium in EBV persistence and pathogenesis of B-cell tumours. Lancet 1988; 1: 855-857.

Almeida L N B, Azevedo R S, Amaker M, Massad E. Cytomegalovirus seroepidemiology in na urban community of SP, Brazil. Ver Saúde Pública 2001; 35 (2): 124-129.

Ambinder RF, Lemas MV, Moore S, Yang J, Fabian D, Krone C. Epstein-Barr virus and lymphoma. Cancer Treat Res 1999; 99: 27-45.

Asa G, Levitsky V, Zou J Z, Frisan T, Dalianis T, Ljungman P, Tingden O, Winiarski J, Emberg I, Masucci M G. Epstein-Barr virus (EBV) load in bone marrow transplantation recipients at risk to develop posttransplant lymphoproliferative disease: prophylactic infusion of EBV-specific cytotoxic T cell. Blood 2000; 95 (3): 807-813.

Avery RK, Adal KA, Longworth DL, Howell BJ. A survey of allogeneic bone marrow transplant programs in the United States regarding cytomegalovirus prophylaxis and preemptive therapy. Bone Marrow Transplantation 2000; 26: 763-767.

Axerold D A, Holmes R, Thomas S E, Magge J C. Limitations of EBV-PCR monitoring to detect EBV associated post-transplant lymphoproliferative disorder. Pediatr Transplantation 2003; 7: 223-227.

Azevedo AM, Souza CA, Azevedo WM. Transplante de medula óssea na prática médica. Medical Máster: Anais de atualização médica 1998; 2: 153-160.

Babcock GJ, Decker LL, Volk M, Thorley-Lawson DA. EBV persistence in memory B cells in vivo. Immunity 1998; 9: 395-404.

Baker K S, DeFor T E, Bums L J., et al. New malignancies after blood or marrow stem-cell transplantation in children and adults: Incidence and risk factors. J Clin Oncol 2003; 21(7): 1352-1358.

Bakker NA, Imhoff GWV, Verschuuren EAM, Son WJV. Presentation and early detection of post-transplant lymphoproliferative disorder after solid organ transplantation. *Organ Transplantation* 2007; 20: 207-218.

Baldanti F, Grossi P, Furione M, Simoncini L, Sarasini A, Comoli P, Maccario R, Fiocchi R, Gerna G. High levels of Epstein-Barr virus DNA in blood in solid organ transplant recipients and their value in predicting posttransplant lymphoproliferative disorders. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 613-619.

Balfour HH. Management of cytomegalovirus disease with antiviral drugs. *Rev Infect Dis* 1990; 12 (7): 849-860.

Baudouin v, Dehee A, Pedron-Grosselele B., et al. Relationship between CD8+T-cell phenotype and function, Epstein-Barr load, and clinical outcome in pediatric renal transplant recipients: a prospective study. *Transplantation* 2004; 77: 1706-1713.

Berger C, Day P, Meier G, Zingg W, Bossert W, Nadal D. Dynamics of Epstein-Barr virus DNA levels in serum during EBV-associated disease. *J Med Virol* 2001; 64: 505-512.

Birkeland SA, Hamilton-Dutoit S. Is posttransplant lymphoproliferative disorder caused by any specific immunosuppressive drug or by the transplantation per se. *Transplantation* 2003; 76: 984-988.

Brennan P. Signalling events regulating lymphoid growth and survival. *Semin Cancer Biol* 2001; 11 (6): 415-421.

Bonon SHA, Menoni SMF, Rossi CL et al. Surveillance of cytomegalovirus infection in haematopoietic stem cell transplantation patients. *J Infection* 2005; 50: 130-137.

Buell J F, Woodle E S. Syndromic incidence of ovarian cancer: is breast cancer and antecedent risk? *Liver Transplantation* 2004; 10: 156-157.

Caldwell R G, Wilson J B, Anderson S T, Longnecker R. Epstein-Barr virus LMP2 drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity* 1998; 9: 405-411.

Candeias J A N, Pereira M S. A survey for EB vírus antibody in adults and children of different ages. *Rev. Inst. Med. Trop* 1970; 12: 333-338.

Capello D, Rossi D, Gaidano G. Post-transplant lymphoproliferative disorders: molecular basis of disease histogenesis and pathogenesis. *Hematological Oncology* 2005; 23: 61-67.

Carmem M C, Tiori M, Odone V F. Associação do vírus Epstein-Barr com a doença de Hodgkin em crianças - Características epidemiológicas. *Rev. Inst. Med. Trop* 1999; 36: 205-208.

Carvalho R P S., et al. EBV infections in Brazil. I Occurrence in normal persons, in lymphomas and in leukemias. *Int J Cancer* 1975; 11: 191-201.

Carvalho R P S., et al. Epstein-Barr infections in Brazil. III: Infections mononucleosis. *Rev. Inst. Med. Trop. SP* 1981; 4: 23.

Castro CY, Ostrowski ML, Barrios R, Green LK, Popper HH, Powell S, Cagle PT, Ro JY. Relationship between Epstein-Barr virus and lymphoepithelioma-like carcinoma of the lung: a clinicopathologic study of 6 cases and review of the literature. *Hum Pathol* 2001, 32: 863-872.

Cesaro S, Murrone A, Mengoli C, Pillon M, Biasolo M A, Calore E. The real time polymerase chain reaction-guided modulation of immunosuppression enables the pre-emptive management of Epstein-Barr virus reactivation after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2005; 128: 224-233.

Chan WY, Chan EKL, Chow JHS. Epstein-Barr virus-associated gastric lymphomas are distinct from mucosa-associated lymphoid tissue-type lymphomas: genetic abnormalities of p53 gene. *Diagn Mol Pathol* 2001; 10: 153-160.

Chen H C, Lung M L, Chan K H, Griffin B E. Tissue distribution of Epstein-Barr genotypes 1996; 70 (10): 7301-7305.

Chen PC, Pan CC, Hsu WH, Ka HJ, Yang AH. Epstein-Barr virus-associated lymphoepithelioma-like carcinoma of the esophagus. *Hum Pathol* 2003; 34: 407-411.

Chu Pg, Chang KL, Chen WG, Chen YY, Shibata D, Hayashi K, Bacchi C. Bacchi M, Weiss LM. Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen (EBNA)-4 mutation in EBV-associated malignancies in three different populations. *Am J Pathol* 1999; 155: 941-947.

Clave E, Agbalika F, Bajzik V, Latour R P, Trillard M, Rabian C. Epstein-Barr reactivation in allogenic stem-cell transplantation: relationship between viral load, EBV-specific T-cell reconstitution and rituximab therapy. *Transplantation* 2004; 77: 76-84.

Cohen JI. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med* 2000; 343: 481-492.

Colimon R & Michelson S. Human Cytomegalovirus: pathology, diagnosis, and treatment. *Adv Nephrol* 1990; 333-356.

Costa F F, Costa S C B. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR): princípios e aplicações clínicas. *Rev Bras Reumatol* 1992; 32: 142-146.

Costa S C B. Infecção por citomegalovírus (CMV): Epidemiologia, Diagnóstico e Tratamento. *Revista Brasileira de Clínica e Terapêutica* 1999, 25(1): 18-28.

Costa F F. Detection of cytomegalovirus infections by PCR in renal transplant patients. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1999; 32: 953-959.

Craig FE, Gulley ML, Banks PM. Posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol* 1993; 99: 265-276.

Crawford D H. Biology and disease associations of EBV. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2001; 356: 461-473.

Cross T G, Loechelt B J. Epstein-Barr virus associated disease following blood or marrow transplant. *Pediatr Transplant* 2003; 7: 44-50.

Crook T, Nicholls JM, Brooks L, O'Nions J, Alladay ML. High level expression of deltaN-p63: a mechanism for the inactivation of p53 in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma (NPC)? *Oncogene* 2000; 19: 3439-3444.

- Crumpacker CS. Ganciclovir. N. Engl. J. Med 1996; 335 (10): 721-729.
- Curtis R E, Travis L B, Rowlings G, et al. Risk of lymphoproliferative disorders after bone marrow transplantation: a multi-institutional study. Blood 1999; 94: 2208-16.
- Curtis J J, Kaplan B. Transplant immunosuppressive drug trials on trial. Am J Transplant 2004; 4(5): 671-672.
- Demmler G J, Buffone G J, Schimbor C M, May R A. Detection of Cytomegalovirus in Urine from Newborns by Using Polymerase Chain Reaction DNA Amplification. J. Infect. Dis 1988; 158: 1177-1184.
- Dotti G, Rambaldi A, Fiocchi R, Mota T, Torre G, Viero P. Anti-CD20 antibody (Rituximab) administration in patients with late occurring lymphomas after solid organ transplant. Haematologica 2001; 86: 618-623.
- Drago F, Aragone M G, Lugani C, Rebora A. Cytomegalovirus Infection in Normal and Immunocompromised Humans. Dermatology 2000; 200: 189-195.
- Dror Y, Greenberg M, Taylor G, Superina R, Hebert D, West L, Connolly B, Sena L, Allen U, Weitzman S. Lymphoproliferative disorders after organ transplantation in children. Transplantation 1999; 67: 990-998.
- Dulley FL. Boletim COSAH, Coordenação de Sangue e Hemoderivados MS/SAS/DAPS 1997: ano II, nº 14.
- Durandy A. Anti-B cell and anti-cytokine therapy for the treatment of post-transplant lymphoproliferative disorder: past, present, and future. Transpl Infect Dis 2001; 3: 104-107.
- Einsele H, Ehninger G, Hebart H et al. Polymerase Chain Reaction Monitoring Reduces the Incidence of Cytomegalovirus Disease and the Duration and Side Effects of Antiviral Therapy After Bone Marrow Transplantation. Blood 1995; 86(7): 2815-2820.
- Emery V C, Cope A V, Bowen E F et al. The Dynamics of Human Cytomegalovirus Replication In Vivo. J Exp Med 1999; 190 (2): 177-182.

Entz-Werle N., et al. Lymphocyte data depletion in EBV induce post-transplant lymphoproliferative disorder treated by rituximab. *Pediatr Transplantation* 2003; 7: 277-281.

Epps R E, Pittelkow M R, Su D W P: Torch syndrome. *Semin Dermatol* 1995; 14: 179-186.

Epstein M, Achong B , Barr Y. Virus particles in cultured lymphoblasts from Birkitt's lymphoma. *Lancet* 1964; 1: 702-703.

Evans A. Clinical syndromes associated with EB virus infection. *Ann Intern Med* 1972; 18: 77-93.

Farber S, Wolbach S B. Intranuclear and cytoplasmic inclusions (protozoan-like bodies) in the salivary glands and other organs of infants. *Am J Pathol* 1932, 8:123-135.

Faulkner GC, Burrows SR, Khanna R, Moss DJ, Bird AG, Crawford DH. X-linked agammaglobulinemia patients are not infected with Epstein-Barr virus: implications for the biology of the virus. *J Virol* 1999; 73: 1555-1564.

Faulkner GC, Krajewski AS, Crawford DH. The ins and outs of EBV infection. *Trends microbial* 2000; 8(4): 185-189.

Fica A. Síndrome de mononucleosis infecciosa em pacientes adolescentes y adultos. *Revista Chil Infect* 2003; 20 (4): 235-242.

Forman S J, Zaia J A. Treatment and prevention of cytomegalovirus pneumonia after bone marrow transplantation: where do you stand? *Blood* 1994; 83: 2392.

Fugiwara S. Epstein-Barr virus nuclear protein 2-induced activation of the EBV- replicative cycle in Akata cells: analysis by tetracycline-regulated expression. *Curr Top Microbiol immunol* 2001; 258: 35-50.

Funch D P, Walker A M, Schneider G., et al. Ganciclovir and acyclovir reduce the risk of post transplant lymphoproliferative disorder in renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2005; 5: 2894-2900.

Gartner B C, Schafer H, Marggraff K, Eisele G, et al. Evaluation of use of Epstein-Barr viral load in patients after allogeneic stem cell transplantation to diagnose and monitor posttransplant lymphoproliferative disease. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40: 351-358.

Greenspan JS, Greenspan D, Lennette ET, Abrams DI, Conant MA, Petersen V, Freese UK. Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral “hairy” leukoplakia, an AIDS-associated lesion. *N Engl J Med* 1985; 313: 1564-1571.

Gerstonskon C, Robertson H, Mohamed M A., et al . Detecção of cytomegalovirus (CMV) antigens in kidney biopsies and transplant nephrectomies as a markes for renal graft dysfunction. *Clin Chen Lab Med* 2000; 38(11): 1201-1203.

Ginzinger D G. Gene quantificação using Real Time quantitative PCR an emerging techonology hits the maisntrean. *Exp Hematol* 2002; 30 (6): 503-512.

Griffiths P d, Clark D a, Emery Vc- Betaherpevirus in transplant recipients. *J Antimic Chem* 2000; 45 (3): 29-34.

Griffiths P D, Panjwani D D, Stirk P R, Ganczakowski M, Ball M G, Blacklock H A, Prentice H G. Rapid diagnosis of cytomegalovirus infection in immunocompromissed patients by detection of early antigen fluorescent foci. *Lancet* 1984 ii; 1242-1244.

Goodpasture E W, Talbor F B. Concernig the nature of iportozoan-like cells in certain lesions of infancy. *Am J Dis Child* 1921; 21: 415-425.

Gulley ML. Molecular diagnosis of Epstein-Barr virus-related diseases. *J Mol Diagn* 2001; 3: 1-10.

Hadou T, Andre J L, Venard V, Bourquard R, Krier-Coudert M J, , Faou A L. Long-term follow-up of Epstein-Barr vírus viremia in pediatric recipients of renal transplantats. *Pediatr Nephrol* 2005; 20: 76-80.

Hanaway M J, Buell J F, Cross T G., et al. Effect of sites of presentation of PTLD markedly influences survival after solid organ transplantation. *Am J Transplant* 2004; (Supl 8): 521.

Hanshaw J B, Didgeon J A, Marshall W C. Viral Diseases of the Fetus and Newborn. Philadelphia 1985, WB Saunders Co, 2nd Ed.

Hanto DW, Frizzera G, Gajl-Peczalska KJ, Simmons RL. Epstein-Barr, immunodeficiency, and B cell lymphoproliferation. Transplantation 1985; 39: 461-472.

Hardy A M, Allen Jr, Morgan W M, Curran J W - The incidence rate of acquired immunodeficiency syndrome in selected populations. Jama 1985; 253: 215-220.

Haque T, Thomas J A., et al. Prospective study in heart and lung transplant recipients correlation persistent Epstein-Barr virus infection with clinical events. Transplantation 1996; 64: 1028-1034.

Harris NL, Ferry JA, Swerdlow SH. Posttransplant lymphoproliferative disorders: summary of Society for Haematopathology workshop. Semin Diag Pathol 1997; 14: 8-14.

Henle G, Henle W, Diehl V. Relation of Burkitt's tumor associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. Proc Natl Acad Sci USA 1968; 59: 94-101.

Herrmann K, Niedobitek G. Epstein-Barr virus-associated carcinomas: facts and fiction. J Pathol 2003; 199: 140-145.

Ho M. Cytomegalovirus in: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE. Principles and practice of infectious diseases. 3^a ed, Churchill Livingstone 1990: 1159-1172.

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. P53 mutations in human cancers. Science 1991; 253: 49.

Hopwood P, Crawford DH. The role of EBV in posttransplant malignancies: a review. J Clin Pathol 2000; 53: 248-254.

Imashuku S, Teramura T, Tauchi H., et al. Longitudinal follow-up of patients with EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. Haematologica 2004; 89: 183-188.

<http://www.medscape.com/medscape/transplantation>

Jiwa N M, Van Der Rijke I M., et al. An improved immunocytochemical method for the detection of human Cytomegalovirus antigens in peripheral blood leukocytes. *Histochemistry* 1989; 91: 345-349.

Johannsen E, Koh E, Mosialog G, Tong X, Kieff E, Grossman SR. Epstein-Barr virus nuclear protein e transactivation of the latent membrane protein 1 promoter is mediated by J Kappa and PU1. *J Virol* 1995; 69: 253-262.

Jones JF, Shurin S, Abramowsky C, Tubbs RR, Sciutto CG, Wahl R, Sands J, Gottmand D, Katz BZ, Sklar J. T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA in patients with chronic Epstein-Barr virus infections. *N Engl J Med* 1988; 318: 733-741.

Joost E J, Van der B H, Meijer E, Niesters H G M. *Blood* 2001; 98 (4): 972-978.

Juvonen E, Aalto S, Tarkkanen J, Volin L, Hedman K, Ruutu T. Retrospective evaluation of serum Epstein-Barr virus DNA levels in 406 allogeneic stem cell transplant patients. *Haematologica the Hematology Journal* 2007; 92 (6): 819-825.

Kafuko GW, Henderson BE, Kirya BG, Munube GM, Day NE, Henle G, Henle W, Morrow RH, pike MC, Smith PG, Williams EH. Epstein-Barr virus antibody levels in children from the West Nile District of Uganda. Report of a field study. *Lancet* 1972; 1: 706-709.

Kaoru W, Kubota N., et al. Simultaneous quantification of EBV, CMV and human Herpesvirus 6 DNA in sample from transplant recipients by multiplex real time PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology* 2007; 5: 1426-1432.

Kew C E, Lopez B R, Smith J K, et al. Posttransplant lymphoproliferative disorder localized near the allograft in renal transplantation. *Transplantation* 2000; 12: 69-809.

Kimura H, Morita M, Yabuta Y, et al. Quantitative analysis of Epstein-Barr virus load by using a Real-Time PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37 (1): 132-136.

Kinch A, Oberg G, Arvidson J, Falk K I, Linde A, Pauksens K. Post-transplant lymphoproliferative disease and other Epstein-Barr virus diseases in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation after introduction of monitoring of viral load by polymerase chain reaction. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 2007; 39 (3): 235-244.

Klumb E C. Biologia de Patogênia dos linfomas Não Hodgkin de origem B na infância: uma revisão. *Revista Bras. De Cancerologia* 2001; 47 (3): 291-01.

Knecht H, Berger C, Rothenberger S, Odermatt BF, Brousset P. The role of Epstein-Barr virus in neoplastic transformation. *Oncology* 2001; 60: 289-302.

Koriyama C, Akiba S, Irya K, Yamaguti T, Hamada GS, Eizuru Y, Aikou T, Watanabe S, Tsugane S, Tokunaga M. Epstein-Barr virus associated gastric carcinoma in japaneses Brazilians and non-japanese Brazilians in São Paulo. *Jpn J Cancer Res* 2001; 92: 911-917.

Kulwichit W, Edwards RH, Davenport EM, Baskar JF, Godfrey V, Raab-Traub N. Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 11963-11968.

Lacerda JF. Imunoterapia Celular de Doenças Linfoproliferativas induzidas pelo Vírus de Epstein-Barr. *Revista da FML* 1999; 2: 113-125.

Lai K K, Cook L, Krantz E M, Corey L, Irome K R. Calibration curves for Real-Time PCR. *Clin Chem* 2005; 51(7) 1132-1136.

Landais E, Saulquin X, Houssaint E. The human T cell immune response to Epstein-Barr virus. *Int J Dev Biol* 2005; 49: 285-292.

Leblond V, Dhedin N, Mamzer Bruneel MF, Choquet S, Hermine O, Porcher R, Nguyen Quoc S, Davi F, Charlotte F, Dorent R, Barrou B, Vernant JP, Raphael M, Levy V. Identification of prognostic factors in 61 patients with posttransplantation lymphoproliferative disorders. *J Clin Oncol* 2001; 3: 772-778.

Leight ER, Sugden B. EBNA-1: a protein pivotal to latent infection by Epstein-Barr virus. *Rev Med Virol* 2000; 10: 83-100.

Lennette E T. Epstein-Barr vírus In: Lennette E H. Laboratory diagnosis of viral infections. New York, Marcel Dekker 1995, 365-380.

Leshner J L. Cytomegalovirus infections and the skin. *J Am Acad Dermatol* 1988; 18: 1333-1338.

Li L, Chaudhuri A, Weintraub LA, hsieh F, Shah S, Alexander S, Salvatierra O, Sarwal MM. Subclinical cytomegalovirus and Epstein-Barr virus viremia are associated with adverse outcomes in pediatric renal transplantation. *Pediatric Transplantation* 2007; 11: 187-195.

Li Q, Springgs Mk, kovats S, Turk SM, Comeau MR, Nepom B, Hutt-Fletcher LM. Epstein-Barr virus uses HLA class II as a cofactor for infection of B lymphocytes. *J Virol* 1997; 71: 4657-4662.

Lima M A P, Rabenhorst S H B. Associação do vírus Epstein-Barr com tumores sólidos. *Revista Bras. Cancerologia* 2006; 52 (1): 87-96.

Lin T S, Zahrieh D, Weller E, et al. Risk factors for cytomegalovirus reactivation after CD6 T-cell-depleted Allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 2002; 74: 49-54.

Lipschutz B. Untersuchungen uber die aetiologie der krankheiten d. herpes genitalis, etc. *Arch Dermatol Syphilol* 1921; 136: 428-482.

Loren A W, Porter D L, Stadtmauer E A, Tsai D E. Post-transplant lymphoproliferative disorder: a review. *Bone Marrow Transplant* 2003; 31: 145-155.

Maeda Y, Teshima T, Yamada M, et al. Monitoring of human herpesviruses after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation and bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 1999; 105: 295-302.

Maeda Y, Teshima T, Yamada M, et al. Reactivation of human herpesviruses after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation and bone marrow transplantation. *Leuk Lymphoma* 2000; 39: 229-239.

Malatack J J, Gartner J C, Urbach A H, Zitelli B J. Oothopic liver transplantation, EBV cyclosporine and lymphoproliferative disease: A growing concern. *J Pediatr* 1991; 118: 667-668.

Maruo S, Yang L, Takada K. Roles of Epstein-Barr virus glycoproteins gp350 and gp25 in the infection of human epithelial cells. *J Gen Virol* 2001; 82: 2373-2383.

May TC, Azulay DR. Infecção por Citomegalovírus. In: Lupi, O; Silva AS, Pereira JR. Herpes – Clínica, Diagnóstico e Tratamento. 1ª ed, Medsi Editora Médica e Científica Ltda. 2000; Cap. 8: 135-156.

Mendonça F, Carmem M C, Odone V F. Associação do Epstein-Barr com a doença de Hodgkin em crianças - Características epidemiológicas. *Pediatria (SP)* 1999; 21 (4): 322-329.

Mireau GM, Greffe BS, Weeks DA. Primary leiomyosarcoma of brain in a man infected with immunodeficiency virus. Case report. *J Neurosurg* 1997; 86: 883-887.

Murray PG, Lissauer D, Junying J, Davies G, Moores S, Bell A, Timms J, Rowlands D, Mcconkey C, Reynolds GM, Ghataura S, England D, carol R, Young LS. Reactivity with a monoclonal antibody to Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 1 defines a subset of an aggressive breast cancers in the absence of the EBV genome. *Cancer Res* 2003; 63: 2338-2343.

Mustafa MM. Cytomegalovirus infection and disease in the immunocompromised host. *Ped. Infect. Dis. J* 1994; 13: 249-259.

Muti G, Cantoni S, Oreste P, Klersy C, Gini G, Rossi V, D'Avanzo G, Comoli P, Baldanti F, Montillo M, Nosari A, Morra E. Co-operative study group on PTLDs. Epstein-Barr virus load and interleukin-10 in EBV- positive and EBV-negative post-transplant lymphoproliferative disorders. *Br J Haematol* 2003; 122: 927-933.

Myers JB. The laboratory diagnosis of cytomegalovirus infections. *Immunol Invest* 1997; 26 (3): 383-394.

Nalesnik M A, Makowka L, Starze T E. The diagnosis and treatment of postransplant lymphoproliferative disorders. *Arq Probe Surg* 1988, 25: 365-472.

Nalesnik M, Jaffe R, Starzi, et al. The pathology of posttrasnplant lymphoproliferative disorders occurring in the setting of cyclosporine-prednisone immunosuppression. *Am J Pathol* 1998; 133-173.

Nalesnik MA, Demetris AJ, Fung JJ, Randhawa P, Zeevi A. Posttransplantation lymphoproliferative disorders. Medscape home page 2000.

Nepomuceno RR, Balatoni CE, Natkunan Y, Snow AL, Krams SM, Martinez OM. Rapamycin inhibits the interleukin 10 signal transduction pathway and the growth of Epstein-Barr virus B-cell lymphomas. *Cancer Res* 2003; 63: 4472-4480.

Nichols W G, Boeckh M. Recent advances in the therapy and prevention of CMV infections. *Journal of Clinical Virology* 2000; 16: 25-40.

Niederman J, Evans A. Epstein-Barr Vírus. In: Evans A S, Kaslow R A, Editors. *Viral infections of humans: Epidemiology and control*. New York: Plenum 1997; 253-283.

Niedobitek G, Agathangelou A, Herbst H, Whitehead L, Wright DH, Young LS. Epstein-Barr virus (EBV) infection in infectious mononucleosis: virus latency, replication and phenotype of EBV-infected cells. *J Pathol* 1997; 182: 151-159.

Niedobitek G. The Epstein-Barr virus: a group 1 carcinogen? *Virch Arch* 1999; 435: 79-86.

Ohshima K, Suzumiya J, Kanda M, Haraoka S, Kawasaki C, Shimazaki K, Kikuchi M. Genotypic and phenotypic alterations in Epstein-Barr virus-associated lymphoma. *Histopathology* 1999; 35: 539-550.

Opelz G, Dohler B. Lymphomas after solid organ transplantation: a collaborative transplant study report. *Am J Transplant* 2004; 4: 222.

Orazi A, Hromas R, Neiman R, et al. Posttransplantation lymphoproliferative disorders in bone marrow transplant recipients are aggressive diseases with a high incidence of adverse histologic and immunobiologic features. *Am J Clin Pathol* 1997; 107: 419-427.

Orentas R J, Schauer D W, Ellis F W, Walczak J, Casper J T. Monitoring and modulation of Epstein-Barr virus loads in pediatric transplant patients. *Pediatr Transplantation* 2003; 7: 305-314.

Oudejans JJ, Dukers DF, Jiwa NM, Van Den Brule AJ, Grasser FA, De Bruin PC, Horstman A, Vos W, Van Gorp J, Middeldorp JM, Meijer CJ. Expression of Epstein-Barr virus encoded nuclear antigen 1 in benign and malignant tissues harbouring EBV. *J Clin Pathol* 1996; 49: 897-902.

Pannuti C S, Vilas Boas L S, Amato Neto V, et al. Detecção de anticorpos IgM nas infecções primárias e secundárias pelo citomegalovírus em pacientes submetidos a transplante renal. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1987; 29: 317-22.

Pannuti C S. Soro-epidemiologia do vírus Epstein-Barr (EBV). *Ver. Saúde Públ* 1981; 15: 93-100.

Pannuti C S – Citomegalia In: Ferreira A W, Ávila S L M eds. *Diagnóstico Laboratorial das principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes*, 2a. edição, Editora Guanabara Koogan 2001, Cap. 5, p. 68-73.

Pannuti C S. Infecção por CMV. *Revisão e Ensaio. Pediatr (S.Paulo)* 1984; 6: 144-153.

Paya C, Humar A, Domingues E., et al. Efficacy and safety of valgancyclovir vs. oral ganciclovir for prevention of Cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 2004; 4: 611-620.

Pegtell D M, Middeldorp J, Thorley-Laswson D A. Epstein-Barr infection in ex vivo tonsil epithelial cell of asymptomatic carriers. *J Virol* 2004 78(22): 12613-12624.

Peh SC. Host ethnicity influences non-Hodgkin's lymphoma subtype frequency and Epstein-Barr virus association rate: the experience of a multi-ethnic patient population in Malaysia. *Histopathology* 2001; 38: 458-465.

Penn I. De novo malignancies in pediatric organ transplant recipients. *Pediatr Transplant* 1998; 2: 56-63.

Pozo, F. & Tenorio, A. Detecção and typing of lymphotropic herpesviruses by multiplex polymerase chain reaction. *J of Virol methods* 1999; 79: 9-19.

Przepiorka D, Weisdorf D, MARTIN P. et al. Consensus conference on acute GVHD grading. *Bone Marrow Transplant* 1995; 15: 825-828.

Reams BD, McAdams HP, Howell DN, Steele MP, Davis RD, Palmer SM. Posttransplant lymphoproliferative disorder: incidence, presentation, and response to treatment in lung transplant recipients. *Chest* 2003; 124: 1242-1249.

Ribbert H. Veber protozoenartige Zellen in der Niere eines syphilitischen Negeborenen und in der Parotis von Kindern. Zentralbl All Pathol 1904; 15: 945-948.

Rickinson AB, Kieff E. Epstein-Barr virus. Fields Virology, 3^a ed, 1996.

Rickinson AB, Kieff E. Epstein-Barr virus. Fields Virology, 3^a ed. Philadelphia: Lippincott - Raven Publishers; 1996.

Riley Jr H D. History of the Cytomegalovirus. Southern Medical Journal 1997, February. <http://www.sma.org/smj/97feb4.htm>

Robertson E, Kieff E. Epstein-Barr vírus nuclear antigen 3c putative repression domain mediates coactivation of the LMP 1 promoter with EBNA 2. J Virol 2002; 76: 232-242.

Roizman B. Redefining Virology. Science 2000; 288 (5475): 2373-2376.

Rowe W P, Hartley J W, Waterman S et al. Cytopathogenic agent resembling salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. Proc Soc Exp Biol Med 1956; 92: 418-424.

Rubin R H. Impact of cytomegalovirus infection on organ transplant recipients. Rev Infect Dis 1990; 12(suppl 7): 754-766.

Rubin R H. Infectious disease complication in renal transplantation. Kidney Int 1993; 44: 221-236.

Rubin R H. Preemptive therapy in immunocompromised hosts. N. Engl. J. Med. 1991; 324: 1057-1059.

Saiki R K, Scharf S, Faloona F, Erlich H A. Enzymatic amplification of globin genomic sequences and restriction site analyses for diagnosis of sickle-cell anemia. Science 1985; 230: 1350-1354.

Secchiero P, et al. Identification of human telomeric repeat motifs at the genome termini of human herpesvirus 7: structural analysis and heterogeneity. J. Virol 1995; 69, 8041-8045.

Shibata D, Martin W J, Appleman M D, Causey D M, Leedom J M, Arnheim N. Detection of Cytomegalovirus DNA in Peripheral Blood of Patients Infected with Human Deficiency Virus. *J Infect Dis* 1988; 158: 1185-1192.

Shibata D, Weiss L M, Hernandez A M., et al. Epstein-Barr virus-associated non-Hodgkin's lymphoma in patients infected with human immunodeficiency virus. *Blood* 1993; 81: 2102-2109.

Sia I G & Patel R. New Strategies for Prevention and Therapy of Cytomegalovirus Infection and Disease in Solid-Organ Transplant Recipients. *Clinical Microbiology Reviews* 2000; 13: 83-121.

Silva A R, Zucoloto S. O papel do vírus Epstein-Barr na tumorigênese humana. *Medicina, Ribeirão Preto* 2003; 36: 16-23.

Sixbey JW, Vesterinen EH, Nedrud JG, Raab-Traub N, Walton LA, Pagano Js. Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected in vitro. *Nature* 1983; 306: 480-483.

Smith MG. Propagation in tissue cultures of a cythpathogenic virus from human salivary gland virus (SVG) disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* 1956; 92: 424-430.

Soler MJ, puig JM, Mir M, Parrilla J, Pedro C, Salar A, Serrano S, Lioveras J. Posttransplant lymphoproliferative disease: Treatment and outcome in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 2003; 35: 1709-1713.

Stevens SJ, Verschuuren EA, Pronk I, Van Der Bij W, Harmsen MC, The TH, Meijer CJ, Van Dn Brule AJ, Middeldorp JM. Frequent monitoring of Epstein-Barr virus DNA load in unfractionated whole blood is essential for early detection of posttransplant lymphoproliferative disease in high-risk patients. *Blood* 2001; 97: 1165-1169.

Stocchi R, Ward KN, Fanin R, Baccarani M, Apperley JF. Management of human cytomegalovirus infection and disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Haematologica* 1998; 84: 71-79.

Straus SE. - Introduction to herpesviridae. In: Mandel G L, Douglas Jr R G, Bennett J E. Principles and Practice of Infectious Diseases, 3ed., New York, Churchill Livingstone 1990; 1139-1144.

Svoboda J, Kotloff R, Tsai D E. Management of patients with post-transplant lymphoproliferative disorder the role of rituximab. Transpl Int 2006; 19(4): 259-269.

Subramanian C, Cotter MA, Robertson ES. Epstein-Barr virus nuclear protein EBNA-3c interacts with the human metastatic suppressor Nm23-H1: a molecular link to cancer metastasis. Nat Med 2001; 7: 350-355.

Swinnen LJ. Lymphoproliferative disorders following organ transplantation: clinical syndromes and treatment options. Epstein-Barr virus Report 1999; 3: 141-155.

Tao Q, Ho FC, Loke SL, Srivastava G. Epstein-Barr virus is localized in the tumor cells of nasal lymphomas of NK, T or B-cell type. Int J Cancer 1995; 60: 315-320.

Tegtmeier G E. Posttransfusion cytomegalovirus infections. Arch Pathol Lab Med 1989; 113: 236-245.

Tegtmeier G E. Posttransfusion Cytomegalovirus infection. Arch Pathol Lab Med 1989; 113: 236-245.

The TH, Van der Ploeg M, Van der Berg A P, Vlieger A M, Van der Giessen M, Van Son W J. Direct detection of cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes: a review of the antigenemia assay and polymerase chain reaction. Transplantation 1992; 54(2): 193-198.

Thomas ED, Sorb R, Clift RA, Fefer A, Johnson FL, Neiman PE, Lerner KG, Glucksberg H, Buckner CD. Bone marrow transplantation (second of two parts). N Engl J Med 1975; v 292: 895-902.

Thorley L D A. Basic virology aspects of Epstein-Barr infection. Semin Hematol 1988; 25: 247-260.

Timuragaoglu A, Ugur-Bilgin A, Colak D. Posttransplant lymphoproliferative disorders in transplant recipients. Transplantation Proceedings 2006; 38: 641-645.

Torre-Cisneros J, Roman J, Torres A, Herrera C, Caston J J, Rivero A, Mingot E, Rojas R, Martin C, Martinez F, Gomez P. Control of Epstein-Barr virus load and lymphoproliferative disease by maintenance of CD8 T lymphocytes in the T lymphocyte-Depleted graft after bone marrow transplantation. *Brief Report* 2004; 190 (1): 1596-1599.

Van der Bij W, Schirm J, Torensma R J, Van Son W, Tegzess A M and Hauw The T. Comparison between Viremia and Antigenemia for Detection of Cytomegalovirus in Blood. *J Clin Microbiology* 1988a; 26 (12): 2531-2535.

Van der Bij W, Torensma R, Van son W J, Tegzess A M, The T H. Rapid immunodiagnosis of active cytomegalovirus infection by monoclonal antibody staining of blood leukocytes. *J. Med. Virol.* 1988b; 25, 179-188.

Van der Meer J T M, Drew W L, Bowden R A, Galasso G J, Griffiths P D, Jabs D A, Katlama C, Spector A S, Whitley R J. Summary of the International Consensus Symposium on Advances in the Diagnosis, Treatment and prophylaxis of Cytomegalovirus Infection. *Antiviral Research* 1996; 32: 119-140.

Van Esser J W, Van Der H, B, Meijer E, et al. Epstein-Barr virus (EBV) reactivation is a frequent event after allogeneic stem cell transplantation (SCT) and quantitatively predicts EBV-lymphoproliferative disease following T-cell depleted SCT. *Blood* 2001; 98: 972-978.

Veronesi R, D M, D C. Citomegalia. *Doenças Infecciosas e Parasitárias* 1991; 8 ed.: 206-211.

Vilmer C, Pérol Y. Manifestations cutanées des infections à cytomegalovirus. *Ann Dermatol Vénéréol* 1984; 111: 119-125.

Vortmeyer AO, Kingma DW, fenton RG, Curti BD, Jaffe ES, Duray PH. Hepatobiliary lymphoepithelioma-like carcinoma associated with Epstein-Barr virus. *Am J Clin Pathol* 1998; 109: 90-95.

Wada K, Kubota N, Ito Yoshinori, Yagasaki H. Simultaneous quantification of Epstein-Barr virus, Cytomegalovirus and Human Herpesvirus 6 DNA in samples from transplant recipients by multiplex Real-Time assay. *Journal of Clinical Microbiology* 2007; 45 (5): 1426-1432.

Wagner HJ, Wessel M, Jabs W, Smets F, Fischer L, Offner G, Bucky P. Patients at risk for development of posttransplant lymphoproliferative disorder: plasma versus peripheral blood mononuclear cells as material for quantification of Epstein-Barr viral load by using real-time quantitative polymerase chain reaction. *Transplantation* 2001; 72: 1012-1019.

Walker R C, Marshall W F, Strickler J G, et al. Pretransplantation assessment of the risk of lymphoproliferative disorder. *Clin Infect Dis* 1995; 20: 1346.

Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA, Sklar J. Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 1989; 320: 502-506.

Weller H, Macauley J C, Craig J M, Wirth P. - Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illness resembling cytomegalic inclusion disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1957; 94: 4-12.

Weller T H. The cytomegaloviruses: ubiquitous agents with protean clinical manifestations (First of two parts). *N. Engl J Med* 1971; 285: 203-214.

Weller TH, Hanshaw JB, Scoth DE. Serological differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease. *Virology* 1960; 12: 130-132.

Wiltshire H, Hikankarn s, Farrell c., et al. Pharmacokinetic profile of ganciclovir after its oral administration and from its prodrug, valganciclovir, in solid organ transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* 2005; 44: 495-507.

Wilson JB, Bell JL, Levine Aj. Expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 induces B cell neoplasia in transgenic mice. *Embo J* 1996; 15: 3117-3126.

Winston D J, Ho W G, Champlin R E. Cytomegalovirus infections after allogeneic bone marrow transplantation. *Rev Infect Dis* 1990; 12 (Suppl. 7): S776-792.

Wong N A, Herbst H, Herrmann K., et al. Epstein-Barr infection in colorectal neoplasms associated with inflammatory bowel disease: detection of the vírus in lymphomas but not in adenocarcionomas 2003; 201 (2): 312-318.

Xu J, Ahmad A, Menezes J. Preferential localization of the Epstein-Barr vírus (EBV) oncoprotein LMP-1 to nuclei in human T cells: implications for its role in the development of EBV genome-positive T-cell lymphoma. *J Virol* 2002; 76: 4080-4086.

Yang HJ, Cho YJ, Kim HS, Chang MS, Sung MW, Kim WH. Association of p53 and BCL-2 expression with Epstein-Barr virus infection in the cancers of head and neck. *Head Neck* 2001; 23: 629-636.

Yates J, Warren N, Reisman D, Sugden B. A cisacting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proc Natl Acad* 1984; 81: 3806-3810.

Yoshida E M, Buczkowski A K, Griulivi A, Zou S, Forrester L A. A cross-sectional study of SEM vírus in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 2001; 7(6): 521-525.

Zheng HX, Burckart GJ, McCurry K, Webber S, Ristich J, Lacono A, Dauber J, McDate K, Grgurich W, Zaldonis D, Pillage G, Griffith BP, Zeevi A. Interleukin-10 production genotype protects against acute persistent rejection after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2004; 23: 541-546.

Ziegler JL, Drew WL, Miner RC, Mintz L, Rosenbaum E, Gershow J, Lennette ET, Greenspan J, Shillitoe E, Beckstead J, Casavant C, Yamamoto K. Outbreak of Burkitt's-like lymphoma in homosexual men. *Lancet* 1982; 2: 631-633.

Zur H, Schulte H H, Klein G, Henle W, Henle G, Clifford P, Santesson L. EBV DNA in biopsies of Burkitt's tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature* 1970; 228: 1056-1058.

Fonte: (<http://www.science.mcmaster.ca/Biology/Virology>)

Fonte: (<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>)

9- APÊNDICE

TERMO DE CONSENTIMENTO

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Eu, _____
aceito colaborar com um estudo que está sendo realizado na Universidade Estadual de Campinas, para a pesquisa do Vírus Epstein-Barr e o Citomegalovírus Humano. Para isso, sei que colherão uma amostra de sangue (4-8 ml) para a realização da pesquisa.

Estou ciente que poderei desistir de participar deste estudo a qualquer hora, e que isto em nada irá prejudicar o meu tratamento.

Qualquer esclarecimento, entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa - FCM/UNICAMP pelo telefone (019) 3788-7232.

Campinas, _____ de _____ de _____.

Paciente: _____
(responsável)

Médico: _____