

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**DETECÇÃO DE CITOMEGALOVIRUS EM PACIENTES COM
RETOCOLITE ULCERATIVA IDIOPÁTICA E NEOPLASIA
COLO-RETAL**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre na área de Imunologia Básica e Aplicada

Aluna: Viviane Casagrande Mariguela

Orientador: Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo

Ribeirão Preto

2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Introdução

1. Introdução

1.1 Citomegalovirus

Os Citomegalovirus (CMV) são um gênero que inclui os maiores membros da família *Herpesviridae*, subfamília *Betaherpesvirinae*. São os mais comuns dentre os patógenos oportunistas que acometem indivíduos imunossuprimidos, causando significativa mortalidade e morbidade (CRUMPACKER, 2000; MOCARSKI, 2001; PASS, 2001). A infecção por CMV é comum em todas as populações humanas, podendo atingir até 100% dos indivíduos. Em geral, o baixo nível sócio-econômico está associado ao aumento na incidência e prevalência desta infecção, o que é demonstrado nos estudos epidemiológicos de países em desenvolvimento (GOODGAME, 1993; JORDAN, 1994; MOCARSKI, 2001; PASS, 2001).

Adquire-se a maioria das infecções por CMV no período perinatal e na infância. Entre indivíduos adultos, a transmissão freqüentemente ocorre por contato sexual. Como todos os Herpesvirus, CMV são capazes de estabelecer infecção latente no hospedeiro após a infecção primária. Os mecanismos que controlam a latência viral ainda não são claros, mas células polimorfonucleares, linfócitos T, células epiteliais do rim, do endotélio vascular e de glândulas salivares podem hospedar CMV em estado não replicativo ou em baixa taxa de replicação. Os indivíduos com infecção latente não apresentam sintomas, mas possuem anticorpos contra CMV (GOODGAME, 1993). A ativação do estado latente pode ocorrer após imunossupressão iatrogênica (como aquela que ocorre após o uso de agentes quimioterápicos), o que é freqüente em casos de

neoplasias e transplantes ou, adquirida, comum em pacientes com AIDS (CRUMPACKER, 2000).

As doenças causadas por CMV apresentam-se em diversas formas clínicas, sendo freqüentemente assintomáticas em hospedeiros imunocompetentes. Em recém nascidos, os CMV causam infecção congênita, que pode ser fatal. Em adultos, os CMV podem produzir síndrome “mononucleose-símile”, idêntica àquela causada pelo vírus de Epstein-Barr. Em pacientes imunocomprometidos, os CMV causam grande número de síndromes clínicas, como coriorretinite, encefalite, esofagite, colite e pneumonite (DREW, 1988; JORDAN, 1994; CRUMPACKER, 2000). O genoma de CMV foi, também, detectado em material da biópsia do intestino de pacientes imunocompetentes com quadro clínico de retocolite ulcerativa (RCU) (BERK *et al*, 1985).

Recentes investigações têm revelado a presença de CMV em tecidos tumorais de neoplasia de cólon, glioma maligno e neoplasia de próstata. Diversos estudos demonstram a presença de fragmentos genômicos e proteínas dos CMV em células de neoplasias sólidas, estando estes restritos à área tumoral, não havendo acometimento de tecidos adjacentes normais (HARKINS, 2002; CINATL, 2004). Assim, poder-se-ia supor que produtos gênicos de CMV promoveriam mutagêneses, progressão do ciclo celular, angiogênese, invasão celular e evasão imune (HARKINS, 2002).

Por definição, infecção primária por CMV é aquela que ocorre em pacientes não expostos previamente ao contato viral. A infecção secundária é definida quando ocorre reativação de uma infecção latente. Por fim, superinfecção é definida como aquela em que um mesmo indivíduo infecta-se com várias cepas genotipicamente diferentes de CMV. A citomegalovirose, como doença, pode resultar de infecções do tipo primária, secundária ou de superinfecções, estando associada a uma infecção ativa, ou seja,

aquela em que o vírus encontra-se replicando no organismo. Nas formas clinicamente caracterizadas e diagnosticadas das infecções primárias por CMV, a doença manifesta-se com maior gravidade. Nestes indivíduos, observam-se títulos de anticorpos elevados que estão correlacionados à alta atividade de replicação viral. Infecções congênicas são, comumente, conseqüentes à infecção primária da mãe durante a gravidez (CRUMPACKER, 2000).

A infecção pelo CMV é mais comum que a doença citomegálica e a maioria dos indivíduos previamente expostos a CMV tem estes vírus em estado latente em vários órgãos, sem que haja evidencia de dano tecidual. Em mulheres grávidas, é alta a freqüência de viremia assintomática intermitente, não associada à lesão tecidual ou doença, demonstrada pelo isolamento do agente em cultura de células (YAMAMOTO *et al*, 2001). Em pacientes imunodeficientes, a infecção por CMV pode ser detectada em glândulas salivares, rim e urina, no entanto, observa-se ausência de dano tecidual nesses órgãos (GOODGAME, 1993). Em indivíduos assintomáticos, os CMV podem ser detectados na urina, saliva, lágrima, sêmen e secreção cervical por meses a anos. Alta taxa de infecção ocorre pelo contato com fluidos corporais contendo CMV, entre parceiros sexuais, crianças em creches e em idade pré-escolar (PASS, 2001). Indivíduos receptores de órgãos são, também, populações de risco para infecções por CMV (PASS, 1985; JORDAN, 1994; CRUMPACKER, 2000; MOCARSKI, 2001; PASS, 2001).

1.2. Estrutura viral

Os CMV medem de 150 a 200 nm (WRIGHT *et al*, 1964), apresentam capsídeo icosaédrico contendo 162 capsômeros (JORDAN, 1994), envolto por um tegumento ou matriz. As partículas virais possuem genoma em fita dupla de DNA de 240 kilobases, que codifica 35 proteínas estruturais, (MOCARSKI, 2001) e proteínas não estruturais em número ainda não definido. Dentre as proteínas estruturais conhecidas dos CMV, cinco são identificadas no capsídeo viral, sendo três as mais importantes, a MCP (*major capsid protein*) ou UL86 com 150 a 155 kilo Dalton (Kda), a mCP (*minor capsid protein*) ou ppUL46 com 11 Kda e a ppUL80 (proteína do capsídeo imaturo e de partículas defectivas) com 36 a 38 Kda. Essas proteínas, durante a infecção, induzem resposta imune humoral específica. Na matriz encontram-se pelo menos 4 proteínas distintas: a ppUL32 ou pp150 (proteína fosforilada altamente imunogênica) com 150 KDa, a ppUL83 ou pp65 (*lower matrix protein*), a ppUL99 ou pp28 (proteína antigênica) e a ppUL82 ou pp71 (*upper matrix protein*) que são consideradas as proteínas mais imunogênicas destes vírus (Figura 1).

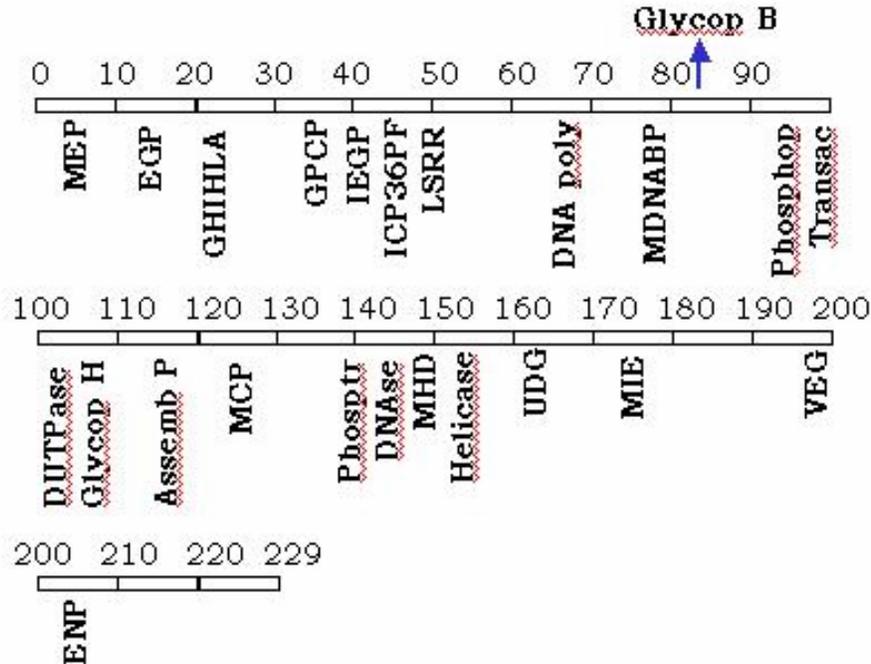


Figura 1: Esquema do genoma dos CMV (cepa AD169), com 229.354 pares de bases, localizando genes codificadores de suas principais proteínas. (pares de bases x 1000). **MEP** – *Major early protein* (3783-4294); **EGP** – *Early glycoprotein* (13464-13922); **GHIHLA** – *Glycoprotein homologus to class 1 HLA* (23637- 24743); **GPCR** – *G protein coupled receptor* (43251-44423); **IEGP** – *Immediate early glycoprotein* (55211-59373); **DNApoly** – *DNA polimerase* (76903-80631); **GlycopB** – *Glycoprotein B* (80772-83492); **MDNABP** – *Major DNA binding protein* (86574-90281); **Phosphop** – *Phosphoprotein* (96315-96620); **Transac** – *Transactivator* (98199-100433); **dUTPase** – *Deoxy uraciltriphosphatase* (104555-105720); **GlycopH** – *Glycoprotein H* (107901-110132); **AssembP** – *Assembly protein* (116203-117324); **MCP** – *Major capsid protein* (124183-128295); **Phosptr** – *Phosphotransferase* (140484-142607); **DNase** – *DNase* (142701-144455); **MHD** – *Multiple hydrophobic domains* (145226-146340); **Helicase** – *Helicase* (151926-154796); **UDG** – *Uracil DNA glycosilase* (162970-163722); **MIE** – *Major immediate early protein* (171009-172225); **VEG** – *Virion envelope glycoprotein* (199080-199637); **ENP** – *Early nuclear protein* (209871-211652).

Os CMV possuem uma estrutura genômica com presença, em suas duas extremidades, de seqüências repetidas. Estas seguem orientação invertida e justaposta internamente, o que divide o genoma em duas seqüências, uma longa (UL-*Unique Long*) e uma curta (US – *Unique Short*), ambas únicas e limitadas por seqüências repetitivas

terminais (ab, ca). A junção entre os componentes UL e US é composta de seqüências repetitivas internas (b'a', a'c') (Figura 2) (MOCARSKI, 2001).

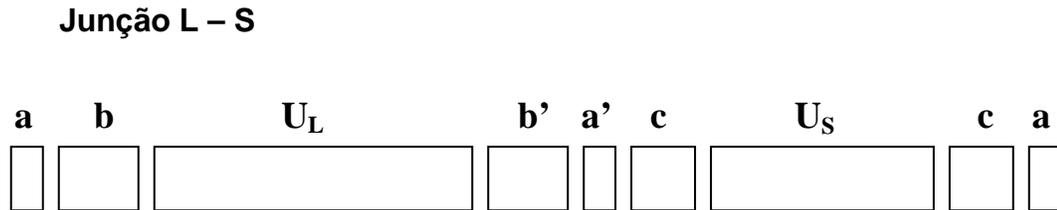


Figura. 2: Organização do genoma dos CMV com seqüências repetidas numa orientação invertida e justaposta internamente o que divide o genoma em duas seqüências, uma longa (UL-Unique *Long*) e uma curta (US – *Unique Short*), ambas únicas e limitadas por seqüências repetitivas terminais (ab, ca). A junção entre os componentes UL e US é composta de seqüências repetitivas internas (b'a', a'c').

O envelope viral, composto de bicamada lipídica, é adquirido da membrana nuclear da célula infectada, durante o processo de maturação do vírus (CHEE *et al.*, 1990). Trata-se de envelope complexo e pleomórfico, composto por 8 glicoproteínas, estando entre as mais importantes a glicoproteína B (gB) e a glicoproteína H (gH) (Figura 3) (MOCARSKI, 2001).

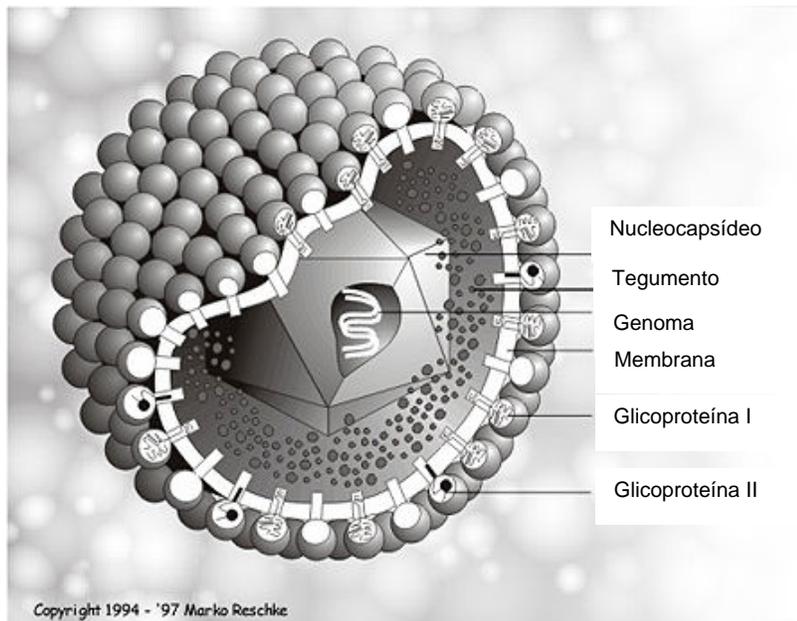


Figura 3. Esquema da partícula de CMV e sua estrutura molecular.

A replicação dos CMV é relativamente lenta, se comparada a de outros vírus da mesma família, podendo variar de 48 a 72 horas. Este processo replicativo envolve a expressão de sucessivas seqüências de genes e síntese das proteínas correspondentes. Após a fusão do envelope com a membrana plasmática, o capsídeo viral é transportado até o núcleo celular onde ocorre sua transcrição e a replicação do material genético. O processo replicativo pode ser dividido em três fases, com base no aparecimento seqüencial de classes diferentes de proteínas virais. A primeira fase, denominada α ou precoce imediata, começa aproximadamente 12 horas após a entrada do vírus na célula, quando há a síntese de proteínas regulatórias. Neste período, ocorre a transcrição restrita de fragmentos específicos de DNA genômico e a síntese de proteínas tais como IE72 e IE86. Estas proteínas têm papel na regulação, inibição da apoptose e modulação da expressão do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I. Tais mecanismos permitem ao vírus controlar a síntese de macromoléculas na célula

hospedeira. Na fase precoce imediata surgem, também, os antígenos chamados precoces imediatos, que são proteínas regulatórias necessárias à multiplicação do DNA viral (SUNSKY *et al.*, 1983; STENBERG *et al.*, 1984; MOCARSKI, 2001; LANDOLFO *et al.*, 2003). A segunda fase, denominada β ou precoce, perdura por, no mínimo, 24 horas e inclui a transcrição e a duplicação de grande parte do material genético viral. As proteínas necessárias à replicação do genoma, como a DNA polimerase, são sintetizadas nesta fase. A última fase, denominada γ ou tardia, ocorre 36 a 48 horas após a infecção viral e nela são produzidas as proteínas estruturais. Nesta fase, ocorre também, a montagem e a liberação dos novos *virions* (Figura 4) (STAGNO, 1975; MERINGAN & RESTA 1990; THE *et al.*, 1992; MOCARSKI, 2001).

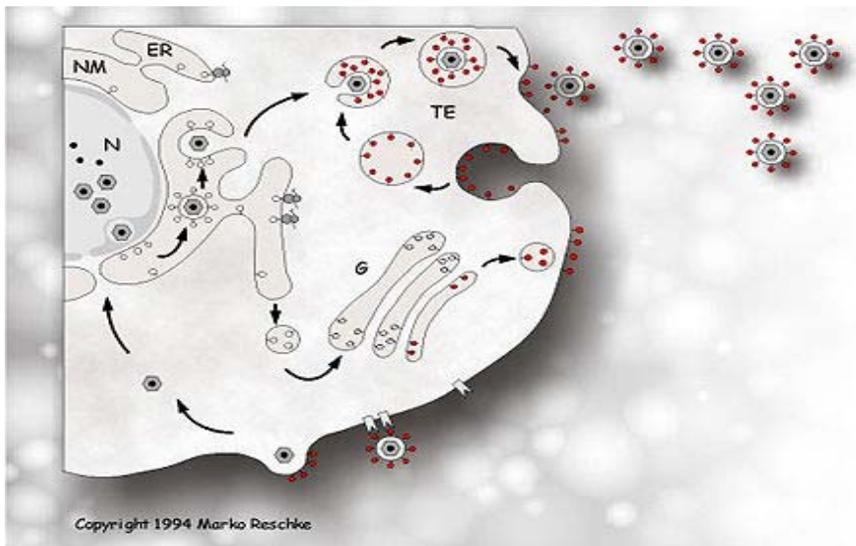


Figura 4. Esquema representativo do ciclo replicativo do CMV, incluindo as fases de entrada, replicação, montagem e liberação de novas partículas virais.

1.3. Métodos diagnósticos da citomegalovirose

1.3.1. Histopatologia

A replicação de CMV no interior de células fibroblásticas humanas, *in vitro*, leva a alteração na morfologia externa destas células, as quais passam a assumir padrão arredondado diferente de sua característica fusiforme tradicional. Este evento é denominado efeito citopático (CPE) (Figura 5a), que pode ser evidenciado em culturas de células. Em tecidos, observa-se, em consequência da infecção por CMV, aumento no volume celular e presença de inclusões intranucleares basofílicas. Estas inclusões são conhecidas como “olho de coruja” pois apresentam halo rodeando a membrana nuclear (Figura 5b) (BRITT & ALFORD, 1996). A presença de células contendo inclusão citomegálica é utilizada no diagnóstico da infecção por CMV em exames histopatológicos. Este método tem por inconveniente ser invasivo, bem como demandar tempo maior, se comparado ao de outros métodos, como a antigenemia e a PCR. Em tecido, também, pode haver regiões no corte histológico onde as inclusões citomegálicas não se fazem presentes em níveis detectáveis. Além disso, o exame histopatológico tem interpretação subjetiva, o que, junto com as limitações técnicas pode resultar, portanto, em falsos negativos.

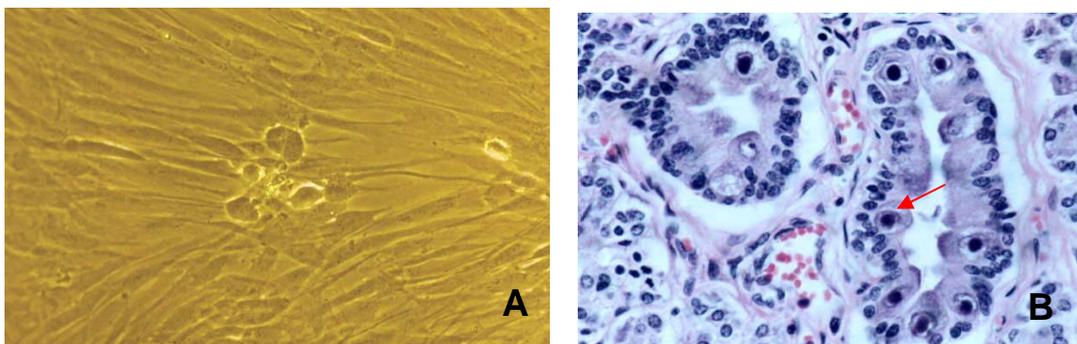


Figura 5. Fotomicrografias mostrando efeito citopático do CMV em cultura de fibroblastos humanos, caracterizado pelo arredondamento destas células, que são comumente

fusiformes e alongadas (A). Mostram, também, e as inclusões citomegálicas (seta) em glândula salivar, que são conhecidas como “olho de coruja” (B).

1.3.2. Antigenemia e Imunohistoquímica

A presença de antígenos de CMV em células mononucleares ou tecidos pode ser especificamente detectada por antigenemia ou por imunohistoquímica respectivamente, utilizando anticorpos monoclonais C-10 e C-11, específicos para a fosfoproteína pp65 (Figura 6), que se localiza na matriz viral. Juntamente com a proteína pp150, a pp65 é a proteína mais abundantemente sintetizada durante a fase de replicação dos CMV. Por ser altamente imunogênica e indicar replicação viral, a pp65 é utilizada como antígeno alvo para o diagnóstico de CMV (MOCARSKI, 2001). A detecção dos anticorpos ligados ao antígeno é, em seguida, revelada por técnicas de imunofluorescência ou imunoperoxidase, podendo, desta forma, ser quantificado o número de leucócitos infectados.

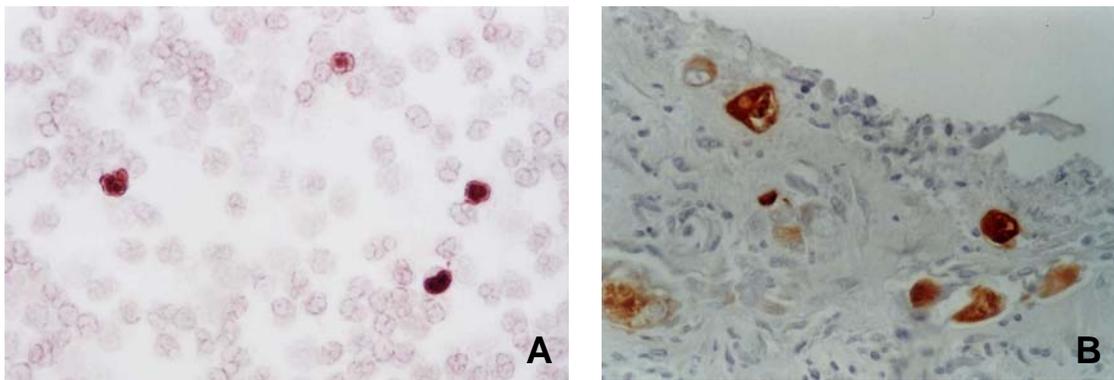


Figura 6. Fotomicrografia de antigenemia (A) e imunohistoquímica (B) evidenciando em marrom avermelhado os antígenos específicos do CMV.

1.3.3. PCR (Reação em cadeia pela polimerase)

A PCR, inicialmente descrita por Saiki *et al* (1985), é utilizada para que se obtenha amplificação exponencial *in vitro* de um fragmento de DNA. No caso de CMV,

pode-se amplificar o gene da glicoproteína B (gB) para detecção da presença viral na amostra. O produto pode ser facilmente observado em gel de agarose, à luz ultravioleta, após coloração com brometo de etídio, depois da corrida eletroforética.

A PCR permite amplificar uma região do genoma viral definida por seqüências denominadas *primers* que se ligam às extremidades 5' de cada uma das fitas do DNA. A enzima responsável pela polimerização dos nucleotídeos é chamada de Taq DNA polimerase, sendo termoestável e tendo a temperatura ideal de atuação de 72°C.

Por ser uma técnica muito sensível e que detecta ínfimas quantidades de DNA, pode haver dificuldade em distinguir a infecção por citomegalovirus da doença citomegálica, com o uso desta metodologia.

1.4. Citomegalovirose e Retocolite Ulcerativa Idiopática

A retocolite ulcerativa idiopática (RCU) é uma doença crônica, de natureza inflamatória e etiologia desconhecida, que acomete o reto e pode se estender por todo o cólon. Caracteristicamente, envolve a mucosa de forma circunferencial e ininterrupta (JEWEL, 1998; STENSON, 1999).

Acomete pessoas de ambos os sexos, predominantemente adultos jovens entre 20 e 40 anos, tendo outro pico de incidência entre os 55 e 65 anos de idade (JEWEL, 1998; STENSON, 1999). Trata-se de uma doença universal, cuja prevalência mundial vem aumentando no decorrer das últimas décadas (EKBOM *et al*, 1991; IRVINE *et al*, 2000).

O sintoma predominante da RCU é a diarreia com sangue, associada ao tenesmo e à urgência fecal. Sintomas gerais como fadiga, febre e perda de peso, estão

presentes, mais freqüentemente, quando há maior extensão da doença. O curso clínico é marcado por episódios de exacerbações e de remissões, espontâneas ou induzidas por tratamento clínico (MEYERS *et al*, 1989; JEWEL, 1998; STENSON, 1999).

Mais comumente, a RCU segue um curso intermitente marcado por períodos de quiescência, interpostos por períodos de reagudizações, que podem durar semanas ou até meses (WATTS *et al*, 1996). Durante estes episódios de doença ativa, os sintomas usualmente limitam as atividades diárias do paciente e repercutem no trabalho e na vida pessoal, piorando a qualidade de vida. Nos períodos de remissão, em geral, os pacientes voltam à vida normal, embora muitos relatem modificações no estilo de vida, motivadas pela ansiedade e pelo medo de novos ataques agudos (HENDRICKSEN *et al*, 1980; IRVINE *et al*, 1994).

O tratamento dos pacientes portadores de RCU inclui orientações dietéticas, medidas de suporte geral, especialmente, o uso de drogas antiinflamatórias e imunossupressoras, como os aminossalicilatos, os corticosteróides, a azatioprina e a ciclosporina (TRUELOVE *et al*, 1956; JEWEL, 1998; STENSON, 1999).

A RCU pode se complicar com hemorragia, perfuração intestinal, formação de pseudopólipos e ocorrência de megacólon tóxico, sendo este o maior responsável pelos óbitos (JEWEL, 1998; STENSON, 1999).

Seja pela imunossupressão adotada como terapêutica, seja pelo fato de a mucosa inflamada promover uma solução de continuidade favorável à invasão de diversos patógenos, a RCU pode ser complicada por infecções locais e sistêmicas, podendo evoluir para a sepse. Vários agentes têm sido implicados nestes quadros, e dentre eles a *Salmonella*, a *Shigella*, o *Campylobacter* e o *Clostridium* (JEWEL, 1998; STENSON, 1999). Mais recentemente tem sido descrita a infecção por CMV associada a

RCU, podendo ter relevância especial no que se refere à gravidade e a evolução clínica dos pacientes (GOODGAME, 1993; STENSON, 1999).

Em 1961, publicou-se o primeiro relato de caso associando RCU e CMV (POWELL, 1961). Desde então, relataram-se vários casos e vem se buscando entender o papel dos CMV na patogênese da RCU (BERK, 1985; EYRE-BROOK, 1986; DIEPERSLOOT, 1990; VEGA, 1999; COTTONE *et al*, 2001; PFAU *et al*, 2001). No entanto, o conhecimento sobre as possíveis inter-relações entre esta infecção viral e a RCU é muito limitado.

1.5. Citomegalovirus e neoplasia colo-retal

A neoplasia colo-retal é a terceira mais comum e a segunda mais letal das afecções neoplásicas que ocorrem em países industrializados (HARKINS, 2002). Acomete homens e mulheres com idade acima de 40 anos. Estudos epidemiológicos sugerem que fatores ambientais e características genéticas do indivíduo podem contribuir para o surgimento deste câncer (COHEN, 1993; HARKINS, 2002).

A carcinogênese da neoplasia colo-retal inclui um complexo processo multifatorial, resultante de alterações genéticas e ambientais. Estas alterações podem gerar mutações em duas classes de genes: os oncogenes (*K-ras*, *C-myc*, *C-src*), reguladores positivos do crescimento celular, que são ativados por mutações somáticas em um único alelo, e os genes supressores de tumor (*p53*, *pRb*, *MCC*, *APC*), genes recessivos que requerem perda ou inativação de ambos os alelos para produzir um fenótipo (GUILLEM, 1995).

Os sintomas da neoplasia colo-retal variam de acordo com a localização do tumor. No cólon proximal (ou direito), comumente observa-se desconforto abdominal, presença de massa palpável, anemia por deficiência de ferro ou, somente, a perda de peso. Lesões colônicas proximais podem, também, alterar o hábito intestinal, produzindo sintomas obstrutivos ou a presença de sangue nas fezes. Por sua vez, o câncer retal pode causar diarreia, sangramento vivo e aparecimento de muco nas evacuações. Tumores maiores podem causar um freqüente desejo de evacuar, com passagem de poucas fezes e uma sensação de evacuação incompleta (ROEDIGER, 1999).

Embora a causa precisa da neoplasia colo-retal não seja bem conhecida, na maioria dos casos, muitos fatores de risco são claramente identificados como: doença intestinal pré-existente (doenças intestinais inflamatórias), história familiar (parentes de primeiro grau com esta doença), fatores dietéticos (ingestão de muita carne e gordura, e de poucas fibras) e, por fim, a constituição genética do indivíduo que pode levar a uma condição denominada Polipose Adenomatosa Familiar, que se associa a mutações em genes importantes (ROEDIGER, 1999).

Os CMV são hábeis em catalisar o processo oncogênico, modificando a biologia das células neoplásicas e, desta forma, podem acelerar as vias de desenvolvimento tumoral. Este fenômeno é diferente da transformação celular, o que exclui o CMV da lista dos vírus com capacidades oncogênicas (CINATL *et al*, 2004 e CINATL JR *et al*, 2004).

As características de latência, infecção persistente e expressão de CMV em células epiteliais colônicas poderiam ser importantes na promoção de eventos oncogênicos diretamente implicados na progressão maligna. A infecção por CMV ativa proto-oncogenes celulares, ciclinas, e quinases envolvidas nos caminhos mitogênicos e de sobrevivência celular (CINATL JR, 2004). A infecção de células tumorais por CMV

pode, também, induzir o aumento de expressão da proteína Bcl-2, que é sintetizada pelo proto-oncogene regulador da apoptose *bcl-2*, o que confere resistência a sinais apoptóticos durante a progressão do tumor (KIEFF, 1998; HARKINS, 2002; CINATL, 2004;).

Sabe-se que os produtos do gene UL111A de CMV podem transformar células *in vitro* e desregular o controle do ciclo celular, interrompendo a transcrição da p53 ou inativando esta proteína. Os produtos gênicos virais imediatamente precoces IE1-72 e IE2-86 podem, também, desregular o controle de iniciação do ciclo celular, por interação com proteínas supressoras de tumor p53 e pRb (HARKINS, 2002; CINATL, 2004; CINATL JR, 2004).

Os CMV são, também, capazes de se evadirem do sistema imune, codificando produtos gênicos que bloqueiam a síntese e a expressão de moléculas do complexo MHC de classe I e classe II, o que dificulta a função das células T CD8 e NK. Desta forma, favorecem o crescimento do tumor (LOENEN, 2001; HARKINS, 2002; CINATL, 2004; CINATL JR, 2004).

A infecção por CMV pode desregular o balanço angiogênico, aumentando a produção de numerosos ativadores e diminuindo a produção de inibidores da angiogênese (HARKINS, 2002; CINATL, 2004; CINATL JR, 2004).

Desta forma, o CMV pode atuar como oncomodulador da progressão tumoral, alterando mecanismos celulares importantes e relevantes para a patogênese da neoplasia colo-retal (HUANG, 1978; SHEN, 1996; KIEFF, 1998; DONIGER, 1999; LOENEN, 2001; HARKINS, 2002; KALEJTA, 2003; CINATL, 2004; CINATL JR, 2004).

No entanto, os estudos sobre uma possível relação entre a infecção por CMV e neoplasia colo-retal ainda são muito limitados e divergentes.

Objetivos

2. Objetivos

Determinar as possíveis associações de CMV com RCU e com Neoplasia Colo-Retal, em pacientes, utilizando a PCR e a imunohistoquímica como métodos diagnósticos de infecção viral.

2.1. Objetivos específicos:

- verificar pela PCR a presença de CMV no sangue e em tecido de pacientes com RCU e com Neoplasia colo-retal, analisando os resultados obtidos nestes dois tipos de amostras clínicas;
- comparar as taxas de detecção de CMV no sangue e em tecido de pacientes portadores de RCU e de neoplasia colo-retal com as observadas em pacientes-controle;
- utilizando imunohistoquímica, verificar a presença de antígenos de CMV em biópsias retais de pacientes com RCU e de portadores de neoplasia colo-retal.

Materials e Métodos

3. Materiais e Métodos

Este trabalho foi realizado no Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

3.1. Casuística

Participaram deste estudo 3 grupos de pacientes: com retocolite ulcerativa (RCU), com neoplasia colo-retal e pacientes-controle.

O grupo com RCU incluiu pacientes em seguimento no ambulatório de doenças inflamatórias intestinais (AGADI) da Divisão de Gastroenterologia do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP no Hospital das Clínicas (HC) desta instituição. Do grupo com RCU, participaram 21 pacientes, estudados entre março de 2002 e maio de 2003. Destes, 12 (57,15%) eram do sexo masculino, com idade variando entre 18 e 62 anos, média de 38 anos e 9 (42,9%) eram do sexo feminino, com idade variando entre 29 e 54 anos e média de 44,8 anos. Os dados destes pacientes foram obtidos por entrevista no momento da coleta das amostras, bem como por revisão de seus prontuários. Os pacientes foram considerados imunossuprimidos quando estavam utilizando como medicamentos azatioprina (4 pacientes) e/ou corticosteróide sistêmico (5 pacientes), por mais que 3 meses antes da coleta das amostras para estudo. Os dados pessoais e clínicos dos pacientes deste grupo encontram-se apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Dados pessoais e clínicos dos pacientes com RCU participantes do estudo.

Paciente	Registro	Gênero	Idade	Extensão da Doença	Imunossupressão*
MMB	0454445J	M	30	Pancolite	Sim
DPP	0419344C	M	42	Pancolite	Não
JM	0431391H	M	18	Colite distal	Sim
EAA	0484539I	M	45	Colite esq	Sim
CDLS	0480131I	M	45	Colite esq	Não
EMR	0417643B	F	51	Colite esq	Não
BR	0237523C	M	40	Pancolite	Sim
ELZ	0473467F	F	37	Colite esq	Sim
MHLC	0537384D	F	50	Colite esq	Não
ACS	0437344A	M	31	Colite esq	Não
JDF	0619111I	F	35	Colite distal	Sim
JLS	0621752F	M	26	Colite distal	Sim
CAPR	0306488K	F	53	Colite esq	Não
INO	0340223D	F	54	Pancolite	Não
MME	0580805A	M	29	Pancolite	Não
MNAR	0083432I	F	48	Pancolite	Não
NRP	0312624F	M	42	Pancolite	Não
EDP	0495246J	M	34	Pancolite	Não
JCGA	0582941A	M	62	Pancolite	Não
APSL	0644643G	F	29	Pancolite	Não
SDBB	0534626A	F	46	Colite distal	Não

- F = feminino, M = masculino.
- Colite esq = colite esquerda
- *Usando azatioprina há mais de 3 meses e/ou corticóide sistêmico
- Registro é o número do paciente no Hospital das Clínicas

O grupo com neoplasia colo-retal incluiu 14 pacientes em seguimento no HC, sob responsabilidade da disciplina de Proctologia do Departamento de Cirurgia e Anatomia da FMRP-USP e que sofreram cirurgia para retirada do tumor, entre janeiro e maio de 2004. Destes, 9 (64,3%) eram do sexo masculino, com idades entre 37 e 89 anos, média de 62,5 anos e 5 (35,7%) eram do sexo feminino, com idade entre 72 e 84 anos, com média de 75,2 anos. Os dados pessoais e clínicos dos pacientes deste grupo encontram-se apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Dados pessoais e clínicos do grupo dos pacientes com neoplasia colo-retal.

Paciente	Registro	Gênero	Idade	Diagnóstico
IK	0682570B	M	37	Adenocarcinoma de cólon
JMO	0649595B	M	60	Adenocarcinoma de reto-sigmóide
ACS	0543378F	M	56	Adenocarcinoma recidivado reto
RGC	0433941K	M	62	Adenocarcinoma de reto
AM	0265719F	M	89	Adenocarcinoma de reto
MASCB	0683818F	F	74	Adenocarcinoma de reto
ATM	0668456J	F	69	Adenocarcinoma retossigmóide
MFM	0092255G	F	84	Adenoma tubular com displasia de alto grau
MCFM	0691055K	F	72	Adenocarcinoma de cólon
AM	0530248G	M	82	Adenocarcinoma de reto
FGF	0473295G	M	64	Adenocarcinoma de cólon
MJC	0056160F	F	69	Adenocarcinoma de reto
JMG	0687493E	M	74	Adenocarcinoma de reto
MP	0692345H	M	38	Adenocarcinoma de cólon

- F = Feminino e M = Masculino
- Registro é o número do paciente no Hospital das Clínicas

Do grupo de pacientes-controle, participaram 12 indivíduos em seguimento nos ambulatórios da Divisão de Gastroenterologia do Departamento de Clínica Médica da FMRP-USP. Eram pacientes com alterações do hábito intestinal, submetidos a retossigmoidoscopia, onde os resultados desse exame, mais os dados da avaliação clínica e laboratorial excluíram doença inflamatória intestinal e neoplasias. Destes, 6 (50%) eram do sexo masculino com idade variando entre 35 e 58 anos, com média de 44,17% anos e 6 (50%) eram do sexo feminino com idade variando entre 28 e 65 anos, com média de 48,17% anos. Os dados pessoais e clínicos dos pacientes deste grupo encontram-se apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Dados pessoais e clínicos do grupo dos pacientes-controle.

Pacientes	Registro	Gênero	Idade	Diagnóstico
AMS	0521747K	M	44	Doença Hemorroidária
TMG	0308070F	F	49	Doença Hemorroidária
JSVS	0612214D	F	55	Esquistossomose Hepatoesplênica
VL	0603684A	M	39	Diarréia Crônica Intermitente (álcool)
MJAR	0621860A	M	38	Fissura Anal
IPS	0626223I	M	58	Doença Hemorroidária
RBSA	0588929B	F	45	Diarréia Funcional
LCC	0630909E	M	35	Intolerância a Lactose
EJO	0639868B	F	28	Doença Hemorroidária e Síndrome do Intestino Irritável
JCS	0315479A	M	51	Diarréia por Disautonomia Diabética
JTSM	0513909I	F	65	Incontinência Fecal (Linfoma de Hodgkin)
MAOM	0232413B	F	47	Diarréia por Disautonomia Diabética

- F = Feminino e M = Masculino
- Registro é o número do paciente no Hospital das Clínicas

Participaram do estudo apenas os pacientes que concordaram, assinando um termo de consentimento após esclarecimento sobre os procedimentos a que seriam submetidos, conforme protocolo aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da FMRP-USP (HCRP nº 3285/2002 e nº 1902/2002).

3.2 Coleta de amostras clínicas e preparo do material

Foram coletadas amostras de sangue total, num volume médio de 5mL, por punção em veia braquial, utilizando metodologia de vácuo, em tubos contendo EDTA. Essas amostras tiveram seus polimorfonucleares separados pelo uso de dextrana a 2%, visando à extração do material genômico destas células. Para tanto, o sangue total foi transferido para tubo cônico de 15 mL visando à separação do creme leucocitário. Para tanto, adicionou-se 1,5 mL de dextrana 2%, incubou-se a 37° C por 1 hora (h) e coletaram-se os leucócitos presentes no sobrenadante com pipeta Pasteur. Este sobrenadante foi lavado por duas vezes com 10 mL de PBS (8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na₂HPO₄, 0,24 g de KH₂PO₄ em volume de 1L de água, com pH 7.4), em tubo cônico de 15 mL, alternando lavagens e centrifugações a 3000 rpm, por 7 minutos (min). Ao final, o precipitado contendo as células leucocitárias foi suspenso em 200 µL de solução tampão de lise (900mL de H₂O + 7,7g de NH₄CL 0,16M + 100mL de H₂O + 2,06g de tris 0,17M) e, a seguir, foi submetido à extração do DNA por método de coluna de troca iônica.

Os materiais de tecido entérico do grupo dos pacientes com RCU, bem como dos pacientes-controle, foram coletados do reto durante exame endoscópico

(retosigmoidoscopia). O material dos pacientes com neoplasia colo-retal foi colhido durante a cirurgia para a retirada do tumor.

Para encontro do genoma de CMV, os fragmentos de tecidos biopsiados foram acondicionados em tubos contendo soro fisiológico, que foram levados ao laboratório em banho de gelo, sendo imediatamente processados para a extração do material genético.

3.3. Extração do DNA

Para extração do DNA leucocitário utilizou-se coluna de troca iônica da marca QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Alemanha), seguindo-se as recomendações do fabricante.

Os materiais de biópsia foram congelados em nitrogênio líquido e, em seguida, triturados em gral e pistilo. Para extração do DNA, foi utilizado o método por fenol/clorofórmio (SAMBROOK *et al*, 1989). Assim, depois de macerado, o material foi diluído em 500 μ L de solução tampão de lise (900mL de H₂O + 7,7g de NH₄CL 0,16M + 100mL de H₂O + 2,06g de Tris 0,17M) e 5 μ L de proteinase K foram adicionados; então, incubou-se a mistura por 2 h, a 55°C. Adicionaram-se 500 μ L de fenol e a mistura foi centrifugada por 2 min a 13000 rpm. O sobrenadante foi retirado e nele adicionaram-se 500 μ L de clorofórmio, misturou-se e centrifugou-se por 2 min, a 13000 rpm. Retirou-se novamente o sobrenadante e foram adicionados 25% do seu volume total com uma solução de acetato de sódio (3M pH 7.0 – 8.0), incluindo, também, 3 vezes este volume total, com etanol a 100%, gelado.

A mistura foi incubada a - 70°C *overnight* e depois centrifugada a 4°C por 30 min, a 13000 rpm. Removeu-se o sobrenadante e o precipitado foi centrifugado por duas

vezes com etanol a 70%, a 13000 rpm por 3 min. Em seguida, o material foi secado em aparelho *speed vac*, por 5 min e então ressuspensão em 500 μ L de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) (Sigma, USA).

3.4. PCR e *nested*-PCR

Esta técnica vem sendo utilizada há vários anos na Unidade Multidepartamental de Pesquisa em Virologia, FMRP-USP, onde se realizou este trabalho (AQUINO *et al*, 1998; YAMAMOTO *et al*, 1998; AQUINO *et al*, 2000; CUNHA *et al*, 2001; MARIN *et al*, 2001; YAMAMOTO *et al*, 2001). O extrato de DNA leucocitário, bem como aquele oriundo do tecido entérico, foi submetido a PCR visando à detecção do genoma de CMV. Para tanto, preparou-se uma mistura de reação contendo: 1 μ g do DNA da amostra clínica, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl (pH 9), 3 mM de MgCl₂, 50 μ M de cada dNTPs, e 0,3 μ M do par de *primers* gB1 e gB2 mostrados na Tabela 4, em volume final de 50 μ L completado com água DEPC. A mistura foi submetida a 95°C, por 3 min, em ciclador térmico (Techne, Inglaterra) e, logo após, com temperatura reduzida para 80°C, acrescentou-se uma unidade de Taq DNA polimerase (Gibco, USA). Em seguida, foram realizados 15 ciclos de 60 segundos (seg) a 94°C, 120 seg a 65°C e 120 seg a 72°C, seguidos por mais 30 ciclos de 60 seg a 94°C, 90 seg a 55°C e 120 seg a 72°C, incluindo ao final uma extensão de 3 min a 72°C. A mistura de reação foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 2% tratado com brometo de etídeo e os *amplicons* apresentando 296 pares de base (pb) foram visualizados como bandas à luz ultravioleta. O tamanho das bandas foi determinado por comparação com marcador para peso molecular com escada de 100 pares de bases (pb) (Amersham farmacia, USA).

Uma *nested-PCR* com os *primers* internos gBN1 e gBN2, mostrados na Tabela 5, foi realizada visando aumentar a sensibilidade do teste. A mistura de reação da *nested-PCR*, preparada como descrito para a PCR, foi submetida a 30 ciclos de 60 seg a 95°C, 60 seg a 65°C e 180 seg a 72°C. Os produtos desta *nested-PCR*, com 100pb, foram observados como antes descrito.

Realizou-se, também, uma PCR com *primers* para a β -globina humana, visando detectar nas amostras clínicas, resultados falso-negativos eventualmente causados por problemas na purificação do DNA, ou pela presença de inibidores da Taq DNA polimerase. As seqüências destes *primers* são mostradas na Tabela 6 (GREER, 1990). A mistura de reação da PCR para a β -globina foi preparada como descrito para a PCR de CMV sendo submetida a 40 ciclos de 60 seg a 95°C, 60 seg a 55°C, 120 seg a 72°C e 5 min a 72°C para extensão. Os produtos desta PCR para β -globina, com 536pb, foram observados como antes descrito.

Tabela 4: Seqüência dos *primers* utilizados na PCR que evidencia *amplicon* do gene gB de CMV com 296 pb.

Primers	Seqüência	Localização no genoma do CMV
GB1	5' GAAACGCGCGGCAATCGG 3'	81874 a 81891
GB2	5' TGGAAGTGGAACTTTGGC 3'	82158 a 82176

Tabela 5: Seqüência dos *primers* internos utilizados na *nested-PCR* que evidencia o *amplicon* interno do gene gB de CMV com 100pb.

Primers internos	Seqüência	Localização no genoma do CMV
GBn1	5' GCGCCGTTGATCCACACACC 3'	81960 a 81979
GBn2	5' TACGCCAGCTGCAGTTTAC 3'	82036 a 82055

Tabela 6. Seqüência dos *primers* utilizados na PCR que evidencia *amplicon* da β -globina com 536 pb.

Primers β-globina	Seqüência
KM29	5' GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG 3'
RS42	5'GCTCACTCAGTGTGGCAAAG 3'

3.5. Detecção antigênica de CMV em cortes de tecido entérico

As biópsias de tecido entérico obtidas do grupo de pacientes com RCU e do grupo dos pacientes-controle foram analisadas no Departamento de Patologia da FMRP-USP. Para tanto, os antígenos de CMV foram visualizados após coloração imunohistoquímica utilizando anticorpos monoclonais contra CMV.

O material coletado de tecido entérico dos pacientes com neoplasia colo-retal foram incluídos na resina histológica *Tissue-tek* (Jung Tissue Freezing Medium, Alemanha), congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -70°C , até a realização dos cortes histológicos. Em seguida, utilizando micrótomo, obtiveram-se cortes de 10 μm destes tecidos, que foram fixados sobre lâminas de microscópio, por 10 min, em acetona gelada, à temperatura de -20°C . Para a detecção dos antígenos de CMV, as lâminas contendo os cortes foram fixadas em acetona, por 5 min e lavadas em PBS, por 5 min. Em seguida, as lâminas foram incubadas por 45 min, a 37°C , com 50 μL do anticorpo monoclonal, que identifica a proteína pp65 de CMV (Clonab, Biotest, Alemanha). A seguir, após lavagem por 3 vezes com PBS, adicionaram-se 50 μL de um conjugado de imunoglobulina anti-IgG de camundongo com peroxidase (Sigma, USA), sendo o material incubado por 45 min, a 37°C . Em continuação, as lâminas foram lavadas por 3 vezes com PBS, durante 5 min, secadas e incubadas por 8 min, em câmara escura, com o

substrato de peroxidase AEC (3-Amino-4-Etilcarbazol, Sigma), contendo, também, 1 μ L de H₂O₂. Este substrato, quando oxidado na presença de antígeno de CMV, oferece coloração acastanhada típica. As lâminas foram transferidas para cuba contendo solução tampão acetato (para interromper a ação da peroxidase-endógena), por 10 min, lavadas com água destilada por 3 vezes, durante 5 min e coradas com hematoxilina de Mayer, durante 15 seg. Finalmente, as lâminas foram lavadas em água corrente, para remover excesso de corante e montadas com glicerina e lamínula. A leitura do teste foi realizada em microscópio óptico comum, buscando no tecido por células contendo núcleo ou membrana perinuclear corados em vermelho amarronzado. Todas as leituras foram feitas desconhecendo-se a procedência da amostra.

3.6. Análise estatística dos dados

Para a análise dos dados e comparação entre os grupos de pacientes estudados quanto às proporções de resultados positivos para CMV foi utilizado o teste exato de Fisher, considerando haver associação quando $p \leq 0.05$ (BAYLEY, 1959). Os cálculos foram feitos com auxílio do programa de computador *GraphPad* (InStat, USA).

Resultados

4. Resultados

4.1. Grupo de pacientes-controle

4.1.1 PCR/*nested*-PCR para CMV

Entre as amostras de sangue dos pacientes-controle, 7 (58,33%) delas tiveram *amplicons* do genoma de CMV visualizados na PCR e, em seguida, isso foi confirmado na *nested*-PCR. Todas as amostras negativas na PCR para CMV apresentaram resultados positivos quando testadas para β -globina, o que excluía possibilidade de resultados falso negativos.

Nos tecidos dos 12 pacientes-controle, 5 (41,7%) tiveram CMV detectado por PCR e *nested*-PCR. Estes resultados são ilustrados nas figuras 7 e 8. Todas as amostras negativas para CMV apresentaram resultados positivos para β -globina (Figura 9). Os resultados dos pacientes deste grupo encontram-se apresentados na Tabela 7.

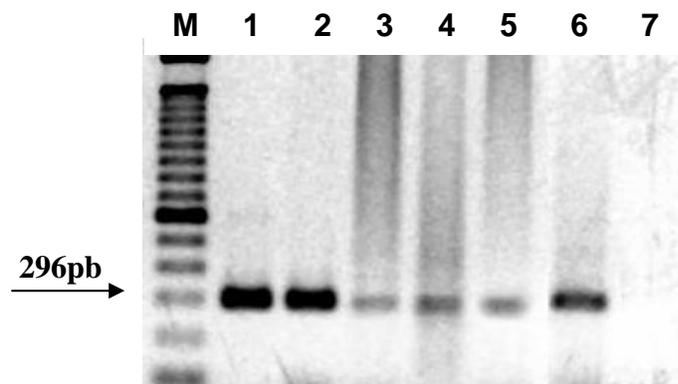


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose dos *amplicons* obtidos na PCR para CMV processando tecido entérico dos pacientes-controle. Nas colunas enumeradas de 2 a 6 observam-se bandas de 296pb. Nas colunas 1 e 7 encontram-se os controles positivo e negativo (água), respectivamente; na coluna M encontra-se marcador molecular de 100 pares de bases.

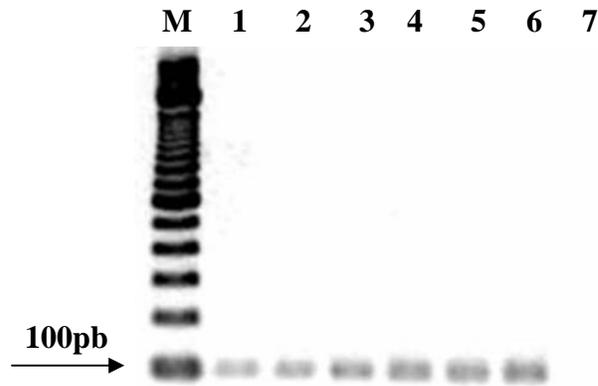


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose dos *amplicons* obtidos na *nested-PCR* para CMV processando tecido entérico dos pacientes-controle. Nas colunas enumeradas de 2 a 6 observam-se bandas de 100pb. Nas colunas 1 e 7 encontram-se os controles positivo e negativo (água), respectivamente; na coluna M encontra-se marcador molecular de 100 pares de bases.

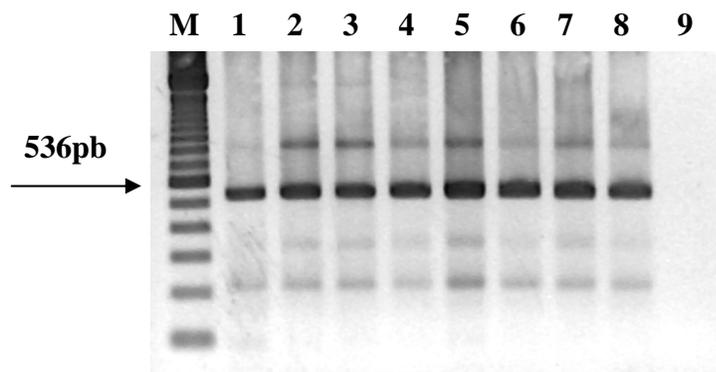


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose dos *amplicons* obtidos na PCR para β - globina nas amostras de biópsia negativas para CMV. Nas colunas enumeradas de 2 a 8 observam-se bandas de 536pb. Nas colunas 1 e 9 encontram-se os controles positivo e negativo (água), respectivamente; na coluna M o marcador molecular de 100 pares de bases.

Analisando a positividade para CMV encontrada no tecido entérico e no sangue do grupo dos pacientes-controle, verificou-se que 66,7% (8/12) dos casos foram positivos em pelo menos uma das amostras, sendo que 4 indivíduos foram positivos tanto no tecido como no sangue, 3 indivíduos foram positivos no sangue e negativos no tecido,

um indivíduo foi positivo no tecido e negativo no sangue, e 4 foram negativos em ambas as amostras clínicas (Tabela 7).

Tabela 7. Resultados obtidos na PCR, nested-PCR e imunohistoquímica nas amostras dos pacientes-controle.

Pacientes	PCR CMV sangue	PCR CMV biópsia	Imunohistoquímica biópsia
AMS	Neg	Pos	Pos
TMG	Pos	Pos	Pos
JSVS	Neg	Neg	Neg
VL	Neg	Neg	Neg
MJAR	Pos	Pos	Pos
IPS	Pos	Neg	Neg
RBSA	Pos	Neg	Neg
LCC	Pos	Pos	Pos
EJO	Neg	Neg	Neg
JCS	Pos	Pos	Pos
JTSM	Neg	Neg	Neg
MAOM	Pos	Neg	Neg

- Pos = positivo e Neg = negativo

4.2. Grupo de pacientes com RCU

4.2.1 PCR / *nested*-PCR para CMV

Dentre as 21 amostras de sangue dos pacientes com RCU, 14 (70%) tiveram *amplicons* do genoma de CMV detectados em ambos os testes. A amostra do sangue de um paciente (MMB) não apresentou banda específica quando submetida ao teste para β -globina. Esta amostra foi considerada falso-negativa e eliminada do trabalho (Figura 10).

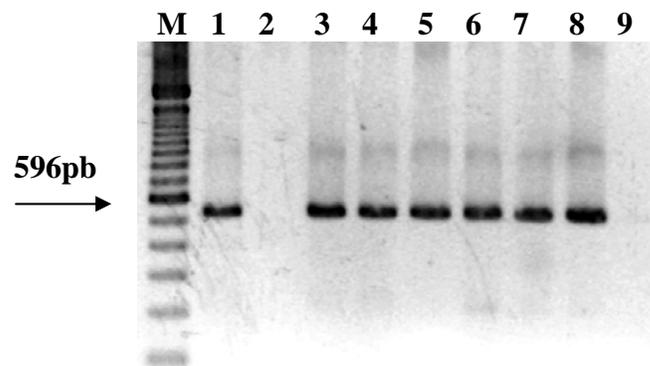


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose dos *amplicons* obtidos na PCR para β -globina das amostras de sangue negativas para CMV. Nas colunas enumeradas de 3 a 8 observam-se bandas de 536pb. Este *amplicon* não é observado na coluna 2 o que sugere que o resultado da PCR para CMV seja um falso negativo. Nas colunas 1 e 9 encontram-se os controles positivo e negativo (água), respectivamente; na coluna M o marcador molecular de 100 pares de bases.

Dentre as 21 amostras de tecido entérico, em 11 (52,4%) detectou-se genoma de CMV por PCR e *nested*-PCR (Figuras 11 e 12). Todas as amostras negativas testadas apresentaram bandas específicas para β -globina afastando resultados falso-negativo. Os resultados do grupo de pacientes com RCU estão apresentados na Tabela 8.

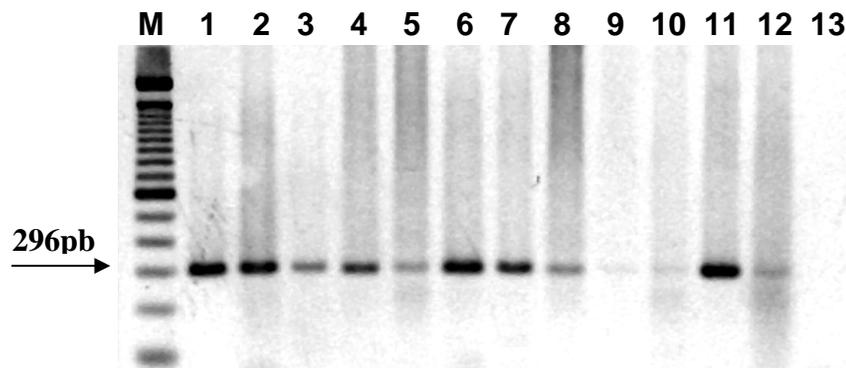


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose dos *amplicons* obtidos na PCR para CMV processando tecido entérico dos pacientes com RCU. Nas colunas enumeradas de 2 a 12 observam-se bandas de 296pb. Nas colunas 1 e 13 encontram-se os controles, positivo e negativo (água), respectivamente; na coluna M encontra-se o marcador molecular de 100 pares de bases.

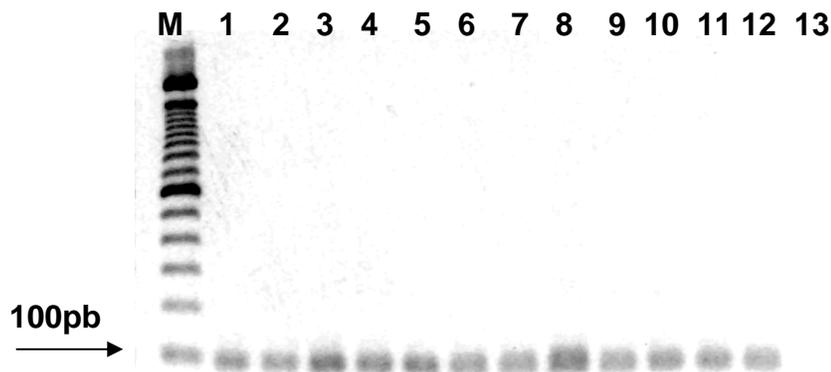


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose dos *amplicons* obtidos na *nested-PCR* para CMV processando tecido entérico dos pacientes com RCU. Nas colunas enumeradas de 2 a 12 observam-se bandas de 100pb. Nas colunas 1 e 13 encontram-se os controles positivo e negativo (água), respectivamente; na coluna M encontra-se o marcador molecular de 100 pares de bases.

Analisando a positividade para CMV encontrada no tecido entérico e no sangue do grupo dos pacientes com RCU, verificou-se que 76,2% (16/21) dos casos foram positivos em pelo menos uma das amostras, sendo que 8 indivíduos foram positivos tanto no tecido como no sangue, 4 indivíduos foram positivos no sangue e negativos no tecido, 4

indivíduos foram positivos no tecido e negativos no sangue, 4 foram negativos em ambas as amostras clínicas e um paciente (MMB) foi negativo somente no tecido, sendo o resultado da amostra de sangue excluído das análises.

Tabela 8. Resultados obtidos na PCR, nested-PCR e imunohistoquímica nas amostras dos pacientes-controle.

Paciente	PCR CMV sangue	PCR CMV biópsia	Imunohistoquímica biópsia
MMB	-----	Neg	Neg
DPP	Pos	Pos	Pos
JM	Neg	Pos	Pos
EAA	Pos	Pos	Pos
CDLS	Neg	Pos	Pos
EMR	Pos	Pos	Pos
BR	Pos	Pos	Pos
ELZ	Pos	Pos	Pos
MHLC	Pos	Pos	Pos
ACS	Neg	Pos	Pos
JDF	Pos	Neg	Pos
JLS	Pos	Pos	Pos
CAPR	Neg	Neg	Neg
INO	Pos	Neg	Neg
MME	Neg	Neg	Neg
MNAR	Pos	Neg	Neg
NRP	Pos	Neg	Neg
EDP	Pos	Neg	Neg
JCGA	Pos	Pos	Pos
APSL	Neg	Neg	Neg
SDBB	Pos	Neg	Neg

- Pos = positivo, Neg = negativo.

Dos 21 pacientes do grupo com RCU, 7 (33,3%) estavam em tratamento com drogas imunossupressoras. Dentre os pacientes possivelmente imunossuprimidos, 71,4% (5/7), tiveram genoma de CMV detectado em tecido entérico, o que ocorreu em somente 42,9% (6/14) dos casos considerados como não suprimidos (Figura 13). No entanto, a diferença entre imunossuprimidos e pacientes não imunossuprimidos não foi estatisticamente significativa ($p = 0,3615$).

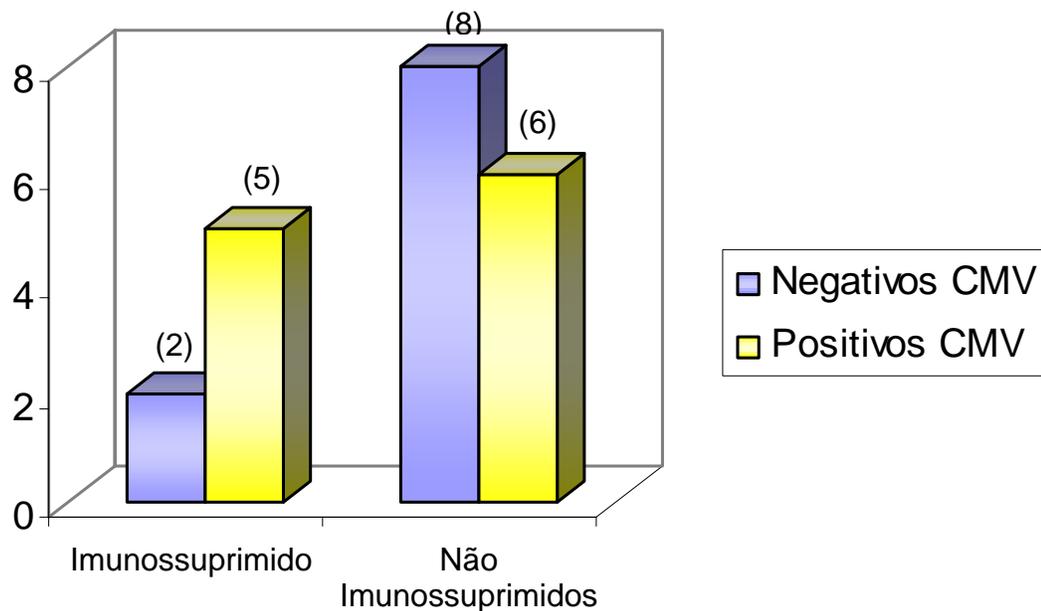


Figura 13. Positividade para CMV nos subgrupos de pacientes com RCU considerados imunossuprimidos e não imunossuprimidos. Comparando as taxas de positividade entre estes dois grupos obteve-se diferença não significativa ($P=0,3615$).

4.2.2. Imunohistoquímica das amostras de tecido entérico do grupo dos pacientes com RCU

Dentre as 21 amostras de tecido entérico proveniente dos pacientes com RCU analisadas por imunohistoquímica, 12 (57,1%) apresentaram positividade para antígenos específicos de CMV (Figura 14). Comparando estes resultados com os obtidos na PCR (11 positivos), observou-se que foram positivos os mesmos pacientes, com exceção de um (JLS), como mostra a Tabela 8.

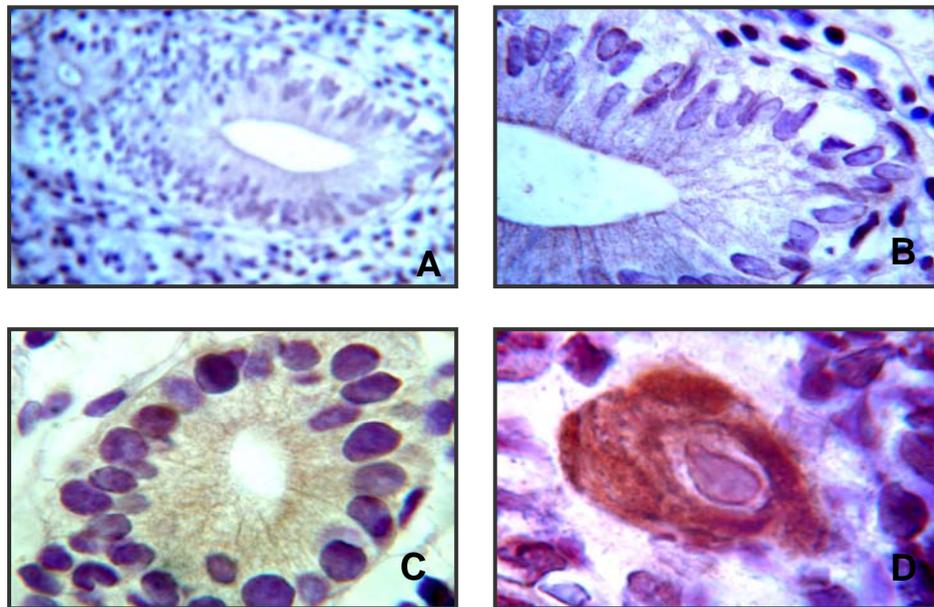


Figura 14. Fotomicrografias representativas do estudo imunohistoquímico para CMV no tecido entérico do grupo dos pacientes com RCU. Em A e B, há ausência de imunomarcção para CMV (200 e 400 X), enquanto que em C e D há imunomarcção positiva para CMV (200 e 400 X).

4.3. Grupo de pacientes com Neoplasia Colo-Retal

4.3.1 PCR/*nested*-PCR para CMV

Dentre as amostras de sangue dos 14 pacientes do grupo com neoplasia colo-retal, 9 (64,3%) tiveram *amplicons* do genoma do CMV detectados em ambos os testes. O teste para β -globina apresentou bandas específicas em todas as amostras negativas testadas, desconsiderando a possibilidade de resultados falso-negativos.

Nas amostras de tecido entérico, somente 2 (14,3%) de 14 pacientes apresentaram positividade para CMV na PCR e *nested*-PCR (Figuras 15 e 16). Assim como nas amostras de sangue o teste para β -globina nos tecidos entéricos apresentou resultados positivos. Os resultados individuais obtidos nesse grupo de pacientes com neoplasia colo-retal estão apresentados na Tabela 9.

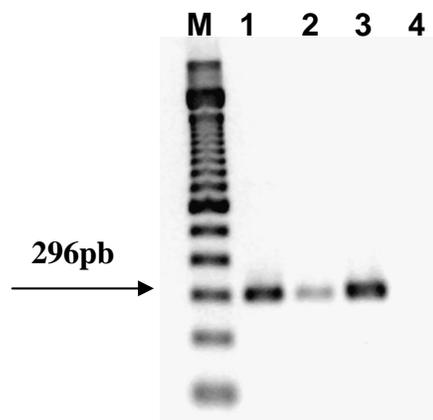


Figura 15. Eletroforese em gel de agarose dos *amplicons* obtidos na PCR para CMV processando tecido entérico dos pacientes com neoplasia colo-retal. Nas colunas enumeradas 2 e 3 observam-se bandas de 296pb. Nas colunas 1 e 4 encontram-se os controles positivo e negativo (água), respectivamente; na coluna M encontra-se o marcador molecular de 100 pares de bases.

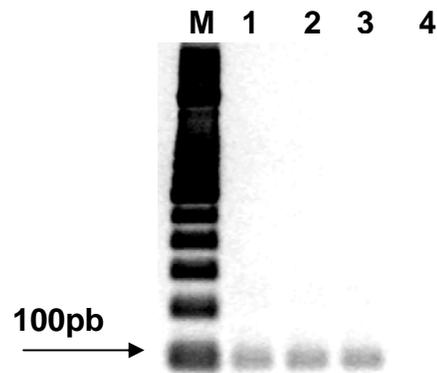


Figura 16. Eletroforese em gel de agarose dos *amplicons* obtidos na *nested-PCR* para CMV processando tecido entérico dos pacientes com neoplasia colo-retal. Nas colunas enumeradas 2 e 3 observam-se bandas de 100pb. Nas colunas 1 e 4 encontram-se os controles positivo e negativo (água), respectivamente; na coluna M encontra-se o marcador molecular de 100 pares de bases.

Analisando a positividade para CMV encontrada no tecido entérico e no sangue do grupo dos pacientes com neoplasia colo-retal verificou-se que em 64,2% (9/14) dos casos obteve-se positividade em pelo menos uma das amostras testadas. Observou-se que 2 indivíduos foram positivos tanto no tecido como no sangue, 7 indivíduos foram positivos no sangue e negativos no tecido e 5 foram negativos em ambas as amostras clínicas.

Tabela 9. Resultados obtidos na PCR, nested-PCR e imunohistoquímica nas amostras dos pacientes-controle.

Paciente	PCR CMV sangue	PCR CMV biópsia	Imunohistoquímica biópsia
IK	Neg	Neg	Neg
JMO	Pos	Pos	Neg
ACS	Pos	Neg	Neg
RGC	Pos	Neg	Neg
AM	Neg	Neg	Neg
MASCB	Pos	Neg	Neg
ATM	Neg	Neg	Neg
MFM	Pos	Neg	Neg
MCFM	Pos	Pos	Neg
AM	Pos	Neg	Neg
FGF	Pos	Neg	Neg
MJC	Neg	Neg	Neg
JMG	Neg	Neg	Neg
MP	Pos	Neg	Neg

- Pos = positivo e Neg = negativo

4.3.2. Imunohistoquímica da amostras de tecido entérico do grupo de pacientes com neoplasia colo-retal

O genoma dos CMV não foi detectado por imunohistoquímica no tecido entérico em nenhum dos integrantes do grupo de pacientes com neoplasia colo-retal.

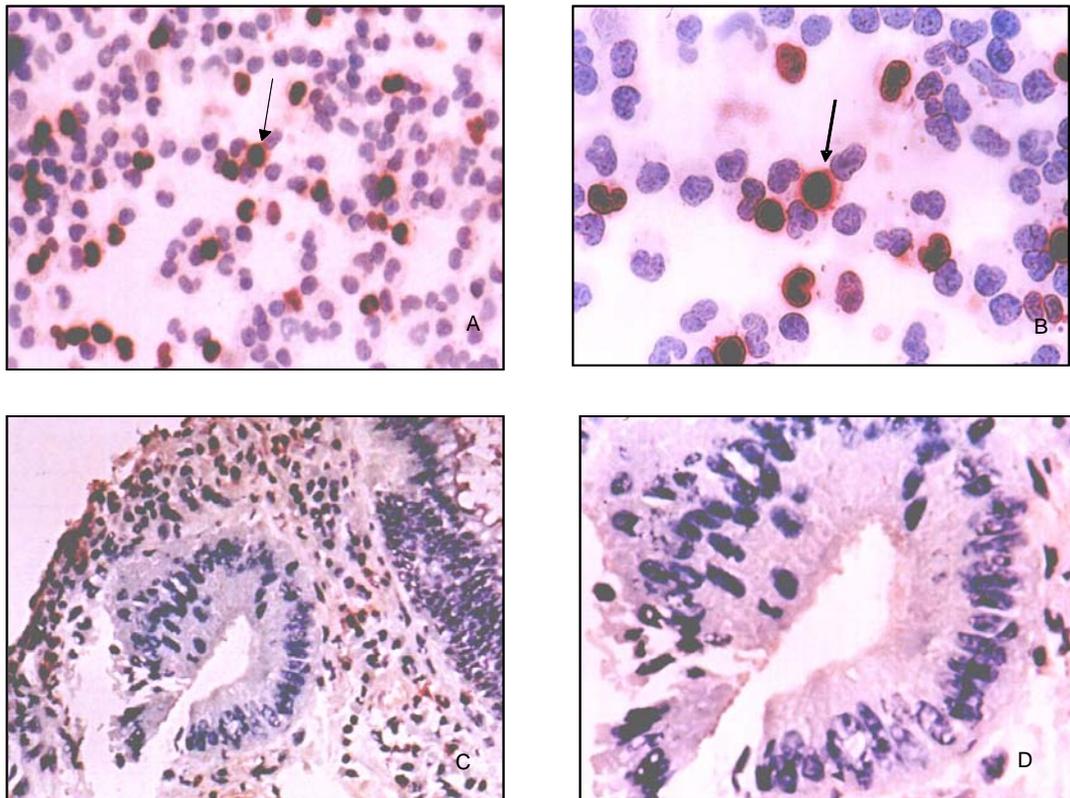


Figura 17. Fotomicrografias representativas do estudo imunohistoquímico para CMV no tecido entérico do grupo dos pacientes com neoplasia colo-retal. Em A e B controle positivo (leucócitos) (200 e 400 X). Enquanto que em C e D pacientes negativos para CMV (200 e 400 X).

4.4. Análise comparativa dos resultados observados nos três grupos

Analisando a positividade para CMV obtida por meio da PCR e/ou da imunohistoquímica obtiveram 16 (76,2%) amostras positivas em tecido entérico e/ou sangue no grupo dos pacientes com RCU dentre 21 casos e 8 (66,7%) amostras positivas no grupo dos 12 pacientes-controle. A diferença entre essas proporções (Figura 18) não foi estatisticamente significativa ($p=0,6905$).

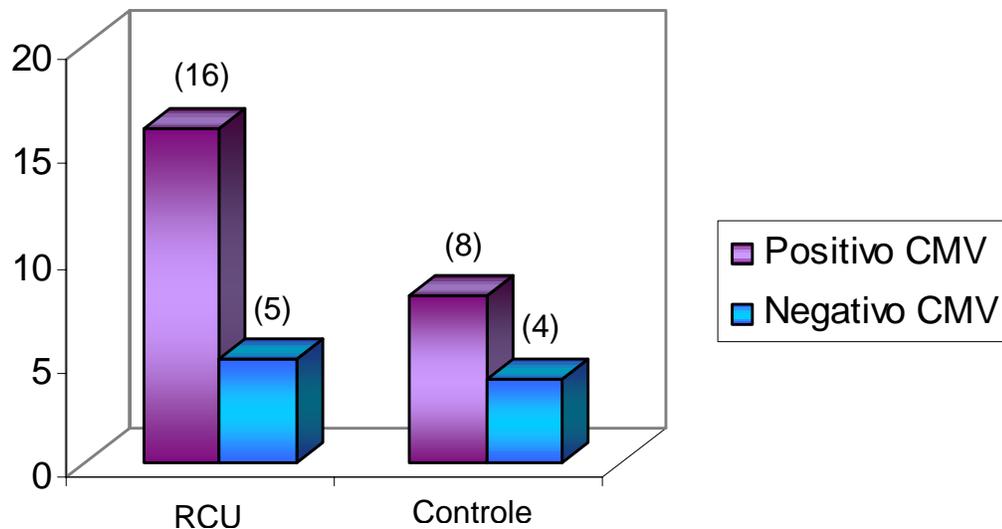


Figura 18. Positividade para CMV na PCR e/ou imunohistoquímica em amostras provenientes do grupo dos pacientes com RCU e do grupo dos pacientes-controle. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($P=0,6905$).

Levando em conta apenas os resultados obtidos no tecido entérico, por PCR e/ou imunohistoquímica, observaram-se 12 (57,1%) pacientes positivos para CMV no grupo dos pacientes com RCU e 5 (41,7%) pacientes positivos no grupo dos pacientes-controle (Figura 19). A diferença entre estas proporções não se mostrou significativa ($p=0,4813$).

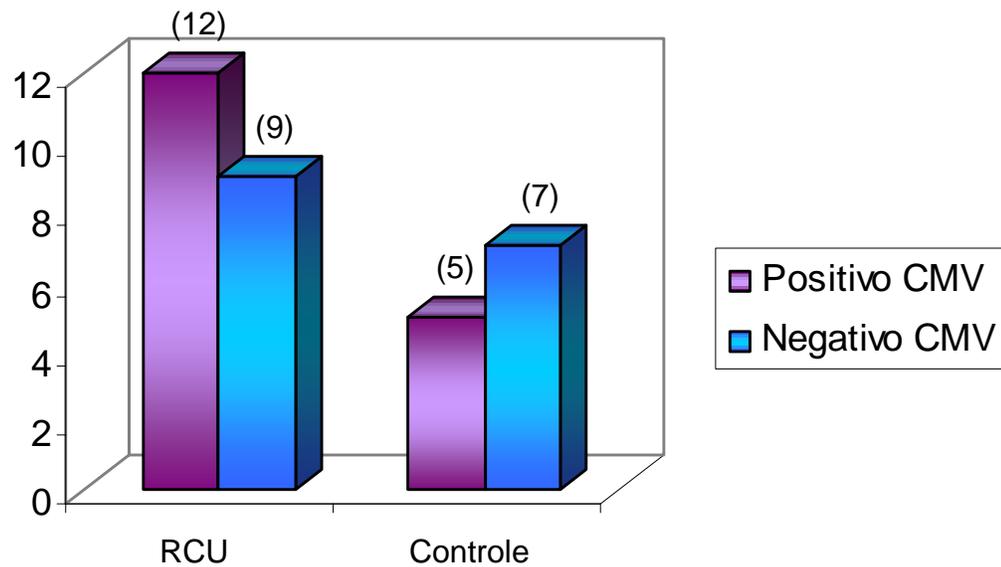


Figura 19. Positividade para CMV na PCR e/ou imunohistoquímica em amostras de tecido entérico do grupo dos pacientes com RCU e do grupo dos pacientes-controle. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($P=0,4813$).

No grupo dos 14 pacientes com neoplasia colo-retal 9 (64,3%) foram positivos para CMV (Figura 20) sendo que esta taxa de positividade não foi significativamente diferente ($p=1,0$) à observada entre os pacientes-controle.

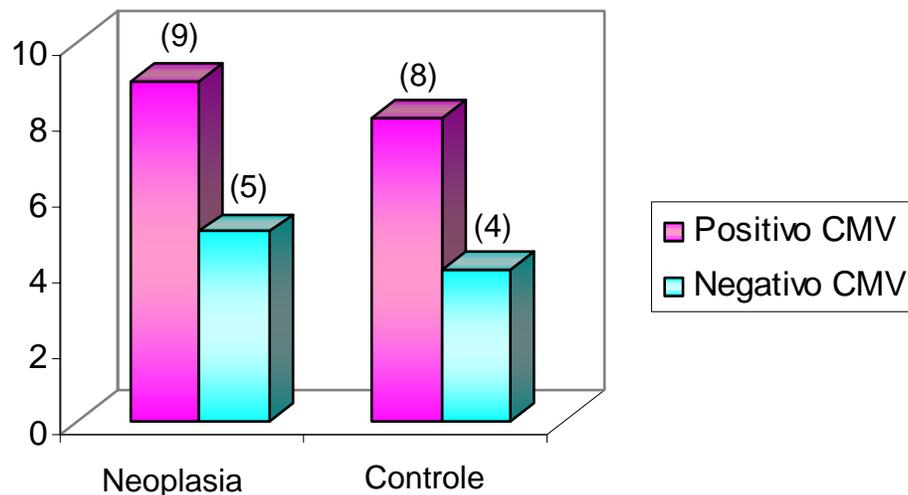


Figura 20. Positividade para CMV na PCR e/ou imunohistoquímica em amostras provenientes do grupo dos pacientes com câncer colo-retal e do grupo dos pacientes-controle. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($P=1,0$).

Do mesmo modo, considerando apenas os resultados obtidos no tecido entérico nos pacientes do grupo com neoplasia colo-retal, observou-se que apenas 2 (14,3%) foram positivos para CMV (Figura 21). Esta pequena positividade, quando comparada à obtida nos pacientes-controle (41,7%) não resultou, porém, em diferença estatisticamente significativa ($p=0,1904$).

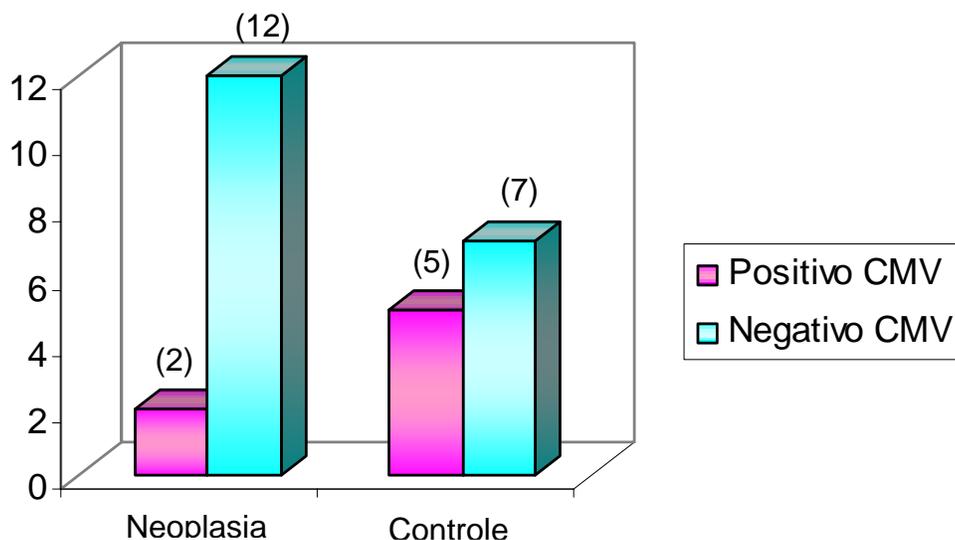


Figura 21. Positividade para CMV na PCR e/ou imunohistoquímica em amostras de tecido entérico do grupo dos pacientes com câncer colo-retal e do grupo dos pacientes-controle. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ($P=0,1904$).

Discussão

5. Discussão

Ao longo dos últimos anos, têm sido cada vez mais observadas lesões gastrintestinais causadas por CMV, devido ao aumento numérico de pacientes com imunodeficiência, como a da AIDS, ou imunodepressões pelo amplo uso de drogas supressoras da imunidade (WADA *et al*, 2003).

Vários autores têm sugerido uma associação entre infecção por CMV e RCU (ORVAR, 1993, ALCALA *et al*, 2000). O primeiro relato desta associação foi feito por Powell *et al*, em 1961. No entanto, estudos relacionando infecção por CMV e RCU só foram retomados na década de 80, o que se deve, provavelmente aos progressos nos métodos diagnósticos da citomegalovirose (TAKAHASHI *et al*, 2004).

Nos últimos anos, a técnica de PCR tem se mostrado uma ferramenta de grande valor em virologia, pela sua capacidade de detectar pequenas quantidades do DNA viral em espécimes clínicos. Esta técnica vem sendo amplamente utilizada no diagnóstico da citomegalovirose, buscando detectar a viremia, que tem sido reconhecida como o maior fator de risco para instalação e progressão de doença (BOWEN *et al*, 1997; SHINKAI *et al*, 1997; SPECTOR *et al*, 1999; YAMAMOTO *et al*, 1999).

A PCR para CMV é método considerado muito sensível na detecção da presença viral em tecidos e leucócitos do sangue periférico (PELLEGRIN *et al*, 1999). Este método, que foi utilizado no presente trabalho, já vem sendo utilizado no nosso laboratório há mais de uma década, tendo se prestado ao processamento da urina de crianças (YAMAMOTO *et al*, 1999), do sangue de transplantados renais (AQUINO *et al*,

2000) e do sangue e tecidos de indivíduos com AIDS (CUNHA *et al*, 2001), sempre com resultados específicos e reprodutíveis.

Neste trabalho, foi feito o processamento, pela PCR para CMV, de amostras de leucócitos do sangue periférico e de tecido entérico de pacientes com RCU, neoplasia colo-retal e pacientes-controle. Os *primers* utilizados geraram *amplicons* únicos e com 296 pares de bases, sugerindo uma alta especificidade da técnica. Além disso, para confirmação definitiva da detecção do genoma viral, as amostras positivas pela PCR para CMV foram submetidas a uma *nested-PCR*, cujos *amplicons* apresentaram-se únicos e com 100 pares de bases, o que exclui qualquer tipo de contaminação durante as reações de PCR.

A alta sensibilidade da amplificação pela PCR de CMV faz com que esta técnica tenha limitações no diagnóstico da infecção por CMV e na doença citomegalovirose (DELGADO *et al*, 1992). Portanto, nem sempre o encontro do DNA viral na amostra clínica é suficiente para confirmar o CMV como agente causal da doença, visto que, em alguns casos, estes vírus, mesmo em pequenas quantidades e em estado de latência, poderiam ter genoma amplificado pela PCR (ZIPETO *et al*, 1992).

Já a detecção de antígenos específicos de CMV em células e tecidos, por imunohistoquímica, pode indicar a replicação do vírus quando se coram antígenos precoces presentes no início da infecção viral (GOODGAME, 1993). Altos níveis de antígenos são freqüentemente encontrados em pacientes com doença por CMV e baixos níveis podem estar relacionados a infecções assintomáticas. Assim, a imunohistoquímica tem sido utilizada para monitorar a infecção e o tratamento antiviral, em pacientes imunocomprometidos (LANDOLFO *et al*, 2003).

Embora se tenha estudado, em várias publicações, a associação de infecção por CMV com RCU, poucos trabalhos visaram quantificar a frequência desta associação.

No presente estudo, buscando pela presença de CMV, utilizou-se as técnicas de imunohistoquímica e PCR. Quanto à detecção de CMV, a imunohistoquímica e a PCR mostraram-se igualmente sensíveis. Todos os participantes positivos tiveram CMV detectado por ambos os métodos, com exceção de um, em que a presença viral foi detectada apenas por imunohistoquímica. Este fato é curioso porque a PCR, por ser capaz de amplificar quantidades ínfimas de DNA, é considerada mais sensível que a imunohistoquímica. No entanto, nossos resultados, avaliados globalmente, mostram que ambos os métodos foram adequados para detecção de CMV.

Analisando as amostras que tiveram CMV detectado no sangue e no tecido entérico, observou-se, tanto no grupo de pacientes com RCU como no grupo de pacientes-controle, maior positividade nas amostras de sangue (70%). Tal fato era esperado, já que os CMV se encontram em estado latente nos leucócitos circulantes, em indivíduos previamente infectados, mas sem manifestações de doença (SINCLAIR *et al* 1994; PASS, 2001 e LANDOLFO *et al*, 2003). Alguns pacientes foram positivos somente no tecido entérico, apresentando-se negativos no sangue, o que sugere a ocorrência de infecção viral local e não sistêmica.

Nos pacientes do grupo com RCU considerados imunossuprimidos, 71,4% (5 de 7) tinham CMV infectando o tecido entérico, enquanto que isto ocorreu em 42,8% (6 de 14) dos pacientes não imunossuprimidos. Esta frequência maior de acometimento entérico nos imunossuprimidos é facilmente explicável já que a queda da imunidade celular propicia que o vírus, mesmo quando previamente latente, inicie seu processo

replicativo ao nível do tecido. Alguns autores estabelecem que os glicocorticóides podem induzir reativação da infecção latente por CMV, e propõe que estes vírus possam então, ser responsáveis pela piora da RCU, em alguns casos resistentes ao tratamento (ALCALA *et al*, 2000). Ressaltamos que, empiricamente, se fosse possível estudar uma casuística 3 vezes maior e obtivéssemos proporcionalmente estes mesmos resultados, a diferença de positividade entre imunossuprimidos e não imunossuprimidos com RCU seria significativa, ou seja, indicaria que a citomegalovirose entérica seria mais freqüente entre os imunossuprimidos. Sabendo que a maioria dos relatos de casos de infecção por CMV em pacientes com RCU ocorre entre os resistentes ao tratamento com corticosteróides, a citomegalovirose entérica poderia ser conseqüência do tratamento da RCU e não causa da doença, embora pudesse levar, por si, a lesões na mucosa intestinal (BERK, 1995; VEGA, 1999; PFAU, 2001; WADA, 2003 E TAKAHASHI, 2004).

O presente estudo, diferentemente dos realizados previamente, incluiu um grupo de pacientes-controle, sem doença intestinal inflamatória. O grupo de pacientes-controle também apresentou alta freqüência de infecção por CMV (66,7%) evidenciando a alta prevalência da citomegalovirose em nossa população, o que dificulta a pesquisa por uma eventual associação entre CMV e RCU.

Quando analisados sangue e/ou tecido entérico, o genoma de CMV foi detectado em 76,2% (16 de 21) dos pacientes com RCU e em 66,7% (8 de 12) dos pacientes-controle. Portanto, observou-se positividade apenas um pouco maior nos pacientes com RCU. Estes resultados tornam difícil que se estabeleça associação entre citomegalovirose e RCU.

A maioria dos trabalhos publicados sobre a associação entre CMV e RCU observaram a presença de CMV em pacientes com RCU aguda e grave, sendo que grande parte dos casos relatados não responderam aos corticosteróides e tiveram que sofrer cirurgia para retirada do cólon (COOPER *et al*, 1977; GOODMAN *et al*, 1979; BERK, 1985; EYRE-BROOK *et al*, 1986; DIEPERSLOOT *et al*, 1990; VEGA, 1999; PFAU *et al*, 2001; COTTONE *et al*, 2001; WADA *et al*, 2003 e TAKAHASHI *et al*, 2004). Os casos de RCU participantes do presente estudo estavam em seguimento e tratamento ambulatorial, em condições estéreis de controle da doença. Nenhum deles teve necessidade de internação para compensar a doença, o que diferencia este estudo dos trabalhos citados quanto à gravidade dos participantes. De qualquer forma, os trabalhos antes citados mostraram a presença de CMV nos pacientes com RCU em estado grave, porém sem poder esclarecer se o vírus foi fator causal para a doença ou, apenas um complicante adquirido durante a evolução e conseqüente à desnutrição ou ao tratamento imunossupressor.

As amostras de tecido entérico do grupo de pacientes com RCU tiveram positividade de 57,1% (12 de 21) para CMV. Esta foi mais elevada que a apresentada pelo grupo de pacientes-controle (41,7% - 5 de 12). Observou-se, portanto tendência a maior positividade para CMV no tecido entérico dos pacientes com RCU, mas provavelmente, pelo pequeno tamanho de nossa casuística, não foi possível demonstrar diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos. Neste aspecto, empiricamente, teria sido necessário estatisticamente uma casuística 6 vezes maior, obtendo-se resultados semelhantes aos apresentados, para que fosse observada uma significância estatística. Portanto, nossos resultados não permitem confirmar associação entre presença de CMV e RCU.

Por outro lado, a possibilidade de haver participação dos CMV na RCU é minimizada por alguns autores que sugerem estarem os CMV, mesmo latentes, disseminados em praticamente todos os tecidos do organismo, incluindo o trato gastrointestinal, como “espectadores” não patogênicos ou invasores secundários. A presença de CMV em áreas de inflamação poderia refletir propensão do vírus a infectar tecidos de crescimento granular, tais como as úlceras na RCU, ou invadir a mucosa com inflamação pré-existente, mas sem significância patogênica na doença inflamatória intestinal (GOODGAME, 1993; ROBEY *et al*, 1988 e PFAU *et al*, 2001). Células mononucleares carregando o vírus em sua fase latente poderiam concentrar o DNA viral nos sítios de inflamação, o que explicaria a presença do vírus detectado nos casos de RCU, como presentes no tecido por transporte passivo em células inflamatórias (ROSKELL *et al*, 1995).

Nos últimos 30 anos, numerosos trabalhos relacionados à detecção do DNA viral, RNA mensageiro e antígenos em tecidos tumorais, tem implicado os CMV na etiologia de várias doenças neoplásicas, incluindo a do colo do útero, a de próstata e, principalmente, o câncer colo-retal (HARKINS *et al*, 2002; CINATL *et al*, 2004). A hipótese de associação da infecção por CMV à neoplasia colo-retal foi retomada recentemente, embora os trabalhos sobre o tema sejam conflitantes em suas conclusões, têm falhado em apresentar evidências da associação ou têm questionado o significado da presença de CMV nestes tumores (KNÖSEL *et al*, 2004; LAU *et al* 2004).

Sabe-se que a infecção por CMV, *in vitro*, é capaz de transformar células de mamíferos, estimulando a síntese de ácidos nucléicos e proteínas, ativando a transcrição de proto-oncogenes e modulando a expressão de proteínas envolvidas nos mecanismos celulares regulatórios, apoptóticos e angiogênicos (ALBRECHT *et al*,

1973; GEDER *et al*, 1976; SPECTOR *et al*, 1984; GEIST *et al*, 1994; JAULT *et al*, 1995; CINATL JR *et al*, 1996; BRESNAHAN *et al*, 1996; YUROCHKO *et al*, 1997; KIEFF *et al*, 1998; CASTILLO *et al*, 2000; SWANTON *et al*, 2000; KALEJA *et al*, 2003; KNÖSEL *et al*, 2004). Tais características biológicas situam os CMV como potenciais agentes atuantes na patogênese da neoplasia colo-retal. Por outro lado, células neoplásicas poderiam propiciar um ambiente genético apropriado para, também, utilizar o potencial oncogênico do CMV, o qual não se manifesta em células normais. Trata-se da oncomodulação, ou seja, da habilidade do vírus em catalizar o processo oncogênico, favorecendo o crescimento do tumor (CINATL *et al*, 2004).

No presente trabalho, o genoma de CMV foi detectado no sangue de 64,3% (9 de 14) dos pacientes e em 14,3% (2 de 14) das amostras de tecido entérico dos pacientes com neoplasia colo-retal. Provavelmente, os CMV encontrar-se-iam em estado latente em leucócitos do sangue periférico, da mesma maneira do que se supõe que tenha ocorrido no grupo de pacientes com RCU e nos pacientes-controle (SINCLAIR *et al* 1994; PASS, 2001; LANDOLFO *et al*, 2003 e HUMMEL *et al*, 2002). É importante destacar que nenhum dos pacientes com neoplasia colo-retal estava em tratamento com drogas imunossupressoras para contenção da doença, no momento da coleta de material.

O genoma dos CMV foi detectado em 64,3% (9 de 14) das amostras de sangue e/ou tecido entérico dos pacientes com neoplasia colo-retal e em 66,6% (8 de 12) daquelas provenientes dos pacientes-controle. Estes resultados revelando proporções praticamente iguais nos dois grupos contradizem aqueles observados em alguns trabalhos, que relatam maior positividade de CMV em tecido tumoral de cólon e reto (HUANG *et al*, 1978; HASHIRO *et al*, 1979 e HARKINS *et al*, 2002).

Nos pacientes com neoplasia colo-retal, a PCR mostrou-se mais sensível que a imunohistoquímica na detecção do CMV. Os antígenos de CMV não foram detectados por esta técnica em nenhum paciente. Esta observação nos faz conjecturar se o vírus poderia estar latente nas células do tecido entérico, ou nos leucócitos e macrófagos contidos no local do tumor, não estando a se multiplicar e, portanto, não sintetizando proteínas-antígeno.

Analisando o tecido entérico, observou-se a presença de CMV em 14,3% dos pacientes com neoplasia colo-retal e em 41,6% dos pacientes-controle. A positividade para CMV nos pacientes com neoplasia colo-retal mostrou-se inferior à dos pacientes-controle. Este resultado não apóia a possibilidade de uma associação entre citomegalovirose e neoplasia colo-retal, Hart *et al* (1982) não encontraram, também, associação entre CMV e neoplasia colo-retal. Esses autores analisaram 14 biópsias de neoplasia colo-retal por hibridização *in situ* e não encontraram RNAm de CMV em nenhuma delas. Nove destas amostras foram testadas por imunofluorescência para antígenos de CMV, mas nenhum antígeno foi detectado. No recente estudo de Knösel *et al* (2004), 77 espécimes de tumor colo-retal foram analisados por PCR e imunohistoquímica, sendo que somente 4 amostras foram positivas na PCR para CMV e nenhuma positividade foi observada por imunohistoquímica. Os resultados obtidos em nosso estudo, portanto, vão de encontro às observações deste trabalho, bem como de outros que obtiveram resultados semelhantes (BRICHACEK *et al*, 1980; LAU *et al*, 2004).

A divergência de resultados entre diferentes trabalhos sobre a possível associação entre a infecção por CMV e a neoplasia colo-retal sugere que o vírus poderia estar atuando como *hit-and-run*. Este mecanismo implica em que o vírus

poderia mediar transformação celular com um ataque (*hit*) inicial e, mais tarde, a célula manter-se-ia em estado transformado, mas já sem moléculas virais (*run*). Embora o conceito de transformação *hit-and-run* seja controverso, por muitos anos tem permanecido como explicação plausível para transformação celular *in vitro* por CMV (SHEN *et al*, 1997; DONIGER *et al*, 1999 e KNÖSEL *et al*, 2004).

Em suma, com a casuística aqui estudada foi possível observar a presença de CMV em tecido entérico de pacientes com RCU, porém sem poder associar a virose a esta doença. Nestes pacientes foi possível, também, observar maior frequência de CMV nos tecidos de pacientes em tratamento com drogas imunossupressoras, o que sugere infecção viral secundária, associada à eventual redução da imunidade. Estudos com maior número de pacientes seriam necessários para confirmar definitivamente se este vírus ubíquo estaria associado a RCU. Por fim, os resultados obtidos sugerem que os CMV não estão associados à neoplasia colo-retal.

Conclusões

6. Conclusões

- O genoma de CMV foi detectado com maior frequência no sangue que em tecido entérico para os 3 grupos de pacientes estudados, provavelmente devido à ampla distribuição desses vírus na população;
- A positividade de CMV no grupo de pacientes com RCU foi pouco maior que a observada no grupo de pacientes-controle, mas sem significado estatístico. Portanto, não foi possível demonstrar associação entre esta infecção viral e RCU;
- No grupo de pacientes com neoplasia colo-retal, o genoma de CMV (em sangue e/ou tecido entérico) foi encontrado em frequência (64,3%) semelhante à observada no grupo de pacientes-controle (66,6%). Porém, no tecido entérico, detectou-se frequência menor de CMV no grupo de pacientes com neoplasia colo-retal (14,3%) que no grupo de pacientes-controle (41,6%), o que indica ausência de associação entre neoplasia colo-retal e CMV;
- A imunohistoquímica apresentou alta sensibilidade na detecção de CMV no grupo de pacientes com RCU, mostrando que estes vírus estariam em estado replicativo nestes pacientes. Já nos pacientes com neoplasia colo-retal a imunohistoquímica não detectou antígenos dos CMV, diferentemente da PCR. Desta forma, os CMV poderiam estar em estado latente nas células do tecido entérico destes pacientes.

Referências Bibliográficas

7. Referências Bibliográficas

- Alcala MJ**, Casellas F, *et al.* Infection by cytomegalovirus in patients with ulcerative colitis requiring colonic resection. *Medicina Clinica (Barc)*. 2000; 114(6):201-204.
- Albrecht T**, Rapp F. Malignant transformation of hamster embryo fibroblasts following exposure to ultraviolet-irradiated human cytomegalovirus. *Virology*. 1973; 55: 53-61.
- Aquino VH**, Figueiredo LTM. Aspects of the Cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2001; 34: 93-101.
- Aquino VH**, Figueiredo LTM. High prevalence of renal transplant recipients infected with more than one cytomegalovirus glycoprotein B genotype. *Journal of Medical Virology*, 2000; 61:138-42.
- Bailey NTJ**. *Statistical Methods in Biology*. The English Universities Press. 1959.
- Berk T**, Gordon SJ, *et al.* Cytomegalovirus infection of the colon: a possible role in exacerbations of inflammatory bowel disease. *The American Journal of Gastroenterology* 1985; 80: 355-60.
- Bowen EF**, Sabin CA, *et al.* Cytomegalovirus viraemia detected by polymerase chain reaction identifies a group of HIV-positive patients at high risk of CMV disease. *AIDS*. 1997; 11(7): 889-893.
- Bresnahan WA**, Boldogh I, *et al.* Human cytomegalovirus inhibits cellular DNA synthesis and arrests productively infected cells in late G1. *Virology*. 1996; 224: 150-160.
- Brichacek B**, Hirsch I, *et al.* Absence of cytomegalovirus DNA from adenocarcinoma of the colon. *Intervirology*. 1980; 14: 223-227.
- Britt WJ & Alford CA**, Cytomegalovirus. In: Fields BN, Knipe DM *et al* editors. *Fields Virology*. 3th edition. Lippincott Raven. 1996.
- Castillo JP**, Yurochko AD, *et al.* Role of human cytomegalovirus immediate-early proteins in cell growth control. *Journal of virology*. 2000; 74(17): 8028-8037.
- Chee MS**, Bankier AT, *et al.* Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 1990; 154:125-69.
- Cinatl J**, Scholz M, *et al.* Molecular mechanisms of the modulatory effects of HCMV infection in tumor cell biology. *TRENDS in Molecular Medicine*. 2004; 10(1): 19-23.

- Cinatl Jr J**, Cinatl J, *et al.* Modulatory effects of human cytomegalovirus infection on malignant properties of cancer cells. *Intervirology*. 1996; 39: 259-269.
- Cinatl Jr J**, Voguel JU, *et al.* Oncomodulatory signals by regulatory proteins encoded by human cytomegalovirus: a novel role for viral infection in tumor progression. *FEMS Microbiology Reviews*. 2004; 28: 59-77.
- Cohen AM**, Minsky BD, *et al.* Colon cancer. In: DeVita Jr VT, Hellman S, Rosenberg SA editors. *Cancer: Principles & Practice of Oncology*. 4th edition. J.B. Lippincott Company 1993: 929.
- Cooper HS**, Raffensperger EC, *et al.* Cytomegalovirus inclusions in patients with ulcerative colitis and toxic dilatation requiring colonic resection. *Gastroenterology*. 1977; 72: 1253-1256.
- Cottone M**, Pietrosi G, *et al.* Prevalence of cytomegalovirus infection in severe refractory ulcerative and Crohn's colitis. *The American Journal of Gastroenterology* 2001; 96:773-5.
- Crumpacker CS**. Cytomegalovirus. In: Mandell LG, Bennett JE, Dolin R editors. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5th edition. Churchill Livingstone. 2000; 1586-1599.
- Cunha AA**, Marin LJ, *et al.* Diagnosis of cytomegalovirus infections by qualitative and quantitative PCR in HIV infected patients. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2002; 44(3): 127-132.
- Delgado R**, Lumbreras C, *et al.* Low predictive value of polymerase chain reaction for diagnosis of cytomegalovirus disease in liver transplant recipients. *Journal of Clinical Microbiology*. 1992; 30:309-19
- Diepersloot RJ**, Kroes AC, *et al.* Acute ulcerative proctocolitis associated with primary cytomegalovirus infection. *Arch Intern Med* 1990; 150: 1749-51.
- Doniger J**, Muralidhar S, *et al.* Human cytomegalovirus and human herpesvirus 6 genes that transform and transactivate, *Clinical Microbiology Reviews*. 1999; 12(3): 367-382.
- Drew WL**. Cytomegalovirus infection in patients with AIDS. *The Journal of Infectious Diseases*. 1988; 158: 449-456.
- Ekbom A**, Helmick C, *et al.* The epidemiology of inflammatory bowel disease: a large, population-based study in Sweden. *Gastroenterology* 1991; 100: 350-8.
- Eyre-Brook IA**, Dundas S. Incidence and clinical significance of colonic cytomegalovirus infection in idiopathic inflammatory bowel disease requiring colectomy. *Gut* 1986; 27: 1419-25.

- Farrokhyar F**, Irvine EJ, *et al.* A critical review of epidemiology studies in inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 2001; 36: 2-15.
- Geder L**, Lausch R, *et al.* Oncogenic transformation of human embryo lung cells by human cytomegalovirus. *Science*. 1976; 192: 1134-1137.
- Geist LJ**, Hunnighake GW. Cytomegalovirus as a trans-activator of cellular genes. *Seminars in Virology*. 1994; 5: 415-420.
- Guillem JG**, Paty PB, *et al.* Molecular biology of colorectal cancer. In: Cohen AM, Winawer SJ, Friedman MA, Gunderson LL editors. *Cancer of colon, rectum and anus*. McGraw Hill. 1995; 149-156.
- Goodgame RW**. Gastrointestinal cytomegalovirus disease. *Annals Internal Medicine* 1993; 119: 924-35.
- Goodman ZD**, Boitnott JK, *et al.* Perforation of the colon associated with cytomegalovirus infection. *Digestive Diseases and Sciences*. 1979; 24(5): 376-380.
- Greer CE**, Peterson SL, *et al.* PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Effects of fixative and fixation time. *American Journal of Clinical Pathology*. 1991; 95: 117-124.
- Harkins L**, Volk AL, *et al.* Specific localization of human cytomegalovirus nucleic acids and proteins in human colorectal cancer. *The Lancet*. 2002; 360: 157-1563.
- Hart H**, Neill WA, *et al.* Lack of association of cytomegalovirus with adenocarcinoma of the colon. *Gut*. 1982; 23: 21-30.
- Hashiro GM**, Horikami S, *et al.* Cytomegalovirus isolations from cell cultures of human adenocarcinomas of the colon. *Intervirology*. 1979; 12: 84-88.
- Hendricksen C**, Binder V. Social prognosis in Ulcerative colitis. *BMJ* 1980; 2: 581.
- Huang ES**, Roche JK. Cytomegalovirus DNA and adenocarcinoma of the colon: evidence for latent viral infection. *The Lancet*. 1978; 1: 957-960.
- Hummel M**, Abecassis MM. A model for reactivation of CMV from latency. *Journal of Clinical Virology*. 2002; 25: S123-S136.
- Irvine EJ**, Feagan B, *et al.* Quality of life: a valid and reliable measure of therapeutic in the treatment of inflammatory bowel disease. Canadian Crohn's relapse prevention trial study group. *Gastroenterology* 1994; 106(2): 287-296.
- Jault FM**, Jault JM, *et al.* Cytomegalovirus infection induces high levels of cyclins, phosphorylated RB, and p53, leading to cell cycle arrest. *Journal of Virology*. 1995; 69(11): 6697-6704.

- Jewell DP.** Ulcerative colitis. In: Feldman M, Scharschmidt BF, Sleisenger MH editors. Sleisenger & Fordtran's. Gastrointestinal and Liver Disease: Pathology, Diagnosis and Management. 6th Edition, Elsevier.1998; 1735-61.
- Jordan MC.** Cytomegalovirus infections. In: Hoeprich PD, Jordan MC, Ronald AR editors. Infectious Diseases. 5th edition. J.B. Lippincott Company 1994; 835-841.
- Kalejta RF, Bechtel JT, et al.** Human cytomegalovirus pp71 stimulates cell cycle progression by inducing the proteasome-dependent degradation of the retinoblastoma family of tumor suppressors. *Molecular and Cellular Biology*. 2003; 23(3): 1885-1895.
- Kieff E, Shenk T.** Modulation of apoptosis by herpesviruses. *Seminars in Virology*. 1998; 8: 471-480.
- Knösel T, Schewe C, et al.** Cytomegalovirus is not associated with progression and metastasis of colorectal cancer. *Cancer Letters*. 2004; 211: 243-247.
- Landolfo S, Gariglio M, et al.** The human cytomegalovirus. *Pharmacology & Therapeutics*. 2003; 98: 269-297.
- Lau SK, Chen YY, et al.** Lack association of cytomegalovirus with human brain tumors. *Modern Pathology*. 2004: 1-6.
- Loenen WAM, Bruggeman CA, et al.** Immune evasion by human cytomegalovirus: lessons in immunology and cell biology. *Seminars in Immunology*. 2001; 13: 41-49.
- Marin LJ, Cunha AA, et al.** Desenvolvimento de uma metodologia de PCR semiquantitativa utilizando plasmídeo clonado com parte do gene gB de citomegalovírus. *Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo* 2001.
- Meringan TC & Resta S.** Cytomegalovirus: Where have we been and where are we going? *Reviews of Infectious Diseases*. 1990; 12(suppl 7): 693-700.
- Meyers S, Jawowitz HD,** The natural history of ulcerative colitis: an analysis of the placebo response. *Am J Gastroenterol* 1989; 11: 33-7.
- Mocarski ES, Courcelle CT.** Cytomegalovirus and their replication. In: Kwiipe DM, Howley PM editors. *Fields Virology*. 4th edition. Lippincott W&W. 2001. 2629-2673.
- Orvar K, Murray J, et al.** Cytomegalovirus infection associated with onset of inflammatory bowel disease. *Digestive Diseases and Sciences*. 1993; 38(12): 2307-2310.
- Pass RF.** Cytomegalovirus. In: Kwiipe DM, Howley PM editors. *Fields Virology*. 4th edition. Lippincott W&W. 2001. 2675-2705.

- Pass RF.** Epidemiology and transmission of cytomegalovirus infection. *The Journal of Infectious Diseases* 1995; 152: 243-56.
- Pellegrin I, Carrigue I, et al.** Evaluation of new quantitative assays for diagnosis and monitoring of cytomegalovirus disease in human immunodeficiency virus positive patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999; 37: 3124-3132.
- Pfau P, Kochman ML, et al.** Cytomegalovirus colitis complicating ulcerative colitis in the steroid-naive patient. *The American Journal of Gastroenterology* 2001; 96: 895-9.
- Powell RD, Warner NE, et al.** Cytomegalic inclusion disease and ulcerative colitis. Report of a case in a young adult. *The American Journal of Medicine* 1961; 30: 334-40.
- Robey SS, Gage WR, et al.** Comparison of immunoperoxidase and DNA in situ hybridization techniques in the diagnosis of cytomegalovirus colitis. *American Journal of Clinical Pathology*. 1988; 89(5): 666-671.
- Roediger WEW,** Câncer de Cólon, Reto e Ânus. *Manual de Oncologia Clínica*. Tradução Márcio Constantino Mimessi. 6^a edição. Springer-Verlag. 1999. 347-381..
- Roskell DE, Hyde GM, Campbell AP, Jewell DP, Gray W.** HIV associated cytomegalovirus colitis as a mimic of inflammatory bowel disease. *Gut*. 1995; 37: 148-150.
- Saiki RK, Scharf S, et al.** Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985; 230: 1350-1354.
- Sambrook J, Fritsch EF, et al.** *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2th edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; E.3-E.4.
- Shen Y, Zuh H, et al.** Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins are mutagenic and mediate "hit-and-run" oncogenic transformation in cooperation with the adenovirus E1A proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1997; 94:3341-3345.
- Shinkai M, Bozzette AS, et al.** Utility of urine and leukocyte cultures and plasma DNA polymerase chain reaction of identifications of AIDS patients at risk for developing human cytomegalovirus disease. *J Infect Dis*. 1997; 175: 302-308.
- Sinclair J, Sissons JGP.** Human cytomegalovirus: pathogenesis and models of latency. *Seminars in Virology*. 1994; 5: 249-258.
- Spector DH, Spector SA.** The oncogenic potential of human cytomegalovirus. *Progress in Medical Virology*. 1984; 29: 45-89.

- Spector SA**, Hsia K, *et al.* Cytomegalovirus DNA load is an independent predictor of CMV disease and survival in advantage AIDS. *Journal of Virology*. 1999; 73(8): 7027-7030.
- Spector SA**, Hirata KK, *et al.* Identification of multiple cytomegalovirus strains in homosexual men with acquired immunodeficiency syndrome. *The Journal of Infectious Diseases*. 1984; 150: 953-955.
- Stagno S**, Reynolds D, *et al.* Cervical cytomegalovirus excretion in pregnant and non-pregnant women: suppression in early gestations. *The Journal of Infectious Diseases*. 1975; 131: 522-527.
- Stenberg RM**, Thomsen DR, *et al.* Structural analysis of the major immediate early gene of human cytomegalovirus. *Journal of Virology*. 1984; 149: 190-199.
- Stenson WF**. Inflammatory Bowel Disease. In: Yamada T, Alpers DH, Laine L, Owyang C, Powell DW editors. *Textbook of Gastroenterology*. 3th Edition. Lippincott W&W. 1999, 1775-1839.
- Sunsky MF**, Thompson DR, *et al.* Organization and expression of the immediate early genes of human cytomegalovirus. *Journal of Virology*. 1983; 43: 1-14.
- Swanton C**, Jones N. Strategies in subversion: de-regulation of the mammalian cell cycle by viral gene products. *International Journal of Experimental Pathology*. 2001; 82: 3-13.
- Takahashi Y**, Tange T. Prevalence of cytomegalovirus infection in inflammatory bowel disease patients. *Diseases of the Colon & Rectum*. 2004; 47(5): 722-726.
- The TH**, van der Ploeg M, *et al.* Direct detection of cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes: a review of the antigenemia assay and polymerase chain reaction. *Transplantation*. 1992; 54(2): 193-198.
- Truelove SC**, Richards WRD. Biopsy studies in ulcerative colitis. *BMJ* 1956; 1: 1315.
- Vega R**, Bertran X, *et al.* Cytomegalovirus infection in patients with inflammatory bowel disease. *The American Journal of Gastroenterology*. 1999; 94: 1053-6.
- Wada Y**, Matsui T, *et al.* Intractable ulcerative colitis caused by cytomegalovirus infection. A prospective study on prevalence, diagnosis, and treatment. *Diseases of the Colon & Rectum*. 2003; 46(10) (suppl): S59-S65.
- Watts JMck**, de Dombal FT, *et al.* Early course of ulcerative colitis. *Gut* 1966; 7:16.
- Wright HT Jr**, Goodheart Cr, *et al.* Human cytomegalovirus. Morphology by negative staining. *Virology*, 1964; 23: 419-24.

- Yamamoto AY**, Aquino VH, *et al.* Diagnóstico da infecção congênita e perinatal por citomegalovírus utilizando a reação em cadeia da polimerase. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 1998; 31: 19-26.
- Yamamoto AY**, Mussi-Pinhata MM, *et al.* Usefulness of the polymerase chain reaction in the detection of cytomegalovirus in blood and urine samples collected on filter paper. *Journal of Virological Methods.* 2001; 97:159-64.
- Yamamoto AY**, Mussi-Pinhata MM, *et al.* Congenital cytomegalovirus infection in preterm and full-term newborn infants from a population with a high seroprevalence rate. *Pediatric Infectious Diseases Journal.* 2001; 20: 188-92.
- Yurochko AD**, Hwang ES, *et al.* The human cytomegalovirus UL55 (gB) and UL75 (gH) glycoprotein ligands initiate the rapid activation of Sp1 and NF- κ B during infection. *Journal of Virology.* 1997; 71(7): 5051-5059.
- Zipeto D**, Revello MG, *et al.* Development a clinical significance of a diagnostic assay based on the polymerase chain reaction for detection of human cytomegalovirus DNA in blood samples from immunocompromised patients. *Journal of Clinical Microbiology.* 1992; 30: 527-30.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)