

**Adriana Maria Alves De Tommaso**

---

---

Este exemplar corresponde à versão final do exemplar da Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração Pediatria.

Campinas, 27 de setembro de 2002.

  
Prof. Dr. Gabriel Hessel  
Orientador

***Detecção do citomegalovírus  
em fragmento hepático de pacientes  
com colestase neonatal extra-hepática  
por meio da reação em cadeia da polimerase***

200307362

---

---

**Campinas**  
2002

Adriana Maria Alves De Tommaso

---

---

**Detecção do citomegalovírus em fragmento hepático de  
pacientes com colestase neonatal extra-hepática  
por meio da reação em cadeia da polimerase**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor. Área de concentração: Pediatria.

Orientador: Prof. Dr. Gabriel Hessel  
Co-orientador: Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa

UNIDADE BC  
Nº CHAMADA T (UNICAMP)  
D483a  
V \_\_\_\_\_ EX \_\_\_\_\_  
TOMBO BCI 52712  
PROC 16-124/03  
C \_\_\_\_\_ D X  
PREÇO R\$11,00  
DATA 15/03/03  
Nº CPD \_\_\_\_\_

CM00180724-0

BIB ID 284964

D483a De Tommaso, Adriana Maria Alves  
T598d Detecção do citomegalovírus em fragmento  
hepático de pacientes com colestase neonatal extra-hepática por meio da reação  
em cadeia da polimerase / Adriana Maria Alves De Tommaso. Campinas, SP  
: [s.n.], 2002.

Orientadores : Gabriel Hessel, Sandra Cecília Botelho Costa  
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade  
de Ciências Médicas.

1. Biologia Molecular. 2. Icterícia neonatal. I. Gabriel Hessel.  
II. Sandra Cecília Botelho Costa. III. Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

---

**Orientador:**

**Prof. Dr. GABRIEL HESSEL**

---

**Membros:**

**1. Prof. Dr. EDGAR FERRO COLLARES**

**2. Profa. Dra. CECÍLIA AMÉLIA FAZZIO ESCANHOELA**

**2. Profa. Dra. GILDA PORTA**

**3. Dra. APARECIDA YULIE YAMAMOTO**

---

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

**Data: 27/09/2002**

---

A meus pais,

Pietro De Tommaso e Marlene Alves De Tommaso,

pelo estímulo, compreensão, carinho, e por serem meu porto seguro, minha referência e a base de tudo. Sem eles, jamais teria chegado até aqui.

A todos os pacientes e responsáveis, sem os quais não haveria a possibilidade de realização deste trabalho.

A Deus,

que me ajudou a alcançar meus objetivos, escancarou janelas quando portas se fecharam, mostrou a luz onde só havia a escuridão e colocou vários anjos espalhados pelo caminho.

*“O Senhor é o meu pastor; nada me faltará.*

*Deitar-me faz em verdes pastos*

*guia-me mansamente a águas tranqüilas.*

*Refrigera a minha alma; guia-me pelas veredas da justiça, por amor do Seu nome.*

*Ainda que eu andasse pelo vale das sombras da morte, não temeria mal algum, porque Tu estás comigo; a Tua vara e o Teu cajado me consolam.*

*Prepara uma mesa perante mim na presença dos meus inimigos,*

*unges a minha cabeça com óleo, o meu cálice transborda.*

*Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias de minha vida e*

*habitarei na casa do Senhor por longos dias”.*

*(Salmo 23)*

Ao meu orientador,

Prof. Dr. Gabriel Hessel

que, acima de tudo, compartilhou de cada porção deste “sofrimento” e transformou-se num grande amigo.

*Médico,*

*mestre na arte de curar.*

*Professor,*

*mestre na arte de ensinar.*

*A você*

*que me pegou pela mão e me ensinou a trilhar mais um caminho na longa estrada da Medicina.*

*Você*

*que me orientou,  
que ouviu meus temores,  
que teve paciência com minhas indagações,  
que me incentivou a raciocinar,  
que me deu espaço para argumentar.*

*Você*

*que me transmitiu seus conhecimentos, suas experiências,  
me guiou muito além da teoria e da técnica,*

*o meu “Muito Obrigada”.*

*Sei que “obrigada” é muito pouco, aliás é quase nada, mas quero compartilhar de mais esta vitória. Para nós significa muito mais do que um trabalho finalizado, em meio a tantos que já realizamos.*

*Significa chegar ao final de uma batalha e, apesar de todas as intercorrências, olhar para trás e perceber que nada foi em vão e o resultado foi compensador. Valeu a pena cada gota de suor e cada lágrima derramada.*

*A você,*

*todo meu carinho, respeito, admiração,...*

A minha co-orientadora,

Prof. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa

que, em meio a tantas atribuições, me ensinou a dar os primeiros passos neste assustador e fascinante mundo da Biologia Molecular, mostrando-se amiga e companheira.

*É melhor tentar e falhar  
que preocupar-se e ver a vida passar,  
é melhor tentar,  
ainda que em vão  
que sentar-se fazendo nada até o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar que em dias tristes  
em casa me esconder,  
prefiro ser feliz, embora louco,  
que em conformidade viver.*

*(Martin Luther King)*

A todos os “anjos” que cruzaram meu caminho:

Ao Prof. Dr. José Dirceu Ribeiro, responsável pela sub-comissão em Pós-graduação da Pediatria, o qual foi fundamental na minha transferência para o Doutorado, pelo carinho, amizade e apoio.

Ao pessoal do Laboratório de Investigação em doenças infecciosas por técnicas de Biologia Molecular: às biólogas Rosana, Dulcinéia e Gláucia e à bioquímica Andréa (alunas de pós-graduação como eu, porém totalmente familiarizadas com o laboratório devido as suas próprias especialidades). Meu sincero agradecimento pela paciência com a minha “ignorância”, pela dedicação, ajuda, consolo e amizade. Às funcionárias Beatriz, Angélica e Ester, e um agradecimento especial à bióloga e amiga Paula que me ensinou praticamente tudo o que sei sobre sobrevivência em Laboratório e técnicas de Biologia Molecular, que sofreu junto comigo quando nada parecia dar certo e comemorou comigo quando as trevas deram lugar à luz.

Aos “vizinhos” - pessoal dos laboratórios de Metabologia, Reumatologia e Moléstias Infecciosas - que foram fundamentais em muitas ocasiões, permitindo que eu pudesse usar materiais não disponíveis no Laboratório de Biologia Molecular.

À Sandra Bonon, do Laboratório de Investigação de doenças infecciosas por técnicas de Biologia Molecular e Antigenemia, localizado na Oftalmologia, pela ajuda em vários momentos e pela amizade.

À Dra. Cecília Amélia Fazzio Escanhoela, chefe do Departamento de Anatomia Patológica que, em meio a tantas obrigações da profissão, realizou a revisão histológica dos pacientes desta tese e ajudou-me a classificar as alterações encontradas no porta-hepatis.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia Patológica: Léia que me ajudou a cortar todos os blocos de parafina, por mais de uma vez; Priscila que corou várias lâminas; Darcy que me ajudou a procurar muitos dos blocos de parafina, amenizando o sofrimento de ficar em meio a todo aquele pó; às “meninas da recepção” Ivete, Malvina, Flávia e Ana; ao Luís e à Vera.

Aos funcionários do SAME, que me auxiliaram com os prontuários de todos os pacientes, e aos funcionários da Biblioteca, que me ajudaram com a aquisição dos artigos científicos.

À Simone Cristina Ferreira, secretária da sub-comissão em Pós-graduação da Pediatria, pelo apoio incondicional em todos os momentos.

À Denise, Lúcia e Bete, do Laboratório de Citologia do CAISM, pela ajuda com o espectrofotômetro para leitura do DNA.

Ao biomédico Deilson Elgui Oliveira, de Botucatu, responsável pelos *primers* que resultaram no sucesso do trabalho e aos alunos de pós-graduação do mesmo laboratório. Pelo carinho, atenção e apoio no momento mais crítico deste trabalho, meu sincero agradecimento e admiração.

À Maria Cristina Fernandes Alvim, técnica em laboratório, que me ajudou em muitos e importantes passos deste trabalho, mesmo sem entender coisa alguma sobre o assunto, com coragem, determinação e grande sede de saber.

A todo o pessoal da Gastroenterologia Pediátrica, Dr. Collares, Dra. Elizete, Dra. Maria de Fátima, Dr. Fernando, Sílvia, Ângela, Roberto e residentes dos anos de 1999/2000/2001 e 2002, e à Marise, do Laboratório de Gastroenterologia Pediátrica que, direta ou indiretamente, participaram deste trabalho.

À amiga Maraisa Centeville, pela ajuda com o programa EpiInfo para colocação dos dados e pelo apoio em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Cláudio Lúcio Rossi, do Departamento de Patologia Clínica, pela ajuda com a discussão a respeito do citomegalovírus e seus diferentes métodos diagnósticos.

Às estatísticas Cleide M. Silva e Andréa F. Semolin, pela análise dos dados.

À FAPESP, pelo apoio financeiro na realização deste projeto, de 1999 a 2001.

À CAPES, pelo apoio financeiro na realização desse projeto em 2002.

#### *Gente - Estrela*

*Há pessoas estrelas e pessoas cometas.  
Os cometas passam...  
apenas são lembrados pelas datas em que passam e retornam.  
Os cometas desaparecem...  
Há muita gente cometa! Passam pela vida da gente apenas por uns instantes....gente que não prende ninguém e a ninguém se prende.  
Importante é ser estrela...estar presente...ser luz...ser vida.  
AMIGO é estrela.  
Podem passar anos, podem surgir distâncias, mas fica a marca no coração. Há necessidade de se criar um mundo de estrelas.  
Todos os dias sentir sua luz e calor...  
Assim são os amigos na vida da gente. Pode-se contar com eles.  
São coragem nos momentos difíceis. São luz nos momentos escuros...  
São segurança nos momentos de desânimo...  
Ser estrela neste mundo passageiro, neste mundo de pessoas cometas é um desafio mas, acima de tudo, uma recompensa.*

*(autor desconhecido)*

---

<i>1. Resumo</i> .....	xxxiii
<i>2. Abstract</i> .....	xxxvii
<i>3. Introdução e Objetivos</i> .....	41
<i>4. Casuística e Métodos</i> .....	63
<i>5. Resultados</i> .....	79
<i>6. Discussão</i> .....	89
<i>7. Conclusões</i> .....	99
<i>8. Análise Estatística</i> .....	103
<i>9. Aspectos Éticos</i> .....	107
<i>10. Referências Bibliográficas</i> .....	111
<i>11. Anexos</i> .....	129

*TABELAS DO TEXTO*

**Tabela 1.** Seqüência dos *primers* utilizados para a detecção da  $\beta$ -globina - pág.72

**Tabela 2.** Seqüência dos *primers* utilizados para a detecção da  $\beta$ -globina, com amplificação de fragmento menor - pág.74

**Tabela 3.** Seqüência de *primers* utilizados para detecção do CMV - pág.77

**Tabela 4.** Distribuição dos pacientes de acordo com o diagnóstico - pág. 82

**Tabela 5.** Classificação do processo inflamatório presente no porta-hepatis - pág. 84

**Tabela 6a.** Frequência das características analisadas no fragmento hepático, classificadas em leve, moderada e grave - pág. 84

**Tabela 6b.** Frequência das características analisadas no fragmento hepático, classificadas em presente ou ausente - pág. 84

**Tabela 7.** Resultado positivo da PCR para CMV (hepático ou porta-hepatis) nos diferentes grupos. - pág. 86

**Tabela 8.** Avaliação da sensibilidade, especificidade, acurácia, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e coeficiente kappa da sorologia pelo método de ELISA, com inclusão e exclusão dos pacientes do grupo IV - pág. 87

*TABELAS DA SESSÃO ANEXOS*

**Tabela 1.** Quadro clínico e características de exame físico dos pacientes avaliados- pág.136

**Tabela 2.** Resultados de média, mediana e desvio padrão dos índices hematimétricos (expressos em valores absolutos) e de bilirrubinas, aminotransferases e enzimas ductulares (expressos em número de vezes o limite superior da normalidade) - pág.136

**Tabela 3.** Resultados da presença e contratilidade da vesícula biliar - pág.137

**Tabela 4.** Resultados dos tipos de porta-hepatis dos 50 pacientes submetidos à cirurgia - pág.137

**Tabela 5.** Resultado de sorologias realizadas nos pacientes para pesquisa de outros agentes  
- pág.137

**Tabela 6.** Dados de história e exame físico dos pacientes estudados - pág.138

**Tabela 7.** Resultados individuais da pesquisa de CMV por sorologia e PCR - pág.144

**Tabela 8.** Características clínicas e histológicas dos pacientes com PCR positivo para o  
CMV - pág.147

**FIGURA 1.** Estrutura do CMV - pág. 54

**FIGURA 2.** Desnaturação do DNA - pág.72

**FIGURA 3.** Hibridização - pág.73

**FIGURA 4.** Extensão do DNA - pág.73

**FIGURA 5.** PCR para  $\beta$ -globina com fragmento amplificado de 110 pb - pág.75

**FIGURA 6.** Porta-hepatis normal - pág. 82

**FIGURA 7.** Processo inflamatório crônico leve do porta-hepatis - pág. 83

**FIGURA 8.** Processo inflamatório ativo moderado do porta-hepatis - pág. 83

**FIGURA 9.** Processo inflamatório ativo grave do porta-hepatis - pág. 83

**FIGURA 10.** PCR para  $\beta$ -globina - pág. 85

**FIGURA 11.** PCR para CMV - pág. 85

AVB	- Atresia de vias biliares
CMV	- Citomegalovírus
DNA	- Ácido desoxiribonucleico
ELISA	- Enzyme Linked Immunosorbent Assay
HLA	- Antígeno de histocompatibilidade
ICAM	- Molécula de adesão intercelular
IgG	- Imunoglobulina G
IgM	- Imunoglobulina M
MHC	- Complexo maior de histocompatibilidade
PCR	- Reação em cadeia de polimerase
RFC	- Reação de fixação de complemento
RNA	- Ácido ribonucleico



*1. Resumo*

“Colestase” significa diminuição ou parada do fluxo biliar para o duodeno. Do ponto de vista anatômico, é classificada em intra- e extra-hepática, sendo a atresia de vias biliares (AVB) a principal causa dessa última.

A AVB é uma das mais graves doenças hepáticas neonatais e sua etiopatogenia permanece desconhecida. Uma participação viral tem sido proposta, incluindo o citomegalovírus (CMV).

A infecção por CMV ocorre em 1-2% dos recém-nascidos sendo assintomática em mais de 90% dos casos. O risco de transmissão para o feto é maior na infecção primária, porém a infecção recorrente conta com a maioria das infecções congênitas. O diagnóstico laboratorial se faz por isolamento viral em cultura de fibroblastos e detecção de anticorpos IgG e IgM contra o CMV. A amplificação de DNA pela reação em cadeia da polimerase (PCR), tornou sua detecção possível em amostras contendo pequeno número de cópias virais.

Devido à teoria de as afecções biliares serem nuances de um mesmo processo patológico e possibilidade do envolvimento viral, o objetivo deste trabalho foi pesquisar o CMV, por meio de PCR, em fragmento hepático de pacientes com colestase neonatal extra-hepática. Secundariamente, correlacionar esses resultados com a sorologia e achados histopatológicos.

Participaram 57 pacientes com colestase neonatal extra-hepática (49 com AVB, 3 com cisto de colédoco, 2 com AVB associada a cisto de colédoco, 2 com estenose de colédoco terminal e 1 com cisto hepático). A sorologia para CMV foi realizada em 47 pacientes (12 por reação de fixação de complemento-RFC e 35 pelo método de ELISA).

Quanto à histologia, analisamos o fragmento hepático de 53 pacientes e o fragmento do porta-hepatis de 32. O CMV foi pesquisado, por PCR, nos fragmentos hepático e de porta-hepatis dos pacientes e dos controles.

A análise estatística constou de: análise descritiva com tabelas de freqüências, teste exato de Fisher, coeficiente Kappa e medidas de acurácia. O nível de significância foi de 5%.

Com relação à sorologia, 1 paciente apresentou positividade pela RFC e, pelo método de ELISA, 12 foram negativos, 9 positivos para IgG e 14 positivos para IgG e IgM.

No tocante ao porta-hepatitis, três não apresentavam alterações e, nos demais, observou-se processo inflamatório de graus variados. O CMV foi positivo em 12 fragmentos hepáticos e 9 porta-hepatitis, com boa concordância entre eles, e em nenhum controle. A frequência geral de positividade para CMV, por PCR, nesta casuística, foi 29,8%.

O resultado da pesquisa de CMV por PCR foi correlacionado com a sorologia, sendo encontrada baixa acurácia dessa última considerando a PCR como padrão. Na histologia, foram analisadas, separadamente, as características do fragmento hepático e o processo inflamatório do porta-hepatitis e não foi encontrada correlação com nenhum dos achados.

Concluimos que: 1. a frequência do CMV nessa população foi elevada; 2. a sorologia é um método de baixa acurácia; 3. não há correlação entre CMV e as alterações histopatológicas; 4. a utilização de *primers* que amplificam fragmento menor para o gene da  $\beta$ -globina é melhor para avaliar a viabilidade do DNA de amostras embebidas em parafina.

Palavras-chave: colestase neonatal extra-hepática, CMV, PCR



*2. Abstract*

Colestasis is the reduction or the interruption of the bile flow to the duodenum. The classification in causes intrahepatic and extrahepatic is very important, being the biliary atresia (BA) the major cause of the later.

BA is the most severe hepatic disorder in newborns and its etiopathogenesis remains unknown. Viral involvement has been proposed, including the cytomegalovirus (CMV).

CMV infection occurs in 1-2% of the newborns and is asymptomatic in more than 90% of the cases. The transmission to the fetus is greater in the primary maternal infection, although a recurrent infection account for the majority of the congenital infections. Laboratory diagnosis is made by serologic methods or by isolation of the virus in fibroblast cell culture. The amplification of DNA by the polymerase chain reaction (PCR) makes possible the diagnosis in specimens with few copies of the virus.

Due the theory that the cholangiopathies have the same pathologic process and possible viral involvement is suggested, the aim of this study was to investigate CMV, by PCR, in liver tissue of patients with extrahepatic neonatal colestasis and correlate these results with serology and histopathologic findings.

Fifty-seven patients with extrahepatic neonatal colestasis participated (49 BA, 3 choledocal cyst, 2 congenital stenosis of the distal common bile duct and 1 hepatic cyst). The CMV serology was performed in 47 patients (12 by complement fixation assay and 35 by ELISA). Regarding to the histology, it was analysed in liver tissue of 53 patients and in porta hepatis of 32 ones. The liver tissues of 51 infants, the porta hepatis of 23 ones and a control group were studied for the CMV DNA using PCR.

The statistical analysis was performed using descriptive analysis with frequency tables, Fisher test, Kappa coefficient and accuracy measures. The significance level used was 5%.

Regarding to the serology, one patient presented a positive result by complement fixation assay and by ELISA method, 12 presented negative results, 9 positive results for IgG antibody and 14 positive results for IgG and IgM.

Concerning to porta hepatitis, three patients did not present any changes and in the remains, it was visualized an inflammatory process of variable degrees. The CMV was positive in 12 liver tissues and 9 porta hepatitis ones, with a good agreement among them, and in none of the control group. In this study the general frequency of positivity to CMV, by PCR was of about 29.8%.

The detection of CMV DNA by PCR was correlated with a low accuracy serology, considering the PCR as gold standard test. At the histology, it was analysed the features of the liver tissue and the inflammatory process of porta hepatitis and no correlation was found among the findings.

It was concluded that: 1- the frequency of CMV was raised in this population, 2- the serology is a low accuracy method, 3- there is no correlation between the CMV and the histopathologic changes and 4- the use of smaller primers for the fragment of the  $\beta$ -globin gene is better for the evaluation DNA quality of paraffin-embedded tissues.

Key-words: extrahepatic neonatal colesthesis, CMV, PCR.



### *3. Introdução e Objetivos*

Colestase é o impedimento do fluxo biliar canalicular, independente do local onde se localiza o obstáculo e(ou) da causa que o determinou (SILVEIRA & PIRES, 1991). Constitui a principal manifestação da doença hepatobiliar, com incidência estimada de 1:2500 nascidos vivos (DICK & MOWAT, 1985). O recém-nascido, em especial o prematuro, tem predisposição à colestase em virtude da imaturidade hepática relativa ao metabolismo dos ácidos biliares, capacidade de síntese de ácidos biliares atípicos hepatotóxicos, redução do *pool* de ácidos biliares resultante da síntese diminuída e da ausência de reabsorção ileal ativa dos mesmos e diminuição da captação dos ácidos biliares pelos hepatócitos. Em consequência dessa imaturidade, o recém-nascido costuma responder às agressões de natureza infecciosa, tóxica ou metabólica com manifestações clínicas, biológicas e histológicas de colestase (JACQUEMIN, 1992).

Clinicamente, a colestase manifesta-se com icterícia, colúria e hipocolia ou acolia fecal. Laboratorialmente, caracteriza-se por aumento dos níveis plasmáticos de bilirrubina direta, ácidos biliares, colesterol e atividade da fosfatase alcalina e gamaglutamiltransferase. Uma dosagem aumentada de bilirrubina direta (acima de 1,5 mg%) indica síndrome colestatia e exige investigação diagnóstica para diferenciação entre causas intra- e extra-hepáticas (COELHO, 1995).

A síndrome colestatia do lactente constitui um dos maiores desafios diagnósticos da Hepatologia Pediátrica. Sob essa denominação, encontram-se diversas afecções de natureza clínica e um grupo de doenças que requer tratamento cirúrgico. A diferenciação entre causas intra-hepáticas e extra-hepáticas é de grande importância, pois as afecções extra-hepáticas são passíveis de tratamento cirúrgico que, se instituído precocemente, poderá prevenir lesão permanente do fígado e melhorar a sobrevida da criança afetada (GROSFELD *et al.*, 1989; MIELI-VERGANI *et al.*, 1989).

A mais freqüente dentre as causas extra-hepáticas de colestase neonatal é a atresia de vias biliares (AVB). Outras possíveis causas são: cisto de colédoco e estenose congênita do ducto biliar comum distal. Há, também, ocasiões em que poderá haver colestase

neonatal extra-hepática secundária à compressão extrínseca da árvore biliar como, por exemplo, um cisto hepático (ROY *et al.*, 1995).

A AVB é uma colangiopatia obstrutiva, sendo uma das mais graves doenças que acometem o fígado no período neonatal e a mais freqüente causa cirúrgica de colestase nessa faixa etária. É o resultado final de um processo inflamatório destrutivo que pode afetar todo o trato biliar ou parte dele. A época do início da lesão ainda não está esclarecida, mas parece ser entre a 19ª semana de gestação e o período logo após o nascimento, levando à fibrose e obliteração do trato biliar em qualquer ponto do hepatis até o duodeno (BALISTRERI, 1985; BALISTRERI *et al.*, 1996). Ocorre, mais freqüentemente, no sexo feminino e a incidência é similar em estudos realizados no Japão, América do Norte e Reino Unido, com freqüência entre 0,8 e 1 para 10000 nascidos vivos (HOWARD, 1983).

De acordo com Kasai, a AVB pode ser classificada em 4 tipos anatômicos (KASAI, 1974):

1. Tipo I- caracterizado por obstrução completa ou parcial do ducto biliar comum;
2. Tipo IIa- obliteração do ducto hepático comum;
3. Tipo IIb- obliteração dos ductos biliar comum, hepático e cístico, sem envolvimento da vesícula biliar;
4. Tipo III- obliteração dos ductos biliar comum, hepático e cístico associada à presença de cone fibroso que se estende até o hilo hepático (anteriormente denominado tipo “não corrigível”).

Este cone ou remanescente fibroso é classificado em três tipos (GAUTIER *et al.*, 1976; GAUTIER & ELIOT, 1981):

1. Tipo I- ausência de epitélio no tecido conjuntivo;
2. Tipo II- presença de estruturas glandulares com epitélio cuboidal ao nível do porta-hepatis ou em qualquer nível do remanescente fibroso;

3. Tipo III- presença de ducto biliar comum de tamanho reduzido com lúmen obstruído por macrófagos e descamação do epitélio cilíndrico.

Clinicamente, pode apresentar-se de duas formas: 1. Tipo embrionário ou fetal, em que a colestase tem início precoce, com icterícia desde o nascimento, podendo se associar a outras anomalias congênitas e 2. Tipo perinatal ou “adquirida”, cujo início é mais tardio e não há anomalias congênitas associadas. Esta última forma de apresentação constitui a maioria dos casos (DESMET, 1992; BALISTRERI *et al.*, 1996).

O tipo embrionário (20-30% dos casos) pode estar associado a alterações no desenvolvimento do coração, trato digestivo ou baço ou outras alterações tais como *situs inversus*, má-rotação, veia porta pré-duodenal e ausência da veia cava inferior (TAN & MOSCOSO, 1994a). Também foi descrita a associação com tecido hepático ectópico umbilical (PARK, 1991). Tem sido observado que essa constelação de alterações é causada por uma expressão anômala de genes que determinam a lateralidade do desenvolvimento dos órgãos torácicos e abdominais (MAZZIOTTI *et al.*, 1999; STOLL *et al.*, 2001). A forma perinatal ocorre no nascimento ou logo após, com destruição progressiva da árvore biliar que apresentou desenvolvimento normal durante a embriogênese (SCHWEIZER, 1986; DESMET, 1992).

Os achados bioquímicos são inespecíficos (aumento de bilirrubina direta, fosfatase alcalina e aminotransferases). Os níveis séricos de gamaglutamiltransferase estão sempre elevados e excedem 300UI/L em 90% dos casos. Poderá haver coagulopatia, secundária à deficiência de vitamina K, após 3 semanas de vida, que é refletida por um tempo de protrombina prolongado (WRIGHT & CHRISTIE, 1981; FUNG & LAU, 1985; BALISTRERI *et al.*, 1996).

A ultra-sonografia abdominal é uma ferramenta diagnóstica útil, pois poderá identificar a presença de coledocolitíase, perfuração do ducto biliar ou outras alterações estruturais da árvore biliar, tais como o cisto de colédoco. Nas crianças com AVB com

anomalias associadas, o ultra-som pode identificar a poliesplenia e as malformações vasculares (BATES *et al.*, 1998). A vesícula biliar pode estar ausente em cerca de 60% dos casos de AVB, porém sua presença não afasta este diagnóstico. Quando visualizada, recomenda-se a realização da prova funcional (observação de sua contratilidade após ingestão de leite). A hipocontratilidade ou não contratilidade é um sinal indireto de que as vias biliares não estão pérvias (ABRAMSON *et al.*, 1982; BRUN *et al.*, 1985; GREEN & CARROL, 1986; IKEDA *et al.*, 1998). Um novo achado ultra-sonográfico, o sinal do cordão triangular, o qual é evidenciado na porção cranial da bifurcação da veia porta, tem sido descrito com alta sensibilidade e especificidade no diagnóstico de AVB (CHOI *et al.*, 1996; KOTB *et al.*, 2001).

A cintilografia hepatobiliar com DISIDA exclui o diagnóstico de AVB quando a excreção do isótopo para o intestino é visualizada. Todavia, quando o radiotraçador não é visualizado, o resultado é inespecífico porque alguns pacientes com colestase intra-hepática e importante disfunção hepática não captam e(ou) não excretam o material para intestino (ABRAMSON *et al.*, 1982; BRUN *et al.*, 1986).

A colangiografia endoscópica retrógrada tem sido proposta, mas é um procedimento de custo elevado, necessita de endoscopista experiente e não é isenta de complicações. Na eventualidade de se diagnosticar atresia, a laparotomia ainda será necessária (SHIRAI *et al.*, 1993; DERKX *et al.*, 1994).

Uma biópsia percutânea tem acurácia diagnóstica em torno de 95% se um tamanho adequado de amostra, contendo 5 a 7 espaços-porta, é obtido. Achados histológicos característicos incluem proliferação ductular, estase de bile celular e em canaliculos e edema ou fibrose portal ou perilobular (BALISTRERI *et al.*, 1996).

Zerbini *et al.* (1997), avaliando 49 variáveis histopatológicas em 100 biópsias hepáticas de 78 pacientes portadores de síndrome colestática neonatal em relação ao valor de discriminação entre as formas intra- e extra-hepáticas, designaram como variáveis

indicadoras a proliferação ductal, colestase portal em ductos neoformados, distribuição da proliferação ductal portal e fibrose portal e, como variáveis orientadoras as pontes porta-porta, presença de neutrófilos no infiltrado inflamatório e tumefação celular. Dentre todas as variáveis, a proliferação ductal e a colestase portal em ductos neoformados apresentaram os mais altos valores preditivos para colestase extra-hepática, conferindo índice de acerto próximo de 90%.

Em 1959, o Dr. Morio Kasai (*apud* BATES, 1998) desenvolveu o procedimento denominado hepatoportoenterostomia na tentativa de restaurar o fluxo biliar. Até então, não havia tratamento cirúrgico efetivo.

Por vários meses após o nascimento, a atividade e a nutrição desses pacientes permanecem normais, mas esses fatores declinam progressivamente com média de sobrevida, em pacientes não tratados, em torno de 19 meses. Sem drenagem biliar a sobrevida, em 3 anos, é inferior a 10% (HAYS & SNYDER, 1963).

O prognóstico após a cirurgia está relacionado a diversos fatores: 1. idade do paciente e alterações anatômicas dos ductos biliares intra-hepáticos à época da cirurgia; 2. velocidade com que se desenvolve a cirrose biliar e suas complicações e 3. destruição inflamatória progressiva e espontânea dos ductos biliares intra-hepáticos (KASAI, 1974; OHI *et al.*, 1985; SCHWEIZER *et al.*, 2000). Após os 60 dias de vida, o benefício da cirurgia diminui gradualmente e, como a maior parte dos pacientes são submetidos à cirurgia após esta idade, os resultados são insatisfatórios, com evolução para hipertensão porta e fibrose intra-hepática progressiva (KASAI, 1974; HOWARD, 1983).

Apesar do tratamento cirúrgico, 1/3 a 2/3 dos pacientes necessitarão de um transplante hepático na evolução da doença e isso representa cerca de 50% das indicações de transplante hepático na faixa etária pediátrica (ROY *et al.*, 1995; DAVENPORT *et al.*, 1997).

A partir desses dados, têm-se proposto três linhas de ação para o estudo dessa doença: 1. esforços para um diagnóstico precoce; 2. métodos de prevenção da progressão da doença e 3. pesquisa de sua etiologia.

A etiologia permanece desconhecida. Defeitos na organogênese podem ser incriminados em menos de 15% dos casos (HOWARD, 1983). Tan *et al.* compararam o desenvolvimento do sistema biliar normal de fetos e embriões humanos a partir de remanescentes fibrosos ressecados de 205 casos de AVB e propuseram que a doença possa ser causada por falha no processo de remodelação ao nível do hilo hepático com persistência dos ductos biliares fetais (TAN *et al.*, 1994a; TAN *et al.*, 1994b; TAN & MOSCOSO, 1994a; TAN & MOSCOSO, 1994b). Não se demonstrou ligação com radiação ionizante ou drogas teratogênicas e nenhuma alteração específica no metabolismo dos ácidos biliares foi identificada (HOWARD, 1983). Fatores sazonais foram pesquisados com resultados conflitantes (STRICKLAND & SHANNON, 1982; YOON *et al.*, 1997).

HO *et al.* (1993) verificaram alteração em artérias hepáticas (do tronco da artéria hepática comum até seus ramos periféricos) de crianças com AVB determinando alteração no fluxo sangüíneo que supre a árvore biliar sugerindo, então, que possa haver correlação entre esta alteração anatômica e a atresia. Também foram conduzidos estudos com HLA (antígeno de histocompatibilidade) em AVB não associada a outras anomalias com significativa frequência de HLA-B12, haplótipos A9-B5 e A28-B35 sugerindo que fatores imunogenéticos possam desempenhar importante papel na determinação da susceptibilidade à doença (SILVEIRA *et al.*, 1993). Por outro lado, Jurado *et al.* (1997) consideram que a AVB não é HLA- mediada.

Foi aventado que as células do epitélio do ducto biliar funcionem como células apresentadoras de antígenos. O ducto biliar normal expressa antígenos da classe I do MHC (*major histocompatibility complex*) mas não os da classe II, que estão presentes em macrófagos e células do endotélio vascular. Foi demonstrado que o epitélio dos ductos

biliares de pacientes portadores de AVB apresenta expressão aberrante dos antígenos da classe II (HLA-DR) e de antígenos associados a macrófagos (CD68), que são elementos essenciais da resposta inflamatória (KOBAYASHI *et al.*, 1997).

Broomé *et al.* (1997) investigaram a expressão do HLA-DR (MHC classe II) e ICAM-1 (molécula de adesão intercelular) e o número de células T CD4+ e CD8+ no porta-hepatis de 11 pacientes com AVB. Todos expressavam tanto ICAM-1 quanto HLA-DR nas células do epitélio dos ductos biliares e células inflamatórias estavam presentes nos tratos portais sendo, principalmente, células T CD4+. Davenport *et al.* (2001) mostraram que linfócitos CD4+ e células CD56+ (células *natural killer*) predominam no fígado e nos ductos biliares extra-hepáticos na AVB e que ICAM-1 predomina nos hepatócitos e tratos portais.

Uma participação viral tem sido relacionada à etiopatogenia da AVB. Essa hipótese foi sugerida pelos achados de histopatologia. O fragmento hepático apresenta, como já referido, as alterações clássicas de um processo obstrutivo como proliferação de ductos biliares e presença de cilindros biliares em ductos portais mas também, em vários pacientes, há presença de um desarranjo lobular e transformação de células gigantes que já foram considerados marcadores de hepatite neonatal infecciosa (WITZELBEN *et al.*, 1978).

Vários autores procuraram demonstrar correlação entre os vírus e a AVB. Em 1982, Morecki *et al.* observaram reatividade sorológica para o reovírus tipo 3 (por método de imunofluorescência indireta) em 17 de 25 pacientes com AVB e 3 de 37 controles. Em 1984, Glaser *et al.*, utilizando a mesma técnica, encontraram positividade em 21 de 34 crianças portadoras de AVB e em 12 de 23 crianças com hepatite neonatal. Por outro lado, Brown *et al.* (1988) não encontraram correlação, utilizando a técnica de ELISA. Outros estudos, utilizando o método de reação em cadeia da polimerase (PCR), também não encontraram relação entre esse vírus e a AVB (SOKOL *et al.*, 1991; STEELE *et al.*, 1995; TYLER *et al.*, 1998).

Riepenhoff-Talty *et al.* (1993) relataram o desenvolvimento de AVB em camundongos recém-nascidos inoculados, por via oral, com rotavírus do grupo A e esses mesmos pesquisadores (1996) encontraram freqüência de 50% de rotavírus do grupo C em fragmento hepático de crianças com AVB pelo método da PCR. Petersen *et al.* (1997) induziram atresia biliar em ratos por meio de injeção intraperitoneal de rotavírus do grupo A. Esses autores observaram que o vírus provocou doença hepatobiliar com sinais de colestase em 67% dos animais e que, na maior parte desses, o ducto biliar extra-hepático tornou-se estenótico e ocluiu em diferentes segmentos com ou sem dilatação pré-estenótica. Essas modificações ocorreram exclusivamente nos ductos extra-hepáticos e levaram a uma atresia irreversível. O mesmo autor, em 1998, também conseguiu induzir AVB em 80% de camundongos inoculados, intra-peritonealmente, com rotavírus *rhesus*. Por outro lado, Bobo *et al.*, em 1997, não encontraram evidências de rotavírus dos grupos A, B e C, pesquisados por meio da PCR, nos remanescentes hepáticos de 10 crianças com AVB.

Em 1998, Drut *et al.* pesquisaram o papilomavírus humano em fragmento hepático, pela técnica de PCR, de 18 crianças portadoras de atresia biliar e 30 controles encontrando positividade em 16 AVB e nenhum controle. Em outro estudo do mesmo ano, os autores encontraram 100% de positividade, também em tecido hepático, avaliando 7 lactentes (3 com hepatite neonatal e 4 com AVB).

Outros vírus também têm sido relacionados à atresia, tais como o vírus Epstein-Barr, vírus da rubéola e o citomegalovírus, mas alguns trabalhos de revisão citam-nos apenas como coincidência (ROY *et al.*, 1995; BALISTRERI *et al.*, 1996).

Em 1987, Lurie *et al.* descreveram 3 casos de infecção neonatal por citomegalovírus (CMV), de evolução fatal, nos quais as alterações hepáticas à autópsia foram semelhantes à obstrução biliar extra-hepática. Hart *et al.*, em 1991, apresentaram gemelares infectados pelo CMV, sendo que um desenvolveu hepatite neonatal e o outro, AVB. Em 1996, Tarr *et al.* relataram uma freqüência de 24% de CMV, diagnosticado por meio de sorologia

positiva para IgM e(ou) cultura positiva na urina, em crianças portadoras de AVB, sugerindo que pode haver uma participação importante desse vírus na etiologia da doença. Em 1998, Fischler *et al.* pesquisaram o CMV, pela técnica de PCR, em fragmento hepático de 18 crianças com AVB e encontraram positividade em 9; dessas, 5 apresentavam sorologia positiva para CMV com IgM+ e 4 com IgG+/IgM- e 3 de 7 crianças com hepatite neonatal (apenas 1 com sorologia positiva).

Por outro lado, Chang *et al.*, em 1992, pesquisaram a participação do CMV na colestase neonatal, por meio de sorologia e PCR no tecido hepático, e encontraram 2 casos positivos em 26 pacientes com AVB. Nos pacientes com hepatite neonatal, encontraram 23 casos positivos em 50, sugerindo evidência da participação do CMV na etiologia da hepatite neonatal e não da AVB. Em 1999, Jevon *et al.* também não conseguiram demonstrar a presença de CMV nos seus 12 pacientes com AVB, utilizando a técnica de PCR. Em estudo recente, Domiati-Saad *et al.* (2000), estudando 19 casos de crianças com colestase neonatal, 10 com hepatite neonatal e 9 com AVB, detectaram a presença de CMV por meio de PCR no tecido hepático em dois casos de hepatite, 1 de AVB e nenhum controle.

Com base nessas informações, observa-se que a etiopatogenia da AVB ainda não está estabelecida e os vírus podem estar implicados.

O cisto de colédoco é a segunda causa mais comum de alteração da árvore biliar extra-hepática. Trata-se de dilatação cística congênita do ducto biliar comum com predominância no sexo feminino (CATALANI *et al.*, 1994). Sua incidência é rara, atingindo 1 em cada 2.000.000 de nascidos vivos em populações ocidentais (DEWBURY *et al.*, 1980). Nos Estados Unidos pode chegar a 1:13000 em admissões hospitalares (JONES *et al.*, 1971). Na Tailândia, a incidência chega a 1:2400 admissões em hospital pediátrico (WATANATITTAN & NIRAMIS, 1998).

Sua etiologia é desconhecida. Uma das hipóteses seria uma alteração no desenvolvimento embrionário da recanalização do colédoco a partir do cordão primitivo. Outra hipótese atribui o papel causal a uma anomalia estrutural da junção colédoco-pancreática com formação de um canal comum que promoveria mistura dos sucos pancreático e biliar levando a uma dilatação cística da parede, secundária à ação enzimática e inflamatória. A fase inicial pode ser assintomática, porém também tem-se descrito uma tríade caracterizada por dor em cólica no quadrante superior direito do abdome, icterícia e massa palpável em hipocôndrio direito ou epigastro. Em neonatos, é descrito quadro de icterícia colestática em que é fundamental o diagnóstico diferencial com AVB (CATALANI *et al.*, 1994).

A classificação de Todani *et al.* (1977) é a mais freqüentemente utilizada:

1. Tipo I- dilatação cística do ducto biliar comum (subdividida em IA: dilatação sacular envolvendo o ducto biliar comum e o hepático comum, IB: dilatação segmentar do ducto biliar comum e IC: dilatação cilíndrica ou difusa);
2. Tipo II- divertículo do ducto biliar extra-hepático;
3. Tipo III- coledococoele;
4. Tipo IV- dilatações císticas múltiplas (subdividido em IVA: múltiplos cistos dos ductos intra- e extra-hepáticos e IVB: múltiplos cistos dos ductos extra-hepáticos) e;
5. Tipo V- cisto do ducto biliar intra-hepático (simples ou múltiplo).

A manifestação clínica difere de acordo com a idade de início. Neonatos e lactentes usualmente apresentam-se com icterícia, vômitos, acolia fecal, massa abdominal e, dependendo do grau de obstrução, alguns casos podem-se assemelhar à AVB. Outra apresentação clínica é massa abdominal palpável não acompanhada de icterícia. Nas crianças maiores, a tríade clássica de dor, massa abdominal e icterícia pode estar presente (MIYANO *et al.*, 2000).

Antes da era do ultra-som, o diagnóstico raramente era feito antes da cirurgia. O tratamento é cirúrgico e diferentes procedimentos têm sido propostos, baseados no tipo de cisto encontrado (ROY *et al.*, 1995).

A estenose congênita do ducto biliar comum distal pode ser causa de colestase obstrutiva neonatal, embora rara. Pode haver significativa estenose da porção distal ou, ocasionalmente, da junção do ducto hepático comum e do ducto biliar comum. A causa é raramente encontrada, mas um processo congênito ou inflamatório parece provável. O diagnóstico é definido por meio de colangiografia. A remoção cirúrgica da área estenótica com anastomose biliar-jejunal em Y-de-Roux deveria ser curativa (ROY *et al.*, 1995).

Até o momento, na Literatura, tem-se abordado uma possível etiologia viral apenas para a AVB, porém as outras causas de colestase obstrutiva neonatal também permanecem sem etiologia definida.

Em 1974, Benjamin Landing propôs que a AVB, o cisto de colédoco e a hepatite neonatal, representariam manifestações variadas de um mesmo processo e usou o termo “colangiopatias obstrutivas neonatais” para descrever essas entidades. Histologicamente, essas desordens compartilhariam de características comuns e ele propôs que uma infecção viral fosse responsável por essas colangiopatias. Desmet, em 1992, propôs a teoria da má-formação da placa ductal na qual, virtualmente, todas as alterações da árvore biliar representariam exemplos de má-formação do ducto biliar causado por alteração na remodelação da mesma.

Se essas duas teorias forem levadas em consideração, poderia-se pensar num insulto viral levando a essas alterações biliares.

A primeira fase da história do CMV foi originada a partir de estudos histopatológicos. Observou-se a presença de células grandes com inclusões nucleares em diversos órgãos de crianças que morreram devido a várias síndromes não específicas (WELLER & HANSHAW, 1962; WELLER, 1970; 1971a;1971b). As células de inclusão

foram primeiro documentadas por Ribbert, que as observou em recém-nascido com provável sífilis, em 1881 (*apud* SANTOS & IAZETTL, 2000). Esses achados foram responsáveis pelo termo “Doença de inclusão citomegálica” mesmo antes do agente causal ser isolado. Em 1956, o vírus foi isolado em cultura de tecido, por ROWE, SMITH e WELLER sendo que este último denominou o vírus, em 1960, de citomegalovírus (SMITH MG, 1956; WELLER *et al*, 1957; WELLER & HANSHAW, 1962; WELLER, 1970; 1971a;1971b).

O CMV pertence à família dos herpes vírus, subfamília betaherpesvírus (vírus de replicação lenta). Com diâmetro de 180 nm, é o maior membro dos herpes vírus. Apresenta um núcleo de 64 nm, envolto por cápsula icosaédrica de 110 nm composta por 162 capsômeros (GRIFFITS & GRUNDY, 1987). O genoma consiste em duplo DNA de, aproximadamente, 240 kilobases e é semelhante ao do herpes simples. Esse genoma codifica, pelo menos, 35 proteínas estruturais e um número indefinido de proteínas não-estruturais. Possui, ainda, envelope pleomórfico e complexo que consiste de, pelo menos, seis glicoproteínas, imunogênicas e que levam à resposta rápida e durável. A mais abundante e mais imunogênica é a glicoproteína B (gB), seguida pela glicoproteína H (gH) (STAGNO, 1995). Recentemente, foi relatada a presença, também, de RNA em seu genoma (BRESNAHAN & SHENK 2000)

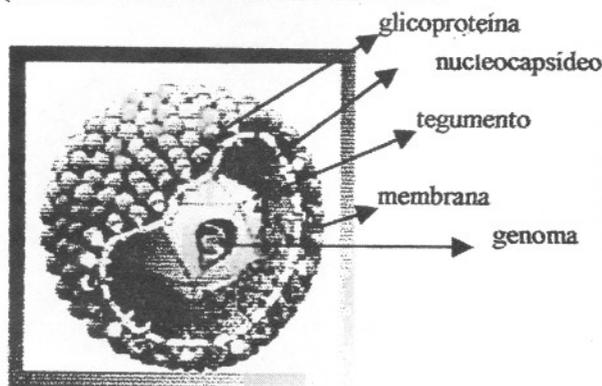


FIGURA 1. Estrutura do CMV

O ciclo replicativo é muito semelhante ao do herpes simples, porém mais lento. Pode ser dividido em três períodos: imediato (ocorre nas primeiras quatro horas após a infecção), precoce (após a fase imediata e persiste por quase 20 horas) e tardio (período após a replicação do DNA viral, coincide com a produção de proteínas estruturais e do vírion). O conhecimento dessas fases é útil para a elaboração de inibidores metabólicos durante a cascata de replicação (STAGNO, 1995).

A infecção congênita por CMV ocorre em, aproximadamente, 1% de todos os recém-nascidos. Estima-se que apenas 5-10% apresentarão doença de inclusão citomegálica típica com hepatoesplenomegalia, icterícia e petéquias, e outros 10% terão infecção congênita subclínica (STAGNO *et al.*, 1982; BOPANA *et al.*, 1992). Estudos em populações gerais de todos os continentes informam que a maioria da população mundial experimenta infecção por CMV durante sua vida (HART *et al.*, 1991). A detecção do vírus em urina, saliva ou tecido de recém-nascidos, durante as três primeiras semanas de vida, define a infecção congênita (STAGNO *et al.*, 1983).

Muitas mulheres adquirem ou reativam a infecção pelo CMV durante a gestação, mas somente uma minoria irá transmitir o vírus para seus fetos. A infecção fetal generalizada é, quase sempre, secundária a infecção primária materna (STAGNO *et al.*, 1982). Devido ao fato de a maioria das gestantes apresentar-se assintomática, os estudos dos mecanismos de transmissão tornam-se prejudicados. Embora ainda não totalmente esclarecida, a infecção intra-uterina é resultado da viremia materna, com subsequente infecção placentária e disseminação hematogênica para o feto. Outra teoria inclui a infecção transovariana por meio de espermatozoides infectados ou reativação da infecção dentro do endométrio, miométrio ou canal cervical (STAGNO, 1995). Ao contrário de infecções como a rubéola e a toxoplasmose congênita, a imunidade materna para o CMV nem sempre leva à proteção suficiente contra transmissão intra-uterina (STAGNO *et al.*, 1983).

O estado sócioeconômico é o fator de maior significância na prevalência da infecção. Em populações de baixo nível sócioeconômico, a prevalência pode chegar a 95-100% (STAGNO, 1995).

A idade da mãe é outro importante fator de risco. Mais de 30% das mulheres jovens liberam CMV no trato genital sendo que, em mulheres acima de 30 anos, os níveis são indetectáveis (KNOX *et al.*, 1979).

No Brasil, são poucos os estudos epidemiológicos sobre o CMV. Pannuti *et al.* (1985), na cidade de São Paulo, observaram incidência de 0,98% em população de baixo nível sócioeconômico e de 0,49% em população de nível sócioeconômico médio. Yamamoto *et al.* (1999) relataram prevalência de 2% de infecção congênita com soropositividade materna de 95%, freqüência considerada alta pelos autores e semelhante às taxas de prevalência em populações com alto índice de soroconversão materna. No Pará, Weirich, pesquisando CMV na saliva de 663 recém-nascidos, por meio da inoculação em fibroblastos, encontrou 21 positivos (3,2%). A pesquisa de anticorpos da classe IgG, pelo método de ELISA, foi positiva em 90,2% das puérperas sendo que, das 21 mães que transmitiram o vírus para o concepto, 4 apresentavam anticorpos da classe IgM (WEIRICH, 1998). Em populações selecionadas, tais como lactentes internados em unidade de terapia intensiva, a prevalência é mais alta (SANTOS *et al.*, 2000).

A doença de inclusão citomegálica é caracterizada pelo envolvimento de múltiplos órgãos, em particular o sistema retículo-endotelial e o sistema nervoso. Weller & Hanshaw (1962) definiram as alterações mais freqüentemente encontradas como sendo hepatomegalia, esplenomegalia, microcefalia, icterícia e petéquias. Microcefalia, geralmente associada a retardo mental ou atraso do desenvolvimento psicomotor, ocorre em cerca de 80% dos casos. Surdez neurosensorial e alterações oculares ocorrem em cerca de 30%. Conforme já mencionado, muitos lactentes não apresentam sintomas precocemente e sua evolução é melhor. A principal alteração tardia relacionada à infecção congênita pelo

CMV é perda auditiva neurosensorial (STAGNO, 1983).

O envolvimento hepático não é raro e evidências clínicas de hepatite são vistas com frequência. A descrição patológica inclui colangite leve, colestase intralobular e colestase obstrutiva secundária à hematopoiese extra-medular (STAGNO, 1995). Calcificações hepáticas têm sido detectadas radiologicamente, em lactentes com infecção congênita (ANSARI *et al.*, 1977; ALIX *et al.*, 1978). Em nosso meio, Passos *et al.* (1996), avaliando 10 lactentes com provável infecção congênita pelo CMV, encontraram colestase em 100% dos casos e, em seis pacientes submetidos à biópsia, as alterações encontradas foram: hipoplasia de ductos biliares, fibrose, transformação de células gigantes, estase biliar e proliferação de ductos biliares.

A infecção perinatal é diagnosticada quando crianças em que a eliminação do vírus pela urina era negativa ao nascimento, passam a apresentá-la entre a 4<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup> semana de vida. Resulta da transmissão do vírus durante o parto, pelo leite materno ou por transfusões de sangue, sendo as duas primeiras as vias mais importantes. A grande maioria dos lactentes permanece assintomática, mas tem sido encontrada pneumonite. Na infecção adquirida, a excreção viral inicia-se entre 30 e 150 dias, com média de 50 dias (STAGNO *et al.*, 1983). Embora essa excreção seja menor que a observada na infecção congênita, a infecção perinatal também é crônica com excreção viral permanecendo por vários anos (STAGNO, 1995).

Em nosso meio, Machado *et al.* (1991) demonstraram que o risco de aquisição de infecção perinatal pelo CMV foi de 30,9% num serviço público na cidade de São Paulo.

O CMV isolado de várias fontes humanas usualmente compartilha um antígeno comum. Todavia, uma heterogeneidade antigênica é bem reconhecida e foi notada, inicialmente, por várias técnicas sorológicas. O DNA das várias cepas tem mostrado, pelo menos, 80% de homologia. As cepas (AD 169, Davis e Towne) são bem adaptadas

para crescimento em cultura e são largamente usadas para pesquisa sendo a cepa AD 169 a de maior reatividade e recomendada para rotina em laboratório (NARIQI, 1991). Recentemente, a variabilidade na virulência das cepas envolvidas na infecção e a capacidade imunológica materna estão sendo estudadas (MURPH *et al.*, 1998; ROSEN *et al.*, 1998; KLEIN *et al.*, 1999; TRINCADO *et al.*, 2000).

Os métodos diagnósticos utilizados para sua detecção podem ser agrupados em quatro categorias: exames citológicos e histopatológicos, isolamento viral e identificação de ácidos nucleicos (COSTA, 1999).

As técnicas citológicas podem ser realizadas em lavados, secreções, aspirados e *imprints* de tecidos. O diagnóstico baseia-se no encontro de inclusões no citoplasma das células analisadas. A sensibilidade dessa técnica é muito baixa e tem pouca utilidade na prática clínica. Com relação à histologia, a grande vantagem é o baixo custo, simplicidade e disponibilidade do equipamento necessário. Os marcadores da infecção são: o achado de células de inclusão típicas e a presença de microabscessos os quais permitem, muitas vezes, atribuir a disfunção ou lesão do órgão estudado ao CMV (COSTA, 1999). Embora a histologia seja um método relativamente confiável, sua sensibilidade é 2 a 6 vezes menor que a do isolamento viral. A especificidade é alta, mas as inclusões podem, ocasionalmente, ser confundidas com inclusões causadas por outros herpesvírus ou adenovírus. Por outro lado, ausência de células de inclusão não exclui diagnóstico de infecção pelo CMV (WONG & WARNER, 1962; MACASAET *et al.*, 1975). Quando as células de inclusão não são detectadas ou não podem ser diferenciadas de outras infecções virais, técnicas com imunohistoquímica oferecem uma alternativa para se alcançar o diagnóstico específico. Nessa técnica são utilizados anticorpos monoclonais contra os antígenos precoces e tardios do CMV permitindo a detecção do antígeno no núcleo e citoplasma das células infectadas (EYZAGUIRRE & WALKER, 2002).

O isolamento viral pode ser feito a partir de materiais biológicos variados. Por tratar-se de vírus lábil, o material deve ser processado imediatamente. Após a inoculação, três ou mais semanas são necessárias para que o CMV possa ser identificado pelo seu efeito citopático característico ou com auxílio de técnica de imunofluorescência. Além da cultura convencional, o vírus pode ser isolado por métodos de identificação rápida. A adsorção viral às células de cultura pode ser facilitada por centrifugação a baixa velocidade ou adição de dexametasona. Posteriormente, usando-se anticorpos monoclonais contra antígenos precoces imediatos do vírus, pode-se ter a conclusão em 24-48 horas, por meio das técnicas de imunofluorescência ou imunoperoxidase.

Os resultados dessas técnicas, quando comparados à cultura convencional, são variáveis e discordantes (COSTA, 1999).

O diagnóstico por meio de testes sorológicos faz-se através da detecção de anticorpos produzidos contra o CMV. Os métodos podem ser divididos em clássicos, como por exemplo a neutralização viral e a fixação de complemento, que não discriminam anticorpos IgM e IgG, e modernos como a imunofluorescência, o radioimunoensaio e os imunoenaios enzimáticos, que discriminam anticorpos IgM e IgG. O requisito principal é a capacidade de o paciente apresentar resposta imunológica humoral adequada. Assim, uma limitação do método é a redução na resposta imune, que pode ocorrer em pacientes com imunodeficiência (COSTA, 1999). Devido ao fato de que os fetos produzem seus próprios anticorpos, sua detecção seria o meio mais prático no diagnóstico da infecção congênita. Os métodos de detecção do anticorpo fetal se baseiam no conceito de que os anticorpos da classe IgM não atravessam a barreira placentária. Porém, resultados falso-negativos podem resultar de competição entre os altos níveis de anticorpos da classe IgG maternos e os níveis relativamente baixos de IgM fetal. Resultados falso-positivos também ocorrem, e podem ser secundários a ocorrência de fatores reumatóides (IgM fetal direcionada contra IgG materna) (STAGNO, 1995).

Dentre os métodos para identificação de ácidos nucleicos, temos a hibridização de DNA e a reação em cadeia da polimerase. O desenvolvimento de técnicas de DNA recombinante com a consequente clonagem e caracterização do CMV tornou possível sua detecção em amostras biológicas por meio de hibridização com sondas específicas. Essa tecnologia tem sido especialmente aplicada no diagnóstico de infecção congênita. Ainda, são testes trabalhosos e necessitam uso de extensas medidas de purificação de DNA (DEMMLER, 1991). A curta vida das sondas e a insensibilidade para baixos títulos de vírus são desvantagens dessa técnica (SANTOS & IAZETTI, 2000).

Com a introdução da amplificação de DNA por meio da reação em cadeia catalizada pela polimerase (PCR), a detecção do CMV foi levada a efeito em amostras contendo pequeno número de cópias do vírus (CHEN *et al.*, 1992; COSTA & COSTA, 1992). A amplificação gênica por PCR é um método de biologia molecular que permite a produção de grande quantidade de fragmentos específicos de DNA a partir de substratos complexos e em concentrações pequenas. De maneira sucinta, esse procedimento consiste em repetidos ciclos de síntese de DNA por meio de dois *primers* ou iniciadores com orientações opostas e seqüências complementares às duas extremidades do fragmento-alvo e levados a efeito por reação enzimática mediada por uma polimerase com atividade em temperaturas elevadas (COSTA & COSTA, 1992).

Cada ciclo de reação de amplificação é composto de três fases distintas:

1. desnaturação- separação das hélices do DNA a ser amplificado;
2. hibridização- ligação complementar entre os *primers* e o DNA;
3. extensão- síntese do DNA pela polimerase.

Cada novo ciclo duplica, teoricamente, a quantidade de DNA-alvo. Através da PCR, obtém-se material suficiente para proceder-se à detecção do DNA desejado. Suas vantagens são: 1. quantidade mínima de amostra necessária; 2. resultado em 24 horas e 3. presença do vírus infectante não é necessária na amostra, permitindo o armazenamento da mesma para

diagnóstico retrospectivo (SANTOS & IAZETTI, 2000).

Essa técnica foi publicada, pela primeira vez, em 1985 por Saiki *et al.* Um número grande de diferentes métodos é usado (PORTER-JORDAN *et al.*, 1990; SMITH KL & DUNSTAN, 1993; GAULT *et al.*, 2001):

a) PCR simples- em que o DNA é amplificado num passo com cerca de 30-40 ciclos, conforme já exposto;

b) submetidas à segunda amplificação com *primers* diferentes. A sensibilidade é aumentada se comparada ao PCR simples;

c) RT-PCR - o RNA é transcrito para DNA com o auxílio da transcriptase reversa e a amplificação do DNA pode ser feita através do PCR simples ou duplo. Sua vantagem é que, desde que a molécula-alvo é o RNA, é possível determinar se o genoma viral é latente ou ativo.

d) PCR em tempo real - oferece um meio mais acurado de quantificar o DNA com a vantagem de evitar a manipulação pós-PCR que pode ser fonte carreadora de DNA.

Em outros materiais, como lavado brônquico, a PCR tem mostrado bons resultados. No líquido, esse parece ser o único método para o diagnóstico do CMV (SANTOS & IAZETTI, 2000). A amplificação de seqüências de ácidos nucleicos em tecidos embebidos em parafina é uma ferramenta útil para análises retrospectivas de espécimes arquivados. Porém, a amplificação desse material é complexa e pode ser influenciada de modo adverso por vários fatores como: quebra do ácido nucleico durante o processamento e estocagem do tecido, intervalo entre a obtenção da amostra e a fixação, tamanho da amostra (biópsias realizadas por meio de agulha oferecem fragmentos pequenos) e tempo entre a estocagem e a realização da PCR (SOGUERO *et al.*, 2000). Espécimes muito antigos ou aqueles fixados sob condições desfavoráveis podem necessitar de *primers* que gerem produtos de amplificação geralmente menores (GREER *et al.*, 1991).

Recentemente, a detecção do antígeno do CMV em leucócitos do sangue periférico (antigenemia) tem sido demonstrada como sendo uma técnica rápida e sensível na detecção do CMV. O teste é baseado na detecção imunocitoquímica direta de proteínas estruturais da matriz viral (pp65) em leucócitos, usando anticorpos monoclonais. É um método sensível para a estimativa da carga viral sistêmica, porém apresenta como desvantagem o fato de a amostra necessitar ser processada em curto período de tempo, sendo recomendável até 8 horas após a coleta (THE *et al.*, 1990; REVELLO *et al.*, 1992).

Como ainda não há uma etiologia precisa para a colestase neonatal extra-hepática e devido a evidências de que os vírus possam desempenhar algum papel em sua etiologia, o objetivo deste trabalho foi:

➤ Objetivo principal:

Pesquisar a presença do CMV, por meio da técnica de PCR e duplo PCR, em fragmento hepático de pacientes portadores de colestase neonatal extra-hepática.

➤ Objetivos secundários:

Relacionar os resultados dessa pesquisa com as sorologias para CMV obtidas desses pacientes e com os achados histopatológicos.

 ***4. Casuística e Métodos***

## 4.1 *Casuística*

### 4.1.1. Pacientes

Foram avaliados 57 pacientes portadores de colestase neonatal extra-hepática (23 do sexo masculino e 34 do sexo feminino) admitidos no serviço de Gastroenterologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, durante o período de setembro de 1981 a julho de 2000. A idade à época da primeira consulta variou de 25 a 239 dias de vida com mediana de 82,5 dias e média de 94 dias. Os antecedentes obstétricos e neonatais dos pacientes são apresentados na tabela 6 em *Anexos*. Demais características dos pacientes podem ser vistas nas tabelas 1-5 em *Anexos*.

Os quatro pacientes que iniciaram acompanhamento no serviço na época deste estudo foram considerados como parte prospectiva do mesmo e solicitado consentimento informado aos responsáveis. Os demais foram considerados como parte retrospectiva.

A colestase neonatal foi secundária a AVB em 49 crianças, AVB associada a cisto de colédoco em duas, cisto de colédoco em três, estenose de colédoco distal em duas e cisto hepático (medindo 3,2 x 3,4cm, próximo ao porta-hepatis, comprimindo árvore biliar e levando à colestase obstrutiva) em uma criança.

Os pacientes foram divididos em 6 subgrupos de acordo com o resultado da sorologia para CMV:

- I. reação de fixação de complemento (RFC) negativa;
- II. RFC positiva (considerando título igual ou superior a 1/4);
- III. ELISA IgG/IgM negativos;
- IV. ELISA IgG+/IgM-;
- V. ELISA IgG+/IgM+;
- VI. não realizada sorologia.

Os pacientes que procuraram o serviço de 1981 a 1991 realizaram a pesquisa do CMV pelo método de reação de fixação de complemento. A partir de 1992, foi instituída, no serviço, a técnica de ELISA. De 1992 até 1998, a técnica de ELISA utilizada foi a manual (SORIN), e a partir de 1998 utilizou-se o ELISA automático (COBAS CORE II). Em ambas as técnicas, a pesquisa do anticorpo IgM foi feita pelo ELISA-captura.

#### 4.1.2. Controles

Como controles, foram incluídas 9 crianças com faixa etária equivalente, nas quais realizou-se biópsia hepática e que apresentaram os seguintes diagnósticos: 1 com hepatotoxicidade por droga, 2 com deficiência de alfa-1-antitripsina, 2 com galactosemia, 1 com fibrose cística, 1 com fibrose hepática congênita, 1 com hepatoblastoma e 1 com doença metabólica sem causa definida.

## 4.2 Métodos

#### 4.2.1. Protocolo de coleta de dados

Com a finalidade de coletar dados dos prontuários foi elaborado protocolo que é apresentado no anexo 1 na seção *Anexos*.

#### 4.2.2. Análise Histológica

A análise histológica foi realizada por um único patologista, Dra. Cecília Amélia F. Escanhoela, que não tinha conhecimento a respeito do diagnóstico etiológico do paciente nem do resultado da sorologia para CMV. Dos 53 fragmentos hepáticos avaliados, 10 eram provenientes de biópsia percutânea, sendo que os demais eram biópsias cirúrgicas. Para tanto, foi elaborado um protocolo com avaliação e graduação das seguintes características:

- ◆ fibrose portal= 0 (ausente), 1 (leve), 2 (moderada), 3 (grave)
- ◆ septos= 0 (ausente), 1 (leve), 2 (moderada), 3 (grave)
- ◆ nódulos= P (presente), A (ausente)
- ◆ colestase= 0 (ausente), 1 (leve), 2 (moderada), 3 (grave)
- ◆ colangite= 0 (ausente), 1 (leve), 2 (moderada), 3 (grave)
- ◆ transformação de células gigantes= P (presente), A (ausente)
- ◆ eosinófilos= P (presente), A (ausente)
- ◆ metaplasia mielóide= P (presente), A (ausente)
- ◆ siderose= 0 (ausente), I (grau I), II (grau II), III (grau III)
- ◆ célula de inclusão citomegálica= P (presente), A (ausente)
- ◆ microabscessos= P (presente), A (ausente)
- ◆ proliferação ductal= 0 (ausente), + (leve), ++ (moderada), +++ (intensa)
- ◆ porta-hepatis= normal, processo inflamatório crônico (predomínio de células linfomononucleares) ou crônico ativo (polimorfonucleares neutrófilos ou macrófagos)
- ◆ processo inflamatório do porta-hepatis= + (leve), ++ (moderado), +++ (grave)

4.2.3. Técnicas de extração de DNA (desenvolvidas no Laboratório de Investigação de doenças infecciosas por técnicas de Biologia Molecular do Departamento de Clínica Médica)

a) *Extração de DNA do material a fresco (técnica descrita por Rogers et al., 1990, com algumas modificações):*

Para digestão da amostra, foi colocada secção de 3 a 7mm de tecido não fixado, já macerado, dentro de um tubo estéril (eppendorf) de 1,5 ml. Após adição de 190µl de solução contendo 0,1M de Tris-HCl (pH igual a 7,5), 1% de SDS e 10µl de uma solução contendo 10mg/ml de proteinase K, o material foi incubado, em banho-maria, a 55°C, por 3 horas. Em seguida, foi feita extração de DNA com fenol-clorofórmio, acrescentando 200µl de fenol e agitando com auxílio de agitador tipo vortex. A seguir, adicionaram-se 200µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) com nova agitação para, depois, proceder-se à centrifugação por 1 minuto a 14000 rpm. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e foram acrescentados, novamente, 200µl de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) com posterior agitação e centrifugação por 1 minuto à 14000 rpm. Para a precipitação do DNA, o sobrenadante foi transferido para outro tubo e acrescentados 25µl de acetato de sódio 3M e 900µl de etanol 100% gelado (conservado a - 20 °C). O material foi, então, homogeneizado e incubado a - 70°C por 30 minutos e, a seguir, centrifugado por 15 minutos a 15000 rpm. Para finalizar, o sobrenadante foi descartado e o precipitado deixado secar para, em seguida, ressuspendê-lo com água estéril.

b) *Extração de DNA dos fragmentos embebidos em parafina (técnica descrita por Latchman, 1995, com algumas modificações):*

Para essa técnica, foram utilizados 10 cortes de 5 micra cada, em tubo para microcentrífuga tipo eppendorf (1,5ml). Para retirar a parafina, foi adicionado, a cada uma das amostras, 1 ml de xileno, agitando-as e deixando-as descansar por 3 a 5 minutos.

Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos, desprezando-se o sobrenadante logo após. Os passos anteriores foram repetidos mais uma vez. A fim de se retirar o xileno, foram adicionados 500µl de etanol a 100% ao material decantado com posterior centrifugação por 5 minutos à velocidade de 14000 rpm. Descartado o etanol a 100%, adicionaram-se 500µl de etanol a 95% com nova centrifugação por 5 minutos a

14000 rpm. Após essa etapa, descartou-se o etanol 95% e foi acrescentado, ao material decantado, etanol a 70% com posterior centrifugação nas mesmas condições e descarte do etanol 70%. O material decantado foi seco por 5 minutos, em temperatura ambiente.

Após a secagem, o material foi ressuspendido em solução de proteinase K (20mg/ml) e solução tampão (50mM Tris; 0,5% SDS; 1mM EDTA; água estéril) e levado ao banho-maria a 55° C durante toda a noite.

Na manhã seguinte, as amostras foram agitadas em vortex para, então, proceder-se à extração do DNA com fenol/clorofórmio. Adicionaram-se 430µl de fenol a cada amostra com homogeneização por 5 minutos e posterior centrifugação por 15 minutos a 14000 rpm. Transferido o sobrenadante para outro eppendorf, adicionaram-se 215µl de fenol + 215µl de clorofórmio com homogeneização por 5 minutos. Após centrifugação por 15 minutos, a 14000 rpm, o sobrenadante foi transferido para outro eppendorf, sendo essa etapa repetida uma segunda vez.

Na seqüência, foram acrescentados 40µl da solução clorofórmio + álcool isopropílico (24:1) e homogeneizada a mistura por 5 minutos com subsequente centrifugação por 15 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante foi colocado em novo eppendorf e homogeneizado com 75µl de acetato de amônio 10M + 750µl de etanol a 100%. A amostra foi, então, levada ao freezer por, pelo menos, 1 semana.

Retiradas as amostras do freezer, as mesmas foram centrifugadas por 30 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol a 100% gelado, cuidadosamente. Após secagem das amostras em temperatura ambiente, foram adicionados 50µl de água estéril, 10µM Tris (pH=8) e 1mM EDTA. O material foi estocado a -20° C até sua utilização para a reação de amplificação do DNA.

Porém, após várias tentativas, com modificação de reagentes e concentrações dos mesmos, não se obteve resultado com relação à amplificação do DNA. Ao submeter as amostras ao espectrofotômetro, a leitura de DNA foi igual a zero. Já é descrita, na literatura

(SOGUERO *et al.*, 2000), a dificuldade em se extrair DNA de material arquivado devido ao uso da parafina, pequeno tamanho do fragmento e tempo de estocagem do mesmo. Devido a esse problema, optou-se pela compra de *kit* comercial para extração, pois achava-se que o problema estava na extração do material.

*c) Extração de DNA com utilização de Kit comercial (DNeasy - Qiagen)*

Devido a essas dificuldades, foi necessário recortar todos os blocos novamente e submetê-los à extração de DNA com utilização de *Kit* comercial.

Para esse procedimento, foi colocada pequena porção (não mais do que 25 mg) de tecido fixado em parafina em tubo de 2ml eppendorf e adicionados 1200µl de xileno com agitação em vortex. Após centrifugação em velocidade total por 5 minutos, em temperatura ambiente, foi removido o sobrenadante, com pipeta, tendo-se o cuidado de não remover o precipitado. Em seguida, adicionaram-se 1200µl de ETOH 100% para remoção do xileno residual com agitação delicada em vortex e posterior centrifugação nas mesmas condições. O etanol foi removido e essa etapa foi repetida mais uma vez.

O precipitado foi incubado, em eppendorf aberto, a 37°C por 10-15 minutos para evaporação do etanol. Em seguida, foi ressuspenso em 180µl de buffer ATL e acrescentados 20µl de proteinase K com homogeneização e incubação a 55°C até o tecido estar completamente lisado.

Após a lise do material, agitou-se o mesmo por 15 segundos e foram adicionados 200µl de buffer AL à amostra com homogeneização e incubação a -70°C por 10 minutos. Acrescentaram-se 200 µl de etanol 100% à amostra, com homogeneização para aplicação do material à mini-coluna a qual está situada no tubo de 2 ml. Centrifugou-se por 1 minuto a 8000 rpm e o filtrado foi descartado junto com o tubo coletor. A mini-coluna foi colocada em novo tubo e adicionaram-se 500µl de buffer AW1 com centrifugação por 1 minuto a

8000 rpm. O filtrado foi, então, descartado junto com o tubo coletor e a mini-coluna foi transferida para novo tubo com adição de 500µl de buffer AW2 e centrifugação por 3 minutos em velocidade total, para secar a membrana do Kit. Esse passo da centrifugação garantiu que nenhum etanol residual seja carregado durante a eluição seguinte.

Seguindo a centrifugação, removeu-se a mini-coluna colocando-a em tubo eppendorf e foram pipetados 100µl de buffer AE diretamente na membrana. O material foi incubado à temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugado por 1 minuto a 8000 rpm. Essa etapa foi repetida uma segunda vez.

#### 4.2.4. Técnica da amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase

##### a) *Detecção do 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. Essa amplificação seguiu a metodologia descrita por SAIKI *et al.* (1985), com algumas modificações. O produto amplificado foi usado como controle interno da reação. O fragmento obtido indicou presença de DNA e as condições da reação foram as mesmas descritas para o CMV. Os *primers* utilizados na primeira reação foram P3 e P5 e, para a segunda reação, P3 e 109 (tabela 1).

**Tabela 1.** Seqüência dos *primers* utilizados para a detecção do  $\beta$ -globina.

Primer	Seqüência
P3	AGA CAG AGA AGA CTC TTG
P5	TCA TTC GTC TGT TTC CCA TTC
109	CCC TTC TTC CTA TGA CAT GAA CTT AAC CAT

Extraído de GRIGNOLI, 1999.

Foram realizados 35 ciclos em termociclador (Robocycler 40 – Stratagene). Os ciclos foram precedidos de um período de desnaturação inicial de 94°C durante 5 minutos e, no final, foram sucedidos por um período de 7 minutos a 72°C para extensão final. Para a primeira reação, cada ciclo compreendeu:

Para a 1ª reação, cada ciclo compreendeu:

- desnaturação por aquecimento (figura 2): 94°C por 1 minuto (separa a fita dupla o DNA em duas fitas simples)



FIGURA 2. Desnaturação do DNA

- hibridização (figura 3)- Ligação do iniciador ou *primer* ao alvo: 55°C por 45 segundos a 1 minuto

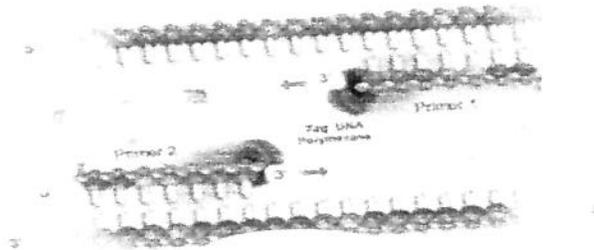


FIGURA 3. Hibridização do DNA

- extensão (figura 4): síntese do DNA pela *Taq* polimerase -72°C por 1 minuto

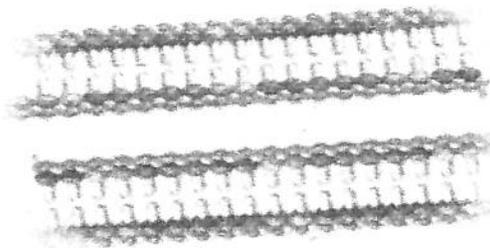


FIGURA 4. Extensão do DNA

Para a dupla-PCR não houve alteração no ciclo de amplificação. Uma alíquota da amostra (5 µl) foi submetida a eletroforese em gel de agarose a 2% previamente corado com brometo de etídio e visualizada em luz ultravioleta. Nas amostras positivas foi

observado um fragmento de 257 pares de bases, correspondente ao gene da  $\beta$ -globina.

Em diversas amostras de materiais antigos e biópsias realizadas por agulha, não foi possível amplificação desse fragmento, mesmo tendo-se efetuado a extração do DNA por meio de *Kit* comercial. Já se tem notícia da dificuldade de amplificação de espécimes muito antigas ou aquelas fixadas sob condições desfavoráveis poderem necessitar de *primers* que gerem produtos de amplificação geralmente menores (GREER *et al.*, 1991).

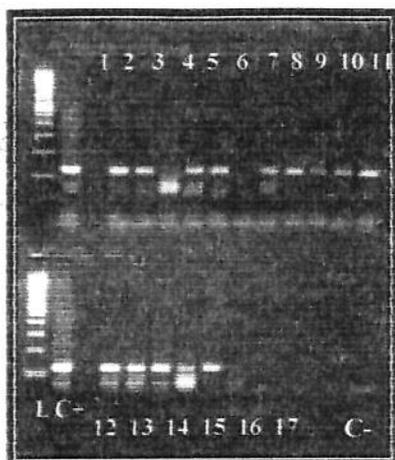
Por isso foi realizada reação nas mesmas condições, porém com utilização de *primers* (tabela 2) que amplificam um produto de tamanho reduzido (110 pares de bases):

**Tabela 2.** Seqüência de *primers* utilizados para detecção da  $\beta$ -globina, com amplificação de fragmento menor.

Primer	Seqüência
PCO3+	5' CCTCTGACACA ACTGTGTTC ACTAGC 3'
PCO4+	5' TCACCACCA ACTTCATCCACG TTCACC 3'

Seqüência de primers gentilmente cedida pelo Laboratório de Biologia Molecular da UNESP-Botucatu e extraída de SAIKI *et al.*, 1988, com algumas modificações.

Em todas as amostras foi observado um fragmento de 110 pares de bases, correspondente ao gene  $\beta$  da globina (figura 5).



L= ladder  
 C+= controle positivo  
 C-= controle negativo  
 1-17= pacientes

Figura 5. PCR para  $\beta$ -globina com fragmento amplificado de 110 pb

Devido a esses resultados, optou-se por realizar a PCR para  $\beta$ -globina em algumas amostras extraídas pelo método tradicional do fenol-clorofórmio e, surpreendentemente, obteve-se amplificação dos fragmentos de 110 pares de bases. Evidenciou-se, desta maneira, que o problema real estava na obtenção do fragmento devido à fragmentação do DNA do material embebido em parafina e não no método de extração.

#### b) Detecção do citomegalovírus

Após a extração, procedeu-se à realização da dupla amplificação gênica (PCR e duplo-PCR). A reação seguiu o método descrito por SAIKI *et al.* (1985), SHIBATA *et al.* (1988) e DEMMLER *et al.* (1988) com algumas modificações.

Para cada reação utilizou-se 0,5 a 1,0  $\mu$ l do DNA a ser estudado (obtido do fragmento hepático após extração conforme descrito anteriormente) em um volume total de 20  $\mu$ l por reação contendo 50mM de cloreto de potássio, 10mM de Tris (pH= 8,4), 3,0 mM de cloreto

de magnésio, 0,1mM de cada *primer* do CMV (MIE4 e MIE5 para a 1ª reação- *primers* externos e IE1 e IE2 para a dupla-PCR- *primers* internos), 200 mM de cada desoxirribonucleotídeo (dATP, dGTP, dCTP e dTTP) e 2-4 unidades da enzima Taq DNA polimerase. Foi utilizada água para completar o volume total da reação. A mistura foi coberta com 1 gota de óleo mineral.

Os *primers* utilizados, bem como o comprimento dos produtos amplificados, podem ser vistos na tabela 3.

Foram realizados 35 a 40 ciclos de amplificação para cada amostra em termociclador (Robocycler 40 – Stratagene). Os ciclos foram precedidos de um período de desnaturação inicial de 94°C durante 5 minutos e, no final, foram sucedidos por um período de 7 minutos a 72°C para extensão final. Para a primeira reação, cada ciclo compreendeu:

- desnaturação: 94°C por 45 segundos a 1 minuto;
- hibridização: 54°C por 45 segundos a 1 minuto;
- extensão: 72°C por 1 minuto.

Para o duplo PCR utilizou-se uma alíquota de 0,5 a 1,0µl do DNA amplificado na primeira reação que foi submetida a nova amplificação com o par de *primers* internos. Não houve alteração no ciclo de amplificação.

Após a realização do duplo PCR, colocou-se uma alíquota da amostra (5 µl) que foi submetida à eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio com posterior visualização do fragmento em luz ultravioleta. Marcadores de peso molecular foram incluídos em cada gel. Nas amostras positivas, foi observado um fragmento de DNA com 159 pares de bases; por outro lado, nenhum fragmento foi amplificado nas amostras negativas. Para cada reação do CMV, utilizou-se, como controle positivo, fluido de fibroblastos contendo a cepa AD 169 e, como controle negativo, foram utilizados reagentes sem a cepa.

**Tabela 3.** Seqüência dos primers utilizados para a detecção do CMV.

Primers	Seqüência	Comprimentos dos produtos amplificados
MIE4	CCA AGC GGC CTC TGA TAA CCA AGC C	435
MIE5	CAG CAC CAT CCT CCT CTT CCT CTG G	
IE1	CCA CCC GTG GTG CCA GCT CC	159
IE2	CCC GCT CCT CCT GAG CAC CC	

Seqüência de primers descrita por SHIBATA *et al.*, 1988 e DEMMLER *et al.*, 1988

MIE= *major immediate-early antigen* (região do CMV cepa Towne)

IE= *immediate-early antigen*

#### 4.2.5. Normas aplicadas para evitar contaminação (KWOK & HIGUCHI, 1989):

Com a finalidade de se evitarem problemas de contaminação das reações, o que levaria a resultados falso-positivos, foram tomados os seguintes cuidados:

- ◆ normas e procedimentos para limpeza e assepsia de vidrarias, pipetas e ambiente de trabalho foram estabelecidas;
- ◆ o ambiente onde ocorreu a extração do DNA foi diferente do ambiente utilizado para a PCR;
- ◆ as amostras foram manipuladas em bancada com fluxo laminar para tornar o ambiente estéril;
- ◆ eletroforese em gel de agarose foi realizada em outro ambiente;

- ◆ ponteiros e tubos (eppendorfs) novos e estéreis foram utilizados para aliquotar as amostras, foram utilizadas ponteiros com filtro;
- ◆ rápida centrifugação para evitar a dispersão do conteúdo por aerossol foi realizada antes da abertura de todos os tubos foi efetuada;
- ◆ trocas constantes de luvas durante o procedimento foram efetuadas.

A decorative horizontal line consisting of a black and white DNA double helix pattern, spanning most of the width of the page.

**5. Resultados**

## 5.1 Sorologia

A sorologia para pesquisa do CMV foi realizada em 47 pacientes. Destes, 12 pelo método de reação de fixação de complemento (casos que procuraram o serviço de 1982 a 1991) sendo que 1 (16,6%) apresentou positividade (resultado de 1/4). Trinta e cinco pacientes realizaram sorologia para CMV pelo método de ELISA sendo encontrados os seguintes resultados: 12 pacientes negativos, 9 pacientes positivos para IgG e negativos para IgM e 14 pacientes positivos para ambos os anticorpos. O restante não realizou sorologia, a maioria por falta de material no serviço. De acordo com esses resultados, os pacientes foram divididos em seis grupos:

- I. reação de fixação de complemento (RFC) negativa = 11 pacientes;
- II. RFC positiva = 1 paciente;
- III. ELISA negativo = 12 pacientes;
- IV. ELISA IgG+/IgM- = 9 pacientes;
- V. ELISA IgG+/IgM+ = 14 pacientes;
- VI. não realizaram sorologia = 10 pacientes.

Dos pacientes em que foi pesquisado CMV pela técnica de ELISA, 2 realizaram pesquisa de CMV na urina, pelo método de PCR, com 100% de positividade (ambos do grupo V). Um desses pacientes realizou PCR no sangue e antigenemia, sendo ambos resultados positivos e o outro realizou antigenemia com resultado negativo.

A distribuição dos pacientes dentro desse grupos, segundo o diagnóstico, pode ser vista na tabela abaixo.

**Tabela 4.** Distribuição dos pacientes de acordo com o diagnóstico.

	AVB		AVB + CC		CC	ECD	CH	TOTAL
Grupo I	9	1	1	0	0	11		
Grupo II	1*			0	0	0	0	1
Grupo III	11*			0	0	1	0	12
Grupo IV	9			0	0	0	0	9
Grupo V	11			1	0	1	1	14
Grupo VI	8			0	2	0	0	10

AVB= atresia de vias biliares extra-hepáticas, CC= cisto de colédoco, ECD= estenose de colédoco distal, CH= cisto hepático, \* 1 paciente com *situs inversus*

## 5.2 Histologia

Com relação ao quadro histológico, foi analisado o fragmento hepático de 53 pacientes e o fragmento do porta-hepatis de 32 deles. No que diz respeito ao porta-hepatis, dos 32 pacientes avaliados, três não apresentavam quaisquer alterações enquanto que, nos demais, foi visualizada presença de processo inflamatório de variados graus de intensidade (figuras 6-9). Devido a esse achado, o processo inflamatório foi classificado em crônico e ativo e graduado em leve, moderado e grave, conforme visto na tabela 5. As características analisadas no fragmento hepático podem ser vistas na tabelas 6a e 6b.



Figura 6. Porta-hepatis normal - estroma com raras células inflamatórias (HE-200X).



Figura 7. Processo inflamatório crônico leve com predomínio de células linfomononucleares (seta). (HE-100X)

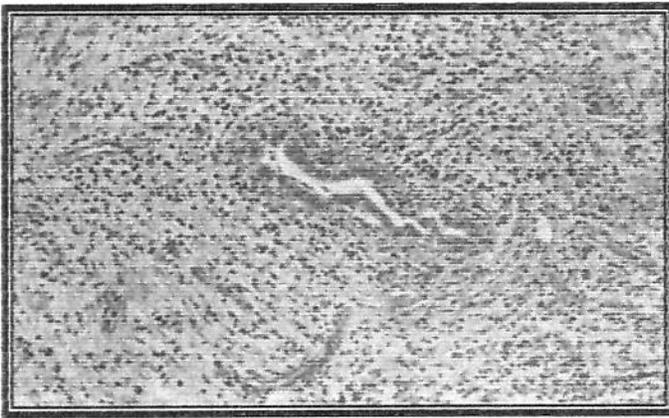


Figura 8. Processo inflamatório crônico ativo moderado contendo macrófagos e eosinófilos e presença de neutrófilos permeando a parede do ducto. (HE-200X)

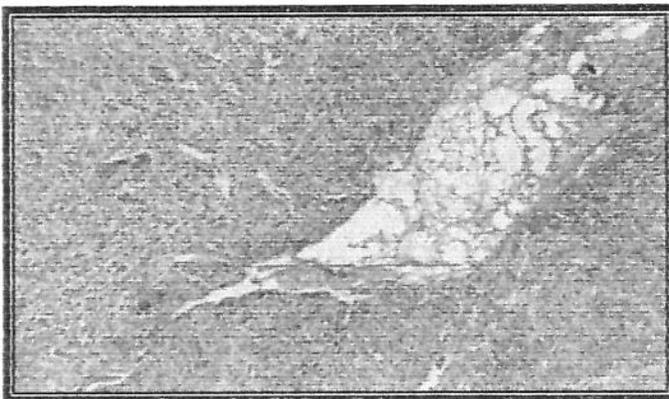


Figura 9. Processo inflamatório crônico ativo grave - destruição ductal completa (HE- 400X)

**Tabela 5.** Classificação do processo inflamatório presente no porta-hepatis.

Porta-hepatis	Frequência	Porcentagem
Normal	3	9,38%
P.C.L.	7	21,88%
P.C.M.	4	12,5%
P.C.A.L.	4	12,5%
P.C.A.M.	8	25%
P.C.A.G.	6	18,75%

P.C.L.= processo crônico leve; P.C.M.= processo crônico moderado; P.C.A.L.= processo crônico ativo leve; P.C.A.M.= processo crônico ativo moderado; P.C.A.G.= processo crônico ativo grave

**Tabela 6a.** Frequência das características analisadas no fragmento hepático, classificadas em leves, moderadas e graves.

	0	1	2	3
Fibrose portal	0	11	28	14
Presença de septos	3	8	27	15
Proliferação de ductos	2	6	27	18
Coletase	0	6	29	18
Colangite	38	9	6	0
Siderose	46	7	0	0

0= ausente; 1= leve; 2= moderada; 3= grave

**Tabela 6b.** Frequência das características analisadas no fragmento hepático, classificadas em presentes ou ausentes.

	Presente	Ausente
Presença de nódulos	32*	21
Transformação de células gigantes	35	18
Presença de eosinófilos	38	15
Metaplasia mielóide	19	34
Inclusão citomegálica	0	53
Microabscessos	0	53

\* >50% em 11 e < 50% em 21

### 5.3 Pesquisa pela PCR

A PCR foi realizada no fragmento hepático e(ou) porta-hepatis de acordo com a disponibilidade das amostras arquivadas. O CMV foi pesquisado, pela técnica de PCR, em 51 fragmentos hepáticos, sendo positivo em 12 (23,53%) e em 23 fragmentos de porta-hepatis, com resultado positivo em 9 (39,13%). A concordância entre os dois, ou seja, apresentar resultado negativo ou positivo em ambos os fragmentos, foi considerada boa (coeficiente kappa= 0,51), mas alguns casos apresentaram discordância. Dois pacientes apresentaram CMV positivo, pela PCR, no fragmento hepático e CMV negativo no porta-hepatis e três crianças apresentaram CMV positivo, pela PCR, no fragmento do porta-hepatis e CMV negativo no fragmento hepático. Os resultados individuais da pesquisa do vírus por PCR, bem como os resultados da sorologia são apresentados na tabela 7, em *Anexos*.

A frequência geral de positividade para o CMV, pela PCR, em nossa casuística foi de 29,8% (17/57), considerando o resultado positivo em um dos dois fragmentos. O resultado de alguns pacientes pode ser visto nas figuras abaixo.

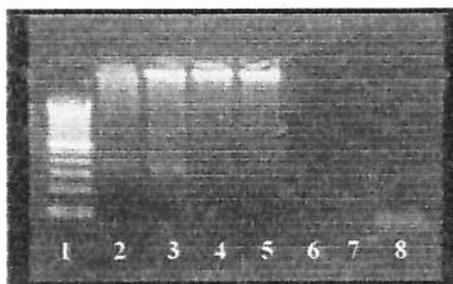


FIGURA 10. PCR para  $\beta$ -globina

- 1= Ladder (marcador de peso molecular)
- 2= Controle positivo
- 3= Porta-hepatis do paciente A
- 4= Fragmento hepático do paciente A
- 5= Fragmento hepático do paciente B
- 6-7= Poços vazios
- 8= Controle negativo

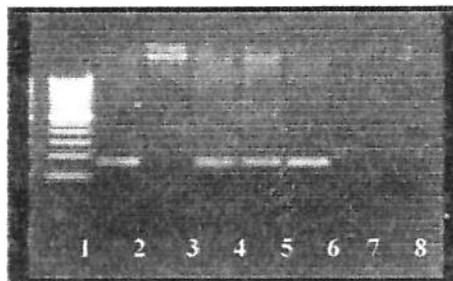


FIGURA 11. PCR para CMV

- 1= Ladder (marcador de peso molecular)
- 2= Controle positivo
- 3= Porta-hepatis do paciente A (CMV-)
- 4= Fragmento hepático do paciente A (CMV+)
- 5= Fragmento hepático do paciente B (CMV+)
- 6= Urina do paciente B (CMV+)
- 7= Poço vazio
- 8= Controle negativo

Os resultados positivos para a PCR comparados à sorologia nos diferentes grupos podem ser vistos na tabela abaixo:

**Tabela 7.** Resultado positivo da PCR para CMV (hepático ou porta-hepatis) nos diferentes grupos.

	GI	G II	G III	G IV	GV	G VI
PCR +	2	1	3	3	6	2

G I (Grupo I)= RFC negativa = 11 pacientes; G II (grupo II)= RFC positiva = 1 paciente;  
 G III (grupo III)= ELISA negativo = 12 pacientes, G IV (grupo IV)= ELISA IGG+/IgM- = 9 pacientes  
 G V (grupo V)=, ELISA IgG+/IgM+ = 14 pacientes; G VI (grupo VI)= não realizaram sorologia=  
 10 pacientes

#### 5.4 Correlação da PCR com a sorologia

Para avaliar a acurácia da sorologia (RFC e ELISA), os dados foram analisados de duas maneiras. Primeiramente, optou-se por correlacionar os resultados da PCR (positiva ou negativa) com a sorologia levando-se em consideração que, os pacientes pertencentes ao grupo IV (ELISA IgG+/IgM-) seriam considerados como sorologia negativa, uma vez que a presença do anticorpo IgG poderia ser apenas passagem transplacentária. Num segundo momento, a correlação foi realizada excluindo-se o grupo IV. Em nenhuma das duas correlações foi observada boa acurácia da sorologia. Quando o grupo IV foi excluído, observou-se aumento na sensibilidade e no valor preditivo negativo, porém houve diminuição da especificidade. A acurácia foi a mesma em ambas as avaliações.

Quando avaliada a acurácia da sorologia apenas pelo método de ELISA, aplicando-se o mesmo raciocínio acima, houve aumento da sensibilidade, porém diminuição da especificidade e da acurácia (tabela 8).

**Tabela 8.** Avaliação da sensibilidade, especificidade, acurácia, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e coeficiente kappa da sorologia pelo método de ELISA, com inclusão e exclusão dos pacientes do grupo IV.

	S	E	VP+	VP-	A	$\kappa$
Com Grupo IV	54,6%	61,9%	42,9%	72,2%	59,4%	0,15
Sem Grupo IV	75%	50%	42,9%	80%	58,3%	0,21

S= sensibilidade; E= especificidade; A= acurácia; VP+= valor preditivo positivo; VP- = valor preditivo negativo;  $\kappa$ = coeficiente kappa

### 5.5 Correlação da PCR com a histologia

O resultado da PCR também foi correlacionado com os achados histológicos. Analisaram-se, separadamente, através do teste exato de Fisher, as características avaliadas no fragmento hepático e o processo inflamatório encontrado no fragmento do porta-hepatis e não se notou correlação estatisticamente significativa com nenhum dos achados.

As características dos pacientes com PCR positiva para o CMV podem ser vistas na tabela 8 da seção *Anexos*.

### 5.6 Pesquisa de DNA do CMV nos controles

Como controles negativos foram avaliados pacientes com colestase neonatal não relacionada ao CMV. Foi realizada PCR para pesquisa de CMV no tecido hepático de 9 pacientes (1 com hepatotoxicidade por droga, 2 com deficiência de alfa-1-antitripsina, 2 com galactosemia, 1 com fibrose cística, 1 com fibrose hepática congênita, 1 com hepatoblastoma e 1 com doença metabólica sem causa definida). Não foi encontrado CMV em nenhum dos pacientes.



## *6. Discussão*

A icterícia neonatal representa um dilema diagnóstico e é de importância o conhecimento de sua causa, quer seja colestase intra-hepática ou extra-hepática. Infelizmente, em uma pequena porcentagem de casos não há resolução desse dilema com base nas características clínicas, laboratoriais, histológicas e de imagem. Isso se deve, em grande parte, ao limitado número de respostas, quer fisiológicas ou anatômicas, que estruturas interdependentes (hepatócitos, árvore biliar intra- e extra-hepática) são capazes de expressar frente a uma variedade de agressões. Além disso, a lesão pode ser muito semelhante em 10-15% dos casos, seja a causa intra- ou extra-hepática (ROY, 1995).

Muitos avanços têm sido obtidos com relação ao diagnóstico, tratamento e conseqüente prognóstico, da AVB e de outras causas de colestase extra-hepática, porém, apesar de uma infinidade de estudos sobre o assunto, as bases etiopatogênicas da doença ainda permanecem desconhecidas.

Dentre as várias agressões que podem estar envolvidas, uma participação viral tem sido aventada. Dentre os vírus em pesquisa, o citomegalovírus foi encontrado em associação com AVB por vários autores (LURIE *et al.*, 1987; HART *et al.*, 1991; TARR *et al.*, 1996; FISCHLER *et al.*, 1998; DOMIATI-SAAD *et al.*, 2000) utilizando vários métodos diagnósticos, inclusive a PCR. Por outro lado, outros autores não conseguiram encontrar correlação (CHANG *et al.*, 1992; JEVON *et al.*, 1999).

Quanto às outras causas de colestase obstrutiva (cisto de colédoco, estenose congênita do ducto biliar comum distal e possível compressão extrínseca), apenas o cisto de colédoco tem sido avaliado quanto à provável associação com vírus e o único vírus pesquisado foi o reovírus. Sokol *et al.* (1991) não encontraram positividade para o reovírus tipo 3 nos pacientes avaliados (29 com AVB, 1 com cisto de colédoco) e Tyler *et al.* (1998) encontraram positividade em 7 de 9 crianças com cisto de colédoco. Ambos os trabalhos utilizaram a técnica da PCR. O presente trabalho é o primeiro, na Literatura, a pesquisar o CMV em outras causas de colestase neonatal extra-hepática, além da AVB. Evidenciou-se, dessa forma, positividade para CMV no paciente com cisto hepático (IgG+/IgM+, PCR+),

em um paciente com estenose de colédoco distal (IgG+/IgM+, PCR+) e em um paciente com cisto de colédoco associado à AVB (RFC-, PCR+).

Nessa casuística, por meio da avaliação sorológica, obteve-se uma frequência de positividade de 31,9% (15 pacientes em 47 - 1 por RFC e 14 pelo método de ELISA, considerando a positividade para o anticorpo da classe IgM). Excluindo-se os pacientes que realizaram pesquisa de CMV pela RFC, uma vez que a mesma apresenta baixa sensibilidade (COSTA, 1999), a frequência de positividade foi de 40% (14 pacientes positivos em 35). Considerando a pesquisa do CMV no fragmento analisado pela PCR, a frequência de positividade foi 29,8%. Dessa forma, observou-se uma alta frequência de sorologia positiva do tipo IgM pelo método de ELISA e de pesquisa positiva no tecido de pacientes com colestase neonatal extra-hepática.

Conforme observada na tabela 8, a acurácia da sorologia foi baixa, não alcançando 60%. Quando se comparam métodos diagnósticos, há necessidade de realização da coleta na mesma época, preferencialmente no mesmo dia. Nesse estudo, a mediana da época da coleta da sorologia, pelo método de ELISA, em relação à realização da biópsia hepática foi de 8 dias e, provavelmente, isso não teria influência sobre os resultados obtidos.

Na verdade, a baixa acurácia não significa erro diagnóstico causado pela sorologia, exceção provavelmente feita aos pacientes do grupo III. Com o objetivo de se avaliar a capacidade de a sorologia detectar a infecção ativa pelo CMV, a correlação deveria ser feita com a PCR no sangue. Porém, a correlação, nesse estudo, está sendo feita com os fragmentos hepático e de porta-hepatis. Essa correlação tem a finalidade de alertar que não se pode concluir, de forma indireta (ou seja, por meio de sorologia positiva), que o vírus seja o responsável pela colestase.

Quando se analisam os 14 pacientes com sorologia IgM positiva (grupo V), verificam-se que apenas seis apresentaram PCR também positiva no fragmento analisado. Isso pode demonstrar que oito pacientes apresentam infecção ativa pelo CMV, porém a colestase não deve ser secundária a essa infecção, o que implicaria necessidade de completar

a investigação para colestase. Em muitos casos, a sorologia positiva para o CMV atrasou o encaminhamento do caso ao serviço, pois foram interpretados como hepatite neonatal secundária à infecção viral. Torna-se de fundamental importância a divulgação desse achado, uma vez que a grande maioria dos pediatras inicia a investigação dos quadros de colestase pela pesquisa de agentes infecciosos e a suspende quando da presença de sorologia positiva.

Outro fator a ser considerado para os pacientes com IgM positivo e PCR negativa, seria a possibilidade de o IgM ser um resultado falso-positivo. Sabe-se que resultados falso-positivos podem ser secundários à presença de fator reumatóide (IgM do recém-nascido contra IgG materno) ou à reação cruzada com outros herpesvírus (STAGNO, 1995). O radioimunoensaio de fase sólida é consideravelmente melhor, com 89% de sensibilidade e 100% de especificidade no diagnóstico da infecção congênita pelo CMV. A magnitude da resposta imune fetal foi relacionada à doença, visto que os pacientes sintomáticos apresentavam os títulos de IgM mais altos (GRIFFITHS *et al.* 1982). Stagno *et al.* (1985) encontraram cerca de 70% de sensibilidade e, aproximadamente 95% de especificidade na detecção de infecção congênita, utilizando o IgM-ELISA. Com o radioimunoensaio, a especificidade foi de 100% e sensibilidade de 89%. Nielsen *et al.* (1987) relatam que o diagnóstico de infecção congênita pode ser melhorado com a pesquisa dos anticorpos IgM e IgE por meio do ELISA-captura. Até que a pesquisa do anticorpo IgM seja melhor aperfeiçoada para uso geral, por meio de um método rápido, viável e definitivo, os clínicos deveriam utilizar mais de um método para auxiliar no diagnóstico (STAGNO, 1995).

Com relação aos nove pacientes do grupo IV (IgG+/IgM-), três apresentavam PCR positiva para CMV. A presença do IgG pode representar passagem transplacentária do anticorpo IgG materno (podendo o lactente estar infectado ou não). Diante desse perfil sorológico, o clínico, além de completar a investigação, deveria preocupar-se em repetir a sorologia pela possibilidade de aparecimento do IgM numa coleta posterior, caso o lactente esteja infectado. Outra possibilidade seria a titulação dos níveis de IgG, pois já é conhecido que esse anticorpo poderá estar presente na criança até os 9 meses de idade, porém há queda

na titulação desde o primeiro mês de vida. No caso de infecção congênita ou perinatal, os níveis de IgG permanecem elevados (SANTOS & IAZZETTI, 2000). Levando-se em consideração os pacientes com PCR positiva, a ausência do anticorpo IgM poderia evidenciar um resultado falso-negativo. Resultados falso-negativos podem ser secundários à competição entre os altos níveis de anticorpos IgG maternos e os níveis de IgM fetal, relativamente baixos (STAGNO, 1995). A concentração de IgM no sangue de cordão é semelhante em neonatos de termo e prematuros. No período pós-natal, frente a um estímulo antigênico, os níveis se elevam rapidamente no decorrer do primeiro mês de vida para então, aumentarem gradualmente. Por volta de um ano de idade, os valores atingem, aproximadamente, 60% dos valores do adulto (LEWIS & WILSON, 1995). Então, apesar de o neonato apresentar elevação dos níveis de IgM, a mesma pode não ser detectada pelos métodos usualmente empregados. Portanto, a ausência do IgM não afasta o diagnóstico de infecção, principalmente congênita e outros testes deveriam ser realizados para confirmação diagnóstica.

Considerando-se o grupo III (ELISA negativo), também obteve-se positividade em três dos 12 pacientes. Então, um resultado sorológico negativo não afastaria o diagnóstico de infecção, podendo ser complementado com outros métodos, como já exposto acima. No entanto, não se pode descartar contaminação das amostras, apesar da baixa probabilidade dessa hipótese devido aos cuidados já descritos com relação à extração e reação de PCR e devido ao uso do duplo PCR. Esse método promove um aumento da eficiência devido à mais rápida e completa desnaturação dos produtos da primeira reação. Assim, eliminam-se os possíveis resultados falso-positivos. Também, minimizam-se possíveis resultados falso-negativos pelo aumento da sensibilidade e especificidade obtidas com as duas amplificações (PORTER-JORDAN, 1990).

Considerando a técnica de amplificação do DNA por meio da PCR, a dificuldade apresentada foi secundária ao fato de os tecidos estarem embebidos em parafina. Nenhuma dificuldade ocorreu com a extração do DNA do tecido a fresco. Já foi colocado que

espécimes muito antigos ou aqueles fixados sob condições desfavoráveis podem necessitar de *primers* que gerem produtos de amplificação geralmente menores (GREER *et al.*, 1991). Com a utilização de *primers* da  $\beta$ -globina que amplificam um fragmento de 110 pares de bases, obteve-se amplificação de quase todas as amostras. Portanto, conclui-se que a extração convencional com fenol-clorofórmio continua válida, não havendo necessidade do uso de *Kit* comercial que é bastante oneroso. Outra vantagem da utilização desses *primers* da  $\beta$ -globina foi a não necessidade de realização do duplo PCR. Com isso, houve maior rapidez nos resultados e, novamente, menor gasto com material.

Quanto aos achados histológicos relacionados à presença do CMV, podem ser encontrados corpos de inclusão citomegálica nas células hepáticas, epitélio do ducto biliar e endotélio vascular, mas sua presença não é essencial para o diagnóstico (LURIE *et al.*, 1987). Outro marcador conhecido é a presença de microabscessos. Embora a histologia seja um método relativamente confiável, sua sensibilidade é 2 a 6 vezes menor que o isolamento viral. A especificidade é alta, mas as inclusões podem, ocasionalmente, ser confundidas com inclusões causadas por outros herpesvírus ou adenovírus (WONG & WARNER, 1962; MACASAET *et al.*, 1975). Nesse estudo, nenhum paciente apresentou células de inclusão citomegálica nem presença de microabscessos no parênquima. A falta desse achado também foi notada por outros autores (HART *et al.*, 1991; CHANG *et al.*, 1992; TARR *et al.*, 1996; JEVON *et al.*, 1999). Infelizmente, não houve correlação estatisticamente significativa entre as características avaliadas no fragmento hepático e o processo inflamatório encontrado no fragmento do porta-hepatis e o resultado positivo da pesquisa do CMV pela PCR.

Ao analisarem-se, separadamente, os fragmentos hepático e de porta-hepatis, notou-se boa concordância entre ambos. Porém, alguns casos apresentaram discordância. Dois pacientes apresentaram CMV positivo, pela PCR, no fragmento hepático e CMV negativo no porta-hepatis. Em ambos, a banda representativa do DNA do gene da  $\beta$ -globina no fragmento do porta-hepatis foi considerada fracamente positiva, enquanto que a banda do fragmento hepático foi considerada fortemente positiva. Então, provavelmente, pode tratar-se de um

resultado falso-negativo pela qualidade do DNA da amostra. Três pacientes apresentaram CMV positivo, pela PCR, no fragmento do porta-hepatitis e CMV negativo no fragmento hepático, mesmo após repetirem-se as reações. Dois desses pacientes apresentavam sorologia positiva (IgG+/IgM+) e banda da  $\beta$ -globina de forte intensidade e um deles apresentava RFC negativa e banda de intensidade fraca. Nesses casos, não há possibilidade de se relacionar o resultado negativo com a qualidade do DNA. Apesar de não ter sido realizada a tipagem da cepa do CMV, não se pode descartar a hipótese da existência de cepas com afinidade por ductos ou hepatócitos e de cepas com diferenças em sua virulência. No estudo de Hart *et al.* (1991) são apresentados os casos de gemelares dizigóticos prematuros infectados congênitamente pelo CMV, sendo que o gemelar A desenvolveu hepatite neonatal com resolução espontânea e o gemelar B evoluiu com AVB e malformações associadas. Estudos posteriores deveriam ser realizados para auxiliar nessa questão.

Não se pode assegurar que o CMV detectado esteja dentro dos hepatócitos e(ou) células dos ductos biliares ou se, simplesmente, esteja circulando no plasma ou nos leucócitos, pois não foi possível a realização da hibridização *in situ* para este fim. No entanto, encontrou-se o vírus no tecido hepático e porta-hepatitis de pacientes com sorologia negativa e com positividade apenas para o anticorpo da classe IgG (grupos III e IV). Esse achado leva a acreditar que o vírus possa estar presente nas células hepáticas e(ou) ductulares.

Encontrou-se, no presente estudo, positividade de 29,8% de detecção de CMV, pela técnica de PCR, nos pacientes com colestase neonatal extra-hepática e, apesar do número reduzido, nenhum dos controles foi positivo para o CMV. Esses achados e os de Fischler *et al.* (1998) e Domiati-Saad *et al.* (2000), indicam que pode haver participação do citomegalovírus na etiopatogenia da AVB. Essa hipótese poderia ser testada com um modelo experimental de indução de AVB por CMV, em animais, utilizando-se a mesma metodologia empregada por Petersen *et al.* (1997).

Por outro lado, Chang *et al.* (1992) e Jevon *et al.* (1999) não encontraram participação do CMV na etiopatogenia da AVB. No trabalho de Jevon *et al.*, foram avaliados

os fragmentos hepáticos de 12 lactentes com AVB, numa população canadense, não sendo encontrado CMV em nenhum deles. Uma provável explicação seria a diferente incidência do vírus nas diversas populações, não estando afastado o envolvimento viral com o quadro de colestase, mas sim baixa prevalência da infecção pelo CMV em determinada população. Chang *et al.* pesquisaram o CMV em 50 lactentes com hepatite neonatal, 26 com AVB e 30 controles encontrando positividade no fragmento hepático de 2 com AVB, 23 com hepatite e em nenhum controle. Uma possível explicação para esse achado poderia ser o tipo de cepa. Outra questão a ser discutida é que os autores utilizam a PCR simples, amplificando um fragmento de 240 pares de bases. No presente estudo, utilizou-se a PCR-dupla, amplificando fragmento de 159 pares de bases o que sensibiliza ainda mais os resultados. Dependendo do número de cópias de vírus e das condições do fragmento, a PCR simples poderia acarretar um resultado falso-negativo. Não foi objetivo desse estudo a análise do CMV em fragmento hepático de casos de hepatite neonatal.

Levantou-se a hipótese de que as células do epitélio do ducto biliar funcionem como células apresentadoras de antígenos. O ducto biliar normal expressa antígenos da classe I do MHC mas não os da classe II. Foi demonstrado que o epitélio dos ductos biliares de pacientes com AVB apresenta expressão aberrante dos antígenos da classe II (KOBAYASHI *et al.*, 1997).

Recentemente, outros trabalhos envolvendo imunohistoquímica têm sido realizados evidenciando alterações específicas em ductos biliares (BROOMÉ *et al.*, 1997; DAVENPORT *et al.*, 2001). Provavelmente, a agressão do epitélio ductal com conseqüente processo atresiante deva ser secundária a uma resposta imunomodulada a qual pode ser desencadeada por agressão de qualquer natureza, inclusive viral. Portanto, o processo final seria de causa multifatorial.

Em conclusão, foi encontrada, nesse estudo, uma associação entre infecção por citomegalovírus e colestase extra-hepática. Esse é o primeiro trabalho latino-americano que pesquisa essa relação. Estudos posteriores com maiores casuísticas e, de preferência, com

tipagem da cepa, seriam úteis no esclarecimento dessas questões. Um modelo experimental incluindo estudo imunohistoquímico também seria de grande valia.



**7. Conclusões**

Através da pesquisa do citomegalovírus em pacientes com colestase neonatal extra-hepática, conclui-se que:

1. A frequência do CMV, pela pesquisa com PCR, nessa casuística, foi elevada (29,8%).
2. A sorologia para detecção dos anticorpos contra o CMV, quando comparada à pesquisa do vírus no tecido, pelo método da PCR, foi considerada como método de baixa acurácia.
3. Não houve correlação entre o CMV e as alterações histopatológicas encontradas nos pacientes desse estudo.
4. A utilização de *primers* que amplificam um fragmento menor para o gene da  $\beta$ -globina é melhor para avaliar a viabilidade do DNA de amostras embebidas em parafina.



A análise estatística foi realizada pela seção de Estatística da Comissão de Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, de acordo com FLEISS, 1981 e FLETCHER *et al.*, 1991.

#### 6.1 Objetivos:

##### 6.1.1. Análise descritiva

6.1.2. Verificar a acurácia da sorologia para CMV utilizando o PCR como padrão-ouro

##### 6.1.3. Verificar a associação entre os resultados da histologia e o PCR

#### 6.2 Metodologia:

##### 6.2.1. Análise descritiva através de tabelas de frequências

6.2.2. Verificação de associação ou comparação de proporções através do teste exato de Fisher

6.2.3. Coeficiente de Kappa como medida de concordância: valores maiores ou iguais a 0,75 indicam excelente concordância; valores entre 0,75 e 0,40 indicam boa concordância e valores menores ou iguais a 0,40 não indicam concordância.

6.2.4. Medidas de acurácia: sensibilidade (proporção de indivíduos com a doença que têm teste positivo para a mesma); especificidade (proporção de indivíduos sem a doença que têm teste negativo para a mesma); valor preditivo positivo (probabilidade da doença em um paciente com resultado de teste positivo); valor preditivo negativo (probabilidade de não ter a doença em um paciente com resultado de teste negativo); acurácia (proporção de todos os resultados corretos dos testes, tanto positivos quanto negativos).

6.2.5. O nível de significância adotado foi de 5%.

#### 6.3 Programa Computacional

Foi utilizado o programa SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 8.2. SAS Institute Inc., 1999-2000, Cary, NC, USA.

 **9. Aspectos Éticos**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (anexo 2).

Na parte prospectiva do estudo (pacientes que procuraram o serviço após o início do mesmo) foi elaborado consentimento informado que foi assinado pelo responsável concordando com a participação no presente estudo (anexo 3).

 **10. Referências Bibliográficas**

1. ABRAMSON S.J., TREVES S., TEELE R.L. The infant with possible biliary atresia: evaluation by ultrasound and nuclear medicine. **Pediatr Radiol**, v.12, n.1, p.1-5, 1982.
2. ALIX D., CASTEL Y., GOUEDARD H. Hepatic calcification in congenital cytomegalic inclusion disease. **J Pediatr**, Brest, v.92, n.5, p.856, may 1978.
3. ANSARI B.M., DAVIS D.B., JONES M.R. Calcification in liver associated with congenital cytomegalic inclusion disease. **J Pediatr**, Glamorgan, v.90, n.4, p.661-662, mar 1977.
4. BALISTRERI W.F. Neonatal cholestasis – medical progress. **J Pediatr**, Cincinnati, v.106, n.2, p.171-184, feb 1985.
5. BALISTRERI W.F., GRAND R., HOOFNAGLE J.H., SUCHY F.J., RYCKMAN F.C., PERLMUTTER D.H., SOKOL R.J. Biliary atresia: current concepts and research directions. **Hepatology**, Cincinnati, v. 23, n.6, p.1682-1692, jun 1996.
6. BATES M.D., BUCUVALAS J.C., ALONSO M.H., RYCKMAN F.C. Biliary atresia: pathogenesis and treatment. **Sem Liver Dis**, Cincinnati, v.18, n.3, p.281-293, ago 1998.
7. BOBO L., OJEH C., CHIU D., MACHADO A., COLOMBANI P., SCHWARZ K. Lack of evidence for rotavirus by polymerase chain reaction/enzyme immunoassay of hepatobiliary samples from children with biliary atresia. **Pediatr Res**, Baltimore, v.41, n.2, p.229-234, feb 1997.
8. BOPPANA S.B., PASS R.F., BRITT W.J., STAGNO S., ALFORD C.A. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality. **Pediatr Inf Dis**, Birmingham, v.11, n.2, p.93-99, feb 1992.
9. BRESNAHAN W.A., SHENK T. A subset of viral transcripts packaged within human cytomegalovirus particles. **Science**, v.30, n.288, p.2373-2376, jun 2000.
10. BROOMÉ U., NEMETH A., HULTCRANTZ R., SCHEYNIUS A. Different expression of HLA-DR and ICAM-1 in livers from patients with biliary atresia and Byler's disease. **J Hepatol**, Sweden, v.26, n.4, p.857-862, apr 1997.

11. BROWN W.R., SOKOL R., LEVIN M.J., SILVERMAN A., TAMARU T., LILLY J.R., HALL R.J., CHENEY M. Lack of correlation between infection with reovirus 3 and extrahepatic biliary atresia or neonatal hepatitis. **J Pediatr**, Denver, v.113, n.4, p.670-676, oct 1988.
12. BRUN P., GAUTHIER F., BOUCHER D., BRUNELLE F. Ultrasound findings in biliary atresia in children. A perspective study with surgical correlation in 86 cases. **Ann Radiol (Paris)**, v.28, n.3-4, p.259-263, 1985.
13. CATALANI G.B., SABBATINI A., MARMORALE C., CORRADINI G., De LUCA S., FIANCHINI A. Cisti congenita del coledoco. **Minerva Chir**, Ancona, v.49, n.12, p.1335-1341, dic 1994.
14. CHANG M-H, HUANG H-H, HUANG E-S, KAO C-L, HSU H-Y, LEE C-Y. Polymerase Chain Reaction to detect human cytomegalovirus in livers of infants with neonatal hepatitis. **Gastroenterology**, Taipé, v.103, n.3, p.1022-1025, sep 1992.
15. CHEN Y-T, MERCER G.O., CHEIGH J.S., MOURADIAN J.A. Cytomegalovirus infection of renal allografts. **Transplantation**, New York, v.53, n.1, p.99-102, jan 1992.
16. CHOI S.O., PARK W.H., LEE H.J., WOO S.K. 'Triangular cord': a sonographic finding applicable in the diagnosis of biliary atresia. **J Pediatr Surg**, Taegu-Korea, v.31, n.3, p.363-366, mar 1996.
17. COELHO C.A.R. Colestase do recém-nascido e do lactente jovem. **Rev Paul Pediatría**, Botucatu, v.13, n.4, p.134-136, dez 1995.
18. COSTA F.F., COSTA S.C.B. Reação em cadeia da polimerase (PCR): princípios e aplicações clínicas. **Rev Bras Reumatol**, Campinas, v.32, n.3, p.142-146, mai/jun 1992.
19. COSTA S. C. B. Infecção por citomegalovírus (CMV): epidemiologia, diagnóstico e tratamento. **Rev Bras Clin Terap**, Campinas, v.25, n.1, p.18-28, jan 1999.
20. DAVENPORT M., GONDE C., REDKAR R., KOUKOULIS G., TREDGER M., MIELI-VERGANI G., PORTMANN B., HOWARD E.R. Immunohistochemistry of the liver and biliary tree in extrahepatic biliary atresia. **J Pediatr Surg**, London e Indianapolis, v.36, n.7, p.1017-1025, jul 2001.

21. DAVENPORT M., KERKAR N., MIELI-VERGANI G., MOWAT A.P., HOWARD E.R. Biliary atresia: The King's college hospital experience (1974-1995). **J Pediatr Surg**, London, v.32, n.3, p.479-485, mar 1997.
22. DEMMLER G.J., BUFFONE G.J., SCHIMBOR C.M., MAY R.A. Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification. **J Infect Dis**, Texas, v.158, n.8, p.1177-1184, dec 1988.
23. DEMMLER G.J. Infectious Diseases Society of America and Centers for Disease Control – Summary of a Workshop on surveillance for congenital cytomegalovirus disease. **Rev Infect Dis**, Texas, v.13, n.2, p.315-329, mar-apr 1991.
24. DERKX H.H., HUIBREGTSE K., TAMINIAU J.Á. The role of endoscopic retrograde cholangiopancreatography in cholestatic infants. **Endoscopy**, Netherlands, v.26, n.9, p.724-728, nov 1994.
25. DESMET V.J. Congenital disease of intrahepatic bile ductus: variation on the theme “Ductal plate malformation”. **Hepatology**, Leuven, v.16, n.4, p.1069-1083, oct 1992.
26. DEWBURY K. C., ALUWIHARE A. P. R., BIRCH S. J., FREEMAN N. V. Prenatal ultrasound demonstration of a choledochal cyst. **Br J Radiol**, Hampshire, v.53, n.633, p.906-907, set 1980.
27. DICK M.C., MOWAT A.P. Hepatitis syndrome in infancy-an epidemiological survey with 10 year follow up. **Arch Dis Child**, v.60, p.512-516, 1985.
28. DOMIATI-SAAD R., DAWSON D.B., MARGRAF L.R., FINEGOLD M.J., WEINBERG A.G. and ROGERS B.B. Cytomegalovirus and human herpesvirus 6, but not human papillomavirus, are present in neonatal giant cell hepatitis and extrahepatic biliary atresia. **Pediatr Dev Pathol**, Dallas, v.3, n.4, p.367-373, jul-aug 2000.
29. DRUT R., GOMEZ M.A., DRUT R.M., CUETO RUA E., LOJO M. Virus Papiloma Humano, hepatitis gigantocelular neonatal y atresia de vias biliares. **Acta Gastroent Latinoamer**, La Plata, v.28, n.1, p.27-31, mar 1998.
30. EMERECKI K. B., WHITINGTON P. F. Molecular basis of neonatal cholestasis. **Pediatrics Clinics of North America**, Chicago, v.49, n.1, p.221-243, feb 2002.

31. EYZAGUIRRE E.J., WALKER D.H. Immunohistochemistry of Infectious Diseases. In: **Diagnostic Immunohistochemistry** 1<sup>a</sup> ed. Philadelphia, 2002, cap.20, p.640-50.
32. FISCHLER B., EHRNST A., FORSGREN M., ORVELL C., NEMETH A. The viral association of neonatal cholestasis in Sweden: a possible link between cytomegalovirus infection and extrahepatic biliary atresia. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, Stockolm, v.27, n.1, p.57-64, jul 1998.
33. FLEISS J.L. Assessing significance in a fourfold table. In: **Statistical Methods for Rates and Proportions**. 2<sup>a</sup> ed. New York, 1981, cap.2, p.19-32.
34. FLEISS J.L. The measurement of interrater agreement. In: **Statistical Methods for Rates and Proportions**. 2<sup>a</sup> ed. New York, 1981, cap.13, p.212-236.
35. FLETCHER R. H., FLETCHER S. W., WAGNER E. H. Diagnóstico. In: **Epidemiologia Clínica**. 2<sup>a</sup> ed. Porto Alegre, 1991, cap.3, p.68-107.
36. FLETCHER R. H., FLETCHER S. W., WAGNER E. H. Frequência. In: **Epidemiologia Clínica**. 2<sup>a</sup> ed. Porto Alegre, 1991, cap.4, p.108-125.
37. FUNG K.P., LAU S.P. Gamma-glutamyl transpeptidase activity and its serial measurement in differentiation between extrahepatic biliary atresia and neonatal hepatitis. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v.4, n.2, p.208-213, apr 1985.
38. GAULT E., MICHEL Y., DEHÉE A., BELABANI C., NICOLAS J-C, GARBARG-CHENON A. Quantification of human cytomegalovirus DNA by real-time PCR. **J Clin Microbiol**, Paris, v.39, n.2, p.772-775, feb 2001.
39. GAUTIER M., JEHAN P., ODIÉVRE M. Histologic study of biliary fibrous remnants in 48 cases of extrahepatic biliary atresia: correlation with postoperative bile flow restoration. **J Pediatr**, Bicêtre, v.89, n.5, p.704-709, nov 1976.
40. GAUTIER M., ELIOT N. Extrahepatic biliary atresia - morphological study of 98 biliary remnants. **Arch Pathol Lab Med**, France, v.105, n.8, p.397-402, aug 1981.
41. GLASER J.H., BALISTRERI W.F., MORECKI R. Role of reovirus type 3 in persistent infantile cholestasis. **J Pediatr**, Cincinnati, v.105, n.6, p.912-915, dec 1984.

42. GREEN D., CARROL B.A. Ultrasonography in the jaundice infant: a new approach. **J Ultrasound Med**, v.5, p.323, 1986.
43. GREER C.E., PETERSON S.L., KIVIAT N.B., MANOS M.M. PCR amplification from paraffin-embedded tissues – effects of fixative and fixation time. **Am J Clin Pathol**, Washington, v.95, n.2, p.117-124, feb 1991.
44. GRIFFITHS P.D., GRUNDY J.E. Molecular biology and immunology of cytomegalovirus. **Biochem J**, London, v.241, n.2, p.313-324, jan 1987.
45. GRIFFITHS P.D., STAGNO S., PASS R.F., SMITH R.J., ALFORD C.A. Congenital cytomegalovirus infection: diagnostic and prognostic significance of the detection of specific immunoglobulin M antibodies in cord serum. **Pediatrics**, Birmingham, v.69, n.5, p.544-549, may 1982.
46. GRIGNOLI C.R.E. Alterações moleculares dos genes de globinas  $\beta$  e  $\delta$  em hemoglobinopatias estruturais e talassêmicas no Brasil. 1999. 80 f. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
47. GROSFELD J.L., FITZGERALD J.F., PREDAINA R., WEST K.W., VANE D.W., RESCORLA F.J. The efficacy of hepatoporoenterostomy in biliary atresia. **Surgery**, Indianapolis, v.106, n.4, p.692-700, oct 1989.
48. HART M.H., KAUFMAN S.S., VANDERHOOF J.Á., ERDMAN S., LINDER J., MARKIN R.S., KRUGER R., ANTONSON D.L. Neonatal hepatitis and extrahepatic biliary atresia associated with cytomegalovirus infection in twins. **Am J Dis Child**, Omaha, v.145, n.3, p.302-304, mar 1991.
49. HAYS D.M., SNYDER W.H. Life-span in untreated biliary atresia. **Surgery**, Los Angeles, v.54, n.2, p.373-375, aug 1963.
50. HO C-W., SHIODA K., SHIRASAKI K., TAKAHASHI S., TOKIMATSU S., MAEDA K. The pathogenesis of biliary atresia: a morphological study of the hepatobiliary system and the hepatic artery. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, Saitama, v.16, n.1, p.53-60, jan 1993.

51. HOWARD E.R. Extrahepatic biliary atresia: a review of current management. **Br J Surg**, London, v.70, n.4, p.193-197, apr 1983.
52. IKEDA S., SERA Y., OHSHIRO H., UCHINO S., AKIZUKI M., KONDO Y. Gallbladder contraction in biliary atresia: a pitfall of ultrasound diagnosis. **Pediatr Radiol**, Kukamoto, v.28, n.6, p.451-453, jun 1998.
53. JACQUEMIN E. Développement et physiopathologie de la sécrétion biliaire. **Arch Fr Pediatr**, v.49, p.741-748, 1992.
54. JEVON G.P. and DIMMICK J.E. Biliary atresia and cytomegalovirus infection: a DNA study. **Pediatr Dev Pathol**, Vancouver, v.2, n.1, p.11-14, jan-feb 1999.
55. JONES P.G., SMITH D.E., CLARKE A.M., KENT M. Choledocal cyst: experience with radical excision. **J Paediatr Surg**, Melbourne, v.6, n.2, p.112-120, apr 1971.
56. JURADO A., JARA P., CAMARENA C., HIERRO L., LAHOZ C., PALOMINO P. Is extrahepatic biliary atresia na HLA-associated disease? (letter) **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, Madrid, v.25, n.5, p.557-558, nov 1997.
57. KASAI M. Treatment of biliary atresia with special reference to hepatic portoenterostomy and its modifications. **Prog Pediatr Surg**, v.6, p.5-52, 1974.
58. KLEIN M., SHOPPEL N., MACH M. Strain-specific neutralization of human cytomegalovirus isolates by human sera. **J Virol**, Erlangen-Germany, v.73, n.2, p.878-886, feb 1999.
59. KNOX G.E., PASS R.F., REYNOLDS D.W., STAGNO S., ALFORD C.A. Comparative prevalence of subclinical cytomegalovirus and herpes simplex virus infections in the genital and urinary tracts of low income urban women. **J Infect Dis**, Birmingham, v.140, n.3, p.419-422, sep 1979.
60. KOBAYASHI H., PURI P., O'BRIAIN D. S., SURANA R., MIYANO T. Hepatic overexpression of MHC class II antigens and macrophage-associated antigens (CD68) in patients with biliary atresia of poor prognosis. **J Ped Surg**, Dublin, Ireland and Tokyo, v.32, n.4, p.590-593, apr 1997.

61. KOTB M.A., KOTB A., SHEBA M.F., EL KOOFY N.M., EL-KARAKSY H.M., ABDEL-KAHLIK M.K., ABDALLA A., EL-REGAL M.E., WARDA R., MOSTAFA H., KARJOO M., A-KADER H.H. Evaluation of the triangular cord sign in the diagnosis of biliary atresia. **Pediatrics**, New York, v.108, n.2, p.416-420, aug 2001.
62. KWOK S. and HIGUCHI R. Avoiding false positives with PCR. **Nature**, California, v.339, n.18, p.237-238, may 1989.
63. LANDING B.H. Considerations of the pathogenesis of neonatal hepatitis, biliary atresia and choledochal cyst-the concept of infantile obstructive cholangiopathy. **Prog Pediatr Surg**, v.6, p.113-139, 1974.
64. LATCHMAN D. S. The basics of molecular biology. In: **PCR: Applications in Pathology. Principles and practice**. Oxford, 1995, cap.2, pp.6-53.
65. LEFKOWITZ J.H. Biliary atresia. **Mayo Clin Proc**, New York, v.73, n.1, p.90-95, jan 1998.
66. LEHTONEN L., SVEDSTRÖM E., KORVENRANTA H. The size and contractility of the gallbladder in infants. **Pediatr Radiol**, Finland, v.22, n.7, p.515-518, 1992.
67. LEWIS D.B., WILSON C.B. Developmental immunology and role of host defenses in neonatal susceptibility to infection. In: **Infectious diseases of the fetus and newborn infant**. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1995, cap.2, p.20-98.
68. LURIE M., ELMALACH I., SCHUGER L., WEINTRAUB. Liver findings in infantile cytomegalovirus infection: similarity to extrahepatic biliary obstruction. **Histopathol**, Haifa, v.11, n.11, p.1171-1180, nov 1987.
69. MACASAET F.F., HOLLEY K.F., SMITH T.F. Cytomegalovirus studies of autopsy tissue. II – Incidence of inclusion bodies and related pathologic data. **Am J Clin Pathol**, Minnesota, v.63, n.6, p.859-865, jun 1975.
70. MACHADO C.M., FINK M.C.D.S., VILAS BOAS L.S., SUMITA L.M., WEINBERG A., SHIGUEMATSU K., SOUZA LC., CASANOVA L.D., PANNUTI C.S. Infecção perinatal pelo citomegalovírus em hospital público do município de São Paulo: estudo prospectivo. **Rev Inst Med Trop S Paulo**, São Paulo, v.33, n.2, p.159-166, mar-abr 1991.

71. MADUREIRA L.R., BARBOSA S.S., CALÇADO A.C. Associação de atresia biliar extra-hepática e citomegalovirose - Relato de um caso. *Arq Bras Med (Supl)*, Rio de Janeiro, v.67, n.5, p.376-378, set/out 1993.
72. MAZZIOTTI M.V., WILLIS L.K., HEUCKEROTH R.O. Anomalous development of the hepatobiliary system in the inv mouse. *Hepatology*, Houston, v.30, n.2, p.372-378, aug 1999.
73. MIELI-VERGANI G., PORTMAN B., HOWARD E.R., MOWAT A.P. Late referral for biliary atresia-missed opportunities for effective surgery. *Lancet*, London, v.1, n.8635, p.421-423, feb 1989.
74. MIYANO T., YAMATAKA A., LI L. Congenital biliary dilatation. *Sem Pediatr Surg*, Tokyo, v.9, n.4, p.187-195, nov 2000.
75. MORECKI R., GLASER J.H., CHO S., BALISTRERI W.F., HORWITZ M.S. Biliary atresia and reovirus type 3 infection. *N Engl J Med*, New York, v.307, n.8, p.481-484, aug 1982.
76. MURPH J.R., SOUZA I.E., DAWSON J.D., BENSON P., PETHERAN S.J., PFAB D., GREGG A., O'NEILL M.E., ZIMMERMAN B., BALE J.F. Epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection: maternal risk factors and molecular analysis os cytomegalovirus strains. *Am J Epidemiol*, Iowa, v.147, n.10, p.940-947, may 1998.
77. NARIQ S. Cytomegaloviruses. In: *Textbook of Human Virology*. 2 ed. St. Louis, 1991. cap. 37, p.889-924.
78. NIELSEN S.L., RONHOLM E., SORENSEN I, JAEGER P., ANDERSEN H.K. Improvement of serological diagnosis of neonatal cytomegalovirus infection by simultaneously testing for specific immunoglobulins E and M by antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol*, Denmark, v.25, n.8, p.1406-1410, aug 1987.
79. OHI R., HANAMATSU M., MOCHIZUKI I, CHIBA T., KASAI M. Progress in the treatment of biliary atresia. *World J Surg*, Sendai, v.9, n.2, p.285-293, apr 1985.

80. PANNUTI C.S., VILAS BOAS L.S., ÂNGELO M.J.O., CARVALHO R.P.S., SEGRE C.A.M. Congenital cytomegalovirus infection. Occurrence in two socioeconomically distinct populations of a developing country. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, São Paulo, v.27, n.2, p.105-107, mar-abr 1985.
81. PARK W-H, CHOI S-O, LEE S-S, RANDOLPH J.G. Ectopic umbilical liver in conjunction with biliary atresia: uncommon association. **J Pediatr Surg**, Washington e Coréia, v.26, n.2, p.219-222, feb 1991.
82. PASSOS O.A., FERNANDES M.I.M., GALVÃO L.C., ZUCOLOTO S., SAWAMURA R., GOLDANI H.A.S. Colestase neonatal e infecção por citomegalovírus: formas de apresentação clínica e histopatológica. **J Pediatr (Rio J.)**, Ribeirão Preto, v.72, n.3, p.159-163, mai/jun 1996.
83. PETERSEN C., BIERMANN S., KUSKE M., SCHÄEL K., MEYER-JUNGHÄEL L., MILDENBERG H. New aspects in a murine model for extrahepatic biliary atresia. **J Pediatr Surg**, Hannover, v.32, n.8, p.1190-1195, aug 1997.
84. PETERSEN C., GRASSHOFF S., LUCIANO L. Diverse morphology of biliary atresia in an animal model. **J Hepatol**, Hannover, v.28, n.4, p.603-607, apr 1998.
85. PORTER-JORDAN K., ROSENBERG E. I., KEISER J. F., GROSS J. D., ROSS A. M., NASIM S., GARRETT C. T. Nested polymerase chain reaction assay for the detection of cytomegalovirus overcomes false positives caused by contamination with fragmented DNA. **J Med Virol**, Washington, v.30, n.2, p.85-91, feb 1990.
86. RIEPENHOFF-TALTY M., GOUVEA V., EVANS M.J., SYENSSON L., HOFFENBERG E., SOKOL R.J., UHNOO I., GREENBERG S.J., SCHAEEL K., ZHAORI G., FITZGERALD J., CHONG S., EL-YOUSEF M., NEMETH A., BROWN M., PICCOLI D., HYAMS J., RUFFIN D. and ROSSI T. Detection of group C Rotavirus in infants with extrahepatic biliary atresia. **J Infect Dis**, Beijing, v.174, n.1, p.8-15, jul 1996.

87. RIEPENHOFF-TALTY M., SCHAEKEL K., CLARK F., MUELLER W., UHNOO I., ROSSI T., FISHER J., OGRA P.L. Group A Rotaviruses produce extrahepatic obstruction in orally inoculated newborn mice. **Pediatr Res**, Buffalo, v.33, n.4, p.394-399, apr 1993.
88. ROGERS B. B., ALPERT L. C., HINE E. A. S., BUFFONE G. F. Analysis of DNA in fresh and fixed tissue by the polymerase chain reaction. **Am J Pathol**, Texas, v.136, n.3, mar 1990
89. ROSEN H.R., CORLESS C.L., RABKIN J., CHOU S. Association of cytomegalovirus genotype with graft rejection after liver transplantation. **Transplantation**, Oregon, v.66, n.12, p.1627-1631, dec 1998.
90. ROY C.C., SILVERMAN A. and ALAGILLE D. Neonatal hepatitis. In: **Pediatric Clinical Gastroenterology** 4 ed. St. Louis, 1995, cap. 20 e 21, p.620-683.
91. SAIKI R.K., SCHARF S., FALOONA F., MULLIS K.B., HORN G.T., ERLICH H.Á. e ARNHEIM N. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, Los Angeles, v.230, n.4732, p.1350-1354, dec 1985.
92. SAIKI R.K., GELFAND D. H, STOFFEL S., SCHARF S. J., HIGUCHI R., HORN G. T., MULLIS K. B., ERLICH H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, San Diego, v.239, n.4839, p.487-491, jan 1988.
93. SANTOS D.V.V., SOUZA M.M.R., GONÇALVES S.H.L., COTTA A.C.S., MELO L.A.O., ANDRADE G.M.Q., BRASILEIRO-FILHO G. Congenital cytomegalovirus infection in a neonatal intensive care unit in Brazil evaluated by PCR and association with perinatal aspects. **Rev Inst Med Trop S Paulo**, Minas Gerais, v.42, n.3, p.129-132, mai/jun 2000.
94. SANTOS P.H., IAZZETTI A.V. Citomegalia congênita e perinatal. **Pediatria Moderna**, São Paulo, v.36, n.12, p.805-826, dez 2000.

95. SCHWEIZER P. Treatment of extrahepatic bile duct atresia: results and long-term prognosis after hepatic portoenterostomy. **Pediatr Surg Int**, v.1, p.30-36, 1986.
96. SCHWEIZER P., SCHWEIZER M., SCHELLINGER K., KIRSCHNER H.J., SCHITTENHELM C. Prognosis of extrahepatic bile-duct atresia after hepatportoenterostoy. **Pediatr Surg Int**, Tübingen, v.16, n.5-6, p.351-355, 2000.
97. SHIBATA D., MARTIN J., APPLEMAN M.D., CAUSEY D.M., LEEDOM J.M., ARNHEIM N. Detection of cytomegalovirus DNA in peripheral blood of patients infected with human immunodeficiency virus. **J Infect Dis**, California, v.158, n.6, p.1185-1192, dec 1988.
98. SHIRAI Z., TORIYA H., MAESHIRO K., IKEDA S. The usefulness of endoscopic retrograde cholangiopancreatography in infants and small children. **Am J Gastroenterol**, Fukuoka, v.88, n.4, p.536-541, apr 1993.
99. SILVEITA T.R., PIRES A.L.G. Icterícia Colestática Neonatal. In: **Gastroenterologia Pediátrica 2<sup>a</sup>** ed. Rio de Janeiro, 1991, cap. 51, p. 465-487.
100. SILVEIRA T.R., SALZANO F.M., DONALDSON P.T., MIELI-VERGANI G., HOWARD E.R., MOWAT A.P. Association between HLA and extrahepatic biliary atresia. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, Porto Alegre, v.16, n.2, p.114-117, fev 1993.
101. SMITH K. L., DUNSTAN R. A. PCR detection of cytomegalovirus: a review. **Br J Haematol**, Nedlands, v.84, n.2, p.187-190, jun 1993.
102. SMITH M.G.. Propagation in tissue cultures of cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. **Proc Soc Exp Biol Med**, St. Louis, v.92, p.424-430, 1956.
103. SOGUERO C., CAMPO E., RIBALTA T., SÁNCHEZ-TAPIAS J.M., SÁIZ J.C. and BRUGUERA M. Assessment of genotype and molecular evolution of hepatitis C virus in formalin-fixed paraffin-embedded liver tissue from patients with chronic hepatitis C virus infection. **Lab Invest**, Barcelona, v.80, n.6, p.851-856, jun 2000.

- 104.SOKOL R.J., ENDO N., OHARA J., LILLY J., LEVIN M., SILVERMAN A., BROWN W.R. Reovirus 3 RNA not detected by polymerase chain reaction in tissues from infants with extrahepatic biliary atresia [Abstract]. **Hepatology**, Denver, v.14, n.4, p.125A, 1991.
- 105.STAGNO S. Cytomegalovirus. In: **Infectious diseases of the fetus and newborn infant**. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1995, cap.7, p.312-353.
- 106.STAGNO S., PASS R.F., DWORSKY M.E., ALFORD C.A. Congenital and perinatal cytomegalovirus infections. **Sem Perinatol**, Birmingham, v.7, n.1, p.31-42, jan 1983.
- 107.STAGNO S., PASS R.F., DWORSKY M.E., HENDERSON R.E., MOORE E.G., WALTON P. D., ALFORD C.A. Congenital cytomegalovirus infection - The relative importance of primary and recurrent maternal infection. **N Engl J Med**, Birmingham, v.306, n.16, p.945-949, apr 1982.
- 108.STAGNO S., TINKER M.K., ELROD C., FUCCILLO D.A., CLOUD G., O'BEIRNE A.J. Immunoglobulin M antibodies detected by enzyme-linked immunosorbent assay and radioimmunoassay in the diagnosis of cytomegalovirus infections in pregnant women and newborn infants. **J Clin Microbiol**, Maryland, v.21, n.6, p.930-935, jun 1985.
- 109.STEELE M.I., MARSHALL C.M., LLOYD R.E., RANDOLPH V.E. Reovirus 3 not detected by reverse transcriptase-mediated polymerase chain reaction analysis of preserved tissue from infants with cholestatic liver disease. **Hepatology**, Oklahoma City, v.21, n.3, p.697-702, mar 1995.
- 110.STOLL C., MORALI A., LEHEUP B., LUCRON H. Extrahepatic biliary atresia with laterality sequence anomalies. **Genet Couns**, Strasbourg, v.12, n.2, p.157-161, apr 2001.
- 111.STRICKLAND A.D., SHANNON K. Studies in the etiology of extrahepatic biliary atresia: Time-space clustering. **J Pediatr**, Texas, v.100, n.5, p.749-753, may 1982.
- 112.TAN C.E.L., DAVENPORT M., DRIVER M., HOWARD E.R. Does the morphology of the extrahepatic biliary remnants in biliary atresia influence survival? A review of 205 cases. **J Pediatr Surg**, London, v.29, n.11, p.1459-1464, nov 1994.

113. TAN C.E.L., DRIVER M, HOWARD E.R., MOSCOSO G.J. Extrahepatic biliary atresia: a first-trimester event? Clues from light microscopy and immunohistochemistry. **J Pediatr Surg**, London, v.29, n.6, p.808-814, jun 1994.
114. TAN C.E.L., MOSCOSO G.J. The developing human biliary system at the porta hepatic level between 29 days and 8 weeks of gestation-a way to understanding biliary atresia. Part I. **Pathol Int**, London, v.44, n.8, p.587-599, ago 1994.
115. TAN C.E.L., MOSCOSO G.J. The developing human biliary system at the porta hepatic level between 11 and 25 weeks of gestation: a way to understanding biliary atresia. Part II. **Pathol Int**, London, v.44, n.8, p.600-610, ago 1994.
116. TARR P.I., HAAS J.E., CHRISTIE D.L. Biliary atresia, citomegalovirus and age at referral. **Pediatrics**, Seattle, v.97, n.6 (Pt 1), p.828-831, jun 1996.
117. THE T.H., VAN DER PLOEG M., VAN DER BERG A.P., VLIEGER A.M., VAN DER GIESSEN M., VAN SON W.J. Direct detection of cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes: a review of the antigenemia assay and polymerase chain reaction. **Transplantation**, v.54, n.2, p.193-198, aug 1992.
118. TODANI T., WATANABE Y., NARUSUE M., TABUCHI K., OKAJIMA K. Congenital bile duct cysts: classification, operative procedures and review of thirty-seven cases including cancer arising from choledochal cyst. **Am J Surg**, Okayama city, v.134, n.2, p.263-269, aug 1977.
119. TRINCADO D.E., SCOTT G.M., WHITE P.A., HUNT C., RASMUSSEN L., RAWLINSON W.D. Human cytomegalovirus strains associated with congenital and perinatal infections. **J Med Virol**, Handwick-Australia, v.61, n.4, p.481-487, aug 2000.
120. TYLER K.L., SOKOL R.J., OBERHAUS S.M., LE M., KARRER F.M., NARKEWICZ M.R., TYSON R.W., MURPHY J.R., LOW R., BROWN W.R. Detection of reovirus RNA in hepatobiliary tissues from patients with extrahepatic biliary atresia and choledochal cysts. **Hepatology**, Denver, v.27, n.6, p.1475-1482, jun 1998.

121. VAN DER BIJ W., TORENSMA R., VAN SON W.J., TEGZESS A.M., THE T.H.  
Rapid immunodiagnosis of active cytomegalovirus infection by monoclonal antibody staining of blood leukocytes. **J Med Virol**, v.25, p.179-188, 1988.
122. WATANATITTAN S. & NIRAMIS R. Choledocal cyst: review of 74 pediatric cases. **J Med Assoc Thai**, Bangkok, v.81, n.8, p.586-594, aug 1998.
123. WEIRICH J. Infecção congênita pelo citomegalovírus: estudo realizado na Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará. **Rev Soc Br Med Trop**, Pará, v.31, n.3, p.325-326, mai-jun 1998.
124. WELLER T.H. Cytomegaloviruses: The difficult years. **J Infect Dis**, Boston, v.122, n.6, p.532-539, dec 1970.
125. WELLER T.H. The cytomegaloviruses: ubiquitous agents with protean clinical manifestations (First of two parts). **New Engl J Med**, Boston, v.285, n.4, p.203-214, jul 1971.
126. WELLER T.H. The cytomegaloviruses: ubiquitous agents with protean clinical manifestations (Second of two parts). **New Engl J Med**, Boston, v.285, n.5, p.267-274, jul 1971.
127. WELLER T.H., HANSHAW J.B. Virologic and clinical observations on cytomegalic inclusion disease. **New Eng J Med**, Boston, v.266, n.24, p.1233-1244, jun 1962.
128. WELLER T.H., MACAULEY J.C., WIRTH P. Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease. **Proc Soc Exp Biol Med**, Harvard, v.94, p.4-12, 1957.
129. WITZELBEN C.L., BUCK B.E., SCHNAUFER L., BRZOSKO W.J. Studies of the pathogenesis of biliary atresia. **Lab Invest**, Pennsylvania, v.38, n.5, p.525-532, may 1978.
130. WONG T.W. and WARNER N.E. Cytomegalic inclusion disease in adults: report of 14 cases with review of literature. **Arch Pathol**, Chicago, v.74, p.403-422, nov 1962.

131. WRIGHT K., CHRISTIE D.L. Use of gamma-glutamyl transpeptidase in the diagnosis of biliary atresia. **Am J Dis Child**, v.135, n.2, p.134-136, feb 1981.
132. YAMAMOTO A.Y., FIGUEIREDO L.T.M., MUSSI-PINHATA M.M. Prevalência e aspectos clínicos da infecção congênita por citomegalovírus. **J Pediatr (Rio J.)**, Ribeirão Preto, v.75, n.1, p.23-28, jan/fev 1999.
133. YOON P. W., BRESEE J. S., OLNEY R.S., JAMES L. M., KHOURY M. J. Epidemiology of biliary atresia: a population-based study. **Pediatrics**, Atlanta, v.99, n.3, p.376-382, mar 1997.
134. ZERBINI M.C., GALLUCCI S.D., MAEZONO R., UENO C.M., PORTA G., MAKSOUD J.G., GAYOTTO L.C. Liver biopsy in neonatal cholestasis: a review on statistical grounds. **Mod Pathol**, São Paulo, v.10, n.8, p.793-799, aug 1997.



## 11.1 - Anexo 1

### **PROTOCOLO PARA COLETA DE DADOS**

#### **I. Identificação:**

- Nome.....
- Sexo:.....
- HC:.....
- Naturalidade/Procedência.....
- Idade à 1ª consulta no HC-UNICAMP:.....

#### **II. Antecedentes pessoais e obstétricos:**

- Materno: - Pré-natal ( ) S ( ) N  
- Infecção ( ) S ( ) N. Se sim, qual:.....
- Parto: ( ) Normal ( ) Cesárea ( ) Fórceps
- Idade gestacional: ( ) Rn de termo ( ) Rn pré- termo
- Peso de nascimento:
- Intercorrências neonatais:

**III. Quadro clínico:** anotar se Ausente ou Presente e, quando presente, início em dias ou meses. Se não houver referência no prontuário, deixar em branco.

- Icterícia ( )
- Acolia ou hipocolia fecal ( )
- Colúria ( )
- Retardo do desenvolvimento neuromotor ( )

**IV.Exame físico:**

- Peso atual (1ª consulta):.....
- Perímetro cefálico:.....
- Estatura:.....
- Hepatomegalia ( )
- Esplenomegalia ( )
- Linfonomegalia ( )
- Fundo de olho ( )
- Retardo neuromotor ( )

**V.Exames subsidiários:**

- Calcificações ao Rx de crânio ( )
- Hb:.....Ht:.....
- Leucócitos:.....
- Plaquetas:.....
- Bilirrubina Direta:.....
- Bilirrubina Indireta:.....
- AST (TGO):.....
- ALT (TGP):.....
- Fosfatase alcalina:.....
- GamaGT:.....
- Sorologia para CMV:.....
- Outras sorologias:.....
- PCR para CMV no sangue e(ou) urina ( ). Se sim, anotar resultado
- Ecografia abdominal:.....

- Descrição cirúrgica:.....
- Biópsia hepática:
  - 1.Presença de inclusão citomegálica ( )
  - 2.Presença de microabscessos lobulares ( )
  - 3.Outros achados:.....

## 11.2 - Anexo 2



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

☒ Caixa Postal 6111  
13083-970 Campinas-S.P.  
☎ 0 19 7888936  
fax 0 19 7888925  
✉ [cep@head.fcm.unicamp.br](mailto:cep@head.fcm.unicamp.br)

PARECER PROJETO Nº 233/99

### **I - IDENTIFICAÇÃO**

**Título do projeto:** DETECÇÃO DO CITOMEGALOVÍRUS EM FRAGMENTO HEPÁTICO DE PACIENTES COM ATRESIA DAS VIAS BILIARES EXTRA-HEPÁTICA POR MEIO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE.

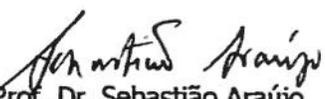
**Pesquisador responsável:** Adriana Maria Alves De Tommaso

### **V - PARECER DO CEP**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e 251/97, bem como ter aprovado os termos do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

### **VI - DATA DA REUNIÃO**

A ser homologado na I Reunião Ordinária do CEP em 2000

  
Prof. Dr. Sebastião Araújo  
VICE PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP

11.3 - Anexo 3

**DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO**  
**PÓS-INFORMAÇÃO**

Eu,.....,  
responsável pelo(a) menor .....  
declaro estar ciente de que meu(minha) filho(a) é portador(a) de atresia de vias biliares extra-  
hepática para a qual ainda não foi descoberta a causa.

Estou ciente de que ele(a) será submetido à biópsia hepática durante o ato cirúrgico,  
como parte da rotina, e fui informado(a) de que parte deste fragmento será encaminhado para  
pesquisa do citomegalovírus a qual não implicará gasto monetário algum nem riscos à saúde  
de meu(minha) filho(a) e que serei informado do resultado no momento em que desejar bem  
como me foi garantido o sigilo quanto às informações.

.....  
Responsável

.....  
Dra. Adriana M A De Tommaso  
(pesquisadora)

Em caso de dúvidas, entrar em contato pelo telefone 3208-2892 ou 9710-8644  
(pesquisadora)

**Tabela 1.** Quadro clínico e características de exame físico dos pacientes avaliados

	Icterícia	Colúria	Acolia	Hipocolia	RDNPM	Hepatomegalia	Esplenomegalia
N	57*	50	42	11	0	51	31**

N= número de pacientes; \* 30 relatam icterícia desde o nascimento; \*\* associada à hepatomegalia  
RDNPM= retardo do desenvolvimento neuro-psico-motor.

**Tabela 2.** Resultados de média, mediana e desvio padrão dos índices hematimétricos (expressos em valores absolutos) e de bilirrubinas, aminotransferases e enzimas ductulares (expressos em número de vezes o limite superior da normalidade).

Variável	N	Média	Mediana	DP
Hb (g%)	57	10,2	10	1,60
Ht (%)	57	31	31	4,74
Leu(/mm <sup>3</sup> )	55	16220	13950	6696,18
BD	54	21	20	9,60
BI	54	4,64	4,2	2,81
AST	55	6,84	5,15	4,72
ALT	55	5,30	3,80	5,11
FALC	49	2	1,80	1,73
γGT	48	15	12,2	12,25

N= total de pacientes; DP= desvio padrão; Hb= hemoglobina; Ht= hematócrito; Leu= leucócitos;  
BD= bilirrubina direta; BI= bilirrubina indireta; AST= aspartato aminotransferase;  
ALT= alanina aminotransferase; FALC= fosfatase alcalina; γGT= gamaglutamiltransferase

**Tabela 3.** Resultados da presença e contratilidade da vesícula biliar.

N	Não visualizada	Presente e contrátil	Presente e hipocontrátil	Hipoplástica
54	32 (59,2%)	3 (5,5%)	4 (7,4%)	8 (14,8%)

**Tabela 4.** Resultados dos tipos de porta-hepatis dos 50 pacientes submetidos à cirurgia no serviço.

N	Tipo I	Tipo II	Tipo III
33	5	24	4

O restante dos pacientes realizaram a cirurgia sem, no entanto, biópsia do porta-hepatis, pois a mesma é prática recente do serviço.

**Tabela 5.** Resultado de sorologias realizadas nos pacientes para pesquisa de outros agentes.

SOROLOGIA	N	Negativa	IgG+/IgM-	IgG+/IgM+
Hepatite A	24	12	12	0
Hepatite B	39	38	0	0
Hepatite C	1	1	0	0
Mononucleose	3	0	3	0
Toxoplasmose	44	30	15	0
Sífilis	41	41	0	0
Rubéola	37	23	14	0

**Tabela 6. Dados de história e exame físico dos pacientes estudados**

PACIENTE	SEXO	IDADE	PRÉ-NATAL	INFECÇÃO	TIPO	PARTO	IDADE GESTACIONAL	1ª CONSULTA	
								IDADE	TIPO
AMG	M	25	SIM	NÃO		VAGINAL	RNT		
AHL	M	60	SIM	SIM	ITU	CESÁREA	RNT		
AMF	M	65	SIM	NÃO		CESÁREA	RNT		
ADS	M	239	SIM	NÃO		VAGINAL	RNT		
ADPS	F	101	SIM	SIM	TOXOPLASMOSE	CESÁREA	RNT		
AFS	M	75	SIM	NÃO		VAGINAL	RNT		
ACS	F	69	SIM	NÃO		VAGINAL	RNT		
ABL	F	48	SIM	NÃO		VAGINAL	RNT		
AGP	F	89	SIM	NÃO		VAGINAL	RNT		
ACNG	F	84	SIM	NÃO		CESÁREA	RNT		
BAF	F	51	SIM	SIM	FLEBITE	VAGINAL	RNT		
BMA	M	176	SIM	NÃO		CESÁREA	RNPT		
CT	F	95	NÃO	NÃO		VAGINAL	RNT		
CCA	M	130	SIM	NÃO		VAGINAL	RNT		
CAAM	F	128	SIM	NÃO		CESÁREA	RNT		
DFL	M	117	SIM	NÃO		CESÁREA	RNT		
DRA	M	98	SIM	NÃO		CESÁREA	RNT		
DAMG	M	174	SIM	NÃO		CESÁREA	RNPT		
JBO	F	97	SIM	NÃO		VAGINAL	RNT		
JSO	F	103	SIM	SIM	↑ FÍGADO	VAGINAL	RNT		

**Tabela 6. Dados de história e exame físico dos pacientes estudados (continuação)**

PACIENTE	PESO NASCIMENTO(g)	INTERCORRÊNCIAS	PESO 1ª CONSULTA(g)	COMPRIMENTO 1ª CONSULTA(cm)
AMG	2950		2850	50
AHL	3350		3610	54
AMF	2950		4400	?
ADS	4600		9370	?
ADPS	2900		5530	60
AFS	3420		4670	56
ACS	2900		3700	?
AEL	3260		4650	56
AGP	2500		4790	56
ACNG	3100		?	?
BAF	3150	FOTOTERAPIA	4350	54
BMA	2930		4650	58
CT	?		3450	55
CCA	3620	PNEUMONIA	7000	64
CAAM	3140		5250	?
DFL	2600		3570	50
DRA	3700	FOTOTERAPIA	6350	59
DAMG	2250		5700	?
JBO	3190		4680	57
JSO	2800		4790	?

**Tabela 6. Dados de história e exame físico dos pacientes estudados (continuação)**

PACIENTE	SEXO	IDADE 1ª CONSULTA	PRÉ-NATAL	INFECÇÃO GESTACIONAL	TIPO	PARTO	IDADE
ESC	F	48	SIM	NÃO		CESÁREA	RNT
GFO	F	50	SIM	NÃO		VAGINAL	RNT
GRRF	M	107	SIM	SIM	CAXUMBA	CESÁREA	RNT
JG	M	42	SIM	SIM	ITU	VAGINAL	RNPT
JRK	F	56	SIM	NÃO		VAGINAL	RNT
JDS	M	67	SIM	NÃO		VAGINAL	RNT
L <sub>1</sub> GS	F	79	SIM	NÃO		CESÁREA	RNT
LDL	M	40	SIM	NÃO		CESÁREA	RNT
LIGS	F	120	SIM	NÃO		VAGINAL	RNT
LS	M	187	SIM	NÃO		VAGINAL	RNT
LMY	M	72	SIM	NÃO		CESÁREA	RNT
MFRF	F	61	SIM	NÃO		CESÁREA	RNT
MICS	F	111	SIM	NÃO		VAGINAL	RNT
MCC	F	86	SIM	NÃO		CESÁREA	RNPT
MFV	F	109	SIM	NÃO		CESÁREA	RNT
NFAM	F	149	SIM	SIM	"IVAS"	VAGINAL	RNT
PAL	F	135	SIM	NÃO		VAGINAL	RNT
RCM	M	?	?	?		?	?
RRX	F	35	SIM	SIM	ITU	CESÁREA	RNT

**Tabela 6. Dados de história e exame físico dos pacientes estudados (continuação)**

PACIENTE	PESO NASCIMENTO(g)	INTERCORRÊNCIAS	PESO 1ª CONSULTA(g)	COMPRIMENTO 1ª CONSULTA(cm)
ESC	3410		3900	56
GFO	3120		3820	55
GRRF	2970		?	?
JG	2710		2690	49
JRK	2650	ASPIRAÇÃO MECÔNIO	3910	54
JDS	3100	FOTOTERAPIA	4900	56
LaGS	3020		4950	53
LDL	3500		5200	57
LiGS	2030	FOTOTERAPIA	4500	60
LS	2945		6200	62
LMY	3110		3170	56
MPRF	3460		4050	57
MICS	2750		5300	58
MCC	2490		4600	56
MFV	3180		5750	61
NFAM	3180		5400	59
PAL	2970		5550	61
RCM	3800		5130	58
RRX	2155	SOFRIMENTO FETAL AGUDO	2700	48

**Tabela 6. Dados de história e exame físico dos pacientes estudados (continuação)**

PACIENTE	SEXO	IDADE	1ª CONSULTA			TIPO	PARTO	IDADE GESTACIONAL
			PRÉ-NATAL	INFECÇÃO	INFEÇÃO			
RAB	M	76	SIM	NÃO		VAGINAL	RNT	
SJT	F	64	SIM	NÃO		CESÁREA	RNT	
SCF	F	168	SIM	NÃO		VAGINAL	RNT	
TDF	F	172	SIM	NÃO		VAGINAL	RNT	
TFMF	M	137	SIM	NÃO		CESÁREA	RNT	
VFS	F	55	SIM	NÃO		VAGINAL	RNT	
WAB	M	76	SIM	NÃO		VAGINAL	RNT	
WROS	M	79	SIM	NÃO		VAGINAL	RNT	
WGSS	M	96	SIM	NÃO		CESÁREA	RNT	
YSR	M	81	SIM	SIM	ITU	CESÁREA	RNT	
FRNP	F	52	SIM	SIM	ITU	VAGINAL	RNT	
BFP	F	69	SIM	NÃO		VAGINAL	RNT	
TEB	F	61	SIM	SIM	ITU	VAGINAL	RNT	
TFMC	F	47	SIM	NÃO		CESÁREA	RNT	
GDS	M	153	SIM	NÃO		CESÁREA	RNT	
RRF	F	144	SIM	NÃO		CESÁREA	RNT	
MBF	75	SIM	SIM	"IVAS"		VAGINAL	RNT	
ACHA	F	85	SIM	NÃO		CESÁREA	RNT	

**Tabela 6. Dados de história e exame físico dos pacientes estudados (continuação)**

PACIENTE	PESO NASCIMENTO(g)	INTERCORRÊNCIAS	PESO 1ª CONSULTA(g)	COMPRIMENTO 1ª CONSULTA(cm)
RAB	3750	PNEUMONIA + CANDIDÍASE	3800	?
SJT	3110		3600	?
SCF	3600		?	?
TDF	3450		6150	63
TFMF	3420		6250	63
VFS	3080		3600	51
WAB	2800		4910	59
WROS	2930		3700	55
WGSS	3080		5860	?
YSR	2980		6130	62
FRNB	2975		4080	54
BFP	2500		3000	59
TEB	2880	FOTOTERAPIA	?	?
TFMC	3130		?	?
GDS	3400		6150	41
RRF	2950		4760	39
MB	2940		5120	37
ACHA	3100		4250	?

ITU= infecção do trato urinário; IVAS= infecção de vias aéreas superiores; RNT= recém-nascido a termo; RNPT= recém-nascido pré-termo

**Tabela 7. Resultados individuais da pesquisa de CMV por sorologia e PCR.**

PACIENTE	SOROLOGIA	RESULTADO	PCR - FÍGADO	PCR - PORTA HEPATIS
AMG	NR		NEGATIVO	NEGATIVO
AFS	ELISA	IgM-/IgG+	POSITIVO	POSITIVO
ACS	RFC	NEGATIVO	NEGATIVO	NR
AMF RFC	POSITIVO(1/4)	POSITIVO	NR	
ADS	ELISA	NEGATIVO	POSITIVO	NR
ADPS	ELISA	IgM+/IgG+	NEGATIVO	NEGATIVO
AHL	ELISA	IgM+/IgG+	NR	NEGATIVO
AEL	RFC	NEGATIVO	NEGATIVO	NR
AGP	ELISA	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
ACHA	ELISA	NEGATIVO	NEGATIVO	NR
ACNG	ELISA	IgM+/IgG+	NEGATIVO	NR
BMARFC	NEGATIVO	NEGATIVO	NR	
BAF	RFC	NEGATIVO	NEGATIVO	NR
BFP	RFC	NEGATIVO	NEGATIVO	NR
CT	ELISA	IgM+/IgG+	POSITIVO	NR
CAAM	ELISA	IgM+/IgG+	NEGATIVO	NR
CCA	ELISA	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
DAMG	ELISA	NEGATIVO	NEGATIVO	NR
DRA	ELISA	IgM+/IgG+	NEGATIVO	POSITIVO
DFL	RFC	NEGATIVO	NEGATIVO	NR

**Tabela 7. Resultados individuais da pesquisa de CMV por sorologia e PCR (continuação)**

PACIENTE	SOROLOGIA	RESULTADO	PCR - FÍGADO	PCR - PORTA HEPATIS
ESC	ELISA	IgM-/IgG+	NEGATIVO	NEGATIVO
FRNP	ELISA	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
GDS	ELISA	IgM+/IgG+	NEGATIVO	NR
GFO	ELISA	IgM-/IgG+	POSITIVO	POSITIVO
GRRF	NR	NEGATIVO	NR	
JBO	NR	NEGATIVO	NEGATIVO	
JDŠ	NR	NEGATIVO	NR	
JRK	RFC NEGATIVO	NEGATIVO	NR	
JG	ELISA	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
JSO	ELISA	IgM-/IgG+	NEGATIVO	NEGATIVO
LaGSELISA	IgM-/IgG+	POSITIVO	NEGATIVO	
LiGS ELISA	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	
LDL	RFC NEGATIVO	NEGATIVO	NR	
LMYNR	POSITIVO	NR		
LŠ	ELISA	IgM-/IgG+	NEGATIVO	NR
MB	NR	POSITIVO	POSITIVO	
MCCELISA	IgM+/IgG+	NEGATIVO	NEGATIVO	
MFRF	ELISA	NEGATIVO	NEGATIVO	NR
MFV ELISA	IgM+/IgG+	POSITIVO	NEGATIVO	
MICS	RFC NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	
NFAM	ELISA	IgM-/IgG+	NEGATIVO	NR

**Tabela 7. Resultados individuais da pesquisa de CMV por sorologia e PCR (continuação)**

PACIENTE	SOROLOGIA	RESULTADO	PCR - FÍGADO	PCR -PORTA HEPATIS
PAL	ELISA	IgM+/IgG+	POSITIVO	NR
RAB	NR	NEGATIVO	NEGATIVO	
RCMELISA	IgM+/IgG+	NEGATIVO	POSITIVO	
RRF	ELISA	IgM-/IgG+	NEGATIVO	NR
RRX	ELISA	IgM-/IgG+	NEGATIVO	NR
SCF	ELISA	IgM+/IgG+	NR	POSITIVO
SJT	NR	NEGATIVO	NR	
TDF	ELISA	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO
TEB	NR	NEGATIVO	NR	
TFMC	NR	NEGATIVO	NR	
TFMF	ELISA	IgM+/IgG+	NEGATIVO	NEGATIVO
VFS	RFC	NEGATIVO	POSITIVO	NR
YSR	ELISA	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
WABRFC	NEGATIVO	NEGATIVO	NR	
WROS	ELISA	IgM+/IgG+	NEGATIVO	NR
WGSS	ELISA	NEGATIVO	NEGATIVO	NR

NR= não realizado



**Tabela 8. Características gerais dos pacientes com PCR positivo para o CMV (continuação).**

DADOS DE HISTÓRIA		DADOS DE EXAME FÍSICO					AVALIAÇÃO LABORATORIAL				AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA						
DIAGN.	IG	PN	ICT	ACOLIA	HIPOCOLIA	COLÚRIA	I	P	H	E	ALT	GGT	BD	SOROLOGIA	PH	FPH	FH
AVB	RNT	3010	S	N	S	S	72	3170	+	+	normal	NR	17,7	NR	não classif.	PCAG	fibrose portal + septos + Eos + nódulos + proliferação ductal moderada colestase intensa
AVB	RNT	3020	S	S	N	S	79	4950	-	-	8	46,5	12,5	IgG+/IgM-	tipo II	PCL	fibrose portal + septos + TGC + nódulos + Eos + proliferação ductal moderada colestase e colangite moderadas
AVB	RNT	2750	S	S	N	S	111	5300	+	+	4,6	14,2	21	RFC -	não classif.	PCL	fibrose portal + septos + TGC + proliferação ductal Eos + colestase moderada
AVB	RNT	3180	S*	S	N	S	109	5750	+	-	6,3	12,2	19,7	IgG+/IgM+	tipo II	PCL	fibrose portal + septos + Eos + proliferação ductal nódulos + TGC colestase intensa colangite leve

**Tabela 8. Características gerais dos pacientes com PCR positivo para o CMV (continuação).**

DADOS DE HISTÓRIA		DADOS DE EXAME FÍSICO							AVALIAÇÃO LABORATORIAL				AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA				
DIAGN.	IG	PN	ICT	ACOLIA	HIPOCOLIA	COLÚRIA	I	P	H	E	ALT	GGT	BD	SOROLOGIA	PH	FPH	FH
AVB	RNT	2940	S*	N	S*	S*	75	5120	+	+	2,9	3,5	44	NR	tipo II	PCAM	fibrose leve + septos + TGC + Eos + proliferação ductal moderada + colestase leve
CH	RNT	2970	S*	S	N	N	135	5550	+	+	2,4	13,9	22	IgG+/IgM+	-	-	fibrose portal + septos + Eos + proliferação ductal intensa + TGC + nódulos + colestase intensa
AVB	RNT	3600	S	S	N	S	168	?	+	+	6,7	normal	26,7	IgG+/IgM+	tipo II	PCL	fibrose portal + septos + TGC + proliferação ductal nódulos + colestase mod. Eos + colangite leve
AVB	RNT	3450	S*	S*	N	S*	172	6150	+	-	8,3	26	19,7	IgG-/IgM-	tipo I	normal	fibrose portal + septos + TGC + proliferação ductal colestase moderada
AVB	RNT	3800	?	?	?	?	?	5130	+	+	4	15,7	NR	IgG+/IgM+	tipo I	?	?
AVB	RNT	3700	S*	S	N	S	98	6350	+	+	1,7	2,8	30	IgG+/IgM+	tipo II	PCAL	fibrose portal + septos + proliferação ductal moderada + nódulos + colestase moderada

**Tabela 8.** Características gerais dos pacientes com PCR positiva para o CMV (continuação).

DADOS DE HISTÓRIA		DADOS DE EXAME FÍSICO					AVALIAÇÃO LABORATORIAL				AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA						
DIAGN.	IG	PN	ICT	ACOLIA	HIPOCOLIA	COLÚRIA	I	P	H	E	ALT	GGT	BD	SOROLOGIA	PH	FPH	FH
AVB	RNT	3080	S*	S*	N	S*	55	3600	+	-	normal	NR	?	RFC -	não classif.	NR	fibrose portal + septos + proliferação ductal + Eos + nódulos + TGC colestase intensa + colangite leve
+CC																	

DIAGN. = diagnóstico; IG= idade gestacional; PN= peso de nascimento; ICT= presença de icterícia; I= idade à primeira consulta (em dias de vida); H= hepatomegalia (por ecografia); E= esplenomegalia (por ecografia); P= peso à primeira consulta; ALT= alanino aminotransferase (em no. de vezes o limite superior da normalidade); GGT= gama glutamiltransferase (em no. de vezes o limite superior da normalidade); BD= bilirrubina direta (em no. de vezes o limite superior da normalidade); PH= porta-hepatitis; FPH= fragmento do porta-hepatitis; FH= fragmento hepático; \* ao nascimento; AVB= atresia de vias biliares; CC= cisto de colédoco; ECD= estenose de colédoco distal; CH= cisto hepático; RNT= recém-nascido do termo; S= sim; N= não; NR= não realizado; ?= sem anotação disponível no prontuário; RFC= reação de fixação de complemento; # situs inversus; Eos= eosinófilos.