

ANA CAROLINA GUARDIA DA SILVA

**DETECÇÃO DO DNA VIRAL DOS HERPESVÍRUS 5 E 6
EM BIÓPSIAS HEPÁTICAS DE TRANSPLANTADOS
DE FÍGADO**

CAMPINAS

Unicamp

2008

ANA CAROLINA GUARDIA DA SILVA

**DETECÇÃO DO DNA VIRAL DOS HERPESVÍRUS 5 E 6
EM BIÓPSIAS HEPÁTICAS DE TRANSPLANTADOS
DE FÍGADO**

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

ORIENTADORA: PROFA. DRA. 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

Si38d Silva, Ana Carolina Guardia da
 “Detecção do DNA viral dos herpesvírus 5 e 6 em biopsias
 hepáticas de transplantados de fígado” / Ana Carolina Guardiã Silva.
 Campinas, SP : [s.n.], 2008.

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

1. Herpesvírus humano 6. 2. Fígado - Transplante. 3. Rejeição
de enxertos. 4. Citomegalovírus. I. Costa, Sandra Cecília Botelho.
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências
Médicas. III. Título.

Título em inglês : Detection of human herpesvirus 5 and 6 in liver transplant patients

Keywords: • Human herpesvirus 6
 • Liver transplant
 • Graft Rejection
 • Cytomegalovirus

Titulação: Mestre em Farmacologia

Banca examinadora:

Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa
Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Ramos
Profa. Dra. Andrea Mendonça Gusmão Cunha

Data da defesa: 28 -07 - 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. Andréa Mendonça Gusmão Cunha

Andréa Gusmão

Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Ramos

Marcelo

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

Data: 28/07/2008

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais José Geraldo e Maria Beatriz, que me amam o suficiente para se privarem dos próprios ideais e assim concretizar os meus sonhos.

Aos meus irmãos Luiz Gustavo e Juliana pelo companheirismo e incentivo ao longo desse projeto. A meus avôs e avós (presentes e ausentes), aos meus tios e tias, primos e primas e meu afilhado Gabriel, pela força e carinho.

Aos meus amigos que compartilham todos os momentos mostrando a verdadeira amizade, amor e companheirismo.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço a Deus pelo privilegio da vida e aos meus pais.

Agradeço imensamente a minha orientadora, Prof^ª Dr^ª Sandra Cecília Botelho a disponibilização do laboratório e a ajuda na organização e execução deste trabalho, meus agradecimentos por toda confiança, oportunidade, paciência.

À Profa. Dra. Ilka de Fátima S. F. Boin, pela confiança, amizade e incentivo, pelo apoio conselhos e valorização deste estudo, serei eternamente grata!

Aos Professores membros da banca de defesa Prof. Dr. Marcelo de Carvalho Ramos, Profa. Dra. Andréa Mendonça Gusmão Cunha, Profa. Dra. Maria de Lourdes R. B. Castro e Prof. Dr. Celso Francisco H. Granato pela participação e partilha de conhecimentos.

AGRADECIMENTOS

Em especial aos pacientes, por terem aceitado participar deste estudo, aos familiares dos doadores, pela permissão da doação.

À Chefe da Equipe de Transplante de Fígado, Profa. Dra. Ilka de Fatima S. F. Boin pela permissão de coletas das amostras realizadas no Centro Cirúrgico e Ambulatório de Transplante, Profª Drª Raquel Stuchi pela colaboração, atenção e valorização deste trabalho.

Ao Sergio do laboratório do núcleo de medicina experimental, que me ajudou muito com as biópsias.

As minhas queridas amigas e companheiras de graduação e pós-graduação Ana Maria e Anali, que sempre me ajudaram nos momentos mais conturbados e sempre estiveram comigo, muito obrigada.

Aos meus amigos e companheiros de pós-graduação Ana Maria, Ronaldo, Anali, Sheila, Beatriz, Fernanda, Gláucia, Claudia, Paula, Angélica, Renata, Emanuel, Arlete, Camila, Camila Carvalho, Cristiane, Aglécio, Rose, Conceição, Daniela.

A Paula, responsável técnica do Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular. As técnicas que passaram pelo laboratório Carolina, Diana, Angélica e Tycha.

Agradeço as minhas grandes amigas Letícia, Maria Fernanda, Maria Laura, Olívia, Priscila, Silvia Renata, Silvia Martins, Rachel, Renata e a minha prima Bruna, que mesmo não estando comigo no laboratório, sempre me incentivaram e são muito importantes para mim.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma, meus sinceros agradecimentos!

*Lembra-te de que falando ou silenciando, sempre é
possível fazer algum bem.*

(Chico Xavier)

*Celebrar a vida é somar amigos, experiências e conquistas,
dando-lhes sempre algum significado.*

(Fernando Brant)

	PAG.
RESUMO	<i>xxxiii</i>
ABSTRACT	<i>xxxvii</i>
1- INTRODUÇÃO	41
1.1- O Transplante de fígado	43
1.2- Citomegalovirus humano	44
1.3- Herpes vírus humano – 6	46
1.4- Características biológicas dos herpesvirus	46
1.4.1- CMV.....	47
1.4.2- HHV-6.....	48
1.5- Mecanismo de replicação	49
1.5.1- CMV.....	49
1.5.2- HHV-6.....	51
1.6- Patogênese	51
1.6.1- CMV.....	51
1.6.2- HHV-6.....	52
1.7- Manifestações clínicas	52
1.8- Epidemiologia e transmissão	53
1.8.1- CMV.....	53
1.8.2- HHV-6.....	54
1.9- Diagnóstico laboratorial da infecção pelo CMV e HHV-6	55
1.9.1- Sorologia.....	55

1.9.2- Histopatologia e citológico.....	56
1.9.3- Isolamento do vírus.....	56
1.9.4- Antigremia.....	57
1.9.5- Detecção de ácidos nucléicos.....	58
1.9.6- Real Time.....	59
1.10- glicoproteína B.....	60
1.11- Agentes anti-virais.....	61
1.11.1- Ganciclovir.....	61
1.11.2- Foscarnet.....	62
1.11.3- Cidofovir.....	62
1.11.4- Aciclovir.....	63
1.12- CMV E HHV-6 em transplantados hepáticos.....	63
2- OBJETIVOS.....	67
3- CASUÍSTICA.....	71
3.1- Critério de inclusão no estudo.....	74
3.2- Critério de exclusão.....	74
3.3- Critério de encerramento.....	74
3.4- Genotipagem.....	74
3.5- Critérios para indicação da biópsia no fígado implantado.....	74
3.6- Critérios para definição de infecção ativa por CMV e HHV-6.....	75
3.7- Critérios para caracterizar da provável doença por CMV.....	75
3.8- Critérios para caracterizar provável doença do HHV-6.....	76
3.9- Definição de disfunção e rejeição do enxerto.....	76

4- MÉTODOS	79
4.1- Extração do DNA genômico (tecidos não-fixados)	81
4.2- Extração do DNA genômico (tecido fixados)	81
4.3- Detecção do gene da β-globina	82
4.4- Nested-PCR para CMV	83
4.4.1- Primers utilizados para reação de N-PCR para CMV.....	84
4.5- Nested-PCR para HHV-6	84
4.5.1- Primers utilizados para reação de N-PCR para HHV-6.....	85
4.6- Identificação das linhagens do CMV	86
4.6.1- Detecção.....	87
4.6.2- Análise dos fragmentos.....	88
4.7- Metodologia Estatística	89
5- RESULTADOS	91
5.1- Monitorização dos pacientes incluídos no estudo	93
5.2- Características dos pacientes incluídos no estudo	95
5.3- Infecções encontradas nas biópsias dos doadores	96
5.4- Nested-PCR para amplificação do Gene da Glicoproteína B (gB)	108
6- DISCUSSÃO	109
7- CONCLUSÕES	119
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
9- ANEXOS	147

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
AGM	Antigenemia
AIDS ou SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ALT	Alanina-amino-transferase
CMV	Citomegalovírus
dATP	Desoxirribonucleotídeo adenina trifosfato
dCTP	Desoxirribonucleotídeo citosina trifosfato
dGTP	Desoxirribonucleotídeo guanina trifosfato
dTTP	Desoxirribonucleotídeo timina trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucléico ou ADN
E	Fase precoce do ciclo de replicação do HHV-5
EA	Antígenos precoces (“Early antigens”)
EBV	Epstein-Barr Vírus
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay ou Ensaio Imunoenzimático
FAF	Falência aguda do fígado
Fc	Porção da molécula da imunoglobulina
g	Gramas
gB	Glicoproteínas do envelope do HCMV
HBV	Vírus da Hepatite B
HCV	Vírus da Hepatite C
HHV-6	Herpesvírus Humano Tipo 6
HHV-7	Herpesvírus Humano Tipo 7

HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IE	Fase imediatamente precoce do ciclo de replicação do HHV-5
IEA	Antígenos imediatamente precoces (“Immediatery early antigens”)
IgG	Imunoglobulinas da classe G
IgM	Imunoglobulinas da classe M
IL	Interferon
L	Fase tardia do ciclo de replicação do CMV
L	Antígenos Tardios (“Late antigens”)
M	Molar
ml	Mililitros
mM	Milimolar
Nested-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase ou dupla PCR
nm	Nanômetro
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pmol	Picomoles
pp65	Proteína matricial de peso molecular 65
RFLP	“Restriction Fragment Length Polymorphism” – Polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição
RPM	Rotação por minuto
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TOF	Transplante ortotópico de fígado
TXH	Transplante de fígado
UFTH	Unidade de Fígado e Transplante Hepático
μl	Microlitros

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1- Seqüência dos primers utilizados para a PCR para β -Globina.....	82
Tabela 2- Seqüência dos primers utilizados para a PCR para CMV.....	84
Tabela 3- Seqüência dos primers utilizados para a N-PCR para CMV.....	84
Tabela 4- Seqüência dos primers utilizados para a PCR para HHV-6.....	85
Tabela 5- Seqüência dos primers utilizados para a N-PCR para HHV-6.....	85
Tabela 6- Seqüência dos “primers” utilizados para a amplificação das glicoproteínas gB do CMV.....	87
Tabela 7- Distribuição dos receptores de transplante hepático em relação ao sexo e idade.....	96
Tabela 8- Distribuição segundo a doença de base dos pacientes transplantados.....	96
Tabela 9- Infecções nas biópsias no pré e pós-transplante.....	97
Tabela 10- Freqüência das biópsias realizadas pós-tranplante.....	98
Tabela 11- Características dos transplantados hepáticos.....	101
Tabela 12- Freqüência das variáveis categóricas em relação à rejeição e doença clinica pelo CMV.....	101
Tabela 13- Pacientes que apresentaram rejeição e infecção pelos vírus do CMV e HHV-6.....	102
Tabela 14- Cruzamento entre a infecção pelo CMV nas biópsias dos doadores com as rejeições dos receptores.....	103
Tabela 15- O cruzamento entre as variáveis da infecção pelo HHV-6 nas biópsias dos doadores com as rejeições dos receptores.....	104

Tabela 16-	Cruzamento entre Rejeição vs DNA do CMV na biópsia pós-transplante.....	104
Tabela 17-	Cruzamento entre Rejeição vs DNA do HHV-6 na biópsia pós-transplante.....	105
Tabela 18-	Doença clínica do CMV vs as infecções do CMV nas biópsias pré-transplante dos doadores.....	105
Tabela 19-	Doença clínica do CMV vs as infecções do CMV nas biópsias pós-transplante.....	105
Tabela 20-	Cruzamento entre a doença clínica do CMV vs infecções do HHV-6 nas biópsias pré-transplante dos doadores.....	106
Tabela 21-	Cruzamento entre a doença clínica do CMV vs infecções do HHV-6 nas biópsias pós-transplante.....	106
Tabela 22-	Pacientes que tiveram recidiva do HCV.....	107
Tabela 23-	Distribuição das biópsia genotipadas.....	108
Tabela 24-	Distribuição dos genótipos para CMV nas biópsias estudada.....	108

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1- Estrutura do Citomegalovírus Humano (CMV).....	47
Figura 2- Representação genômica do HHV-6B.....	48
Figura 3- Ciclo de Replicação do CMV.....	50
Figura 4- Proteínas virais no núcleo de fibroblastos humanos infectados.....	57
Figura 5- Esquema representando a PCR.....	59
Figura 6- Padrão da digestão para os genótipos (gB1,gB2, gB3, gB4 e mistura de linhagens) do CMV com as enzimas RsaI e Hinf I.....	88
Figura 7- Gel de agarose visto à luz ultravioleta exibindo fragmentos de amplificação obtidos por N-PCR para β -globina humana.....	93
Figura 8- Gel de agarose visto à luz ultravioleta exibindo fragmentos de amplificação obtidos por N-PCR para o CMV.....	94
Figura 9- Gel de agarose visto à luz ultravioleta exibindo fragmentos de amplificação obtidos por N-PCR para o HHV-6.....	94
Figura 10- Gel de agarose visto à luz ultravioleta exibindo fragmentos de amplificação obtidos por N-PCR para o gene da glicoproteína gB.....	95
Figura 11- Diagrama ilustrando o número de amostras positivas para qualquer combinação do vírus.....	98

LISTA DE GRÁFICOS

	PÁG.
Gráfico 1- DNA dos herpesvírus 5 e 6 encontrado nas biópsias hepáticas dos doadores.....	97
Gráfico 2- Pacientes que apresentaram pelo menos um resultado positivo pela N-PCR para CMV e HHV-6.....	99
Gráfico 3- Pacientes com infecção para CMV.....	100
Gráfico 4- Pacientes com infecção para HHV-6.....	100
Gráfico 5- Transplantados que apresentaram rejeição.....	103
Gráfico 6- Transplantados por HCV que tiveram recidiva do vírus.....	107

RESUMO

O *Citomegalovírus* (CMV) e o *Herpesvírus humano 6* são vírus universais pertencentes à subfamília dos betaherpesvírus. Esses vírus permanecem latentes, podendo ser reativados por um período de imunossupressão, como acontece em pacientes submetidos a transplantes de fígado. O CMV é um importante patógeno oportunista, que influencia negativamente esses pacientes. O HHV-6 é um vírus linfotrópico, além de infectar outras células como monócitos e células endoteliais, usando o receptor celular CD-46. A reativação do HHV-6 tem sido associada com a do CMV e rejeição do enxerto. Nos transplantados de fígado a reativação do HHV-6 tem aparecido junto com a infecção do CMV. O CMV tem sido associado como importante causa de mortalidade e morbidade nos transplantados de órgãos sólidos. Esses vírus podem causar disfunção no enxerto, supressão da medula e pré-disposição para a doença por CMV.

Este estudo detectou o DNA do CMV e HHV-6 em 41 transplantados de fígado usando a Nested-PCR. Este método foi escolhido por ser mais sensível e possibilitar a genotipagem. Também analisamos a co-infecção e o impacto clínico desses vírus nos transplantados hepáticos.

145 biópsias foram analisadas (41 – biópsias de doador e 104 – biópsias pós-transplante). 23 (15.8%) das 145 foram positivas para o CMV e 53 (36.5%) positivas para o HHV-6. 19 (13%) tiveram a co-infecção na mesma amostra. 21 pacientes tiveram rejeição ao enxerto e desses 16 tiveram infecção viral.

A presença desses vírus observado, nas biópsias hepáticas dos doadores e no pós-transplante, sugere que as infecções no pré-transplante são importante via de transmissão desses vírus aos receptores, causando episódios de rejeição.

ABSTRACT

Cytomegalovirus (CMV), *Human Herpesvirus-6* (HHV-6), belong to the β -herpesvirus subfamily. These viruses can be reactivated from latency during immunosuppression. period especially after liver transplantation, CMV has been the most important opportunistic infection that negatively influences the outcome of patients. HHV-6 is a lymphotropic virus, but it may also infect other cells, such as monocytes and epithelial cells, using the CD46-molecule as a cellular receptor. HHV-6 reactivations are often seen associated with CMV infection and allograft rejection. In liver transplant patients, HHV-6 reactivations are frequently found together with CMV infection. CMV has been implicated as an important causes of morbidity and mortality among solid organ transplant patients. Both have been related to graft dysfunction, bone marrow suppression, and predisposition to CMV disease.

In this study, CMV and HHV-6 DNA were detected in 41 liver transplant patients, using nested polymerase chain reaction (PCR). This method was chosen because increase the sensibility and with the products we can be classified into CMV genotypes. We also evaluate the co-infection and the clinical impact between those virus in liver transplant patients.

145 biopsies were tested, (41 - liver donor biopsies and 104 - liver post- transplant), Twenty three (15,8%) of 145 liver biopsies were CMV- PCR positive and fifty three (36,5%) of 145 were positive HHV-6- PCR. Nineteen (13%) of 145 biopsies were both CMV and HHV-6 positive. 21 patients had allograft rejection and 16 had infection for this virus.

With the presence of the viruses observed in the samples of the donor and post-transplant, suggests that pre-transplant HHV-6 and CMV infection may be a risk factor post-transplant. They had associated with allograft refection.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Transplante de fígado

Atualmente o transplante hepático é considerado o tratamento de escolha para doenças hepáticas agudas ou crônicas, que não sejam curáveis com outros tratamentos ou que ponha em risco a vida ou causem piora importante da qualidade de vida do paciente (Keeffe, 2001; Prados e Cuervas-Mons, 2005).

A primeira tentativa de transplante de fígado em humanos foi realizada nos Estados Unidos, em Denver, Colorado, por Thomas Starzl, em 1963. Em seguida foram realizadas dezenas de tentativas em diferentes países por inúmeros autores, e apenas em 1967 é que houve o primeiro resultado favorável. Tratava-se de uma menina de 2 anos de idade, portadora de um colangiocarcinoma. Esta menina, veio a falecer 13 meses depois, em decorrência de metástases da doença original. Ainda nesse ano, Starzl apresentou à imprensa de seu país os quatro primeiros sobreviventes, mostrando que o transplante de fígado já era uma realidade. Pretendia obter apoio da população para a doação de órgãos e aumentar o número dos beneficiados com este procedimento (Küss R & Bourget P, 1992).

Em 1978, ocorreu um fato importante para o desenvolvimento dos programas de transplantes que foi o aparecimento de uma nova droga imunossupressora, a ciclosporina, um inibidor da calcineurina. Esta droga foi utilizada, inicialmente, em Cambridge por Calne, em transplantados renais (Calne et al., 1978). Starzl, em Pittsburgh, utilizou a ciclosporina a partir de 1980, em doses menores do que as utilizadas em Cambridge, e obteve resultados satisfatórios que favoreceram enormemente o desenvolvimento dos programas de transplantes a partir de então (Starzl et al., 1981). Este fato elevou a taxa de sobrevida após o transplante hepático, que era de 30% utilizando imunossupressão com azatioprina, corticosteróides e globulina anti-linfocítica policlonal, para mais de 70% (Iwatsuki et al., 1988). Em 1983, uma conferência do National Institutes of Health, nos EUA, passou a aceitar o transplante de fígado como uma opção terapêutica efetiva para doenças hepáticas avançadas (“National Institutes of Health - consensus development conference statement”, 1984).

O primeiro transplante ortotópico de fígado (TOF) bem sucedido na América Latina foi realizado no Hospital das Clínicas em São Paulo, pela equipe da Unidade de Fígado, no dia 1º de setembro de 1985. Tratava-se de uma jovem de 20 anos, portadora de

um tumor primário de fígado. Essa paciente teve evolução pós-operatória satisfatória, mas também faleceu 13 meses depois em decorrência de recidiva da doença original.

A partir de então, a Unidade de Fígado passou a realizar, rotineiramente, o procedimento. Em 1988, o grupo realizou o primeiro transplante inter vivos de fígado, empregando doador vivo relacionado (Raia et al., 1989).

A Unidade de Transplante Hepático do HC da Universidade Estadual de Campinas UNICAMP passou a realizar transplante no início de setembro de 1991, sendo o primeiro grupo a realizar transplante no interior do Estado de São Paulo. Até hoje foram realizados mais de 380 transplantes de Fígado pela Equipe da Unicamp, com média de 20 a 30 cirurgias por ano.

O TOF está associado com uma alta incidência de infecções causadas por vírus, bactérias e fungos. Essas infecções ocorrem mais frequentemente durante os dois primeiros meses após o transplante em decorrência principalmente do uso do imunossupressor (Dockrell, 1999).

As infecções por herpesvírus são as causas mais freqüentes de infecções virais em transplantados, incluindo o *Citomegalovirus* (CMV), *Epstein Barr vírus* (HHV-4), *Herpes simplex vírus* (HHV-1 e HHV-2), vírus da *Varicela zoster* (HHV-3 e os *Herpesvírus humano 6 e 7* (HHV-6 e HHV-7). Outras infecções virais, como as hepatites B e C, infecções por *Poliomavirus* (cepas JC e BK), *Adenovirus* e *Papilomavirus* também são freqüentes nestas populações (Fishman et al, 1998; Colvin et al, 2001; Smith et al, 2001). Com o desenvolvimento de imunossupressores mais potentes, passaram a ocorrer relatos de infecções virais com maior gravidade e maior taxa de recorrência (Smith et al, 2001; Smack & Gregor et al, 2003)).

1.2- Citomegalovirus humano (CMV)

O *Herpesvirus Humano 5* (CMV) foi inicialmente relacionado por Ribbert em 1904, ao agente etiológico da "Doença de Inclusão Citomegálica", cuja denominação deriva-se do efeito citopático característico, representado pelos aumentos dos volumes

celulares pôr inclusões intranucleares e citoplasmáticas observadas nos tecidos infectados (Weller, 1970; Murray, 1997).

A primeira evidência experimental para dar suporte à etiologia da Doença de Inclusão Citomegálica ocorreu quando Cole e Kutner, em 1926, demonstraram a presença de vírus em células de glândulas submaxilares de cobaias jovens, que adquiriram a infecção após terem recebido uma inoculação de glândulas salivares. Esses pesquisadores sugeriram que o agente infeccioso pertencia ao grupo dos vírus filtráveis, já que o material do inóculo havia sido filtrado e era de espécie-específica (Plachter et al, 1996).

Em 1954, Smith conseguiu isolar o vírus a partir de culturas de tecidos, usando a infecção de glândula salivar de camundongo como modelo experimental (Smith, 1956). Em 1956/57, o Citomegalovírus humano foi isolado quase que simultaneamente por três pesquisadores: Smith em St. Louis, Rowe em Bethesda e Weller em Boston, todos eles utilizando técnicas de cultura celular em amostras de urina e tecido de crianças com provável infecção causada pelo vírus (Rowe et al, 1956; Smith, 1956; Weller, 1957).

O nome definitivo “Citomegalovirus” foi proposto, em substituição aos termos Doença de Inclusão Citomegálica e Vírus de glândulas salivares, por Weller em 1970, que listou três critérios para a identificação do citomegalovírus: a -tendência em causar infecção em glândula salivar; b - Crescimento lento, somente em linhagens celulares derivadas de seus hospedeiros naturais e c - Formação de inclusões citoplasmáticas, além das inclusões nucleares.

A partir destes estudos, uma linhagem do Citomegalovirus humano (CMV-cepa AD169), foi adaptada em laboratório por Tamashiro et al. 1982, que realizou sua replicação em culturas de fibroblastos humanos e caracterizou a infecção pela presença de lesões focais constituídas por células gigantes, contendo inclusões intranucleares idênticas àquelas observadas nos materiais precedentes de pacientes (Alford & Britt, 1990).

Baseando-se em critérios morfológicos e bioquímicos, em 1973, o Grupo de Estudos dos Herpesvírus do [Comitê Internacional de Taxoma Viral (CITV)] para Nomenclatura dos Vírus decidiu não utilizar o termo citomegalovírus e recomendou que fosse dado um número arábico a todos os herpesvírus: o CMV ficou classificado como

Herpesvírus Humano Tipo 5. Em 1979, o mesmo Comitê reabilitou o nome citomegalovírus. A família Herpesviridae foi dividida em três sub-famílias: *Alphaherpesvirinae* (*Herpes simplex* tipo 1 e 2, *Herpes zoster* (HHV3)), *Bethaherpesvirinae* (Citomegalovírus, herpes vírus humano 6 e 7) e *Gammaherpesvirinae* (*Epstein Barr e Herpesvirus Humano* 8) (Brown & Abernathy, 1998; Ho, 1991).

1.3- Herpes vírus humano - 6 (HHV- 6)

Em 1986 o HHV6 foi isolado pela primeira vez a partir de células mononucleares do sangue periférico de adultos com desordens linfoproliferativas, sendo inicialmente chamado de Vírus Humano Linfotrópico B (HBLV) (Salahuddin et al, 1986). Após análise de microscopia eletrônica e do genoma do HBLV, em 1987, chegou-se à conclusão que este agente pertencia à família dos Herpesvírus, passando a ser denominado de *Herpesvírus Humano* 6 (HHV- 6) (Ablashi et al, 1987).

A primeira publicação que correlacionou uma doença clínica com HHV-6 surgiu no Japão, em 1988, por Yamanishi et al., na qual foi demonstrada a soroconversão para este vírus em crianças com diagnóstico clínico de exantema súbito (Santo, 2000). Ablashi et al, em 1993 reconheceram oficialmente duas variantes do HHV6 (a variante HHV6-A e HHV6-B, que apresentam características biológicas, imunológicas, epidemiológicas e moleculares bem distintas). O genoma completo das duas variantes só foi determinado em 1995 para a variante A (Gomples et al, 1995) e em 1999 para a variante B (Domingues et al, 1999; Isegawa et al, 1999).

1.4- Características biológicas dos herpesvírus

Todos os herpesvírus possuem quatro elementos estruturais: 1- Um nucleocapsídeo icosaédrico com aproximadamente 100 nm de diâmetro e contendo 162 capsômeros protéicos, 2- Uma estrutura proteica eletrodensa contendo o DNA viral, 3- Um envelope derivado da membrana celular e contendo glicoproteínas virais e proteínas integrais e, 4- Um tegumento entre o nucleocapsídeo e o envelope (Biberfeld et al., 1987; Yoshida et al., 1989). (figura 1).

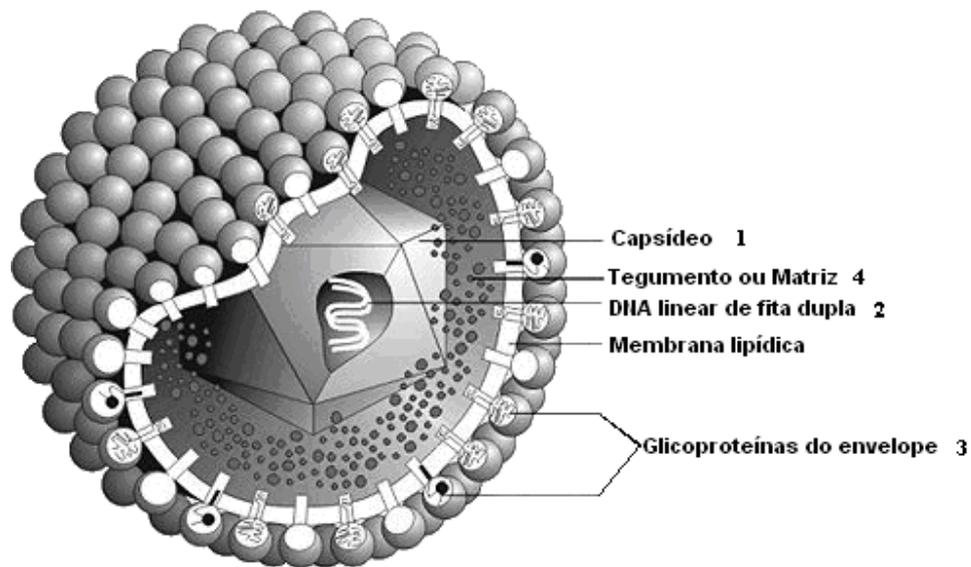


Figura 1- Estrutura do Citomegalovírus Humano (CMV). Copyright 1994 – 97 Marko Reschke <http://www.biografix.de/hcmv/html/metaframe.htm>

1.4.1- CMV

O CMV é um membro pertencente a subfamília *Betaherpesvirinae* da família *Herpesviridae*, sua estrutura é semelhante á de outros herpesvírus, sendo considerado o maior membro desta família, com diâmetro de aproximadamente 200nm. O genoma viral é composto por DNA de fita dupla com 240 kb (Landolfo et al., 2003) e que codifica 33 proteínas estruturais e um número indefinido de proteínas não estruturais, sendo algumas delas conhecidas por serem imunogênicas e desencadearem resposta humoral específica (Mustafa, 1994). Seu comprimento estimado é de 65-68 nm, e pode ser dividido em dois segmentos, denominado componente longo (L) e curto (S), com possibilidade de sofrerem inversão durante a replicação. Os segmentos estão delimitados por seqüências de terminais repetitivos (TR). A junção entre os componentes L e S é composta de seqüências repetitivas internas (IR) e são designadas IR-L e IR-S, quando ligadas aos componentes L e S respectivamente. A seqüência entre as regiões repetidas são únicas (U) e denominadas como U-L e U-S. O CMV tem maior complexidade genômica do que os outros herpesvírus, devido à ocorrência de várias aquisições e duplicações gênicas (Stinsk, 1990).

O *Citomegalovírus* é bastante termolábil e sua vida média a 37°C é de 45 minutos, sendo totalmente inativado a 56°C por 30 minutos, pelo pH menor que 5, pela exposição ao éter a 20% por duas horas, pela luz ultravioleta por 5 minutos, ciclos de congelamento e descongelamento e é mais estável na urina a 4°C (Drew, 1988; Brown & Abernathy, 1998; Costa, 1999).

1.4.2- HHV-6

O genoma do HHV- 6 é linear, com DNA de fita dupla, contendo 160-162 kb com uma região central única (U) de 143-145 kb, contendo estruturas de leitura aberta (ORFS) U1-100 e flanqueado por um terminal “direto de repetição” (DR) de 8 á 9 Kb e interrompido por três repetições intermediárias, R1, R2 e R3 (Thomson et al., 1994; Gompels et al., 1995; Dominguez et al., 1999; Isegawa et al.,1999) (figura 2).

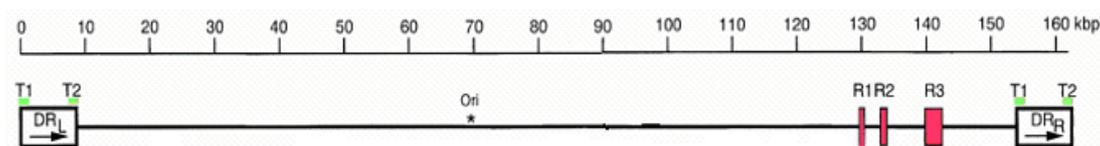


Figura 2- Representação genômica do HHV-6B

(<http://cmr.asm.org/content/vol18/issue1/images/large/zcm0010521270001.jpeg>).

Os terminais de repetição estão representados nos quadrados (DRL e DRR) e as regiões de repetição intermediárias estão representadas em vermelho (Isegawa et al.,1999).

O genoma do HHV-6 é envolvido por um capsídeo icosaédrico constituído por 162 capsômeros e envelopado. A partícula viral envelopada mede cerca de 180-200 nm de diâmetro (Thomson et al., 1994; Santos, 2000). Seqüenciando os nucleotídeos tem-se mostrado 66% de homologia entre a seqüência do DNA do HHV-6 e CMV (Singh & Carrigan, 1996). Contém 7 regiões de genes conservados, encontrados em todos os herpesvírus, um grupo de genes descobertos somente nos β -herpesvirus e genes específicos para o gênero *Roseolavirus* (Clark, 2000).

O HHV-6 possui duas variantes, A e B que possuem 90% de similaridade em suas seqüências de nucleotídeos (Ablashi et al, 1993; Dockrell, 2003). Apresentam características clínicas e epidemiológicas distintas. A variante B está implicada na maioria dos sintomas associados com a infecção do HHV-6, incluindo *roseola infantum*, e a variante A está associada a vários sintomas neurológicos, refletindo seu neurotropismo (Razonable & Paya, 2002). É também prevalente em pacientes infectados com o *Vírus da imunodeficiência humano* (HIV) (Singh & Carrigan, 1996).

É um vírus linfotrópico, utiliza o receptor celular CD46, que está presente nas membranas de superfície das células nucleadas e fisiologicamente envolvidas com a regulação do sistema complemento (Liszewski et al., 1991), como os monócitos, células endoteliais, epiteliais (Hárma et al., 2003), células da glia e fibroblastos (Desachy et al., 2001).

1.5- Mecanismo de replicação

1.5.1- CMV

Para o CMV iniciar a infecção na célula do hospedeiro, é necessário que seja absorvido pelos receptores de superfície celular da célula, resultado de uma cascata de interações entre proteínas virais e celulares, seguido da fusão do envelope viral com a lamela externa da membrana citoplasmática. A partir daí o capsídeo é transportado para os poros nucleares e o DNA é liberado no núcleo celular, onde ocorre a transcrição gênica (Silva, 2000; Landolfo et al., 2003)

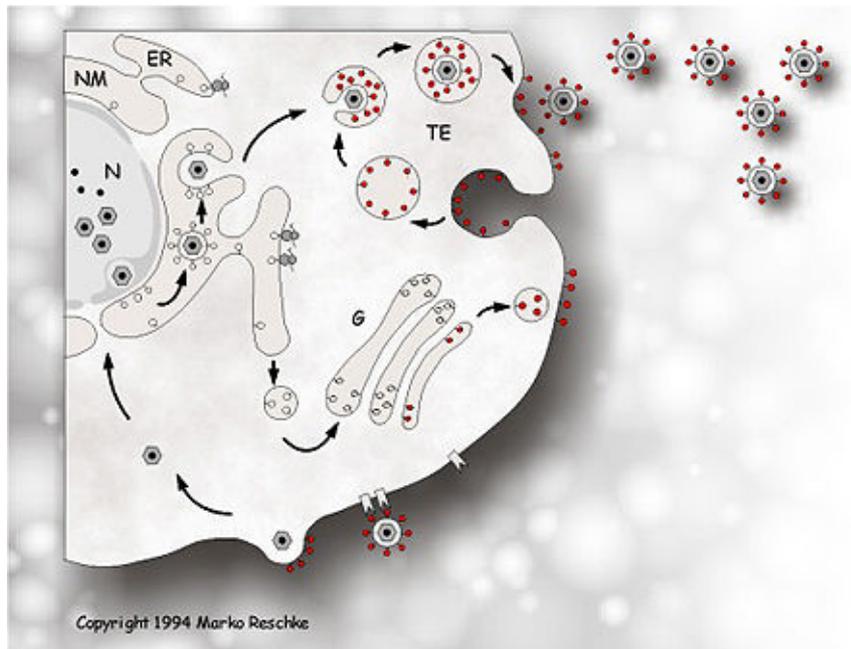


Figura 3- Ciclo de Replicação (www.biografix.de/biografix/english/images/2/p_2b2b.jpg)

Após a infecção e incorporação do material genético, genes são transcritos, codificando proteínas que auto-regulam sua expressão. Os genes virais são expressos por períodos: imediatamente precoce ou IE (immediate early) de duração de 0 á 2 horas, precoce ou E (early) de 2 á 24 horas e tardio ou L (late), com 24 horas pós – infecção e as proteínas sintetizadas são classificadas como alfa, beta ou gama, respectivamente. As proteínas sintetizadas durante os períodos IE e E são geralmente associadas á regulação da replicação do vírus, enquanto as sintetizadas no período L são estruturais. Após a síntese das proteínas IE ocorre a replicação do genoma viral (Straus, 1990; Colimon & Michelson, 1990).

Depois da infecção primária, esses vírus mantêm sua latência no hospedeiro humano na forma epissomal no interior da célula ou mantendo um baixo nível de replicação viral, adequadamente controlado pelo funcionamento do sistema imune (Razonable et al., 2002).

1.5.2- HHV-6

O HHV-6A e o HHV-6B penetram na célula por fusão membranar, mediada pela interação com o receptor de superfície CD46 (Santoro et al., 1999).

Em seguida o capsídeo é liberado no citoplasma da célula e é transportado para região perinuclear, o genoma viral é liberado no núcleo. O vírus usa então a maquinaria celular para transcrição e tradução de suas proteínas, (IE, E, L) (Oster & Hollenberg, 2002). A transcrição é semelhante ao padrão dos herpesvírus, com proteínas expressas imediatamente precoces (IE), precoce (E) e tardias (L) (Mirandola et al, 1998; Dockrell, 2003). O capsídeo maduro vai para o citoplasma onde adquire seu tegumento e um envelope viral, que quando maduro é liberado pra o espaço extracelular. O tempo total da infecção á liberação de novos vírus é de aproximadamente 72h (Cardinali et al., 1998, Black et al., 1989).

1.6- Patogênese

1.6.1- CMV

O *Citomegalovírus Humano* possui baixa patogenicidade, é um vírus citopático e, conseqüentemente, pode produzir destruição do tecido (Alford & Britt, 1990). O CMV compartilha com outros herpesvírus a capacidade de permanecer latente no hospedeiro, disseminar-se célula a célula em presença de anticorpos circulantes, reativar-se em condições de imunossupressão e induzir imunossupressão transitória no hospedeiro (Drago et al, 2000). A infecção por CMV aumenta a expressão de antígenos do MHC na superfície das células do enxerto através da indução de liberação de mediadores como interferon, podendo ativar células T citotóxicas que seriam o "gatilho" para rejeição aguda, em associação com estimulação de aloantígenos (Cainelli & Vento, 2002). A latência explica o fato de que, uma vez infectado com o vírus, o paciente estará infectado por toda sua vida, mesmo sem evidência de replicação viral ativa. A associação celular significa que o vírus é transmitido entre indivíduos, sendo a imunidade celular essencial para a defesa do hospedeiro, a qual é mediada por linfócito T CD4 antígeno-específico (Rubin, 1990).

1.6.2- HHV-6

O *Herpesvírus humano 6* pode ser considerado um herpesvírus imunotrópico que pode infectar diretamente ou interferir na função de alguns componentes do sistema imune (Singh & Carrigan, 1990).

A infecção pelo HHV- 6 tem como características tropismo por células linfóides, indução do receptor CD4 em algumas células, supressão da resposta imune, indução de citocinas, transativação de outros vírus, capacidade de transformar certas células em cultura e capacidade, em alguns casos de aumentar a replicação do HIV (Levy, 1997).

Sabe-se que este vírus infecta células mononucleares e, o aumento de sua replicação induz o aumento da produção de interferon alfa (INF- α) (Kikuta et al, 1990), interleucina-1B (IL-1B) e TNF- α (Flamand et al, 1991). A infecção em células mononucleares de sangue periférico resulta em supressão da função de linfócito T, demonstrado pela redução da síntese de Interleucina 2 (IL-2) e de proliferação celular (Flamand *et al*, 1995).

Pode também infectar outras linhagens de células, como as de origem epitelial, fibroblástica e neural com diferentes eficiências. Após infecção primária, o HHV- 6 estabelece latência em diferentes células e órgãos incluindo monócitos/macrófagos, glândulas salivares, cérebro e rins (Abdel & Asmar, 2004).

1.7- Manifestações clínicas

A infecção pelo CMV em indivíduos imunocompetentes é geralmente subclínica, mas quando ocorre, seu quadro clínico assemelha-se a “síndrome da mononucleose” (Nesmith & Pass, 1995). As manifestações clínicas da mononucleose são similares às induzidas pelo vírus *Epstein-Barr*: Febre persistente, mialgia, encefalite, linfadenopatia cervical e esplenomegalia (Landolfo et al., 2003).

Em pacientes imunossuprimidos, o CMV pode provocar doença grave, e os grupos de maior risco são crianças com infecção congênita, receptores de órgãos, pacientes com câncer submetidos a quimioterapia e os portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (Costa, 1999; Maya & Azulay 2000).

O uso de medicamentos imunossupressores tem contribuído para o aumento da ocorrência de infecção pelo CMV, podendo levar ao aumento de morbidade e mortalidade em pacientes transplantados (Jong et al, 1998).

A infecção primária pelo HHV-6 ocorre geralmente na infância, como uma doença aguda que pode causar febre e acomete crianças entre 6 meses a um ano de idade (Asano et al., 1994). A maioria das infecções é assintomática, e além da febre pode estar associada a erupções cutâneas doença denominada Roseola Infantum ou exantema súbito (Braun et al., 1997).

A reativação em pacientes imunocomprometidos pode resultar em diferentes síndromes clínicas, com maior ocorrência em pacientes transplantados, pacientes com câncer e infectados com HIV. A incidência média é de 62% em receptores de órgãos sólidos (Abdel & Asmar, 2004).

Pacientes imunossuprimidos manifestam efeitos diretos e indiretos decorrentes da infecção pelo HHV-6. São efeitos diretos, febre com erupções cutâneas, mielossupressão, pneumonite intersticial e de encefalite. Os efeitos indiretos resultam em exacerbação da infecção e doença causada por CMV, além de aumento da frequência de infecções produzidas por agentes oportunistas (Razonable e Paya, 2002).

1.8- Epidemiologia e transmissão

1.8.1- CMV

Estima-se que em populações de alto nível socioeconômico a prevalência da infecção pelo CMV seja de 40 a 60% enquanto que em populações de baixo nível sócio-econômico seja de 80 a 100%. Indivíduos imunocompetentes raramente desenvolvem doença causada pelo CMV (Koziel, 2000; Costa, 1999). No Brasil, a soroprevalência atinge mais de 90% na população adulta (Suassuna & Machado, 1992; Camargo et al., 1996; Costa et al., 1999; Aquino & Figueiredo, 2001).

Uma vez infectado, o hospedeiro não elimina mais o vírus, que permanece em estado de latência, podendo ser reativado em condições especiais (Shen et al., 1996; Bruggeman et al., 1999; Gupta et al., 2003; Lassener et al., 2000).

O CMV humano é espécie específico e infecta somente a população humana, e sua transmissão ocorre de maneira horizontal e vertical, através de secreções orofaríngeas, lágrimas, secreções cervicais e vaginais, líquido seminal, leite materno, urina, fezes e sanguínea. Ao lado de várias formas de infecção natural, o CMV pode ser transmitido iatrogenicamente, por meio de transfusões de sangue ou por transplante de órgãos. (Alford e Britt, 1990; Bruggeman, 1993; Brown e Abernathy, 1998).

Os grupos considerados de alto risco: como os transplantados, os portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e aqueles que são submetidos à quimioterapia, têm maior risco de desenvolver a doença por CMV (Costa, 1999).

Nos receptores de transplante de órgãos, a infecção pelo CMV pode apresentar-se sob três formas distintas (Ho et al., 1975): a) Infecção primária: doadores soropositivos transmitem o CMV para receptores soronegativos, que manifestam a infecção após o transplante, geralmente com comprometimento sistêmico. b) Reativação da infecção: reativação do vírus latente endógeno, em receptores soropositivos, desencadeada pela imunossupressão. c) Reinfecção: forma de infecção por CMV na qual receptor é soropositivo, e ocorre contaminação por uma cepa viral diferente, transmitida pelo doador, também soropositivo. Com a imunossupressão esta nova cepa viral pode ser ativada (Schimidt et al, 1996).

1.8.2- HHV-6

A infecção pelo HHV-6 é onipresente nos primeiros dois anos de vida, e o "pico" de infecção varia de 6-9 meses (Caserta et al., 2001). Estudos sugerem que mais de 90% dos adultos são soropositivos para o HHV-6 (Levy et al.,1990, Saxinger et al., 1988). A infecção ocorre em todo mundo, sem restrição geográfica (Okuno et al., 1989; Krueger et al., 1998). O primeiro estudo sorológico da infecção pelo HHV-6 no Brasil foi

realizado por Linhares M. e colaboradores em 1990, que reportou uma soroprevalência de 76.5 e 77.2% em brasileiros e imigrantes de japoneses, respectivamente, no nordeste do Brasil (Freitas & Linhares, 1997).

Não se sabe ao certo o modo de transmissão, mas o HHV6 está presente tanto na saliva como nas células epiteliais da cavidade oral, sugerindo que a secreção oral contribui para a transmissão, especialmente do subgrupo HHV6-B (Levy et al, 1990; Simmons et al., 1992; Clark, 2000). A análise de cepas de HHV6 isolado de mães e filhos sugere que este tipo de transmissão possa ocorrer (Van Loon et al, 1995). A incidência da transmissão vertical do HHV-6 do é de aproximadamente 1 a 2% e não foi relacionada à transmissão intrauterina pelo CMV (Boutolleau, et al., 2003; Dahl et al.,1999).

A incidência de infecção pelo HHV-6 pós-transplante varia de acordo com o tipo de transplante, sendo mais freqüente em receptores de medula óssea (48%, variando de 28 a 75%), incidindo em cerca de 32% (0-82%) dos receptores de órgãos sólidos (Dockrel & Paya, 2001).

1.9- Diagnóstico laboratorial da infecção pelo CMV E HHV-6

O diagnóstico laboratorial pode ser realizado por meio de cinco categorias de exames: citopatológicos e histopatológicos, isolamento do vírus; sorológicos, identificação de antígenos virais e moleculares (Chou, 1990; Myers, 1997; Lautenschlager et al., 2000).

1.9.1- Sorologia

A detecção sorológica do HHV-6 assim como do CMV, de uma resposta imune antiga ou recente se faz pela pesquisa das imunoglobulinas específicas IgG e IgM contra o CMV. A resposta positiva para IgG indica a ocorrência de uma infecção antiga, a positividade para IgM indica uma infecção recente (Chou, 1990; Chou & Scott, 1990; Chiu et al., 1998; Landolfo et al., 2003).

Mais recentemente, têm sido utilizados testes imunoenzimáticos (ELISA) com anticorpos monoclonais, para a detecção de partículas virais na urina ou soro (Mckeating, 1985). A introdução de testes laboratoriais rápidos e precoces tem permitido aos clínicos detectar a replicação viral e diagnosticar, portanto, a infecção ativa por CMV antes do início da doença. Isso proporciona a oportunidade de iniciar o tratamento antiviral precocemente (Sia & Patel, 2000). Essa então chamada terapia precoce (“*pre-emptive therapy*”) é definida como tratamento altamente efetivo administrado por um curto período, em indivíduos que estão com um alto risco de desenvolver doença por CMV (Rubin, 1991).

1.9.2- Exames histopatológicos e citológicos

As células de inclusão citomegálicas podem ser demonstradas em fragmentos de tecidos (fígado, rim, pulmão, etc.), em sedimento urinário, lavado gástrico e broncoalveolar e outros materiais. Quando presentes têm grande valor diagnóstico. As grandes vantagens desta técnica são sua simplicidade, rapidez e baixo custo. Contudo, a alta incidência de resultados falsos negativos limita muito seu uso e por isso deve ser complementada com técnicas mais sensíveis (Suassuna & Machado, 1992; Panutti, 2001).

1.9.3- Isolamento do vírus

Além da complexidade envolvida com os métodos clássicos de cultura celular, a lenta replicação do vírus faz com que seja necessário um período mínimo de 21 dias para o resultado final tornando esse método ineficaz para aplicação clínica, por isso esta técnica tem sido substituída pelo ensaio de “shell vials” que é mais sensível, específico e rápido onde o resultado pode ser observado em um período de 24h (Gleaves et al., 1984; Griffiths et al., 1984). Nessa técnica diferentes materiais clínicos são inoculados em placas contendo lamínulas (“shell-vials”) com monocamadas de fibroblastos humanos em cultura. Para se evitar a espera de até quatro semanas para aparecimento do efeito citopático característico do CMV, adiciona-se a estas lâminas em intervalos de 24, 48 e 72 horas, uma mistura de anticorpos monoclonais contra diferentes antígenos do vírus, sendo a revelação

feita através de técnicas de imunofluorescência. Este método detecta antígenos virais na superfície das células infectadas “in vitro” e apresenta especificidade similar ao da cultura convencional, porém, mais sensível e rápido (Rawlinson, 1999).

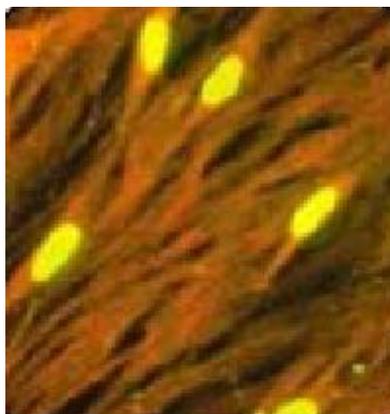


Figura 4- Proteínas virais no núcleo de fibroblastos humanos infectados (Landolfo et al 2003)

1.9.4- Antigenemia

A detecção por antigenemia tem sido considerado um grande avanço no diagnóstico da infecção ativa por CMV e HHV-6 em transplantes de órgãos. A evidência de replicação viral é fornecida pela detecção do antígeno específico do HHV-6 usando anticorpos monoclonais (Singh & Carrigan, 1996). A presença de antigenemia em leucócitos do sangue periférico proporciona um marcador precoce de infecção ativa pelo CMV e é um teste rápido (van der Berg et al, 1991). Esse método depende do uso de anticorpos monoclonais que detectam o antígeno viral pp65, uma proteína estrutural expressa nos leucócitos do sangue durante a fase precoce do ciclo de replicação do CMV. Este teste é limitado à detecção de antígenos virais nos leucócitos. O resultado não é somente qualitativo, mas é também quantitativo, correlacionando o número de células infectadas com maior probabilidade de desenvolvimento de manifestações clínicas associadas ao CMV (Lo et al, 1997; Niubó et al, 1996; The et al, 1992). A detecção do antígeno de CMV em leucócitos do sangue periférico tem sido demonstrada como uma técnica rápida (5 horas) e sensível na detecção de CMV (Van Der Bij et al., 1988; The et al., 1990).

1.9.5- Detecção de ácidos nucleicos

A detecção do DNA viral é feita pela amplificação gênica utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR). O PCR permite a amplificação de um fragmento específico de DNA, cuja concentração final excede, em milhares de vezes, a inicial por meio da síntese enzimática de numerosas cópias da porção original (Saiki et al., 1985; Costa, 1999).

A reação consiste de repetidos ciclos de síntese de DNA por meio de 2 iniciadores (primers) com orientações opostas, isto é, dois segmentos de aproximadamente 20 nucleotídeos com seqüências complementares às duas extremidades do fragmento-alvo do DNA viral, mediada pela polimerase. Cada ciclo da reação é constituída por: Desnaturação: separação das hélices do DNA a ser amplificado. Anelamento: ligação complementar entre os iniciadores e o DNA a ser amplificado. Extensão: síntese do DNA pela “taq polimerase”, utilizada para replicação das fitas do DNA. A orientação dos “primers” faz com que a síntese de DNA ocorra na região interna entre eles. Assim, o produto da extensão de um “primer” é utilizado como substrato para o outro, o que resulta em cada ciclo, na duplicação da quantidade de DNA sintetizada pelo ciclo precedente. Assim, o número de cópias do fragmento alvo tem um aumento exponencial, o que faculta no final de 30 ciclos um aumento na ordem de 10^6 cópias, partindo-se de uma única molécula (Saiki et al., 1985; Shibata et al., 1988).

O aumento da especificidade e sensibilidade da PCR foram alcançados pela “Nested-PCR”, onde o produto da primeira PCR, amplificada com um par de “primers”, é submetido à nova reação de amplificação utilizando-se um par de “primers” internos ao primeiro, sendo o produto então detectado por eletroforese em gel de agarose (Brytting et al, 1991).

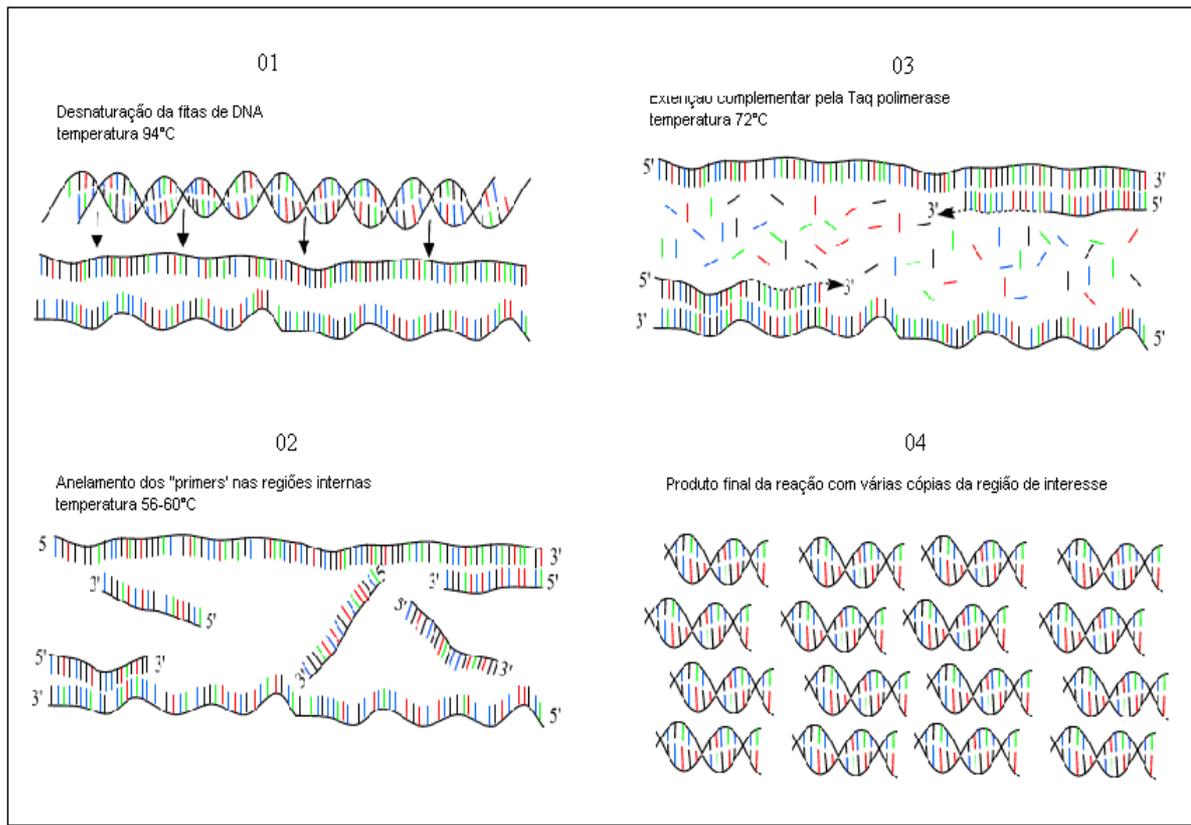


Figura 5- Reação em Cadeia da polimerase (Andy Vierstraete, 1999), (<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>) – com modificações.

1.9.6- Real-Time

A técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real-Time PCR) é um procedimento sensível que permite um monitoramento mais eficiente e precoce da infecção ativa do CMV e HHV-6. É um método baseado na detecção, ciclo após ciclo de produto de PCR acumulado, que é marcado com moléculas fluorescentes intercalantes de DNA dupla fita, utiliza o sistema TaqMan para gerar um sinal pela clivagem de uma sonda oligodeoxinucleotídica fluorogênica alvo-específica durante a amplificação, os produtos são quantificados durante a fase exponencial da reação sendo possível pelas condições de clivagem, detecção fluorescente e aplicação de um software específico em um único instrumento. Os resultados quantitativos são obtidos logo após o término da reação de amplificação (Locatelli et al., 2000; Gautheret-Dejean et al., 2002).

1.10- Glicoproteína B (gB)

O estado imunológico do paciente influencia os resultados clínicos da infecção pelo CMV, e também as diferentes cêpas do vírus podem variar sua virulência (Fries et al., 1994; Brown et al., 1995). A virulência de diferentes cêpas do CMV ocorre devido à variação de genes envolvidos na penetração da célula do hospedeiro, tropismo pôr tecidos e replicação (Sarcinella et al., 2002). A glicoproteína B (gB) é a principal proteína do envelope do CMV e é codificada pelo gene UL55. A gB tem sido associada à absorção na célula hospedeira e disseminação do vírus célula a célula, e também um importante alvo da resposta imune que induz a formação de anticorpos de neutralização (Cranage et al., 1986; Navarro et al., 1993; Hopkins et al., 1996). Algumas regiões da gB são variáveis entre as diferentes cêpas do CMV, e estão situadas próximas ao sítio de clivagem da protease, entre os aminoácidos 460 e 461 (Vogelberg et al., 1996). Chou & Dennison (1991), desenvolveram um método de genotipagem do CMV baseado nas seqüências de nucleotídeos de outras regiões variáveis da gB que estão situadas entre os nucleotídeos 1344 e 1440, pelas enzimas de restrição *Hinf* I e *Rsa* I. As regiões foram amplificadas pela PCR seguido da análise de restrição, que demonstrada quatro diferentes genótipos de gB (Chou & Dennison, 1991).

Muitos estudos têm tentado achar relação entre os genótipos da gB e a ocorrência da doença por CMV em pacientes imunossuprimidos (Sarcinella et al., 2002; Coaquette et al., 2004). A coinfeção com múltiplos genótipos de gB em pacientes imunossuprimidos está associado a uma maior carga viral e maior probabilidade de desenvolvimento doença por CMV. Maior grau de rejeição do órgão e co-infecções com outros herpesvírus. As infecções pelos genótipos gB1, gB2, gB3, são relativamente comum e ocorrem proporcionalmente (28.9%, 19.6% e 23.7% respectivamente) e a infecção com o genótipo 4 não é muito comum ocorrendo em 2.0% (Coaquette et al., 2004).

Um estudo feito por Rosen et al. (1998), com transplantados de fígado mostrou que o genótipo gB1 estava relacionado com altos episódios de rejeição aguda.

1.11- Agentes anti-virais

Em indivíduos imunocompetentes a reativação do HHV-6 e CMV pode causar complicações, para o HHV-6 não existe uma medicação antiviral específica e aprovada para seu tratamento, as drogas usadas contra o HHV-6 são as mesmas usadas na terapia ou profilaxia da infecção pelo CMV: Ganciclovir, Aciclovir, Cidofovir e Foscarnet (De Bolle et al., 2005). O Ganciclovir intravenoso é atualmente o tratamento padrão recomendado para a doença por CMV em receptores de órgão sólidos, requer hospitalização, tem um alto custo e suas reações adversas são incomodas aos pacientes (Preiksaitis et al., 2005; Green & Preiksaitis, 2004).

1.11.1- Ganciclovir

Cymevene® (Ganciclovir) é o nome comercial para o ganciclovir, uma droga antiviral, ativa contra o *Citomegalovírus*. O nome químico do Ganciclovir é 9-(1,3-Dihidroxi-2-propoximetil) guanina. É um nucleosídeo sintético análogo da 2'-desoxiguanina, que inibe a replicação dos Herpesvírus, tanto in vitro como in vivo (MAR et al, 1985). Nas células infectadas pelo CMV, o Ganciclovir é inicialmente fosforilado a ganciclovir monofosfato pela quinase protéica viral UL97. Depois de ocorrer a fosforilação, diversas quinases celulares produzem o ganciclovir trifosfato, o qual é lentamente metabolizado no interior da célula. Após a entrada do ganciclovir na célula, como a fosforilação é amplamente dependente da quinase viral, a fosforilação do ganciclovir ocorre preferencialmente em células infectadas pelo vírus. A atividade virustática do ganciclovir é devido à inibição da síntese do DNA viral por dois mecanismos: (1) inibição competitiva da incorporação da desoxiguanosina trifosfato (DGTP) ao DNA pela DNA polimerase e (2) a incorporação do trifosfato de ganciclovir ao DNA viral causa um subsequente término ou alongamento muito limitado do DNA viral (Sullivan et al., 1992; Biron, 2006).

No vírus HHV-6, a fosforilação ocorre pela quinase protéica viral UL69 (Ansari & Emery, 1999), porem seu papel no ciclo de replicação do vírus ainda é investigado. O Ganciclovir é ativo contra ambas as variantes A e B, embora seja mais efetivo para o HHV-6B (Singh, 2000).

A resistência viral deve ser considerada em pacientes com resposta clínica repetidamente pobre ou com excreção viral persistente durante o tratamento. O principal mecanismo de resistência ao Ganciclovir é a diminuição da capacidade de formar moléculas ativas de trifosfato; resistência viral tem sido descrita devido à mutação nos genes UL97 ou UL54 do CMV, tanto no gene da cinase viral (UL97) responsável pela monofosforilação ou no gene da polimerase viral (UL54). Os vírus contendo mutações no gene UL97 são resistentes ao ganciclovir isolado, enquanto que vírus com mutações no gene UL54 podem apresentar resistência cruzada a outros antivirais com mecanismo de ação semelhante e vice-versa (Gilbert and Boivin, 2005).

O valganciclovir (Valcyte®, Roche) é um L-valil éster (pró-droga) do ganciclovir a qual, após sua administração oral, é rapidamente convertido para ganciclovir pelas esterases intestinal e hepática. O ganciclovir é um análogo sintético da 2'-desoxiguanosina, a qual inibe a replicação dos herpesvírus, *in vitro* e *in vivo* (Pescovitz et al., 2000; Mar et al., 1985).

1.11.2- Foscarnet

Em 1991 foscarnet (Foscavir®, AstraZeneca) tornou-se a segunda droga aprovada para o tratamento do CMV. É um análogo pirofosfato, que exerce sua ação antiviral por inibição direta específica da DNA polimerase viral e transcriptase reversa em concentrações que não afetam a DNA polimerase celular. Linhagens de CMV resistentes ao ganciclovir podem ser sensíveis ao foscarnet (Biron, 2006). Muitos estudos de caso tem mostrado o uso bem sucedido do foscarnet no tratamento de encefalites causado pelo HHV-6 em transplantados (Zerr et al., 2002), outros estudos mostram resultados contrários (Biron, 2006; De bolle et al., 2005).

1.11.3- Cidofovir

Cidofovir (Vistide®, Gilead) é um nucleosídeo acíclico fosfonado com o nome químico 1-[(s)-3-hydroxy-2-phosphonylmethoxypropyl] cytosine (HPMPC) possui amplo espectro de ação antiviral contra os herpesvirus e outros vírus DNA, incluindo diversos *poxvírus* (De Clercq and Holy, 2005).

O cidofovir converte a quinase da célula infectada em monofosfato de cidofovir e subsequentemente a difosfato de cidofovir, um inibidor competitivo da polimerase do DNA do CMV, causando uma terminação prematura na síntese do DNA viral (Cihlar et al., 1998). In vitro o cidofovir tem mostrado forte atividade contra o HHV-6 (Reymen et al., 1995). Em um estudo feito por De Bolle et al., 2006 mostrou que o gaciclovir tem uma eficácia superior comparada ao cidovovir em suprimir a replicação e os sintomas neurológicos decorrente da infecção ativa pelo HHV-6.

1.11.4- Aciclovir

O aciclovir foi o primeiro análogo de nucleosídeo potente contra os herpes vírus. É um análogo sintético da 2'-desoxiguanosina da guanosina, apresenta potente atividade seletiva sobre as células infectadas, é ativado para forma fosforilada pela timidinaquinase e DNA-polimerase viral. A forma trifosfato ativa age como inibidor e substrato para a DNA-polimerase específica dos herpesvírus, impedindo a síntese do DNA viral (Biron, 2006).

1.12- CMV E HHV-6 em transplantados hepáticos

Durante as duas últimas décadas, com técnicas avançadas de cirurgia, melhores protocolos de imunossupressão e melhor acompanhamento dos transplantados no pós-operatório, tem aumentado o grau de sucesso dos transplantes de fígado. As infecções oportunistas constituem um dos principais problemas para os transplantados de fígado, e os vírus HHV-6 e CMV são patógenos oportunistas frequentes nesses pacientes (Razonable & Paya, 2002; Yoshikawa, 2003).

Recentes estudos sugerem que as infecções pelos vírus CMV, HHV-6 e HHV-7 podem ser uma importante causa de morbidade e mortalidade nesses pacientes e o HHV-6 tem sido relacionado à disfunção do enxerto, supressão da medula e predisposição para a doença por CMV (Schmidt et al, 1996; Lautenchlager et al, 1998; Feldstein, 2003). O

HHV-7 em pacientes imunossuprimidos pode se reativar e, em associação com outros herpesvírus causar danos tanto ao órgão transplantados, como ao estado geral do paciente (Ward et al., 2005; Thomasini et al, 2007).

O CMV e o HHV-6 são responsáveis por uma variedade de doenças causadas pela infecção primária ou por reativação de infecção latente em condições de imunossupressão, especialmente após transplante de órgãos (Pozo & Tenório, 1999; Chapenko et al., 2001). O CMV tem sido implicado na imunomodulação da resposta imune em pacientes transplantados de órgão e também pode aumentar o risco de infecções causadas por bactérias e fungos, bem como causar disfunção do enxerto (Shibolet et al., 2003).

Fatores que controlam a reativação e o aumento de replicação do HHV-6 em pacientes imunocomprometidos podem ser semelhantes aos que ocorrem pelo CMV. O HHV-6 tem a habilidade de reativar vírus heterólogos, isso pode explicar sua função na patogênese da doença por CMV após o transplante de fígado podendo também influenciar no desenvolvimento de infecções fúngicas oportunistas (Mendez et al., 2001). É importante à observação da co-infecção, pois vários estudos têm relatado a possível interação direta, indireta ou a ação imunomodulatória desses dois vírus (Mendez et al., 2001; Humar et al., 2002; Clark, 2003; Razonable & Paya, 2002; Lautenschlager et al., 2002; Lautenschlager et al., 2000; Humar et al., 2000;).

A infecção ativa pelo CMV acontece em 30-60% nos transplantados hepáticos e 18-40% desses pacientes desenvolvem infecção sintomática após a cirurgia (Gao & Zheng, 2004). Nos transplantados o HHV-6 e CMV podem causar: febre, encefalite, pneumonite intersticial e hepatite. A infecção pelo CMV é a mais importante infecção oportunista que influencia negativamente esses pacientes (Paya & Razonable, 2003). O HHV-6 tem sido associado com a infecção causada pelo CMV após o transplante de fígado. Recentemente, tem sido demonstrada a presença de antígenos específicos do HHV-6 em biópsias de fígado em associação com a histopatologia de fígado alográfico (Lautenschlager et al, 2000).

A reativação após o transplante é comum e está associada com o desenvolvimento de rejeição aguda do enxerto (Deborska et al., 2003; Jacobs, 2001).

Devido à importância da doença por CMV no período pós-transplante e, as características compartilhadas entre os betaherpesvírus, por ser pouco estudada no Brasil a interação do HHV-6 com o CMV, estudos que ajudem a compreender a inter-relação entre eles e a avaliação de possíveis efeitos patogênicos se fazem necessário.

2- OBJETIVOS

- 1 - Detectar a presença de seqüências gênicas específicas do CMV e do HHV-6 em biópsias hepáticas dos doadores de fígado, por nested-PCR.
- 2 - Realizar segmento prospectivo nos pacientes transplantados hepáticos, mediante análise das biópsias hepáticas, por detecção ,molecular do CMV e do HHV-6 por nested-PCR.
- 3 - Verificar o impacto clínico da infecção pelo CMV e HHV-6 nos pacientes submetidos ao transplante hepático no hospital das clínicas da UNICAMP.
- 4 – Nas biópsias dos doadores e dos receptores positivos para o DNA do CMV realizar genotipagem da região gb.

3- CASUÍSTICA

No Hospital de Clínicas da UNICAMP, no período de 2000 á 2006, foram estudados 41 pacientes submetidos a transplante ortotópico de fígado, de ambos os sexos e qualquer etnia. Entraram em nossa casuística 41 biópsias de doadores e 104 biópsias que foram colhidas no período após o transplante.

Nas 41 biópsias hepáticas de doadores 20 estavam fixadas em blocos de parafinas e 21 não estavam fixadas, pois foram colhidas no ato cirúrgico pela equipe de transplante de fígado e encaminhadas ao Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular do Departamento de Clínica Médica. A monitorização dos pacientes transplantados hepáticos foi realizada prospectivamente e as biópsias foram feitas quando indicado pela Unidade de Transplante Hepático do HC – UNICAMP (UFTH).

Todos os 41 transplantados tiveram indicação de realização de biópsia, em média foram feitas 3 biópsias por paciente, as 104 biópsias estudadas no período pós-transplante estavam fixadas em blocos de parafina.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética Institucional da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas. O termo de Consentimento (Livre e Esclarecido) foi preenchido e assinado por cada paciente ou responsável no momento da coleta.

O esquema de imunossupressão básica padronizado no setor de transplante hepático constituiu de ciclosporina (0,4 mg/Kg/dia), metilprednisona (1,0g no inicio, 20 mg no 30º dia, 15 mg no 60º dia, 10 mg no 90º dia, 5 mg após 3 meses). Tacrolimus-FK-506 (0,1 mg/kg/dia) e micofenolato mofetil-MMF (1000 mg/dia) foram administrados para alguns pacientes baseado no estudo de cada caso. Todos os receptores de transplante hepático desse estudo fizeram profilaxia para infecção por *Herpes Simplex* com Aciclovir – 200 mg 12/12h ou 8/8h – durante 60 dias. Os pacientes não fizeram profilaxia para o CMV, a não ser que o doador fosse soro-positivo e o receptor soro-negativo. Os pacientes com doença por CMV, com sintomas clínicos, receberam ganciclovir, por via intravenosa na dose de 5 mg/Kg 2 vezes ao dia por 3 semanas, seguido por dose de manutenção. Todos os receptores dessa casuística eram IgG positivo para o CMV.

3.1- Critérios de inclusão no estudo

- Consentimento livre e esclarecido do paciente para a coleta de amostras de biópsias para análise pré-transplante e monitorização pós-transplante;
- Sobrevida dos pacientes transplantados e do fígado, acompanhado pelas biópsias quando indicadas pela equipe do transplante.

3.2- Critérios de exclusão

- Foram excluídos os pacientes que evoluíram com óbito no ato cirúrgico.
- Foram excluídos os pacientes que não tiveram indicação de biópsias hepática no pós-transplante.

3.3- Critério de encerramento

O estudo deu-se por encerrado quando houve um número de pacientes suficiente para análises conclusivas.

3.4- Genotipagem

Foram incluídos no estudo de determinação das linhagens de CMV, pacientes que apresentaram infecção ativa pelo CMV durante o estudo.

3.5- Critérios para indicação da biópsia no fígado implantado

A indicação e a realização para a punção das biópsias no pós-transplante foi pela equipe médica da UFTH. Ocorreu quando existiu alteração clínica e/ou nos exames laboratoriais de rotina, que apresentavam risco a saúde do paciente e do fígado transplantado.

3.6- Critérios para definição de infecção Ativa por CMV e HHV-6

Infecção Primária para CMV - soro conversão após o transplante, com o aparecimento dos anticorpos IgM (Imunoglobulina tipo M) e IgG(Imunoglobulina tipo G) anti-CMV, detectados por ELISA.

Infecção Secundária ou reativação para CMV - aumento significativo dos títulos de anticorpos IgG anti-CMV pós-transplante, comparados com os títulos no pré-transplante, detectados por ELISA.

Para CMV e HHV-6: Nested-PCR - duas ou mais reações de PCR positivas para CMV e HHV-6 . Antigenemia: uma ou mais reações positivas para CMV e HHV-6.

3.7- Critérios para caracterizar provável Doença por CMV

Para caracterização de provável doença por CMV, além das evidências laboratoriais de infecção ativa citadas acima, faz-se necessária à presença de manifestações clínicas compatíveis com aquelas sabidamente causadas pelo CMV (Ljungman, Griffiths e Paya, 2002):

- Febre maior ou igual a 38°C, por no mínimo 3 dias, acompanhada por leucopenia ($\leq 3.000/mn^3$) e plaquetopenia ($\leq 100.000/mn^3$) afastadas outras causas;
- Pneumonite: com sintomas respiratórios de pneumonia
- (achados radiológicos e/ou hipoxemia), junto com o CMV detectado por PCR em lavado brônquio-alveolar ou biópsia de pulmão;
- Doença Gastrointestinal: com sintomas gastrointestinais (colite, gastrite ou esofagite) associado com histologia ou imunohistoquímica positiva para CMV de biópsias de lesões macroscópicas do trato gastrointestinal;

- Hepatite ou colangite: o vírus deverá ser demonstrado em biópsias hepáticas (por cultura, imunohistoquímica, hibridização “in situ” ou PCR) em combinação com: aumento de duas vezes o valor máximo normal de alanina-amino-transferase(ALT), achados histopatológicos consistentes com hepatite ou colangite;
- Doenças Neurológicas: sintomas como encefalite, mielite transversa ou outros sinais de doença difusa do sistema nervoso central juntamente com a detecção de CMV por PCR em líquido cérebro-espinhal, por cultura ou detecção do antígeno;
- Retinite: lesões oftalmológicas típicas com ou sem provas virológicas;
- Nefrite: “nefrite por CMV” pode ser definida pela detecção da infecção pelo CMV sempre com a identificação histológica em biópsia de rim obtida do paciente com disfunção renal;
- Miocardite: sempre com identificação histológica convencional em biópsia de coração obtida de pacientes com miocardite;

3.8- Critérios para caracterizar provável doença por HHV-6

Para a caracterização de provável doença por HHV-6, além das evidências de infecção ativa citadas anteriormente, fez-se necessário a presença de manifestações clínicas compatíveis com aquelas causadas pelo HHV-6; Encefalite, pneumonite intersticial, disfunção do enxerto, plaquetopenia, leucopenia e febre (Feldstein et al., 2003).

3.9- Definição de disfunção e rejeição do enxerto

A avaliação da disfunção hepática foi baseada na elevação sérica da alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, gama-glutamil transpeptidase e das bilirrubinas.

Episódios de rejeição do enxerto foram documentados baseados em análises histopatológicas de material obtido por biópsias hepáticas. Foram classificadas em aguda (leve, moderada e grave) ou crônica (Banff 2000).

4- MÉTODOS

4.1- Extração do DNA genômico (tecidos não-fixados)

As amostras foram cortadas em secções de 3 a 7mm de tecido não fixado e colocadas dentro de um tubo estéril de 1,5 ml e macerado. Adicionou-se 190 µl de uma solução de 0,1 M de Tris-Hcl (pH 7.5) e 1% de SDS. Nessa solução adicionou-se 10 µl de uma solução de proteinase K (10 mg/ml de uma solução estoque). O tecido foi incubado por 3 horas ou overnight a 55°C. Adicionou-se 200µl de fenol e foi vortexado. Adicionou-se 200µl de clorofórmio álcool isoamílico 24:1, agitou e centrifugou por 1 minuto. O sobrenadante foi removido e adicionou-se 200µl de clorofórmio álcool isoamílico, agitou-se e centrifugou por 1 minuto. Removeu-se o sobrenadante, e adicionou-se 25µl de acetato de sódio 3M, 900µl de etanol 100% a -20°C, vortexou. Incubou a -70°C por 30 minutos centrifugando a seguir a 15.000 RPM por 15 minutos, a solução foi descartada e o pellet foi ressuspensionado com 70µl de água estéril.

Todas as amostras foram submetidas à quantificação. Nas biópsias a fresco dos doadores os resultados variaram de 200 µg/µl à 800µg/µl.

4.2- Extração do DNA genômico (tecidos fixados)

Nas amostras emblocadas em parafinas, foram feitos de 12 a 15 cortes em micrótomo, com espessura de 5µc. Para cada bloco, foi utilizada uma navalha descartável, evitando-se assim, contaminação entre as partes de tecido a serem testadas. Estes cortes foram colocados em tubos tipo “ependorf”, de 1,5 ml e submetidos a extração, que foi dividida em três partes: a) desparafinização e hidratação; b) digestão com proteinase K (digestão de proteínas); c) extração do DNA.

Tanto a digestão quanto a extração, foram realizadas com o *Kit Qiagen Dneasy tissue Kit – Uniscience*.

As etapas estão descritas a seguir:

- a) Desparafinização – nesta etapa, adiciona-se 1 ml de xilol à amostra, levando ao aquecimento em banho-maria a 65°C por trinta minutos. Agita-se no vórtex, centrifuga-se a amostra por cinco minutos a 14.000 RPM,

descarta-se o sobrenadante. Este procedimento foi repetido mais uma ou duas vezes até total exclusão da parafina. A seguir, as amostras foram hidratadas com sucessivos banhos de etanol absoluto, 95% (duas vezes) e água destilada (duas vezes), agitando-se no vórtex e centrifugando a 14.000 RPM entre cada etapa, descartando-se o sobrenadante;

- b) seguindo-se o protocolo do Kit, com algumas modificações, adiciona-se à amostra, 180 µl do buffer ATL e 20 µl da proteinase K (20µg/µl) – ambos incluídos no Kit mencionado. A amostra é então levada ao banho-maria de 55° a 66°C, overnight para completa digestão do tecido; c) inicia-se a extração do DNA, seguindo o protocolo do fabricante, com eluições finais de 40µl.

Todas as amostras foram submetidas à quantificação. Nas biópsias dos doadores os resultados variaram de 20 à 170µg/µl. Os resultados das biópsias de ponta de agulha variaram de 10µg/µl à 50µg/µl.

4.3- Detecção do gene da β-globina

Para a verificação da presença de DNA nas amostras foi feita à amplificação gênica pela PCR do gene da β-Globina (presente no DNA humano) utilizando primers que detectam esse gene. Foram utilizados dois primers que flaqueiam uma região constante do gene da β-Globina humana (Tabela 1): (Saiki et al., 1985)

Tabela 1- Seqüência dos primers utilizados para a PCR para o gene da β-Globina

Primer	Seqüência
PCO3	CTT CTG ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC
PCO4	TCA CCA CCA ACT TCA TCC ACG TTC ACC

Em todas as amostras com DNA presente foram observados fragmentos de 110 pares de base correspondentes ao gene da β-Globina. A amplificação do fragmento do gene da β-globina humana evidencia a viabilidade do DNA da amostra e funciona como controle

da reação de PCR. A não amplificação desse gene demonstra que o DNA presente na amostra avaliada não é viável e, portanto, deve ser excluído da reação.

Trinta ciclos foram realizados automaticamente em equipamento apropriado. As amostras foram aquecidas inicialmente a 94° C por 7 minutos, para inativação de qualquer atividade de proteases que possa interferir com a reação enzimática e, no último ciclo o período de extensão (72° C) foi de 7 minutos. Os ciclos foram realizados automaticamente em equipamento apropriado (“DNA Thermal Cycler” Perkin Elmer/Cetus, Norwalk, Conn, EUA). Após a reação de amplificação, 5 µl de nested foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2% contendo brometo de etídio para visualização com luz ultravioleta e fotografado em sistema Polaroyd.

4.4- Nested-PCR para CMV

A reação em cadeia da polimerase seguirá o método escrito por Saiki e colaboradores (1985), com algumas modificações. Cada reação de amplificação conterà de 1 a 5µl do DNA estudado em volume total de 25µl, 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 de cada desoxirribonucleotideo (dATP , dCTP , dTTP , dGTP) e 2 unidades de Taq DNA polimerase .

Foram complementados 30 ciclos de amplificação para cada amostra e cada um deles compreenderá:

- Separação de hélices de DNA (aquecimento a 94° durante 1 min);
- Ligação complementar entre os primers e o DNA (temperatura de 55° por 1 min);
- Extensão dos primers por ação da Taq DNA polimerase (72° durante 1 min) .

Os ciclos foram realizados automaticamente em equipamento apropriado (“DNA Thermal Cycler” Perkin Elmer/Cetus, Norwalk, Conn, EUA).

4.4.1- Primers utilizados para reação de Nested-PCR para CMV

Os iniciadores foram utilizados dois iniciadores que flaqueiam uma região constante do CMV:

Tabela 2- Sequência dos primers utilizados para a PCR para CMV

Primer	Seqüência
MIE 4	CCA AGC GGC CTC TGA TAA CCA AGC C
MIE 5	CAG CAC CAT CCT CCT CCT CCT CTG G

N-PCR: uma alíquota do DNA amplificado na primeira reação é amplificado com o par de primers interno:

Tabela 3- Sequência dos primers utilizados para a N-PCR para CMV

Primer	Seqüência
IE1	CCA CCC GTG GTG CCA GCT CC
IE2	CCC GCT CCT CCT GAG CAC CC

As condições da reação são as mesmas da primeira reação.

Após as duas reações de amplificação e reamplificação, 5 µl de nested foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% contendo brometo de etídio para visualização com luz ultravioleta e fotografado em sistema Polaroyd.

4.5- Nested-PCR para HHV-6

A reação seguiu o método descrito por Secchiero et a., 1995, com algumas modificações. Para a primeira reação de PCR o DNA extraído como descrito anteriormente será procesado na quantidade de 5 microlitros com 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 200 µM de cada desoxirribonucleotideo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10 pmol de cada primer e 1,25 U de Taq DNA Polimerase para um volume final de

50 microlitros usando água deionizada estéril q.s.p. O PCR foi realizado em Termociclador - MJ Research –MA. Com uma desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 53°C e 30 segundos a 72°C e, extensão final de 72°C por 5 minutos.

Um segundo PCR foi realizado usando metade do volume de DNA usado na primeira reação de PCR para um volume final de 50 microlitros por tubo contendo: 60 mM Tris-HCl (pH 8.5), 2 mM MgCl₂, 200 µM de cada desoxirribonucleotideo (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 10 pmol de cada primer (sense e antisense) e, 1,25 U de Taq DNA Polimerase. As condições da reação seguem as mesmas da PCR anterior exceto que a temperatura de anelamento é de 47°C.

Após as duas reações, 5 µl de nested foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% contendo brometo de etídio para visualização com luz ultravioleta e fotografado em sistema Polaroyd.

4.5.1- Primers utilizados para reação de Nested-PCR para HHV-6

Os iniciadores (primers) utilizados para o primeiro PCR-HHV-6(A/B) serão:

Tabela 4- Seqüência dos primers utilizados para a PCR para HHV-6

Primer	Seqüência
Ex1	5' GCG TTT TCA GTG TGT AGT TCG GCAG 3'
Ex2	5' TGG CCG CAT TCG TAC AGA TAC GGA GG 3'

Os iniciadores (primers) utilizados para o segundo PCR-HHV-6 serão:

Tabela 5- Seqüência dos primers utilizados para a N-PCR para HHV-6

Primer	Seqüência
IN3	5' GCT AGA ACG TAT TTG CTG CAG AAC CG 3'
IN4	5' ATC CGA AAC TGT CTG ACT GGCA 3'

Após as duas reações de amplificação e reamplificação, 5 µl de nested foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% contendo brometo de etídio para visualização com luz ultravioleta e fotografado em sistema Polaroyd.

Cuidados especiais utilizados para se evitar contaminação das amostras durante a reação da PCR. A fim de se eliminar problemas de contaminação das reações, o que poderia ocasionar resultados falso-positivos, foram tomados os seguintes cuidados:

- As amostras a serem amplificadas foram manipuladas em salas diferentes (sala pré-PCR) de onde a amplificação foi feita (sala pós-PCR);
- Todos os reagentes e materiais pré-PCR e pós-PCR foram preparados e utilizados em ambientes diferentes;
- Antes da abertura dos tubos de microcentrífuga foi efetuada rápida centrifugação para concentrar o líquido contido no tubo na região inferior e evitar sua dispersão por evaporação.
- Todo material plástico (ponteiras e tubos plásticos para PCR) utilizado foi novo e não autoclavado;
- Trocas constantes de luvas foram feitas durante todo o procedimento.

4.6- Identificação das linhagens de CMV

A identificação das diferentes cepas do CMV foi feita à partir do DNA de pacientes que apresentaram “Nested PCR” positivos para a região IE do vírus.

Condições da reação: Para primeira reação utilizamos de 1-7µl da amostra CMV positiva para um volume total de 20,0 µl da reação. Foram adicionados 10% do volume total da reação de Tampão 10X (50 mM de cloreto de potássio, 10 mM de Tris-HCl (pH 8,4)), 2,0 mM cloreto de magnésio, 120 nmol dos “primers” gB 1319 e gB 1659 (Tabela 6), 200 mM de cada desoxirribunucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e 0,02 unidade de Taq DNA polimerase.

Tabela 6- Seqüência dos “primers” utilizados para a amplificação das glicoproteínas gB do CMV.

Primer	Seqüência
gB 1319	5'TGGA ACT GGAACGTTT GGC3'
gB 1659	5'GCACCTTGACGCTGGTTTGG3'
gB 1604	5'GAAACGCGCGGCAATCGG3'

O “primer” gB 1319 foi utilizado para as duas reações.

Os “primers” gB 1319 e gB 1604 foram descritos por Chou, 1990; gB 1659 por Vogelberg et al., 1996.

Para a primeira reação, trinta e cinco ciclos foram realizados automaticamente em equipamento apropriado (“DNA Thermal Cycler”-MJ, EUA). Os ciclos foram precedidos por um período de desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos e no final, 7 minutos a 72°C para a extensão final. O ciclo de amplificação para a primeira reação compreendeu: Desnaturação: 94°C 30 segundos; Anelamento: 55° C – 45 segundos 35 vezes; Extensão: 72° C – 1 minuto. Na etapa seguinte mantivemos a concentração dos reagentes para um volume total de reação de 40,0 µl (volume necessário para a continuidade do procedimento – análise de restrição). Nesse caso adicionamos 1,4 µl da primeira PCR como molde e o par de “primers” usado foi gB 1319 e gB 1604. O ciclo da “Nested PCR” para a gB foi o seguinte: Desnaturação: 94°C – 30 segundos; Anelamento: 60°C - 30 segundos; 35 vezes Extensão: 72°C - 1 minuto.

4.6.1- Detecção

Cerca de 6,0 µl do produto amplificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 2,0% corado com brometo de etídio, visualizado sob luz ultravioleta e fotografado em sistema Polaroyd.

4.6.2- Análise do fragmento amplificado por enzimas de restrição (PCR-RFLP - “restriction fragment length polymorphism”)

Após confirmação da amplificação, os produtos da gB foram digeridos com enzimas de restrição para a determinação das linhagens de CMV (Chou et al., 1990). Utilizamos as enzimas Hinf I e Rsa I, para a clivagem da região gB (Figura 06). Cerca de 12,0 µl do produto amplificado foi utilizado para a execução da reação de digestão, que continha também, 2,0 µl do tampão da enzima e 0,5 µl da enzima correspondente. Água deionizada e estéril foi adicionada para completar 20,0 µl e a mistura foi conduzida ao banho-maria a 37° C overnight.

Os fragmentos produzidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1000 (Gibco-BRL) a 2,0% corado com brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados em sistema Polaroyd.

As diferentes linhagens de HCMV apresentam padrões de digestão característicos (Chou et al., 1990), que são levados em consideração para a distinção entre os tipos de CMV.

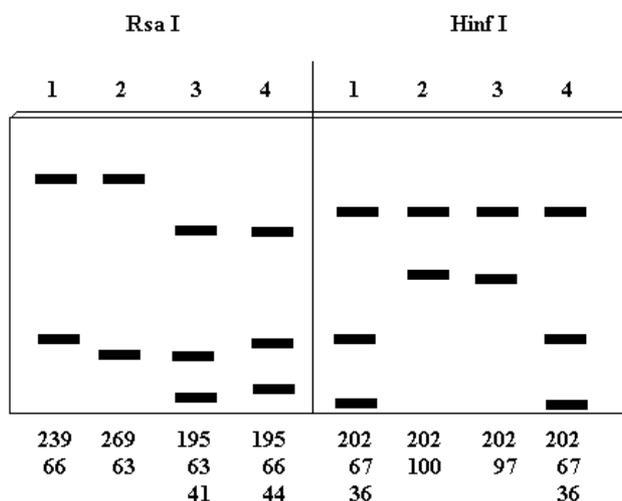


Figura 6- Padrão da digestão para os genótipos (gB1,gB2, gB3, gB4 e mistura de linhagens) do CMV com as enzimas RsaI e Hinf I.

4.7- Metodologia estatística

Utilizamos tabelas de frequências para as variáveis categóricas (Doador, Infecção, etc...).

Para verificar se existe diferença dos Grupos (Com e Sem rejeição e a variável CMV) entre as variáveis categóricas, foi utilizado o teste Qui-quadrado ou Teste Exato de Fisher. O nível de significância adotado foi de 5%, ou seja, $p\text{-valor} \leq 0.05$ (Fleiss, 1981; Collet, 1994).

5- RESULTADOS

5.1- Monitorização dos pacientes incluídos no estudo.

Em todas as amostras foram amplificados 110 pares de bases para o gene da β -globina humana, como controle interno das reações (figura 07). Todas as amostras foram submetidas à Nested-PCR para CMV (figura 8) e HHV-6 (figura 9) resultando em bandas de 159 pb para o DNA do CMV e 258 pb para o DNA do HHV-6 nos pacientes transplantados hepáticos.

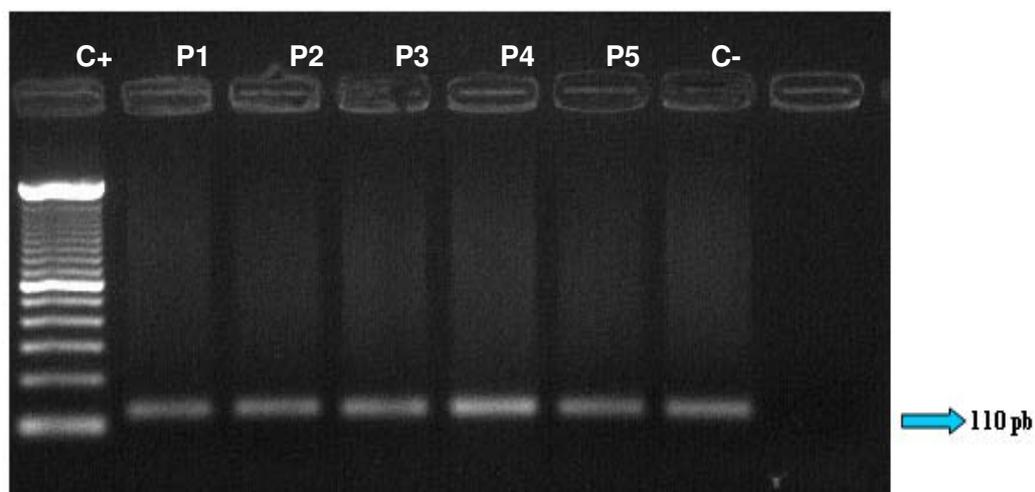


Figura 7- Gel de agarose visto à luz ultravioleta exibindo fragmentos de amplificação obtidos por N-PCR para β -globina humana. A figura 7 mostra nas colunas: M Marcador de peso molecular, C+ controle positivo, P1, P2, P3, P4, P5 Pacientes positivos para β – globina humana, C- Controle negativo.

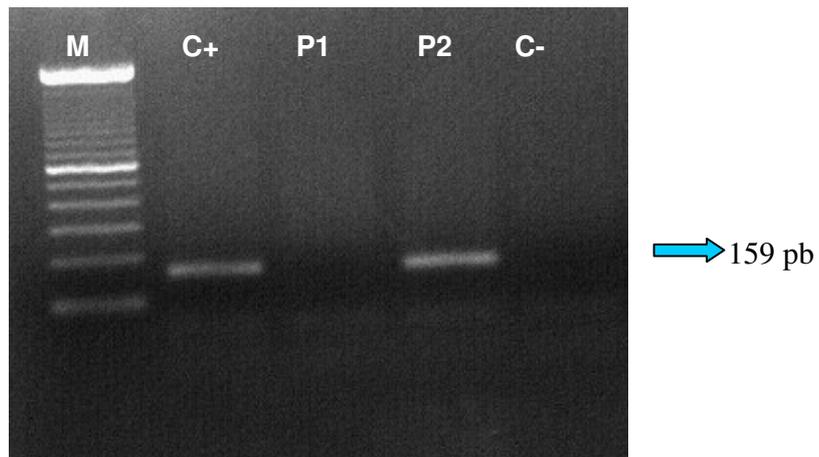


Figura 8- Gel de agarose visto à luz ultravioleta exibindo fragmentos de amplificação obtidos por N-PCR para o CMV. A figura 8 mostra nas colunas: M - Marcador de peso molecular, C+ Controle positivo, P1 - Paciente negativo para o CMV, P2 Paciente positivo para o CMV, C- Controle negativo.

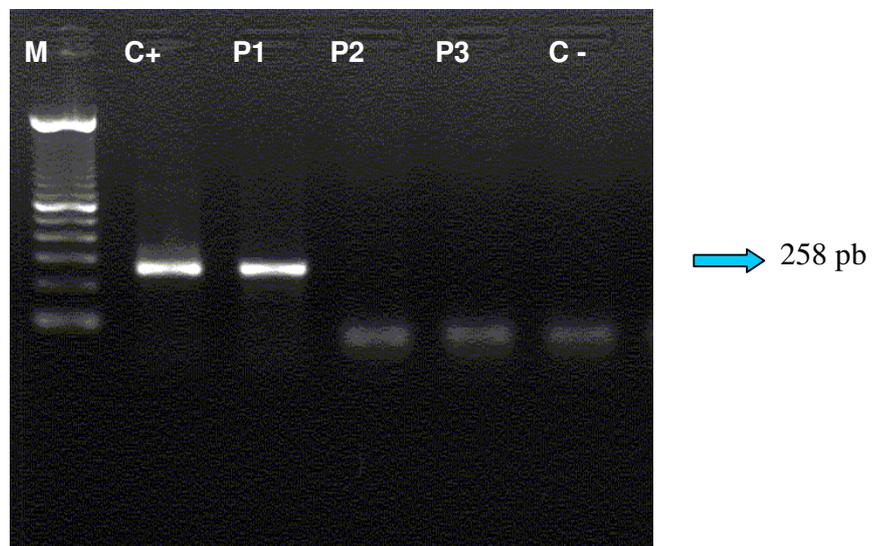


Figura 9- Gel de agarose visto à luz ultravioleta exibindo fragmentos de amplificação obtidos por N-PCR para o HHV-6. A figura 9 mostra nas colunas: M - Marcador de peso molecular, C+ Controle positivo, P1 - Paciente positivo para o HHV-6, P2 e P3 Pacientes negativo para o HHV-6, C- Controle negativo.

Nas amostras positivas para o DNA do CMV na região MIE e IE, foram submetidas a uma nova reação de N-PCR, para amplificação da glicoproteína gB, resultando em bandas de 300 pb (figura 10).

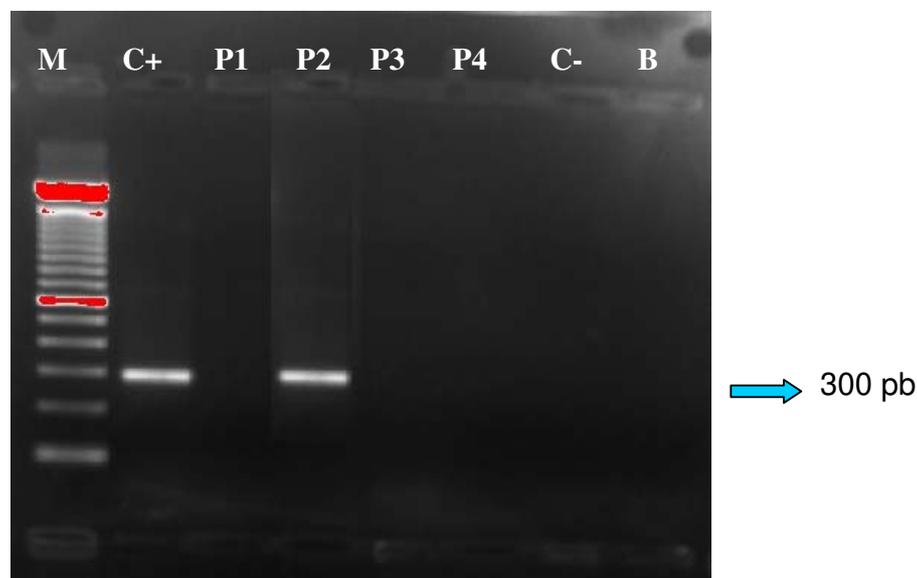


Figura 10- Gel de agarose visto à luz ultravioleta exibindo fragmentos de amplificação obtidos por N-PCR para o gene da glicoproteína gB. A figura 10 mostra nas colunas: M - Marcador de peso molecular, C+ Controle positivo, P1 - Paciente negativo para a glicoproteína gB, P2 Pacientes positivo para a glicoproteína gB, P3 e P4 Pacientes negativo para a glicoproteína gB, C- Controle negativo, B - branco.

5.2- Características dos pacientes incluídos no estudo

No período pré-transplante foram obtidos dados que revelaram características gerais dos pacientes submetidos ao transplante hepático. Dos 41 receptores, 32 (78%) eram do sexo masculino e 9 (22%) do sexo feminino. As idades variaram de 11 a 61 anos, com uma média de 44 anos. Todos os pacientes foram positivos para anti-CMV IgG, mas não para IgM antes do transplante.

Três dos 41 pacientes foram a óbito, nenhum por doença nem hepatite por CMV.

Tabela 7- Distribuição dos receptores de transplante hepático em relação ao sexo e idade:

Total de Receptores	41
Idade (média)	44
Sexo (M/F)	32/9

A indicação para o motivo do transplante de fígado está relacionado na tabela 8 com as doenças de base de cada paciente.

Tabela 8- Distribuição segundo a doença de base dos pacientes transplantados:

Doença de base	Pacientes
Cirrose Hepática por HCV + álcool	12/41
Cirrose Hepática por HCV e HBV	2/41
Cirrose Hepática por HBV	3/41
Cirrose Hepática por HCV	14/41
Insuficiência Hepática por doença de Wilson	1/41
Cirrose criptogênica	2/41
Cirrose hepática alcoólica	3/41
Insuficiência hepática auto imune	2/41
Insuficiência hepática por colangite esclerosante aguda	1/41
Cirrose biliar primaria	1/41

5.3- Infecções encontradas nas biópsias dos doadores

Nas Biópsias dos fígados a serem implantados (doadores), foi realizado a N-PCR para CMV e HHV-6. Das 41 biópsias dos órgãos doados, 4 (9,7%) estavam positivas para o DNA do CMV e 15 (36,6%) para o DNA do HHV-6 como mostra o gráfico 1. Dessas 3/41 (7,3%) tinham a co-infecção .

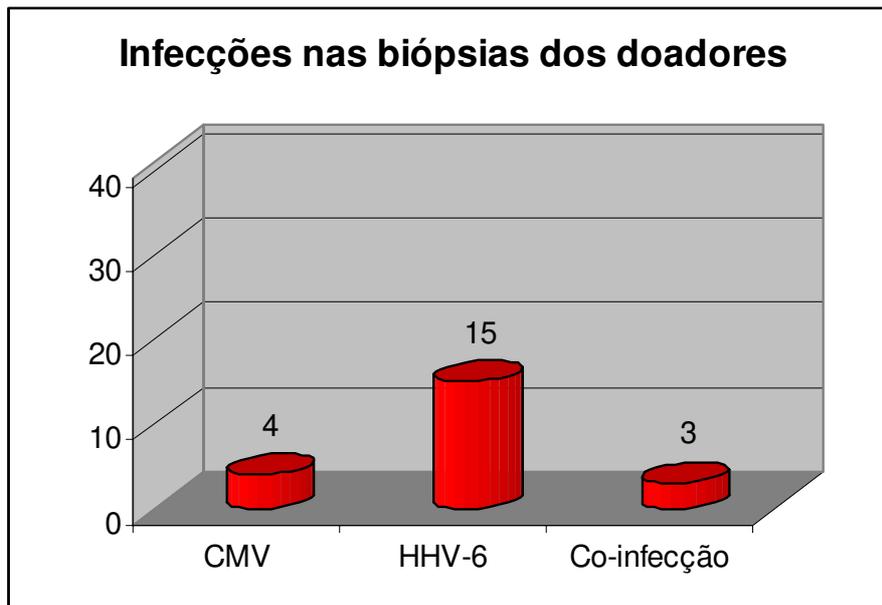


Gráfico 1- DNA dos herpesvírus 5 e 6 encontrado nas biópsias hepáticas dos doadores:

Dos 4 transplantados que apresentavam a biópsia do doador infectada com o DNA do CMV, 3 deles tiveram pelo menos mais uma biópsia positiva para o CMV no pós-transplante, e dos 15 pacientes que apresentavam a biópsia do doador infectada com o DNA do HHV-6, 11 continuaram positiva após o transplante (tabela 09).

Tabela 9- Infecções nas biópsias no pré e pós-transplante

	N-PCR CMV	N-PCR HHV-6
	pré-tx / pós-tx	pré-tx / pós-tx
Positivo	4 / 3	15 / 11

Foram estudadas 145 biópsias, mediana de 3,5 amostras por indivíduo, a frequência de biópsia realizadas pelos pacientes está descrita na tabela 10.

Tabela 10- Frequência das biópsias realizadas pós-tranplante

Número de biópsias feitas por pacientes	Número de pacientes	Porcentagem
1	12	29.27%
2	11	26.83%
3	7	17.07%
4	8	19.51%
5	1	2.44%
6	2	4.88%

Foram estudadas 41 biópsias de doadores e 104 biópsias realizadas após o transplante. Em todas as amostras foram realizados N-PCR para o CMV e HHV-6.

As infecções pelo CMV e HHV-6, detectada nas biópsias, pelo método de N-PCR ocorreram em 23/145 (15,8%) para CMV, e 53/145 (36,5%) para HHV-6 como mostra a figura 11, confirmando dados da literatura sobre a sua taxa de infecção em pacientes transplantados hepáticos. A co-infecção (infecção simultânea) dos vírus na mesma amostra aconteceu em 19/145 (13%) dos casos (anexo 02).

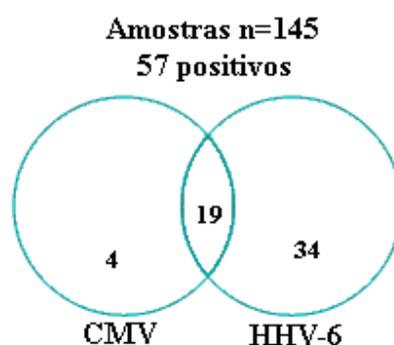


Figura 11- Diagrama ilustrando o número de amostras positivas para qualquer combinação dos vírus estudados.

Dos 41 pacientes transplantados hepáticos monitorizados na Unidade de Fígado e Transplante Hepático do Hospital das Clínicas da UNICAMP, 15/41 (36%) apresentaram pelo menos 1 resultado positivo na Nested-PCR em biópsia de fígado para CMV, 27/41 (66%) transplantados foram positivos pelo menos 1 vez para o HHV-6 nas biópsias de fígado estudadas. 14/41 (34%) pacientes apresentaram pelo menos 1 vez a co-infecção por esses vírus, como mostra o gráfico 02 .

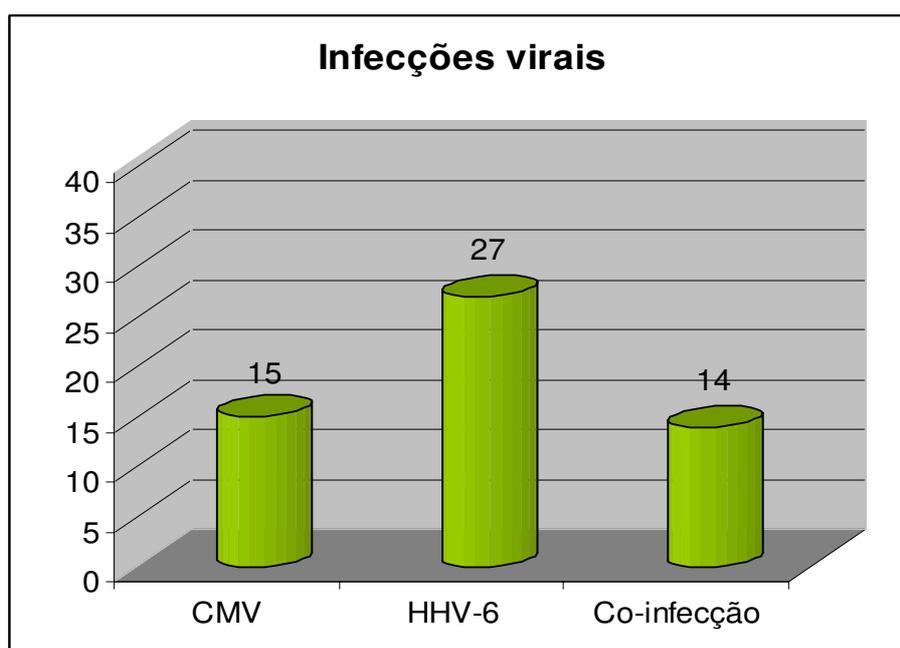


Gráfico 2- Pacientes que apresentaram pelo menos um resultado positivo pela N-PCR para CMV e HHV-6.

Dos 15 pacientes que apresentaram positividade para o CMV 8/15 tiveram provável doença por CMV e foram tratados com ganciclovir, 10/15 tiveram rejeição e 10/15 apresentaram infecção oportunista.

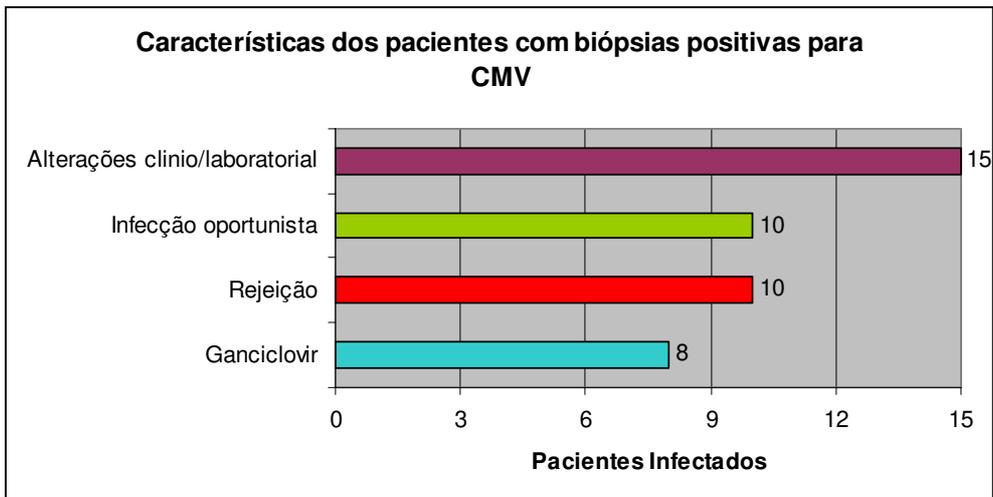


Gráfico 3- Pacientes com infecção para CMV

Dos 27 pacientes que apresentaram infecção para o HHV-6 14/27 tiveram rejeição e 17/27 apresentaram infecção oportunistas.

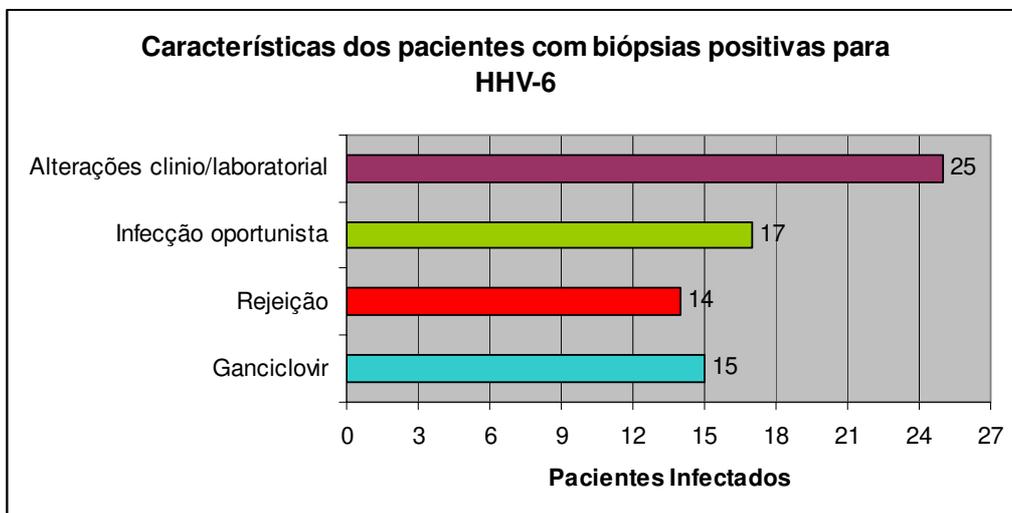


Gráfico 4- Pacientes com infecção por HHV-6

A tabela 11 mostra as alterações ocorridas durante o período de acompanhamento dos 41 transplantados estudados, e a relação com o DNA do CMV e HHV-6 encontrados na biópsias. A tabela 12 descreve a frequência de rejeições e doenças por CMV nos pacientes estudados.

Tabela 11- Características dos transplantados hepáticos

	Pacientes	Infecção por CMV nas biópsias	Infecção por HHV-6 nas biópsias
Rejeição	21/41	10/21	15/21
Provável Doença	17/41	8/17	15/17
Alterações clinico/laboratoriais	31/41	15/31	24/31
Infecção Oportunista	21/41	10/21	17/21

Tabela 12- Frequência das variáveis categóricas em relação à rejeição e doença clinica pelo CMV

Rejeição	Frequência	Porcentagem	Frequência acumulada
Pacientes sem rejeição	20	48.78%	20
Pacientes com rejeição	21	51.22%	41

Doença por CMV	Frequência	Porcentagem	Frequência acumulada
Pacientes sem Doença	24	58.54%	24
Pacientes com Doença	17	41.46%	41

O diagnóstico das rejeições foram consideradas mediante o laudo anatomopatológico das biópsias que foram analisadas pelo departamento de anatomia patológica do HC – UNICAMP, e a classificada em aguda (leve, moderada e grave) e crônica (gráfico 5). Dos 21 casos de rejeição, 16 apresentou o DNA dos herpesvirus 5 e 6 nas biópsias como mostra a tabela 13.

Tabela 13- Pacientes que apresentaram rejeição e infecção pelos vírus do CMV e HHV-6

Paciente	Rejeição do enxerto	Grau	Início do quadro	Infecção por CMV	Infecção por HHV-6
2	Sim	Aguda/leve	77	Doador, 45, 61	Doador, 45, 61
8	Sim	Aguda/Moderada	16	15	Doador, 15
9	Sim	Aguda/leve	105	37, 94	37, 94
12	Sim	Aguda/Grave	146	Não	37, 94
13	Sim	Aguda/Moderada	565	557	Doador, 528, 543, 557, 960
19	Sim	Aguda/Grave	10	Doador, 8, 1102	Doador, 8, 1102
20	Sim	Aguda/Leve	42	Não	41, 125
22	Sim	Aguda/Grave	30	Não	97
24	Sim	Crônica	1440	Doador, 93, 266	Não
26	Sim	Aguda/Grave	5	6	6
31	Sim	Aguda/Moderada	66	36	36, 1236, 1330
33	Sim	Aguda/Leve	285	Não	312
34	Sim	Aguda/Leve	5	Não	Doador
35	Sim	Aguda/Moderada	391	550	550
38	Sim	Aguda/Leve	104	Doador	Doador
40	Sim	Aguda/Leve	100	Não	Doador, 8, 229

*Os números indicam os dias depois do transplante, no início do quadro foi o dia que a rejeição foi identificada, na coluna da infecção os números indicam o dia da infecção nas biópsias.

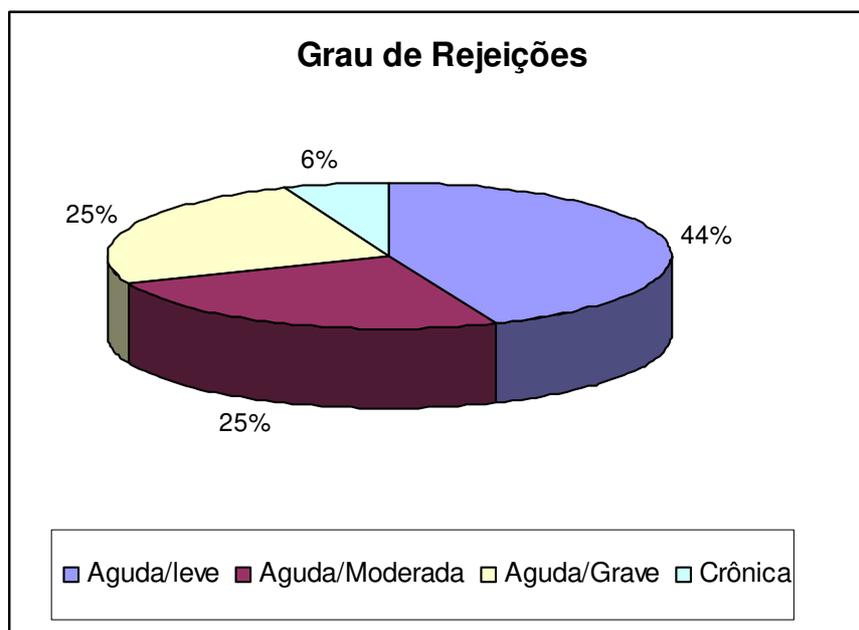


Gráfico 5- Transplantados que apresentaram rejeição:

O cruzamento entre as variáveis de interesse que foi a infecção pelo CMV nas biópsias dos doadores com as rejeições dos receptores. Foi demonstrado uma tendência (0.0591) na influencia desse vírus em causar rejeição no pós-transplante, implicando assim um pior prognóstico do paciente. Essa tendência é mostrada na tabela 14.

Tabela 14- Cruzamento entre a infecção pelo CMV nas biópsias dos doadores com as rejeições dos receptores.

n= 41pacientes

Rejeição	DNA do CMV na biópsia do doador		Total
	Ausente	Presente	
Ausente	20	0	20
Presente	17	4	21
Total	37	4	41
Teste exato de Fisher			p-valor 0.0591

O cruzamento entre as variáveis da infecção pelo HHV-6 nas biópsias dos doadores com as rejeições dos receptores demonstrou que não teve um valor significativo (0.8370). Como mostra a tabela 15.

Tabela 15- O cruzamento entre as variáveis da infecção pelo HHV-6 nas biópsias dos doadores com as rejeições dos receptores.

n= 41 pacientes

Rejeição	DNA do HHV-6 na biópsia do doador		
	Ausente	Presente	Total
Ausente	13	7	20
Presente	13	8	21
Total	26	15	41
Q - Quadrado			p-valor 0.8370

Foram cruzados dados das variáveis de interesse que foi a infecção dos vírus diagnosticada depois do transplante, ou seja, nas biópsias que foram indicadas pela equipe médica em relação à rejeição (tabela 16 e 17). Não mostrando significância estatística.

Tabela 16- Cruzamento entre Rejeição vs DNA do CMV na biópsia pós-transplante.

n=41 pacientes

Rejeição	DNA do CMV na biópsia pós-transplante		
	Ausente	Presente	Total
Ausente	15	5	20
Presente	12	9	21
Total	27	14	41
Q - Quadrado			p-valor 0.2288

Tabela 17- Cruzamento entre Rejeição vs DNA do HHV-6 na biópsia pós-transplante

n=41 pacientes

Rejeição	DNA do HHV-6 na biópsia pós-transplante		
	Ausente	Presente	Total
Ausente	10	10	20
Presente	9	12	21
Total	19	22	41

Q - Quadrado p-valor 0.6466

Os cruzamentos entre as variáveis de interesse que foi a doença clínica do CMV entre as infecções do CMV e HHV-6 nas biópsias tanto do doador quanto nas prospectivas, e os respectivos coeficientes de concordância e testes de associações, são mostradas nas tabelas a seguir. Na tabela 18 e 19 mostra que não foram significativos as infecção do CMV nas biópsias e a doença clínica causada por ele.

Tabela 18- Doença clínica do CMV vs as infecções do CMV nas biópsias pré-transplante dos doadores.

n= 41 pacientes

Doença por CMV	DNA do CMV na biópsia do doador		
	Ausente	Presente	Total
Ausente	22	2	24
Presente	15	2	17
Total	37	4	41

Teste exato de Fisher p-valor 1.0000

Tabela19- Doença clínica do CMV vs as infecções do CMV nas biópsias pós-transplante.

n=41 pacientes

Doença por CMV	DNA do CMV pós-transplante		
	Ausente	Presente	Total
Ausente	17	7	24
Presente	10	7	17
Total	27	14	41

Q - quadrado p-valor 0.4243

Na tabela 20 mostra que as biópsias dos doadores que tinham a infecção pelo HHV-6 (0.0128) influenciaram significativamente para o desenvolvimento da doença clínica causada pelo vírus CMV, prejudicando a saúde do receptor no pós-transplante. Em relação das infecções do HHV-6 encontrada nas biópsias no pós-transplante não foi significativo para a doença do CMV como mostra a tabela 21.

Tabela 20- Cruzamento entre a doença clínica do CMV vs infecções do HHV-6 nas biópsias pré-transplante dos doadores.

n= 41 pacientes

Doença por CMV	DNA do HHV-6 na biópsia do doador		
	Ausente	Presente	Total
Ausente	19	5	24
Presente	7	10	17
Total	26	15	41

Q – quadrado p-valor 0.0128

Tabela 21- Cruzamento entre a doença clínica do CMV vs infecções do HHV-6 nas biópsias pós-transplante.

n= 41 pacientes

Doença por CMV	DNA do HHV-6 na biópsia pós-transplante		
	Ausente	Presente	Total
Ausente	19	5	24
Presente	7	10	17
Total	26	15	41

Q - quadrado p-valor 0.2325

A principal indicação de transplante de fígado no mundo é pela infecção pelo vírus da hepatite C, causa cirrose hepática. Em nosso estudo 26/41 (63,4%) pacientes foram transplantados por Cirrose hepática pelo vírus C. A recidiva desse vírus é muito comum nesse grupo de pacientes. Assim 12/26 (46%) transplantados tiveram a recidiva do vírus depois do transplante. A tabela 22 mostra os pacientes que tiveram a recidiva viral, a infecção pelo CMV e HHV-6 nas biópsias e a co-infecção viral.

Tabela 22- Pacientes que tiveram recidiva do HCV.

Paciente	Recidiva viral	Dia da recidiva	Infecção por CMV	Infecção por HHV-6	Co-infecção CMV/HHV-6
1	Sim	360	Não	Sim	Não
3	Sim	360	Não	Sim	Não
6	Sim	110	Sim	Sim	Sim
11	Sim	255	Não	Não	Não
12	Sim	146	Não	Sim	Não
17	Sim	323	Não	Sim	Não
18	Sim	321	Sim	Sim	Sim
20	Sim	322	Não	Sim	Não
26	Sim	1808	Sim	Sim	Sim
28	Sim	813	Não	Não	Não
31	Sim	150	Sim	Sim	Sim
40	Sim	229	Não	Sim	Não

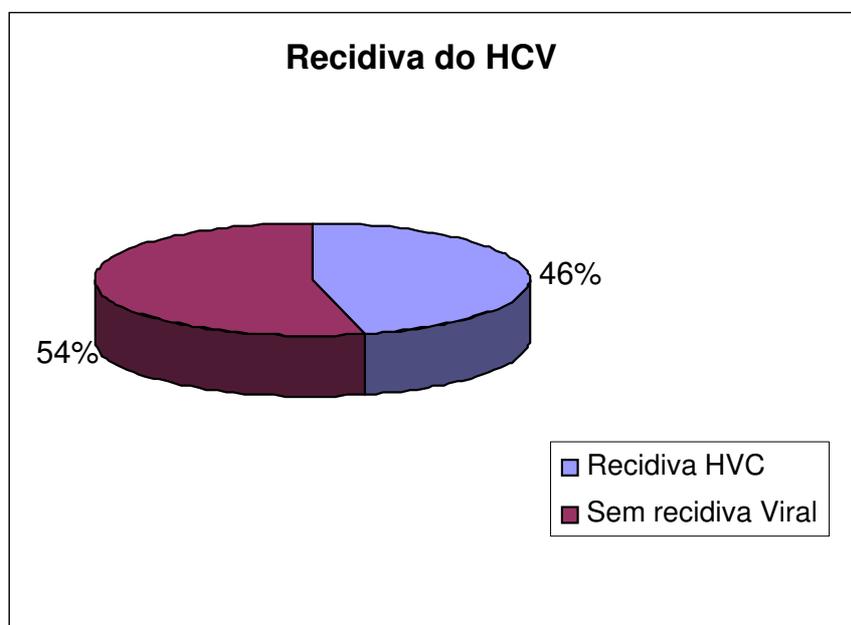


Gráfico 6- Transplantados por HCV que tiveram recidiva do vírus.

5.4 Nested-PCR para Amplificação do Gene da Glicoproteína B (gB)

23 biópsias foram positivas para o CMV na regiões MIE e IE do vírus. As 23 que foram testadas por N-PCR para a região gB, 10 amplificaram a região gB, e então genotipadas por enzimas de restrição.

A genotipagem foi realizada em 7/41 (17%) pacientes com infecção pelo CMV, 5 pacientes cada um com uma biópsia do período pós-transplante, 1 pacientes que teve uma biópsia no período pré-transplante e duas no pós-transplante, e 1 paciente que teve uma biópsia no período pré-transplante e uma no período do pós-transplante.

Tabela 23- Distribuição das biópsia genotipadas.

Paciente	Numero de Biópsias
02	Biópsia do doador e 2 no pós-transplante
07	1 biópsia
13	1 biópsia
14	1 biópsia
19	Biópsia do doador e 1 no pós-transplante
24	1 biópsia
31	1 biópsia

A análise com enzima de restrição permitiu identificar padrões eletroforéticos distintos, caracterizando os genótipos virais. O genótipo gB2 foi encontrado em 3 amostras duas delas de doadores, e uma do pós-transplante. Nas 7 restantes, houve mistura de cepas.

Tabela 24- Distribuição dos genótipos para CMV nas biópsias estudada.

	Amostras
gB1	0
gB2 (2 Biópsias de doadores e 1 no pós)	3/10
gB3	0
gB4	0
Mistura de linhagens (7 biópsias no pós)	7/10

6- DISCUSSÃO

O *Citomegalovírus* e o *Herpesvírus Humano 6* são da subfamília *Betaherpesvirinae*. Estes vírus permanecem em latência ou com um baixo nível de replicação viral depois da primeira infecção reativando-se em imunossuprimidos como acontece com transplantados de órgãos (Dockrell & Paya, 2001; Ihira et al., 2001). Com o aperfeiçoamento das técnicas cirúrgicas, os progressos na terapia de imunossupressão, na profilaxia antibiótica e no controle da hemostasia, houve uma diminuição das complicações nos transplantados de fígado (Singh et al., 1994; Wade et al., 1995; Cubiella et al., 2001). No entanto as infecções oportunistas continuam sendo os principais problemas para os transplantados de fígado, e os vírus HHV-6 e CMV são os principais patógenos nesses pacientes (Razonable & Paya, 2002; Yoshikawa, 2003).

No presente estudo foram identificados em biópsias hepáticas o DNA do CMV em 15(36%) pacientes dos 41 estudados e o DNA do HHV-6 em 27(66%) dos 41 estudados. A comparação desses dados com outros é dificultada pois não há muitos estudos semelhantes na literatura. Sebeková et al., (2005) pesquisou o DNA dos herpesvírus em biópsias de rim, e o HHV-6 foi o mais encontrado. O CMV tem soroprevalência mundial entre 30 e 90%, dependendo de fatores socioeconômicos e localização geográfica (Gandhi & Khanna, 2004). Estudo feito por Razonable e colaboradores (2000) demonstrou soroprevalência para o HHV-6 de 95% na população mundial, sem restrições geográficas.

A Reação em Cadeia da Polimerase, descrita por Saiki et al. (1985), permite a amplificação de regiões do genoma a ser estudado a partir de quantidades mínimas de DNA, sendo, portanto, uma metodologia de escolha para a utilização em tecidos fixados em formalina e emblocados em parafina (Coates et al., 1991). No presente estudo utilizamos a Nested PCR para detecção de seqüências de DNA do CMV e do HHV-6 em biópsias de fígado de 41 pacientes transplantados hepáticos. A pesquisa em tecido conservado em parafina em amostras mais antigas requer uso de primers que gerem produtos com menor número de pares de bases (Greer et al., 1991). De acordo com vários autores, a N-PCR é considerada mais sensível que a histologia (Roger set al., 1990) ou testes sorológicos (Dries et al., 1999). Utilizou-se a N-PCR por ser um método, mais específico e mais sensível quando comparado com outros métodos e também porque o produto da PCR pode ser processado com enzimas de restrição para a genotipagem do CMV.

No presente estudo obtivemos biópsias de 41 transplantados hepáticos, desde o pré-transplante e durante o seguimento, quando indicado pela UFTH. Das biópsias dos doadores, 20 eram fixadas em parafina e 21 á fresco. Com um protocolo de extração de DNA bem padronizado (tanto para as amostras fixadas quanto para as á fresco) (Marcon, 2006), foi possível a quantificação do DNA e a amplificação do gene da β -globina em 100% dessas amostras.

Detectamos em 4 (9.7%) biópsias de doadores o DNA do CMV e em 15 (36%) o DNA do HHV-6. Três dessas biópsias apresentaram co-infecção. Todos os pacientes estudados receberam aciclovir para prevenção de infecção por *Herpes Simples* (HSV). Não foi feita profilaxia universal com Ganciclovir para prevenir doença por CMV.

Em nossa casuística tivemos 15 amostras que apresentaram o DNA do HHV-6 antes do transplante. Na evolução desses pacientes 11 continuaram positivos e mais 16 positivaram o exame no período pós-cirúrgico. Dos 4 pacientes que apresentavam o CMV antes do transplante, 3 continuaram positivos e mais 12 positivaram o exame no período pós-cirúrgico. Alguns estudos indicam que a detecção do HHV-6 ocorre precocemente em relação à detecção do CMV em pacientes transplantados hepáticos (Lautenschlager et al., 2000; Humar et al., 2000).

Vírus como o CMV e o HHV-6 possuem propriedades imunomoduladoras e assim facilitam infecções fúngicas e bacterianas (Kusne & Blair, 2006). Segundo os autores Humar et al., (2002) e Roger set al., (2000), há uma relação significativa entre o HHV-6 e o CMV com infecções oportunistas (bacterianas e fúngicas) (Paya & Sampathkumar, 2000; Fietze et al., 1994; Paya et al., 1993).

Em nossa casuística, de 15 biópsias que estavam positivas para o HHV-6 nos transplantados que desenvolveram a doença clínica pelo CMV, 10 já eram positivas no doador. A análise estatística neste estudo adotou um nível de significância de 5%, ou seja $p\text{-valor} \leq 0.05$. O cruzamento de interesse da infecção pelo HHV-6 nas biópsias dos doadores versus a doença pelo CMV no pós-transplante teve um $p\text{-valor}$ de 0.0128. A alta frequência da infecção pelo HHV-6 nas biópsias dos órgãos doados influenciou significativamente para o desenvolvimento da doença causada pelo vírus CMV, prejudicando a

saúde do receptor e pondo em risco o enxerto no pós-transplante. O Herpes Vírus Humano 6 tem-se destacado nos últimos anos, pois alguns estudos têm demonstrado sua interação com o CMV, sugerindo que o HHV6 potencializaria a infecção por CMV, e que a co-infecção desses vírus possa ter impacto na apresentação clínica, evolução e resposta terapêutica do CMV após transplante de órgãos (Gentile, 2000; Desjardin et al, 1998; Ratnamohan et al, 1998 e Herbein et al, 1996).

Neste estudo a co-infecção esteve presente em 14(34%) dos 41 pacientes, e 8 deles evoluíram com rejeição. A infecção concomitante pelos dois herpesvírus está geralmente associada com manifestações clínicas e tem sido descrito que a infecção por HHV-6 pode levar a reativação do CMV ou a alteração da história natural da doença por CMV (Abdel & Asmar, 2004).

A rejeição ao enxerto no presente trabalho foi considerada mediante os laudos anatomopatológicos das biópsias que foram analisadas pelo departamento de anatomia patológica da Unicamp. Foram constatados 21 casos (51%) de rejeição celular ao enxerto nos 41 transplantados, que foram classificadas em aguda (leve, moderada e grave) ou crônica. Tivemos 12 receptores com rejeições aguda/leve, 5 aguda/moderada, 3 aguda/grave e um paciente apresentou rejeição crônica. Nesses 21 casos de rejeição 16 (76%) estavam com infecção pelos herpesvírus. A infecção ativa pelo CMV é um fator de risco importante nas rejeições de enxerto (Griffith et al., 2000; Mendez et al., 2001; Amorim et al., 2001; Hibberd & Snyderman, 1995; Pastacaldi et al., 2001) e atualmente têm-se acumulado cada vez mais evidências associando o HHV-6, junto com o CMV ou mesmo sozinho, com rejeições ao enxerto em transplantados hepáticos (Griffith et al., 2000; Mendez et al., 2001; Lautenschlager et al., 1998; Clark et al., 2003; Razonable & Paya, 2002; Lautenschlager et al., 2002; Lautenschlager et al., 2000; Humar et al., 2000; Razonable et al., 2003).

O cruzamento estatístico entre as variáveis infecção pelo CMV nas biópsias dos doadores versus a rejeição do enxerto no receptor, teve um p-valor de 0.0591, que demonstra uma tendência do CMV no doador em causar a rejeição no órgão implantado. Esse valor poderia ter sido significativo se tivéssemos um N um pouco maior. Em relação ao HHV-6 não houve valor estatístico significativo. Dos 21 casos de rejeição 16 (76%)

tinham a infecção viral. 14 (66%) tiveram biópsia positiva para o vírus HHV-6 e 11(52%) para o vírus CMV. Segundo Lautenschlager et al. (2002), infecções no enxerto causadas pelo HHV-6 estão associadas à disfunção do órgão, infiltração periportal de linfócitos e um aumento na expressão de moléculas de adesão. Segundo Gao & Zheng (2004), o FK pode reverter a rejeição, mas aumenta a incidência da doença por CMV. A função da terapia anti-rejeição é muito importante para manter o órgão transplantado viável, mas desde que isso não interfira na resposta de células T-citotóxicas específicas contra o CMV.

Em nosso estudo 26/41 (63,4%) pacientes foram transplantados por Cirrose hepática pelo HCV, na literatura, as principais indicações de transplante de fígado no mundo é devido ao vírus da hepatite C, que causa cirrose hepática e falência crônica do fígado. Técnicas bioquímicas e histológicas têm mostrado que a recorrência do HCV é comum depois do primeiro ano pós-transplante de fígado (Böker et al., 1997), 12/26 (46%) transplantados tiveram a recidiva do vírus C pós-transplante. A recorrência da infecção pelo HCV depois do transplante de fígado é universal, ocorrendo entre 50-60% dos casos (Gordon et al., 1997).

O vírus HHV-6 esteve presente em 83% dos transplantados que recidivaram o vírus da hepatite C. 10 pacientes apresentaram o DNA do vírus HHV-6 nas biópsias e 4 o DNA do CMV. Os pacientes que não apresentaram biópsia positiva para o DNA do HHV-6 também não apresentaram o DNA do CMV. A co-infecção foi encontrada em quatro de 12 receptores com episódios de recorrência do HCV. Existem suspeitas na literatura de uma interação entre o CMV e o vírus da hepatite C (HCV), mostrando uma prevalência maior do CMV em pacientes com hepatite C crônica do que na população normal (Lautenschlager et al., 2002; Burak et al., 2002). Em transplantados hepáticos, a presença do CMV em pacientes com hepatite C como doença que levou a cirrose hepática, influenciou o curso na doença causada pelo HCV, piorando sua evolução: mais episódios de rejeição e aumento da mortalidade (Cermelli et al., 1999). Esses mesmos autores encontraram similar interação com o HHV-6. Em nosso trabalho, observamos que 7 dos casos de rejeição tiveram a recidiva do vírus da hepatite C (HCV).

Singh et al., 2002 demonstraram que a frequência da recorrência do vírus C depois do transplante hepático não foi afetada, pela presença do HHV-6, entretanto os pacientes com o HHV-6 diagnosticado tiveram uma tendência em recidivar esse vírus mais cedo que os pacientes que não tiveram o DNA viral presente. Humar et al., (2002), não encontraram associação entre os vírus CMV e HHV-6 e a recorrência do HCV.

Encontramos em 23 pacientes dos 41 transplantados o DNA do CMV nas regiões MIE e IE, essa é uma região menor sendo assim mais específica. Para a genotipagem da região gB foi realizada uma nova PCR nas amostras dos 23 pacientes. A glicoproteína B do CMV é o componente principal do envelope viral. É uma proteína essencial para a replicação do vírus, importante no processo de adsorção na célula hospedeira e disseminação do vírus célula a célula; ela é também um importante alvo da resposta imune humana que induz à formação de anticorpos. (Cranage et al., 1986; Navarro et al., 1993; Hopkins et al., 1996).

A N-PCR amplifica o DNA alvo em duas etapas: na primeira amplificação, um par de primers externos que flanqueia a região de interesse e gera uma seqüência longa do DNA alvo. Uma pequena aliquota desse produto é utilizada numa segunda etapa de amplificação, com primers agora internos que vão gerar seqüências menores do DNA alvo final (Porter-Jordan et al., 1990), e assim aumentando a especificidade e sensibilidade da PCR simples. A amplificação de bandas com intensidade baixa (muito claras), dificultou a análise do resultado em alguns casos. Esse problema pode ser provavelmente explicado pela presença de pequenas quantidades de cópias do fragmento do DNA alvo nas amostras. Em alguns casos a amplificação da região não foi observada. Tecidos conservados em parafina em amostras antigas requer uso de primers que gerem produtos com menor número de pares de bases (Greer et al., 1991), devido à degradação do DNA. Como para a região gB amplificamos 300 pb (fragmento maior), não foi possível a amplificação de todos os casos. Por isso das 23 amostras positivas para o CMV na região MIE, em apenas 10 foi possível a amplificação da região gB.

A metodologia geralmente aplicada para a distinção entre os subtipos de CMV é a PCR-RFLP (Chou, 1990; Chou & Dennison, 1991; Fries et al., 1994), que através de um tratamento com endonucleases de restrição, o produto da PCR é clivado em fragmentos

de diferentes tamanhos e o perfil da digestão é determinante das linhagens. Para a gB, utilizam-se as enzimas de restrição *Rsa I* e *Hinf I*, que determinarão pelo menos quatro subtipos virais. Sheep et al. (1998) em seus estudos para a mesma região, caracterizaram um quinto genótipo. Recentemente, Trincado et al. (2000), encontraram em um grupo de crianças com infecção congênita por CMV, dois novos genótipos virais (gB6 e gB7).

Em nossos trabalho as 10 amostras analisadas pelas anzinimas de restrição foram genotipadas de 7 pacientes (2, 7, 13, 14, 19, 24, 31) dos 41 transplantados, pois alguns pacientes tiveram mais de uma amostra genotipada.

A análise de restrição demonstrou mistura de cepas em 6 dos 7 pacientes, 3 desses 6 desenvolveram a doença pelo CMV. Esses dados corroboram com os de Sarcinella et al., (2002), que demonstraram que, em transplantados de fígado a infecção com múltiplos genótipos do CMV é comum e esses pacientes desenvolvem mais a doença pelo CMV. Desses 6 pacientes 4 evoluíram com rejeição. Infecções com múltiplos genótipos gB em pacientes imunocomprometidos, está associada a maior carga viral, alta prevalência de doença por CMV e a alta incidência de rejeição do enxerto, além de favorecer a infecção por outros vírus (Coquette et al., 2004).

Nos 7 transplantados estudados, encontramos 2 biópsias de doador com genótipo gB2 (paciente 2 e 19), a biópsia desses pacientes no pós-tranplante demonstrou mistura de cepa, o que sugere uma reinfecção do doador para o receptor de uma cepa diferente que ele já tinha, por isso a mistura de linhagem nas amostras, depois do transplante. A biópsia do doador do paciente 31 não apresentava o DNA do CMV, no pós-transplante teve uma biópsia positiva para o CMV com genótipo gB2, o que é sugestivo de reativação do vírus endógeno. Acredita-se que algumas linhagens têm preferência em infectar determinados órgãos ou tipos celulares, ou que são mais virulentas ou mais imunossupressoras que outras, ou ainda que têm uma maior probabilidade de contribuir para a rejeição de órgãos, em casos de transplantes (Binder et al., 1999). Alguns trabalhos associam as diferentes cepas do CMV a gravidade de manifestações clínicas no pós-transplante.

Rosen et al., (1998) perceberam um número significativamente maior da linhagem gB1 entre os transplantados hepáticos com episódios de rejeição aguda, contudo, não houve diferença na gravidade da rejeição ou desenvolvimento de rejeição crônica entre os pacientes com genótipos diferentes, conclusões também obtidas por Sarcinella et al., (2002).

Em nosso estudo foram a óbito 3 transplantados (7%) dos 41, nenhum por doença ou hepatite por CMV. O paciente 12 evoluiu para óbito no dia 493 pós-transplante por choque séptico e recidiva viral do HCV. Suas biópsias foram positivas para o HHV-6, uma antes do transplante e outra 136 dias depois do transplante. Nessa mesma amostra foi encontrada rejeição aguda cronificada. Paciente 16 evoluiu para óbito no dia 15 pós-transplante por choque séptico e insuficiência renal. Apresentou biópsias negativas para os herpesvírus estudados. Paciente 31 evoluiu para óbito 6 anos e meio pós-transplante por HIV e recidiva do HCV, teve uma coinfeção viral logo nos primeiros meses pós-TXH, e continuou positivo para o HHV-6 em outras amostras analisada.

Em nossa casuística, 3 pacientes apresentaram alterações no SNC e esses pacientes tiveram suas biópsias positivas para o DNA do HHV-6 desde o pré-transplante, 2 dos 3 transplantados tiveram a co-infecção no período pós-transplante, porém a associação da infecção viral com as alterações no SNC não foram confirmadas. Estudo feito por Rogers et al., (2000) mostrou que complicações neurológicas e/ou distúrbios mentais estão associados à infecção pelo HHV-6. As complicações no SNC causadas pelo HHV-6 podem acontecer, pois este vírus induz a produção de citocinas, incluindo o interferon-alfa, uma citocina conhecida por sua toxicidade neurológica e segundo esses autores, pode causar mudança no estado mental por efeitos indiretos do HHV-6 no SNC.

7- CONCLUSÕES

Monitorizou-se pacientes submetidos a TXH em relação à presença do DNA viral do CMV e HHV-6 nas biópsias hepáticas, utilizando-se a técnica de “Nested PCR” e avaliou-se o impacto clínico;

- Detectou-se nas biópsias dos doadores de transplante hepático o DNA viral do CMV em 12,6% e do HHV-6 em 45%;
- O DNA do CMV esteve presente em 36% dos transplantados que tiveram suas biópsias analisadas;
- O DNA do HHV-6 esteve presente em 66% dos transplantados que tiveram suas biópsias analisadas;
- A co-infecção esteve presente em 34% dos receptores estudados e 57% desses pacientes evoluíram com rejeição;
- Em 51% dos transplantados hepáticos estudados ocorreram episódios de rejeição nas biópsias analisadas, e 76% desses apresentaram o DNA dos herpesvírus;
- O DNA do HHV-6 presente na biópsia dos órgãos doados influenciou para o desenvolvimento da doença causada pelo CMV, prejudicando a saúde do receptor;
- O DNA do CMV presente na biópsia dos doadores demonstrou uma tendência do CMV em causar a rejeição no órgão implantado;
- O DNA do vírus HHV-6 esteve presente em 83% dos pacientes que reativaram o vírus C. 63,4% dos pacientes foram transplantados por Cirrose Hepática pelo vírus C, e 46% recidiram a doença original;
- A amplificação do DNA do CMV da região gB foi observada em 10 amostras, 7 apresentaram mistura de cepas e 3 apresentaram o genótipo gB2.

Conclusão Final

- A presença desses vírus observados nas biópsias dos transplantados estudados, indica que esses vírus influenciaram na rejeição do enxerto causando um importante impacto clínico para esse grupo de risco.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-haq NM, Asmar BI. Human herpesvirus 6 (HHV6) infection. *Indian Pediatr* 2004; 71(1): 89-96.

Ablashi DB, Agut Z, Berneman G. Human herpesvirus-6 strain groups; a nomenclature. *Arch Virology* 1993; 129: 363-366.

Ablashi DV, Salahudin SZ, Josephs SF, Iman F, Lusso P, Gallo RC, et al. HBVL (or HHV6) in human cells lines. *Nature* 1987; 329 (6136): 207.

Alford CA, Britt WJ. Cytomegalovirus In: Fields, B.N. & Knipe, D.M. *Virology* Raven Press 1990; 2:1981-2010.

Aquino VH, Figueiredo ITM. Cytomegalovirus infection in renal transplant recipients diagnosed by nested-PCR. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2001; 34: 93-101.

Amorim ML, Cabeda JM, Seca R, Mendes AC, Castro AP, Amorim JM. CMV infection of liver transplant recipients: comparison of antigenemia and molecular biology assays. *BMC Infect Dis.* 2001; 1:2.

Ansari A, Emery VC. The U69 gene of human herpesvirus 6 encodes a protein kinase which can confer ganciclovir sensitivity to baculoviruses. *J Virol* 1999; 73:3284–3291.

Asano YT, Yoshikawa S, Suga I, Kobayashi T, Nakashima T, Yazaki Y, et al. Clinical features of infants with primary human herpesvirus 6 infection (exanthem subitum, roseola infantum). *Pediatrics* 1994; 93:104-108.

Berkman SC, Ashcraft E, Baillie GM. Valganciclovir for CMV prophylaxis in liver transplant recipients: an initial experience. *Am J Transplant* 2004; 4(suppl 8):358.

Biberfeld P, Kramarsky B, Salahuddin SZ, Gallo RC. Ultrastructural characterization of a new human B lymphotropic DNA virus (human herpesvirus 6) isolated from patients with lymphoproliferative disease. *J Natl Cancer Inst* 1987; 79(5):933-41.

Binder T, Siegert W, Kruse A, Oettle H, Wilborn F, Peng R, Timm H, Neuhaus P, Schmidt CA. Identification of Human Cytomegalovirus Variants by Analysis of Single Strand Comormation Polymorphism and DNA Sequencing of the Envelope Glycoprotein B Gene Region-Distribution Frequency in Liver Transplant Recipients. *Journal of Virologica Methods*, 78(1-2): 153-162, 1999.

Biron KK. Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. *Antiviral Res* 2006; 71(2-3): 154-63.

Black JB, Sanderlin KC, Goldsmith CS, Gary HE, Lopez C, Pellett PE. Growth properties of human herpesvirus-6 strain Z29. *J Virol Methods* 1989; 26(2):133-45.

Boutolleau DD, Cointe A, Gautheret-Dejean M, Mace H, Agut L, Grangeot-Keros, Ingrand D. No evidence for a major risk of roseolovirus vertical transmission during pregnancy. *Clin. Infect* 2003; 36:1634-1635.

Böker KH, Dalley G, Bahr MJ, Maschek H, Tillmann HL, Trautwein C, Oldhaver K, Bode U, Pichlmayr R, Manns MP. Long-term outcome of hepatitis C virus infection after liver transplantation. *Hepatology*. 1997; 25(1):203-10.

Braun DL, Dominguez G, Pellet PE. Human herpesvirus 6. *Clinical Microbiology Review* 1997; 10 (3): 521-567.

Brown HL, Abernathy MP. Cytomegalovirus Infections. *Seminars in Perinatology* 1998; 22(4):260-266.

Brown JM, Kaneshima H, Mocarski ES. Dramatic interstrain differences in the replication of human cytomegalovirus in SCIDhu mice. *Journal of Infectious Diseases* 1995; 171:1599–1603.

Brugemman CA. Cytomegalovirus and latency: na overview. *Archiv B Cell Pathology* 1993; 64:325-333.

Bruggeman CA, Marjorie HJ, Nelissen-Vrancken G. Cytomegalovirus and atherogenesis. *Antiviral Res* 1999; 43(3): 135-144.

Brytting M, Sundquist V, Stalhandske P, Linde A, Wahren B. Cytomegalovirus detection of an immediate early protein gene with nested primer oligonucleotides. *J Virol Methods* 1991; 32: 127-138.

Cainelli F, Vento S. Infections and solid organ transplant rejection: a cause-and-effect relationship? *Lancet Infect Dis.* 2002 Sep;2(9):539-49.

Calne RY, Thiru S, McMaster P. Cyclosporin A in patients receiving renal allografts from cadaver donors. *Lancet* 1978; 2:1323-7.

Camargo IFA, Granato C, fiança SVH, Tomyana HT, Cobo E, Ajzen H, Pestana JOM. Infecção pelo citomegalovirus em pacientes submetidos a transplante renal: Estudo de 20 casos. *Jornal Brasileiro de Nefrologia* 1996; 18(2):130-136.

Cardinali, G., M. Gentile, M. Cirone, C. Zompetta, L. Frati, A. Faggioni, and M. R. Torrisi.. Viral glycoproteins accumulate in newly formed annulate lamellae following infection of lymphoid cells by human herpesvirus 6. *J. Virol* 1998. 72: 9738-9746.

Caserta MT, Mock DJ, Dewhurst S. Human herpesvirus 6. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 829–833.

Cermelli C, Concari M, Pietrosevoli P, Meacci M, Sabbatini AM, Divincenzo A, Carubbi F, Loria P, Bagni A, Carulli N, Portolani M. Herpesvirus DNA is frequently detected in liver tissue from hepatitis C patients. *J Clin Virol.* 1999; 14(1):9-16.

Chang YT, Loew GH. Reaction mechanisms of form-aldehyde with endocyclicimino groups of nucleic bases. *J. Am Chem Soc.* 1994; 116:3548-3555.

Chapenko S, Folkmane I, Tomsone V, Kozireva S, Bicans J, Amerika D, Rozentals R, Murovska M. Infection of beta-herpesviruses (CMV, HHV-6, HHV-7): role in postrenal transplantation complications. *Transplant Proc.* 2001; 33(4):2463-4.

Chiu SS, Cheung CY, Tse CY, Peiris M. Early diagnosis of primary human herpesvirus 6 infection in childhood: serology, polymerase chain reaction, and virus load. *J Infect Dis.* 1998;178(5):1250-6.

Chou SW, Scott KM. Rises in antibody to human herpesvirus 6 detected by enzyme immunoassay in transplant recipients with primary cytomegalovirus infection. *J Clin Microbiol.* 1990; 28(5):851-4.

Chou S. Newer Methods for Diagnosis of Cytomegalovirus Infection. *Rev Infect Dis* 1990; 12(7):727-735.

Chou S. Differentiation of Cytomegalovirus Strains by Restriction Analysis of DNA Sequences Amplified I Tom Clinical Specimens. *Journal of Infectious Diseases* 1990; 162: 738-42.

Chou SW, Dennison KM. Analysis of interstrain variation in cytomegalovirus glycoprotein B sequences encoding neutralization-related epitopes. *J Infect Dis* 1991; 163(6):1229-34.

Cihlar T, Fuller MD, Cherrington JM. Characterization of drug resistance-associated mutations in the human cytomegalovirus DNA polymerase gene by using recombinant mutant viruses generated from overlapping DNA fragments. *J. Virol* 1998; 72: 5927–5936.

Clark DA. Human herpesvirus 6. *Rev Med Virol* 2000; 10:155-173.

Clark DA, Griffiths PD. Human herpesvirus 6: relevance of infection in the immunocompromised host. *Br J Haematol.* 2003; 120(3):384-95.

Coquette A, Bourgeois A, Dirand C, Varin A, Chen W, Herbein G. Mixed cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis.* 2004 Jul 15;39(2):155-61.

Coates PJ, D'Ardenne AJ. Et al., Simplified procedures for applying the polymerase chain reaction to routinely fixed paraffin wax section. *J. Clin. Pathol.* 1991; 44:115-118.

Colimon R, Michelson S. Human Cytomegalovirus: pathology, diagnosis, treatment. *Adv Nephrol* 1990; 19:333-356.

Costa SCB. Infecção por citomegalovirus (CMV); epidemiologia, diagnóstico e tratamento. *Revista Brasileira de Clínica Terapêutica* 1999; 25(1):18-28.

Cranage MP, Kouzarides T, Bankier AT, Satchwell S, Weston K, Tomlinson P, Barrell B, Hart H, Bell SE, Minson AC, et al. Identification of the human cytomegalovirus glycoprotein B gene and induction of neutralizing antibodies via its expression in recombinant vaccinia virus. *Embo J* 1986; 5(11):3057-63.

Crumpacker CS. Ganciclovir. *N Engl J Méd* 1996; 335: 721-729.

Cubiella J, Sala M, Fernández J, Navasa M, Salmerón JM, Gómez J, et al. Complicaciones infecciosas asociadas al trasplante hepático: análisis de 104 pacientes. *Gastroenterol Hepatol* 2001; 24(4):186-90.

Cuervas-Mons, V.; Martinez, J.; Dekker, A.; Starzl, T.E.; Van Thiel, D.H. Adult liver transplantation: An analysis of the early causes of death in 40 consecutive cases. *Hepatology* 1986; 6(3):495-501,.

Dahl HG, Fjaertoft T, Norsted FZ, Wang M, Mousavi-Jazi A. Reactivation of human herpesvirus 6 during pregnancy. *J Infect Dis* 1999; 180:2035-2038.

Deborska D, Durlík M, Sadowska A, Nowacka-Cieciura E, Pazik J, Lewandowski Z, Chmura A, Galazka Z, Paczek L, Lao M. Human herpesvirus-6 in renal transplant recipients: potential risk factors for the development of human herpesvirus-6 seroconversion. *Transplant Proc* 2003; 35(6): 2199-201.

De Bolle L, Naesens L, De Clercq E. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clin Microbiol Rev.* 2005 Jan;18(1):217-45.

De Clercq E, Holy A. Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4:928–940.

Desachy A, Ranger-Rogez S, Francois B, Venot C, Traccard I, Gastinne H, Denis F, Vignon P. Reactivation of human herpesvirus type 6 in multiple organ failure syndrome. *Clin Infect Dis* 2001; 32(2): 197-203.

Desjardin JA, Gibbons L, Cho E, Supran ES, Falagas EM, Werner GB, Snyderman RD. Human herpesvirus 6 reactivation is associated with cytomegalovirus and syndromes in kidney transplant recipients at risk for primary cytomegalovirus infection. *J Infect Dis* 1998; 178: 1783.

Dockrell DH. Human herpesvirus 6: molecular biology and clinical features. *Journal Medical Microbiology* 2003; 52(1):5-18.

Dockrell DH, Paya CV. Human herpesvirus-6 and -7 in transplantation. *Rev Med Virol* 2001; 11: 23-36.

Dockrell DH, Mendez JC, Jones M, Harmsen WS, Ilstrup DM, Smith TF, Wiesner RH, Krom RA, Paya CV. Human herpesvirus 6 seronegativity before transplantation predicts the occurrence of fungal infection in liver transplant recipients. *Transplantation*. 1999; 67(3):399-403.

Dockrell DH, Smith TF, Paya CV. Human herpesvirus 6. *Mayo Clin Proc*. 1999; 74(2): 163-70.

Dominguez G, Dambaugh TR, Stamey FR, Dewhurst S, Inove N, Pellet PE. Human herpesvirus-6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus-6A. *Journal Virology* 1999; 73(10):8040-8052.

Drago F, Aragone MG, Lugani C, Rebora A. Cytomegalovirus infection in normal and immunocompromised humans. *Dermatology* 2000; 200:189-195.

Drew WL. Herpesviridae: Cytomegalovirus. *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases. Principles and Practice* 1988; 247-260.

Dries V, von Both I, Müller M, Gerken G, Schirmacher P, Odenthal M, Bartenschlager R, Drebber U, Meyer zum Büschenfeld KH, Dienes HP. Detection of hepatitis C virus in paraffin-embedded liver biopsies of patients negative for viral RNA in serum. *Hepatology*. 1999;29(1):223-9.

Feldstein AE, Razonable RR, Boyce TG, Freese DK, El-Youssef M, Perrault J, Paya CV, Ishitani MB. Prevalence and clinical significance of human herpesviruses 6 and 7 active infection in pediatric liver transplant patients. *Pediatr Transplant* 2003; 7(2):125-9.

Fietze E, Prösch S, Reinke P, Stein J, Döcke WD, Staffa G, Löning S, Devaux S, Emmrich F, von Baehr R, et al. Cytomegalovirus infection in transplant recipients. The role of tumor necrosis factor. *Transplantation*. 1994; 58(6):675-80.

Fishman JA, Rubin RH. Infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med.* 1998 Jun 11;338(24):1741-51.

Flamand L, Gosselin J, D'addario M, Hiscott J, Ablashi DV, Gallo RC, Menezes J. Human herpesvirus 6 induces interleukin-1 β and tumor necrosis factor alpha, but not interleukin-6, in peripheral blood mononuclear cell cultures. *Journal Virology* 1991; 65: 5105-5110.

Flamand L, Gosselin J, Stefanescu I, Ablashi D, Menezes J. Immunosuppressive effect of human herpesvirus 6 on T-cell functions: suppression of interleukin-2 synthesis and cell proliferation. *Blood* 1995;86(1):418.

Freitas RB, Linhares A. Prevalence of hhv-6 antibody in the population of Belém, Pará, northern Brazil. *Transactions of the royal Society of Tropical Medicine and Higiene* 1997; 91: 538-540.

Fries BC, Chou S, Boeckh M, Torok Storb B. Frequency distribution of cytomegalovirus envelope glycoprotein genotypes in bone marrow transplant recipients. *Journal of Infectious Diseases* 1994; 169: 769–774.

Gandhi MK, Khanna R. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *Lancet Infect Dis.* 2004; 4(12):725-38

Gao LH, Zheng SS. Cytomegalovirus and chronic allograft rejection in liver transplantation. *World J Gastroenterol.* 2004; 10(13):1857-61.

Gautheret-Dejean A, Manichanh C, Thien-Ah-Koon F, Fillet AM, Mangeney N, Vidaud M, Dhedin N, Vernant JP, Agut H. Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of human herpesvirus-6 infection and application to bone marrow transplant patients. *J Virol Methods.* 2002; 100(1-2):27-35.

Gentile G. Post-transplant HHV-6 Diseases. *Herpes.* 2000; 7(1):24-27.

Gleaves CA, Smith TF, Shuster EA, Pearson GR. Rapid detection of cytomegalovirus in MRC-5 cells inoculated with urine specimens by using low-speed centrifugation and monoclonal antibody to an early antigen. *J Clin Microbiol* 1984; 19:917–919.

Gilbert, C., Boivin, G., 2005. Human cytomegalovirus resistance to antiviral drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 873–883.

Gompels UA, Nicholas J, Lawrence G, Jones M, Thonson BJ, Martin ME, et al. The DNA sequence of human herpesvirus-6: structure, coding content and genome evolution. *Virology* 1995; 209(1):29-51.

Gordon FD, Poterucha JJ, Germer J, Zein NN, Batts KP, Gross JB Jr, Wiesner R, Persing D. Relationship between hepatitis C genotype and severity of recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Transplantation.* 1997; 63(10):1419-23.

Gozlan J, Laporte JP, Lesage S, Labopin M, Najman A, Gorin NC, Petit JC. Monitoring of cytomegalovirus infection and disease in bone marrow recipients by reverse transcription-PCR and comparison with PCR and blood and urine cultures. *J Clin Microbiol* 1996; 34:2085–2088.

Green M, Avery RK, Preiksaitis J. Cytomegalovirus. *Am J Transplant* 2004 (Suppl 10); 4: 51–58.

Greer CE, Lund JK, Manos MM. PCR amplification from paraffin-embedded tissues: recommendations on fixatives for long-term storage and prospective studies. *PCR Methods Appl.* 1991;1(1):46-50.

Griffiths PD, Clark DA, Emery VC. Betaherpesviruses in transplant recipients. *J Antimicrob Chemother.* 2000;45:29-34.

Griffiths PD, Panjwani DD, Stirk PR, Ball MG, Ganczakowski M, Blacklock HA, Prentice HG. Rapid diagnosis of cytomegalovirus infection in immunocompromised patients by detection of early antigen fluorescent foci. *Lancet* ii 1984; 1242–1245.

Gupta M, Diaz-Mitoma F, Feber J, Shaw L, Forget C, Filler G. Tissue HHV6 and HHV7 determination in pediatric solid organ recipients – a pilot study. *Pediatric Transplantation* 2003; 7: 458-463.

Härmä M, Höckerstedt K, Krogerus L, Lautenschlager I. Pretransplant human herpesvirus 6 infection of patients with acute liver failure is a risk factor for posttransplant human herpesvirus 6 infection of the liver. *Transplantation.* 2006 15;81(3):367-72.

Herbein G, Strasswimmer J, Altieri M, Woehl-Jaegle ML, Wolf P, Obert G. Longitudinal study of human herpesvirus 6 infection in organ transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 1996; 22(1):171-3.

Hibberd PL, Snyderman DR. Cytomegalovirus infection in organ transplant recipients. *Infect Dis Clin North Am*. 1995; 9(4):863-77.

Ho M. *Cytomegalovirus: Biology and Infection*. Plenum Publ. Corp. 1991; 1-440

Ho M, Suwansirikul S, Dowling JN, Youngblood LA, Armstrong JA. *N Engl J Med* 1975; 293: 1109.

Hopkins JI, Fiander AN, Evans AS, Delchambre M, Gheysen D, Borysiewicz LK. Cytotoxic T cell immunity to human cytomegalovirus glycoprotein B. *J Med Virol*. 1996; 49(2):124-31.

Humar A, Kumar D, Raboud J, Caliendo AM, Moussa G, Levy G, Mazzulli T. Interactions between cytomegalovirus, human herpesvirus-6, and the recurrence of hepatitis C after liver transplantation. *Am J Transplant*. 2002; 2(5):461-6.

Humar A, Malkan G, Moussa G, Greig P, Levy G, Mazzulli T. Human herpesvirus-6 is associated with cytomegalovirus reactivation in liver transplant recipients. *J Infect Dis*. 2000; 181(4):1450-3.

Humar A, Kumar D, Caliendo AM, Moussa G, Ashi-Sulaiman A, Levy G, Mazzulli T. Clinical impact of human herpesvirus 6 infection after liver transplantation. *Transplantation* 2002; 73:599-604.

Ihira M, Yoshikawa T, Suzuki K, Ohashi M, Suga S, Asonuma K, Tanaka K, Asano Y. Correlation between human herpesvirus 6 and 7 infections after living related liver transplantation. *Microbiol Immunol*. 2001;45(3):225-32.

Isegawa YT, Mukai K, Nakano M, Kagawa J, Chen Y, Mori T, Sunagawa K, Kawanishi J, Sashihara A, Hata P, Zou H, Kosuge K, Yamanishi. Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvirus 6 variants A and B. *J Virol* 1999; 73:8053-8063

Iwatsuki S, Starzl TE, Todo S, Gordon RD, Esquivel CO, Tzakis AG, et al. Experience in 1,000 liver transplants under cyclosporine-steroid therapy: a survival report. *Transplant Proc* 1988; 20(Suppl 1):498-504.

Jacobs F, Knoop C, Brancart F, Gilot P, Melot C, Byl B, Delforge ML, Estenne M, Liesnard C; Brussels Heart and Lung Transplantation Group. Human herpesvirus-6 infection after lung and heart-lung transplantation: a prospective longitudinal study. *Transplantation* 2003; 75(12):1996-2001.

Jong MD, Galasso GJ, Gazzard B, Griffiths PD, Jabs DA, Kern ER, Spector SA. Summary of the II International Symposium on Cytomegalovirus. *Antiviral Res* 1998; 39(3):141-62.

Lam KM, Oldenburg N, Khan MA, Gaylore V, Mikhail GW, Strouhal PD, Middeldorp JM, Banner N, Yacoub M. Significance of reverse transcription polymerase chain reaction in the detection of human cytomegalovirus gene transcripts in thoracic organ transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 1998; 17: 555–565.

Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, Lembo D. The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther* 2003; 98(3):269-97.

Lassener D, Geiessler F, Bosse S, Hofmann J, Witzigmann H, Remke H, Hauss J, Wagner O. Diagnosis and monitoring of acute cytomegalovirus infection in peripheral blood of transplant recipients by nested reverse transcriptase polymerase chain reaction (PT-PCR). *Transpl.Int.* 2000.

Lautenschlager I, Höckerstedt K, Linnavuori K, Taskinen E. Human herpesvirus-6 infection after liver transplantation. *Clin Infect Dis* 1998; 26(3):702-7.

Lautenschlager I, Linnavuori K, Höckerstedt K. Human herpesvirus-6 antigenemia after liver transplantation. *Transplantation.* 2000;69(12):2561-6.

Lautenschlager I, Linnavuori K, Lappalainen M, Suni J, Höckerstedt K. HHV-6 reactivation is often associated with CMV infection in liver transplant patients. *Transpl Int* 2000; 13 Suppl 1:351-353.

Lautenschlager J, Lappalainen M, Linnavuori K, Suni J, Hockerstedt K. CMV infection is usually associated with concurrent HHV-6 and HHV-7 antigenemia in liver transplant Patients. *J Clin Virol* 2002; 25:57-61.

Levitsky J, Stosor V, Abecassis M, Ison MG. A survey of CMV prevention strategies after liver transplantation. Paper presented at: American Transplant Congress 2007; 5-9.

Levy JA, Landay A, Lennette ET. Human herpesvirus 6 inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication in cell culture. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2362–2364.

Levy J. A Tree new human herpesviruses (HHV-6, HHV-7 and HHV-8). *The Lancet* 1997; 349: 558-562.

Liszewski MK, Post TW, Atkinson JP. Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu. Rev Immunol* 1991; 9:431-455.

Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definition of Cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 1094-1097.

Keeffe EB. Liver Transplantation: Current Status and Novel Approaches to Liver Replacement. *Gastroenterology* 2001; 120(3):749-62.

Kikuta H, Nakane A, Lu I, Taguchi Y, Minagawa T, Matsumoto S. Interferon induction by human herpesvirus 6 in human mononuclear cells. *The Journal of Infect Disease* 1990; 162(1): 35-38.

Koziel MJ. Herpesvirus infection of the liver. *Infect Dis Clin North Am* 2000; 702-707.

Krueger GR, Koch B, Leyssens N, Berneman Z, Rojo J, Horwitz C, et al. Comparison of seroprevalences of human herpesvirus-6 and -7 in healthy blood donors from nine countries. *Vox Sang* 1998; 75(3):193-7.

Kusne S, Blair JE. Viral and fungal infections after liver transplantation--part II. *Liver Transpl.* 2006; 12(1):2-11.

Küss R, Bourget P. El hígado, el páncreas y el intestino. In Küss R, Bourget P (eds). Una historia ilustrada del trasplante de órganos. Rueil-Malmaison, Sandoz 1992; 76-90.

Lo CY, Yuen KY, Lui SL, Li FK, Chan TM, Lo WK, Cheng IK. Diagnosing cytomegalovirus disease in CMV seropositive renal allograft recipients: a comparison between the detection of CMV DNAemia by polymerase chain reaction and antigenemia by CMV pp65 assay. *Clin Transplant*. 11: 286-293, 1997.

Locatelli G, Santoro F, Veglia F, Gobbi A, Lusso P, Malnati MS. Real-time quantitative PCR for human herpesvirus 6 DNA. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(11):4042-8.

Mar EC, Chiou JF, Cheng YC, Huang ES. Inhibition of cellular DNA polymerase- α and human cytomegalovirus-induced DNA polymerase by the triphosphates of 9-(2-hydroxyethoxy-methyl) guanine and 9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl) guanine. *J Med Virol* 1985; 53: 776-780.

Marcon GEB. Aspectos Moleculares do Trypanosoma cruzi em tecidos do coração e TGI de chagásicos crônicos necropsiados [Tese – Doutorado]. Campinas (SP): UNICAMP; 2007.

Maya TC; Azulay DR. Infecção pelo Citomegalovirus. In: Lupi O; Silva AS; Pereira Jr. Herpes – Clíica, Diagnóstico e Tratamento, 1º Ed., Medsi Editora Médica e Científica, Cap 8; 135-156, 2000.

Mendez JC, Dockrell MJ, Espy MJ, Smith TF, Wilson JÁ, Harmsen WS, et al. Human β -Herpesvírus interactions in solid organ transplant recipients. *The J Infect Dis* 2001; 183:179-84.

Mckeating, J.A., Stagno, S., Stirk, P.R., Griffiths,P.D. Detection of Cytomegalovirus in Urine by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Med. Virol*. 16: 367-373, 1985.

Mirandola P, Menegazzi P, Merighi S, Ravaioli T, Cassai E, Di Luca D. Temporal mapping of transcripts in herpesvirus 6 variants. *J Virol* 1998;72(5):3837-44.

Murray BM. Management of cytomegalovirus infection in solid-organ transplant recipients. *Immunol Invest*. 1997; 26(1-2):243-55.

Mustafa MM. Cytomegalovirus Infection and Disease in the Immunocompromised Host. *The Ped Inf Dis J* 1994; 13:249-259.

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

National Institutes of Health. Consensus Development Conference Statement: Liver transplantation. June 20-23, 1983. *Hepatology*, 4(suppl): S107-10, 1984.

Navarro D, Paz P, Tugizov S, Topp K, La Vail J, Pereira L. Glycoprotein B of human cytomegalovirus promotes virion penetration into cells, transmission of infection from cell to cell, and fusion of infected cells. *Virology*. 1993; 197(1):143-58.

Nesmith JD, Pass RF. Cytomegalovirus Infection in Adolescents. *Adolesc Med* 1995; 6(1):79-90.

Niubó J, Perez JL, Martinez-Lacasa JT, Garcia A, Roca J, Fabregat J, Gil-Vernet S, Martin R. Association between quantitative cytomegalovirus antigenemia with symptomatic infection in solid organ transplant patients. *Diagn. Microbiol. Infec. Dis* 1996; 24:19-24.

Oña M, Melón S, Rodriguez JL, Sanmartin JC, Bernardo MJ. Association between human herpesvirus type 6 and type 7, and cytomegalovirus disease in heart transplant recipients. *Transplant Proc.* 2002;34(1):75-6.

Oster B, Hollsberg P. Viral gene expression patterns in human herpesvirus 6B-infected T cells. *J Virol* 2002; 76:7578-7586.

Okuno T, Takahashi K, Balachandra K, Shiraki K, Yamanishi K, Takahashi M, Baba K. Seroepidemiology of human herpesvirus 6 infection in normal children and adults. *J Clin Microbiol* 1989; 27(4):651-3.

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

Pacsa AS, Essa S, Voevodin A, el-Shazly A, Kazak H, Nampoory MR, Johny KV, Said T, Al-Nakib W. Correlation between CMV genotypes, multiple infections with herpesviruses (HHV-6, 7) and development of CMV disease in kidney recipients in Kuwait. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003;20;35(2):125-30.

Pastacaldi S, Teixeira R, Montalto P, Rolles K, Burroughs AK. Hepatic artery thrombosis after orthotopic liver transplantation: a review of nonsurgical causes. *Liver Transpl.* 2001;7(2):75-81.

Paya CV, Wiesner RH, Hermans PE, Larson-Keller JJ, Ilstrup DM, Krom RA, Rettke S, Smith TF. Risk factors for cytomegalovirus and severe bacterial infections following liver transplantation: a prospective multivariate time-dependent analysis. *J Hepatol.* 1993;18(2):185-95.

Paya CV, Wilson JA, Espy MJ, Sia IG, DeBernardi MJ, Smith TF, Patel R, Jenkins G, Harmsen WS, Vanness DJ, Wiesner RH. Preemptive use of oral ganciclovir to prevent cytomegalovirus infection in liver transplant patients: a randomized, placebo-controlled trial. *J Infect Dis.* 2002;185(7):854-60.

Paya CV. Fungal Infections in solid-organ transplantation. *Clin Infect Dis* 1993; 16: 677-88.

Paya CV. Indirect effects of CMV in the solid organ transplant patient. *Transpl Infect Dis.* 1999;1, 1:8-12

Paya C, Razonable RR. Cytomegalovirus infection after solid organ transplantation. In: Bowden R, Ljungman P, Paya C, eds. *Transplant infection.* Vol 1. Philadelphia, PA: Lippincott, Williams and Wilkins; 2003:298-325.

Plachter B, Singzer C, Jahn G. Cell Types involved in replication and distribution of human cytomegalovirus advances. *Virus Research* 1996; 46: 195-261.

Pescovitz MD, Rabkin J, Merion RM, Paya CV, Pirsch J, Freeman RB, O'Grady J, Robinson C, To Z, Wren K, Banken L, Buhles W, Brown F. Valganciclovir results in improved oral absorption of ganciclovir in liver transplant recipients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(10):2811-5.

Prados E, Cuervas-Mons V. Transplante hepático. Indicaciones y contraindicaciones generales. Elección del momento. In: Berenguer J, Bruguera M, García M, Sáez LR. Tratamiento de las Enfermedades Hepáticas y Biliares. Asociación Española para el Estudio del Hígado. Madrid: Elba. 2005; 411-23.

Preiksaitis JK, Brennan DC, Fishman J, Allen U. Canadian society of transplantation consensus workshop on cytomegalovirus management in solid organ transplantation final report. *Am J Transplant* 2005; 5: 218–227.

Porter-Jordan K, Rosenberg EI, Keiser JF, Gross JD, Ross AM, Nasim S, Garrett CT. Nested polymerase chain reaction assay for the detection of cytomegalovirus overcomes false positives caused by contamination with fragmented DNA. *J Med Virol*. 1990; 30(2):85-91.

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

Raia S, Nery JR, Mies S. Liver transplantation from living donors. *Lancet* 1989; 2: 497.

Ratnamohan VM, Chapman J, Howse H, Bovington K, Robertson P, Byth K, et al. Cytomegalovirus and human herpesvirus 6 both cause disease renal transplantation. *Transplantation*; 66(7): 877-882, 1998.

Razonable RR, Rivero A, Brown RA, Hart GD, Espy MJ, van Crujisen H, Wilson J, Groettum C, Kremers W, Smith TF, Paya CV. Detection of simultaneous beta-herpesvirus infections in clinical syndromes due to defined cytomegalovirus infection. *Clin Transplant*. 2003;17(2):114-20.

Razonable RR, Brown RA, Wilson J, Groettum C, Kremers W, Espy M, et al. The clinical use of various blood compartments for cytomegalovirus (CMV) DNA quantitation in transplant recipients with CMV disease. *Transplantation* 2002; 73(6):968-73

Razonable RR, Paya C. The impact of HHV-6 and 7 infection on the outcome of liver transplantation. *Liver Transplantation* 2002; 8:651-658.

Rawlinson WD. Diagnosis of Human Cytomegalovirus Infection and Disease. *Pathology* 1999; 31:109-115.

Reymen D, Naesens L, Balzarini J, Holý A, Dvoráková H, De Clercq E. Antiviral activity of selected acyclic nucleoside analogues against human herpesvirus 6. *Antiviral Res* 1995; 28(4):343-357.

Rogers J, Rohal S, Carrigan DR, Kusne S, Knox KK, Gayowski T, Wagener MM, Fung JJ, Singh N. Human herpesvirus-6 in liver transplant recipients: role in pathogenesis of fungal infections, neurologic complications, and outcome. *Transplantation*. 2000 Jun 27;69(12):2566-73.

Rogers BB, Alpert LC, Hine EA, Buffone GJ. Analysis of DNA in fresh and fixed tissue by the polymerase chain reaction. *Am J Pathol*. 1990;136(3):541-8.

Rosen HR, Corless CL, Rabkin J, Chou S. Association of cytomegalovirus genotype with graft rejection after liver transplantation. *Transplantation* 1998; 66(12):1627-1631.

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

Rubin RH. Impact of cytomegalovirus infection on organ transplant recipients. *Rev Infect Dis*. 1990 Sep-Oct;12 Suppl 7:S754-66.

Rubin RH. Preemptive therapy in immunocompromised hosts. *N. Engl. J. Med*. 324: 1057-1059, 1991.

Sachihara J, Tanaka-taya K, Tanaka S, Amo K, Miyagawa H, Hosoi G, et al. High incidence of human herpesvirus 6 infection with a high viral load in cord blood stem cell transplant recipients. *Blood* 2002; 100 (6): 2005-2011.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HÁ, & Arnheim N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230:1350-1354.

Salahuddin SZ, Ablashi DV, Markham PD, Josephs SF, Sturzenegger S, Kaplan M, et al. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science* 1986; 234(4776):596-601.

Sampathkumar P, Paya CV. Management of cytomegalovirus infection after liver transplantation. *Liver Transpl.* 2000;6(2):144-56.

Santoro F, Kennedy PE, Locatelli G, Malnati MS, Berger EA, Lusso P. CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell* 1999; 99(7):817-27.

Santos RLB. Propriedades Gerais dos Herpesvírus. In: Lupi A, Silva AS, Pereira JR, AC. - Herpes Clínica, Diagnóstico e Tratamento, 1ª edição, Medsi Editora Médica e Científica Ltda; 2000. cap10, p.79-189.

Sarcinella L, Mazzulli T, Willey B, Humar A. Cytomegalovirus glycoprotein B genotype does not correlate with outcomes in liver transplant patients. *J Clin Virol* 2002; 24(1-2): 99-105.

Saxinger C, Polesky H, Eby N, Grufferman S, Murphy R, Tegtmeir G, Parekh V, Memon S, Hung C. Antibody reactivity with HBLV (HHV-6) in U.S. populations. *J Virol Methods* 1988; 21(1-4):199-208.

Schmidt CA, Wilbron F, Weiss K, Brinkmann V, Oettle H, Lohmann R, et al. A prospective study of human herpesvirus type 6 detected by polymerase chain reaction after liver transplantation. *Transplantation* 1996; 61(4):662-4.

Sebeková K, Feber J, Carpenter B, Shaw L, Karnauchow T, Diaz-Mitoma F, Filler G. Tissue viral DNA is associated with chronic allograft nephropathy. *Pediatr Transplant.* 2005;9(5):598-603.

Secchiero P, Carrigan DR, Asano Y, Benedetti L, Crowley RW, Komaroff AL, et al. Detection of human herpesvirus 6 in plasma of children with primary infection and immunosuppressed patients by polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1995; 171(2): 273-80.

Shepp DH, Match ME, Lipson SM, Pergolizzi RG. A Fifth Human Cytomegalovirus Glycoprotein B Genotype. *Research in Virology* 1998; 149: 109-114.

Shen CY, Chang BL, Chang SF, Yang SL, Tseng SL, Chen CY, et al. Molecular epidemiology of cytomegalovirus infection in kindergarten children. *J Med Virol* 1996; 48(1): 33-37.

Shibata D, Martin WJ, Appleman MD, Causey DM, Leedom JM, Arnheim N. Detection of cytomegalovirus DNA in peripheral blood of patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1988; 158(6):1185-92.

Shibolet O, Ilan Y, Kalish Y, Safadi R, Ashur Y, Eid A, Shouval D, Wolf D. Late cytomegalovirus disease following liver transplantation. *Transpl Int.* 2003;16(12):861-5.

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

Silva AG. Propriedades Gerais dos Herpesvírus. In: Lupi A, Silva AS, Pereira JR, AC. *Herpes Clínica, Diagnóstico e Tratamento: 1ª edição*, Medsi Editora Médica e Científica Ltda; 2000. cap1, p.1-13.

Simmons A, Demmrich Y, La Vista A, Smith K. Replication of human herpesvirus 6 in epithelial cells in vitro. *J Infect Dis* 1992; 166:202–205.

Singh N, Carrigan DR. Human herpesvirus-6 in transplantation: an emerging pathogen. *Ann Intern Med.* 1996 Jun 15;124(12):1065-71.

Singh, N, Gayowski T, Wagener MM, Yu VL. Infectious Complications in Liver Transplant Recipients on Tacrolimus. *Transplantation* 1994; 58(7):774-8.

Singh N, Husain S, Carrigan DR, Knox KK, Weck KE, Wagener MM, Gayowski T. Impact of human herpesvirus-6 on the frequency and severity of recurrent hepatitis C virus hepatitis in liver transplant recipients. *Clin Transplant.* 2002;16(2):92-6.

Singh N, Carrigan DR. Human herpesvirus-6 in transplantation: an emerging pathogen. *Ann Intern Med* 1996; 124(12):1065-71.

Singh N. Human herpesvirus-6, -7 and -8 in organ transplant recipients. *Clinical Microbiology Infect* 2000; 6:453-459.

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

Starzl TE, Klintmalm GBG, Porter KA, Iwatsuki S, Schroter GP. Liver transplantation with use of cyclosporin-A and prednisone. *N Engl J Med* 1981; 305: 266-9.

Stinski MF. Cytomegalovirus and its replication. In: Fields, BN; Knipe, DM. *Virology*; 2 ed., New York, Raven Press Ltda 1990; 1959-1980.

Straus SE. Introduction to Herpesviridae. In: Mandell GL, Douglas JRRG, Benett JE. *Principles and practice of infectious diseases*. Churchill Livingstone: 1990; 3^a ed. New York, 1139-44.

Suassuna JH, Leite LL, Villela LH. Prevalence of cytomegalovirus infection in different patient groups of an urban university in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 1995; 28(2):105-8.

Suassuna JHR, Machado RD. Diagnóstico das Infecções por Citomegalovírus (CMV) em Pacientes com Deficiência Imunológica. *Revista da Associação de Medicina do Brasil* 1992; 38(1): 33-47.

Sullivan V, Talarico CL, Stanat SC, Davis M, Coen DM, Biron KK. A protein kinase homologue controls phosphorylation of ganciclovir in human cytomegalovirus-infected cells. *Nature* 1992; 358:162-164.

Tamashiro JC, Hock LJ, Spector DH. Construction of a cloned library of the EcoRI fragments from the human cytomegalovirus genome (strain AD169). *J Virol*. 1982; 42(2):547-57.

The TH, van der Bij W, van den Berg AP, van der Giessen M, Weits J, Sprenger HG, van Son WJ. Cytomegalovirus antigenemia. *Rev Infect Dis* 1990; 12 Suppl 7:734-744.

The TH, Van Der Ploeg M, Van Der Berg AP, Vlieger AM, Van Der Giessen M, Van son WJ. Direct detection of cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes: a review of the antigenemia assay and polymerase chain reaction. *Transplantation* 54(2): 193-198, 1992.

Thomson BJ, Dewhurst S, Gray D. Structure and heterogeneity of the a sequences of human herpesvirus 6 strain variants U1102 and Z29 and identification of human telomeric repeat sequences at the genomic termini. *J Virol* 1994; 68(5):3007-3014.

Thomasini RL, Sampaio AM, Bonon SH, Boin IF, Leonardi LS, Leonardi M, Costa SC. Detection and monitoring of human herpesvirus 7 in adult liver transplant patients: impact on clinical course and association with cytomegalovirus. *Transplant Proc.* 2007; 39(5):1537-9.

Tong CYW, Bakran A, Willians H, Cheung CY, Peiris JSM, Association of human herpesvirus 7 with CMV disease in renal transplant recipients. *Transplant* 2000; 70(1): 213-216.

Trincado DE, Scott GM, White PA, Hunt C, Rasmussen I, Ra Wlinson WD. Human Cytomegalovirus Strains Associated with Congenital and Perinatal Infections. *Journal of Medical Virology*, 61(4): 481-487,2000.

Van Den Berg, AP; Klompmaker, IJ; Haagsma, EB; scolten-sampson, A.; Bijlevel, CMA; Schirm, J.; Van Der Giessen, M.; Slooff, MJH; The, TH. Antigenemia in the Diagnosis and Monitoring of Active Cytomegalovirus Infection after Liver Transplantation. *J Infect Dis* 164: 265-270, 1991.

Van der Bij W, Schirm J, Torensma R, van Son WJ, Tegzess AM, The TH. Comparison between viremia and antigenemia for detection of cytomegalovirus in blood. *J Clin Microbiol* 1988; 26(12):2531-2535.

Vogelberg C, Meyer-König U, Hufert FT, Kirste G, von Laer D. Human cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in renal transplant recipients. *J Med Virol* 1996; 50(1):31-4.

van Loon NM, Gummuluru S, Sherwood DJ, Marentes R, Hall CB, Dewhurst S. Direct sequence analysis of human herpesvirus 6 (HHV-6) sequences from infants and comparison of HHV-6 sequences from mother/infant pairs. *Clin Infect Dis* 1995; 21(4):1017-1019.

Wade JJ, Rolando N, Hayllar K, Philpott-Howard J, Casewell MW, Willians R. Bacterial and Fungal Infections after Liver Transplantation: An analysis of 284 Patients. *Hepatology* 1995; 21(5):1328-36.

Ward KN, Andrews NJ, Verity CM, Miller E, Ross EM. Human herpesviruses-6 and -7 each cause significant neurological morbidity in Britain and Ireland. *Arch Dis Child* 2005; 90(6): 619-23.

Weller TH. Cytomegaloviruses: the difficult years. *J Infect Dis* 1970; 122,6: 532-539.

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.* 94: 4-12, 1957.

Yamanishi K, Okuno T, Shiraki K, Takahashi M, Kondo T, Asano Y, Kurata T. Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet*. 1988 May 14;1(8594):1065-7.

Yoshikawa T. Human herpesvirus-6 and -7 infections in transplantation. *Pediatr Transplant*. 2003 Feb;7(1):11-7.

Yoshida M, Uno F, Bai ZL, Yamada M, Nii S, Sata T, et al. Electron microscopic study of a herpes-type virus isolated from an infant with exanthem subitum. *Microbiol Immunol*. 1989; 33(2):147-54.

Zerr DM, Gupta D, Huang ML, Carter R, Corey L. Effect of antivirals on human herpesvirus 6 replication in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002; 34(3):309-17.

Programas computacionais utilizados:

The SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 9.1.3. SAS Institute Inc, 2002-2003, Cary, NC, USA.

SPSS for Windows , versão 10.0.5 (27Nov1999)

SPSS Inc, 1989-1999, Chicago, IL, USA.

9- ANEXOS

Anexo 1- Distribuição geral dos resultados obtidos, durante a monitorização das infecções ativas por CMV e HHV-6 no pré-transplante e pós-transplante hepático, nos pacientes estudados.

Paciente	Doador (CMV)	Doador (HHV-6)	Numero de Biópsias Pós-TXH	Momentos das Indicações das bx Em dias pós TXH	Infecção CMV	Dia da infecção	Infecção HHV-6	Dia da infecção	Co-infecção
1	Negativo	Positivo	2	110, 360	Negativo	-	Negativo	-	Não
2	Positivo	Positivo	3	61, 74, 157	Sim	61, 74	Sim	61, 74	Sim
3	Negativo	Positivo	4	330, 707, 982, 1324	Negativo	-	Sim	330, 982, 1324	Não
4	Negativo	Negativo	2	3, 19	Negativo	-	Sim	19	Não
5	Negativo	Negativo	1	150	Negativo	-	Negativo	-	Não
6	Negativo	Positivo	3	5, 41, 109	Sim	41, 109	Sim	41	Sim
7	Negativo	Negativo	5	168, 210, 478, 570, 1150	Sim	168	Sim	168/210	Sim
8	Negativo	Positivo	1	15	Sim	15	Sim	15	Sim
9	Negativo	Negativo	2	37, 94	Sim	37, 94	Sim	37, 94	Sim
10	Negativo	Negativo	2	543, 865	Negativo	-	Negativo	-	Não
11	Negativo	Negativo	1	250	Negativo	-	Negativo	-	Não
12 [⊕]	Negativo	Positivo	3	136, 350, 480	Negativo	-	Sim	480	Não
13	Negativo	Positivo	4	528, 543, 557, 960	Sim	557	Sim	528, 543, 557, 960	Sim
14	Negativo	Positivo	1	43	Sim	43	Sim	43	Sim
15	Negativo	Negativo	1	98	Negativo	-	Negativo	-	Não
16 [⊕]	Negativo	Negativo	1	19	Negativo	-	Negativo	-	Não
17	Negativo	Positivo	6	123, 136, 163, 286, 994, 1270	Negativo	-	Sim	136, 163	Não
18	Negativo	Positivo	3	120, 262, 1627	Sim	120	Sim	120, 262	Sim

19	Positivo	Positivo	3	8, 1102, 1476	Sim	8, 1102	Sim	8, 1102	Sim
20	Negativo	Negativo	4	27, 41, 125, 316	Negativo	-	Sim	41, 125	Não
21	Negativo	Negativo	1	1477	Negativo	-	Negativo	-	Não
22	Negativo	Negativo	2	25, 97	Negativo	-	Sim	97	Não
23	Negativo	Negativo	2	67, 352	Negativo	-	Sim	67	Não
24	Positivo	Negativo	3	93, 266, 367	Sim	93, 266	Negativo	-	Não
25	Negativo	Negativo	2	76, 975	Negativo	-	Negativo	-	Não
26	Negativo	Negativo	4	6, 87, 166, 1808	Sim	6	Sim	6	Sim
27	Negativo	Negativo	1	280	Negativo	-	Negativo	-	Não
28	Negativo	Negativo	2	48, 813	Negativo	-	Negativo	-	Não
29	Negativo	Negativo	1	183	Negativo	-	Negativo	-	Não
30	Negativo	Negativo	4	5, 330, 1150, 1562	Sim	1562	Sim	1562	Sim
31‡	Negativo	Negativo	4	36, 150, 1236, 1330	Sim	36	Sim	36, 1236, 1330	Sim
32	Negativo	Negativo	2	463, 792	Negativo	-	Negativo	-	Não
33	Negativo	Negativo	2	308, 312	Negativo	-	Sim	312	Não
34	Negativo	Positivo	1	338	Negativo	-	Negativo	-	Não
35	Negativo	Negativo	3	482, 520, 550	Sim	550	Sim	550	Sim
36	Negativo	Negativo	4	7, 700, 731, 767	Negativo	-	Negativo	-	Não
37	Negativo	Negativo	4	22, 180, 195	Negativo	-	Negativo	-	Não
38	Positivo	Positivo	1	74	Negativo	-	Negativo	-	Sim
39	Negativo	Negativo	6	49, 47, 216, 366, 390, 725	Negativo	-	Sim	147	Não
40	Negativo	Positivo	2	8, 229	Negativo	-	Sim	8, 229	Não
41	Negativo	Positivo	1	915	Negativo	-	Negativo	-	Não

* Na coluna de biópsias pós-transplante os números indicam os dias que elas foram realizadas. Nas colunas de dia da infecção, os números indicam os dias pós-transplante em que se obtiveram resultados positivos. “Doador” foi encontrado infecção na biópsia do doador (antes do tx). “-” Significa que todos os resultados dos exames foram negativos. ‡ - Significa que o paciente foi à óbito.

Anexo 2- Pacientes que tiveram a co-infecção por CMV e HHV-6.

Paciente	Infecção para CMV	Infecção para HHV-6	Co-infecção
1	Não	Sim (Doador)	Não
2	Sim (Doador, 45, 61)	Sim (Doador, 45, 61)	Sim
3	Não	Sim (Doador, 330, 982, 1324)	Não
4	Não	Sim (19)	Não
5	Não	Não	Não
6	Sim (41, 109)	Sim (Doador, 41)	Sim
7	Sim (168)	Sim (168, 210)	Sim
8	Sim (15)	Sim (Doador, 15)	Sim
9	Sim (37, 94)	Sim (37, 94)	Sim
10	Não	Não	Não
11	Não	Não	Não
12	Não	Sim (Doador, 136)	Não
13	Sim (557)	Sim (Doador, 528, 543, 557,960)	Sim
14	Sim (43)	Sim (Doador, 43)	Sim
15	Não	Não	Não
16	Não	Não	Não
17	Não	Sim (Doador, 136, 163)	Não
18	Sim (120)	Sim (Doador, 120, 262)	Sim
19	Sim (Doador, 8, 1102)	Sim (Doador, 8, 1102)	Sim
20	Não	Sim (41, 125)	Não
21	Não	Não	Não
22	Não	Sim (97)	Não
23	Não	Sim (67)	Não
24	Sim (Doador, 93, 266)	Não	Não
25	Não	Não	Não
26	Sim (6)	Sim (6)	Sim
27	Não	Não	Não
28	Não	Não	Não
29	Não	Não	Não
30	Sim (1562)	Sim (1562)	Sim
31	Sim (36)	Sim (36, 1236, 1330)	Sim
32	Não	Não	Não

33	Não	Sim (312)	Não
34	Não	Sim (Doador)	Não
35	Sim (550)	Sim (550)	Sim
36	Não	Não	Não
37	Não	Não	Não
38	Sim (Doador)	Sim (Doador)	Sim
39	Não	Sim (147)	Não
40	Não	Sim (Doador, 8, 229)	Não
41	Não	Sim (Doador)	Não

* Nas colunas de infecções para CMV e HHV-6 os números indicam os dias pós-transplante em que se obtiveram resultados positivos. “Doador” foi encontrado infecção na biópsia do doador (antes do tx). Na coluna de co-infecção as palavras em vermelhos significa que houve o diagnóstico dos vírus na mesma amostra.

Anexo 3- Distribuição da correlação clínica e laboratorial dos pacientes estudados:

P	Infecção por CMV	Infecção por HHV-6	Rejeição do enxerto	Provável doença por CMV (ganciclovir)	Infecção Oportunista	Tipo	Sinais, sintomas e alterações laboratoriais	Óbito
1	-	Doador	Não	Não	-	-	Leucopenia, plaquetopenia, Aumento de enzimas hepáticas, recidiva HCV (360)	Não
2	Doador, 45, 61	Doador, 45, 61	Sim (77)	Não	Sim (18)	<i>Staphylococcus epidermis</i> Pneumonia (PNE umatoceles)	Aumento se enzimas hepáticas, Leucopenia, plaquetopenia, Náusea e vômito, sinusite.	Não
3	-	Doador, 330, 982, 1324	Não	Sim (30)	Sim (330)	<i>Staphylococcus sp</i>	Aumento de enzimas hepáticas, plaquetopenia, pancitopenia sinusite aguda, alterações no sistema nervoso central (SNC), vírus C com moderada ativação (360).	Não
4	-	19	Não	Não	Sim (323)	Colangite	Aumento de enzimas hepáticas, leucopenia e plaquetopenia, PCR positivo para CMV, cefaléia holocraniana febre, abscesso hepático sinusite, colangite, mialgia, vômito.	Não
5	-	-	Não	Não	Não	-	Alterações nas enzimas hepáticas, leucopenia, plaquetopenia	Não
6	41, 109	Doador, 41	Não	Não	Não	-	Aumento de enzimas hepáticas, plaquetopenia, alterações nas hemácias vômito, icterícia recidiva viral (110).	Não

7	168	168, 210	Não	Não	Sim (30)	<i>Enterobacter Cloacae</i>	Aumento de enzimas hepáticas, plaquetopenia, anisocitose, obstrução das vias biliares, náusea, vômito e icterícia	Não
8	15	Doador, 15	Sim (16)	Sim (28)	Sim (25)	<i>s. aureus e aeromonas r.</i>	Enzimas hepáticas altas, leucopenia, neutopenia. PCR e AGM positivo para CMV, cefaleia.	Não
9	37, 94	37, 94	Sim (105)	Sim (98)	Sim (40)	ITU citrobacter	Aumento de enzimas hepáticas, diarreia, anemia, SD consuptiva. RDA leve c/ varizes esofágicas, divertículo em colo esq.	Não
10	-	-	Não	Não	Não	-	Assintomático	Não
11	-	-	Sim (255)	Sim (15)	Sim (15)	ITU levedura Pneumonia, sara	AGM e PCR positivos para CMV, aumento de enzimas e plaquetopenia, recidiva viral (255), encefalopatia hepática.	Não
12	-	Doador, 480	Sim (146)	Sim (30)	Sim (4)	Pneumonia	Aumento de enzimas hepáticas, pancitopenia, PCR e AGM positivo para CMV. febre e colúria, recidiva viral (146), hepatite aguda cronicada	Sim (495)
13	557	Doador, 528, 543, 557, 960	Sim (565)	Sim (27)	Não	-	Aumento de enzimas hepáticas, PCR positivo para CMV, colestase.	Não

14	43	Doador, 43	Não	Sim (60)	Sim (60) (132)	<i>Epstein Barr e Mononucle ose</i>	Aumento das enzimas hepáticas, plaquetopenia, pancitopenia. Náusea, vômito e alteração no SNC	Não
15	-	-	Sim (100)	Não	Sim (100)	<i>Staphylococ cus aureus</i>	Leucopenia, plaquetopenia e Aumento de enzimas hepáticas Enterorragia, trombose portal.	Não
16	-	-	Não	Não	Não	-	Assintomático	Sim (15)
17	-	Doador, 136, 163	Não	Sim (24)	Sim (22)	<i>Enterococc us feacales Staphylococ cus Aureus</i>	PCR e AGM positivo para CMV. Aumento de enzimas hepáticas, leucopenia, anisocitase. moderada recidiva viral (323), hepatite crônica	Não
18	120	Doador, 120, 262	Não	Sim (150)	Não	-	Leucopenia, macrocitose, hipocromia, elevação das enzimas. febre e Avc na região parietal. Convulsão (150), recidiva viral C (321), hepatite crônica.	Não
19	Doador, 8, 1102	Doador, 8, 1102	Sim (10)	Não	Sim (120)	<i>Cândida albicans</i>	Aniso, neutrofilia, hemácias hipocronicas. Elevação das enzimas hepáticas, dilatação das vias biliares, colangite.	Não

20	-	41, 125	Sim (42)	Sim (34)	Sim (500)	<i>E. coli</i>	PCR positivo para CMV e D+90 AGM. Elevação de enzimas, plaquetopenia, leucopenia, estenose hepática, recidiva viral (322) hepatite crônica.	Não
21	-	-	Não	Não	Sim (4)	<i>Staphylococcus aureus</i>	Assintomático	Não
22	-	97	Sim (30)	Não	Não	-	Assintomático	Não
23	-	67	Não	Não	Não	-	Assintomático	Não
24	Doador, 93, 266	-	Sim (1440)	Sim (360)	Sim (126)	<i>E. coli</i> <i>Staphylococcus Aureus</i>	Plaquetopenia, leucopenia, elevação da enzimas hepáticas. diarreia, febre, náusea, vômito.	Não
25	-	-	Sim (25)	Não	Não	-	Elevação de enzimas, plaquetopenia e leucopenia.	Não
26	6	6	Sim (5)	Não	Sim (14)	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>E. coli</i>	Elevação das enzimas hepáticas, recidiva viral.	Não
27	-	-	Não	Não	Não	-	Assintomático	Não
28	-	-	Sim (45)	Não	Não	-	Elevação de enzimas, palquetopenia, icterícia, febre, estenose biliar, recidiva HCV (813).	Não
29	-	-	Não	Não	Não	-	Assintomático	Não
30	1562	1562	Não	Não	Sim (159)	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Herpes zooster</i>	Elevação de enzimas, plaquetopenia, aniso, corpúsculo de h.jolly, anemia. PCR positiva para CMV, hepatite crônica auto-imune.	Não

31	36	36, 1236, 1330	Sim (66)	Não	Sim (150)	Erisipela	Plaquetopenia, elevação de enzimas diarréia e febre recidiva viral (150). e colestase severa	Sim (2360)
32	-	-	Não	Não	Não	-	Assintomático	Não
33	-	312	Sim (285)	Sim (90)	Sim (300)	Bacteriana	PCR e AGM positivo para CMV, elevação de enzimas hepáticas, febre diarréia	Não
34	-	Doador	Sim (5)	Sim (8)	Sim (8)	<i>Staphylococcus Haemolyticus Enterobacter cloacae</i>	PCR positivo para CMV, diarréia, febre	Não
35	550	550	Sim (391)	Sim (391)	Não	-	Plaquetopenia, PCR positivo para CMV Diarréia, febre	Não
36	-	-	Não	Não	Não	-	Assintomático	Não
37	-	-	Sim (27)	Não	Não	-	Assintomático	Não
38	Doador	Doador	Sim (104)	Sim (90)	Não	-	PCR positivo para CMV, plaquetopenia, elevação de enzimas.	Não
39	-	147	Não	Sim (86)	Não	-	PCR positivo para CMV	Não
40	-	Doador, 8, 229	Sim (100)	Não	Sim (25)	<i>Citrobacter</i>	Aumento de enzimas hepáticas, recidiva viral (229)	Não
41	-	Doador	Não	Sim (51)	Não	-	PCR positivo para CMV	Não

* Nas colunas de N-PCR para CMV e HHV-6 os números indicam os dias pós-transplante em que se obtiveram resultados positivos. “Doador” foi encontrado infecção na biópsia do doador (antes do tx). “-” Significa que todos os resultados dos de exame foram negativos. Os números que estão entre parênteses significa os dias pós-transplante.