

LÍGIA PATRÍCIA DE CARVALHO BATISTA ÉBOLI

**Infecção por EBV em crianças submetidas a transplante
hepático em um único centro do Brasil e sua relação com nível
de imunossupressão e doença linfoproliferativa**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Programa de
Pediatria

Orientadora: Prof^a Dr^a. Ana Cristina Aoun
Tannuri

São Paulo

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Éboli, Lígia Patrícia de Carvalho Batista
Infecção por EBV em crianças submetidas a
transplante hepático em um único centro do Brasil e
sua relação com nível de imunossupressão e doença
linfoproliferativa / Lígia Patrícia de Carvalho
Batista Éboli. -- São Paulo, 2021.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Pediatria.
Orientadora: Ana Cristina Aoun Tannuri.

Descritores: 1. Transplante de fígado 2. Pediatria
3. Infecções por vírus Epstein-Barr 4. Citomegalovírus
5. Transtornos linfoproliferativos 6. Imunossupressão

USP/FM/DBD-028/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Dedico esta tese aos meus filhos, Ricardo e Maria Fernanda, por sempre me incentivarem a procurar respostas para todos os “Por Ques?”. Vocês são e sempre serão a razão de todos os meus esforços para ser uma pessoa melhor.

Agradecimentos

Agradeço inicialmente a Deus por permitir tantas coisas boas na minha vida e por ter me dado forças para alcançar meus objetivos frente a tanta adversidade.

Agradeço a minha mãe, mulher guerreira, de fibra que criou os dois filhos com garra, coragem e determinação e me proporcionou, com muito esforço, uma educação completa com base forte que foi o alicerce de todo esse trabalho que vem sendo construído.

A minha avó, minha inspiração, exemplo de mulher forte, determinada, fiel a seus propósitos. Se ultrapassei barreiras, foi por sua causa, seus ensinamentos os quais levarei para sempre comigo e os utilizarei para criação dos meus filhos.

Agradeço a uma pessoa mais que especial em minha vida, minha segunda mãe, minha fortaleza, meu porto seguro, minha Tia Fernanda (*in memoriam*). Você sempre soube do meu potencial e alimentava minha alma de esperança. Você se dedicou a minha formação como ninguém, muitas vezes abrindo mão do seu conforto para me proporcionar o melhor. Nunca saberei agradecer tanto que fez por mim.

Ao meu marido, Renan, há 16 anos do meu lado, meu refúgio em águas turbulentas, minha paz, minha razão. Você me faz olhar para frente e de cabeça erguida. Obrigada por ser sempre luz no meu caminho. Amo-te infinito.

Aos meus filhos por me mostrarem o que é o amor em sua forma mais sublime, mais pura e gratuita. Não consigo definir a grandiosidade do que sinto por vocês e do que representam para mim. Apenas sinto!

Ao meu irmão, Gustavo, que foi e muitas vezes ainda é pai, me protege, me orienta e me guarda como sua cria. Gratidão.

Aos meus tios, tias, primos, que estiveram sempre presente na minha infância, adolescência e ainda se fazem presentes, torcendo por mim e me aplaudindo a cada vitória.

A todos os mestres que tive o prazer de desfrutar a sabedoria além de compartilhar aprendizado e experiências. Dr. Ramiro Azevedo, você me mostrou a hepatologia pediátrica, fez com que eu me encantasse por essa área ainda tão nova e desconhecida. Agradeço sua dedicação aos seus pacientes e alunos, por me incentivar a sempre ir atrás de novos conhecimentos e oportunidades. Você foi um grande condutor deste caminho traçado. Meu muito obrigada!

A Professora Ana Cristina Tannuri, que me aceitou como aluna de pós-graduação apostando na minha capacidade. Você é inspiração para todas as mulheres médicas, por desbravar o meio cirúrgico, mostrando além de capacidade técnica, ternura, amor, compaixão e humildade. Obrigada por acreditar em mim e por fazer tanto pelos nossos pacientes do Nordeste, sempre que necessário!

A todos os professores, mestres e colegas da Cirurgia Pediátrica do Instituto da Criança, obrigada por sempre me receberem com carinho, paciência, por me passarem conhecimento, por contribuírem na construção dessa tese. Um agradecimento especial à Helena e ao Paulo, nossos enfermeiros, sempre presentes e disponíveis para ajudar. Vocês foram peças fundamentais para a construção desse sonho! Obrigada pela dedicação de sempre!

Agradeço ainda o apoio e suporte técnico e motivacional de todos que fazem parte da Unidade de Transplante de Fígado (UTF) do Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC) em Pernambuco, equipe que me orgulho todo dia de fazer parte, pois, apesar das dificuldades seguem firme no propósito de fornecer sempre o melhor para os pacientes. Destaco um agradecimento especial ao professor Cláudio Lacerda que diante do meu retorno à cidade natal me acolheu, acreditou no meu potencial e me mostra, a partir do exemplo, que os grandes médicos são aqueles que comungam do conhecimento científico e humanidade

no trato ao paciente. Sua dedicação e doação diária ao serviço é inspiração para todos que decidem trabalhar com transplante hepático. Obrigada, professor!

E por fim, e não menos importante, aos meus pacientes e seus familiares, que confiam no meu trabalho, compartilham suas dores, expectativas e luta diária a favor da vida. Sem eles não teria razão para tanto e por eles dedico-me ao estudo diário tentando me aperfeiçoar e ser uma profissional cada dia mais completa. Muito obrigada!

Essa dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento dessa publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L.Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

Sumário

Lista de Siglas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Abstract

1. Introdução	1
2. Justificativa	10
3. Objetivos	12
4. Materiais e Métodos	14
4.1. Critérios de Inclusão	15
4.2. Critérios de exclusão.....	15
4.3. Desenho do estudo	15
4.4. Transplante hepático na criança.....	16
4.5. Imunossupressão.....	17
4.6. Profilaxia Antiviral.....	17
4.7. Suspeita de Infecção por EBV	18
4.8. Quantificação por PCR em tempo real do Vírus Epstein-Barr	18
4.9. Diagnóstico de PTLD	19
4.10. Variáveis analisadas	19
5. Análise Estatística	21
6. Resultados	23
8. Conclusão	47
9. Referências	49

Lista de Siglas

CNI	Inibidores da Calcineurina
DHL	Desidrogenase Láctica
DP	Desvio Padrão
EBV	Vírus do Epstein-barr
FNT-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias e Granulócitos e Macrófagos
IFN-α	Interferon alfa
IL-2	Interleucina 2
MELD	Model for End-stage Liver Disease
MMF	Micofenolato Mofetil
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
NFAT	Fator Nuclear de Células T ativadas
NK	<i>Natural Killer</i>
OKT3	Globulina anti-linfócitos monoclonais
OR	<i>Odds Ratio</i>
PBL	<i>Peripheral Blood Lymphocytes</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PELD	<i>Pediatric End-stage Liver Disease</i>
PTLD	Doença Proliferativa Pós Transplante
SNC	Sistema Nervoso Central
SPLIT	Grupo de estudo em transplante hepático pediátrico
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

Lista de Tabelas

Tabela 1. <i>Características das crianças participantes do estudo, Instituto da Criança, FMUSP, 2018.</i>	24
Tabela 2. <i>Características das crianças submetidas a transplante hepático segundo a presença de doença linfoproliferativa, Instituto da Criança, FMUSP, 2018.</i>	25
Tabela 3. <i>Características das crianças submetidas a transplante hepático segundo o período de realização do transplante, Instituto da Criança, FMUSP, 2018.</i>	26
Tabela 4. <i>Caracterização da PTLD em pacientes submetidos a transplante hepático, Instituto da Criança, FMUSP, 2018.</i>	27
Tabela 5. <i>Caracterização da PTLD em pacientes submetidos a transplante hepático antes do ano de 2006 e depois, bem como relação com rejeição do enxerto e desfecho, Instituto da Criança, FMUSP, 2018.</i>	29
Tabela 6. <i>Caracterização da PTLD em pacientes submetidos a transplante hepático antes do ano de 2006 e depois. Instituto da Criança, FMUSP, 2018.</i>	30
Tabela 7. <i>Comparação entre os níveis de PCR antes e depois da medida tomada, Instituto da Criança, FMUSP, 2018.</i>	31
Tabela 8. <i>Comparação entre os níveis de PCR entre pacientes com doença linfoproliferativa segundo a medida tomada, Instituto da Criança, FMUSP, 2018.</i>	32
Tabela 9. <i>Correlação entre os níveis de PCR e as doses e nível sérico das diferentes medidas (tacrolimus, ciclosporina e sirolimus), Instituto da Criança, FMUSP, 2018.</i>	34
Tabela 10. <i>Fatores associados com doença linfoproliferativa (PTLD) em crianças submetidas a transplante hepático, Instituto da Criança, FMUSP, 2018.</i>	35

Lista de Figuras

Figura 1. Tratamento da PTLD baseada na estratificação de gravidade do paciente. * PTLD grave considerada na presença de pelo menos 1 dos seguintes critérios: (i) envolvimento de mais de um órgão; (ii) envolvimento da medula óssea; (iii) disfunção de órgão; (iv) estado geral ruim; (v) histologia monomórfica; (vi) PTLD benigna não responsiva à diminuição da imunossupressão por 3 semanas. § PTLD de alto risco diagnosticada na presença de pelo menos 2 dos seguintes critérios: (i) estágio III ou IV; (ii) histologia monomórfica; (iii) estado geral ruim; (iv) DHL maior que duas vezes o limite superior de normalidade (ou \geq a 1000 UI/L). Adaptado de Gross T et al, 2012.	8
Figura 2. Distribuição dos valores de PCR segundo a presença de PTLD.	33

Resumo

Eboli LPCB. Infecção por EBV em crianças submetidas a transplante hepático em um único centro do Brasil e sua relação com nível de imunossupressão e doença linfoproliferativa [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

INTRODUÇÃO: Doença linfoproliferativa pós-transplante (PTLD) é uma condição clínica de alta mortalidade que pode estar relacionada a proliferação do vírus Epstein-Barr (EBV) em pacientes submetidos à imunossupressão crônica. A monitoração da replicação viral através da técnica de PCR pode ser uma ferramenta útil para evitar o desenvolvimento de PTLD, uma vez que permite redução ou retirada da imunossupressão precocemente. PCR quantitativo para EBV é solicitado para todos os pacientes pediátricos submetidos a transplante de fígado no Instituto da Criança – FMUSP desde o ano de 2006. **OBJETIVOS:** Avaliar os pacientes pediátricos submetidos a transplante hepático entre 1989 e 2016, caracterizando aqueles transplantados antes e após o ano de 2006 quanto ao desenvolvimento de doença linfoproliferativa bem como analisar o impacto da redução dos imunossupressores ou troca de medicamento na carga viral. Também foram avaliados fatores de risco para PTLD. **MATERIAL E MÉTODOS:** Análise retrospectiva de 428 pacientes pediátricos submetidos a transplante hepático entre 1989 e 2018 no Instituto da Criança – FMUSP. Os pacientes foram divididos em 2 grupos (transplantados antes ou após 2006) e caracterizados quanto a peso, idade ao transplante, gênero, tipo de doador, imunossupressor utilizado e desenvolvimento de doença linfoproliferativa. Pacientes com aferição contínua de PCR para EBV foram avaliados quanto o impacto de determinada conduta (redução da imunossupressão ou troca de imunossupressor) sobre o número de cópias viral. Modelo de regressão logística foi aplicado para avaliar fatores relacionados a PTLD. **RESULTADOS:** A prevalência de PTLD foi de 4,2%. Sorologia para CMV apresentou associação estatística com doença linfoproliferativa. Após início de monitoramento dos pacientes com dosagem de PCR para EBV (depois do ano 2006), observou-se um predomínio da forma mais grave, monomórfica da doença linfoproliferativa ($p=0,009$). A taxa de óbito pela

doença foi de 5% (1 paciente). Um total de 240 crianças foram submetidas a 1778 aferições de PCR quantitativo para EBV (média de 7 PCRs por criança). Os valores de PCR medidos para cada criança foram avaliados antes e depois da redução do tacrolimus ou da ciclosporina ou da troca do tacrolimus por sirolimus. Houve mudança no nível de PCR após a redução do tacrolimus ($p=0,002$), assim como na troca do tacrolimus por sirolimus ($p=0,008$). Não houve significância estatística na redução da dose de ciclosporina ($p=0,441$). Observou-se que o número de cópias de EBV era significativamente maior ($p=0,029$) nos pacientes que desenvolveram PTLD. A sorologia positiva para CMV na ocasião do transplante apresentou associação com diminuição do risco para doença linfoproliferativa na análise univariada (OR não ajustado). Quando colocadas as variáveis no modelo de regressão múltipla, a soropositividade para CMV continuou a ser um fator de proteção independente para doença linfoproliferativa (OR= 0,24; IC95% 0,06-0,92), isto é, reduz em 76% a chance de ter PTLD ajustada pela sorologia para EBV. CONCLUSÃO: A monitoração da carga viral por PCR possibilita intervenção precoce o que parece impedir o surgimento das formas mais brandas de doença linfoproliferativa. Soropositividade para citomegalovírus pré-transplante constitui fator protetor para PTLD.

Descritores: Transplante de Fígado; Pediatria; Infecções por Vírus Epstein-Barr; Citomegalovírus; Transtornos Linfoproliferativos; Imunossupressão.

Abstract

Eboli LPCB. EBV infection in children undergoing liver transplantation in a single center in Brazil and its relationship with immunosuppression level and lymphoproliferative disease [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2021.

INTRODUCTION: Post-transplantation lymphoproliferative disease (PTLD) is a clinical condition of high mortality that may be related to the proliferation of the Epstein-Barr virus (EBV) in patients undergoing chronic immunosuppression. Monitoring viral replication through the PCR technique can be a useful tool to avoid the development of PTLD, since it allows early reduction or removal of immunosuppression. Quantitative PCR for EBV is requested for all pediatric patients undergoing liver transplantation at the Instituto da Criança - FMUSP since 2006. **OBJECTIVES:** To evaluate pediatric patients undergoing liver transplantation between 1989 and 2016, characterizing those transplanted before and after 2006 regarding the development of lymphoproliferative disease and analyze the impact of immunosuppressive reduction or drug exchange on viral load. Risk factors for PTLD were also evaluated. **MATERIALS AND METHODS:** Restrospective analysis of 428 pediatric patients submitted to liver transplantation between 1989 and 2018 at the Instituto da Criança - FMUSP. The patients were divided into 2 groups (transplanted before or after 2006) and characterized in terms of weight, age at transplantation, gender, type of donor, immunosuppressant used and development of lymphoproliferative disease. Patients with continuous measurement of PCR for EBV were evaluated for the impact of a certain conduct (reduction of immunosuppression or exchange of immunosuppressant) on the number of viral copies. A logistic regression model was applied to evaluate factors related to PTLD. **RESULTS:** The prevalence of PTLD was 4.2%. Serology for CMV presented statistical association with lymphoproliferative disease. After the beginning of monitoring of patients with PCR dosage for EBV (after the year 2006), a predominance of the most severe, monomorphic form of lymphoproliferative disease was observed ($p=0.009$). The death rate from the disease was 5% (1 patient). A total of 240 children were submitted to 1778 quantitative PCR measurements for EBV (average of 7 PCRs per child). The PCR values measured for each child were evaluated before and

after tacrolimus or cyclosporine reduction or tacrolimus exchange for sirolimus. There was a change in the PCR level after tacrolimus reduction ($p=0.002$), as well as tacrolimus exchange for sirolimus ($p=0.008$). There was no statistical significance in the reduction of cyclosporine dose ($p=0.441$). It was observed that the number of EBV copies was significantly higher ($p=0.029$) in patients who developed PTLD. Positive serology for CMV at the time of transplantation was associated with decreased risk for lymphoproliferative disease in univariate analysis (unadjusted OR). When the variables were placed in the multiple regression model, seropositivity for CMV continued to be an independent protection factor for lymphoproliferative disease (OR= 0.24; 95%CI 0.06-0.92), i.e., it reduces by 76% the chance of having PTLD adjusted by serology for EBV. CONCLUSION: Monitoring the viral load by PCR allows early intervention, which seems to prevent the emergence of milder forms of lymphoproliferative disease. Seropositivity for cytomegalovirus pre-transplantation is a protective factor for PTLD.

Descriptors: *Liver Transplantation; Pediatrics; Epstein - Barr virus Infections; Cytomegalovirus; Lymphoproliferative Disorders; Immunosuppression.*

1. INTRODUÇÃO

O vírus do Epstein-Barr (EBV) é um vírus DNA que infecta células B. A infecção começa no epitélio orofaríngeo e quando se resolve um estágio inativo de latência se segue, com vírus presente em um pequeno número de células B induzindo e controlando a proliferação celular ¹. Resposta celular imune é o componente fundamental no controle da infecção por EBV. Os linfócitos T citotóxicos são direcionados contra a proliferação de células B ^{2,3}, porém o vírus nunca é completamente eliminado e um pequeno número de células B latentes permanecem infectadas pelo resto da vida ⁴.

Quando um órgão ou tecido de um indivíduo é transplantado para um receptor geneticamente diferente desencadeia-se uma série de eventos celulares e moleculares. Células B, T e NK (natural-killer), macrófagos e células dendríticas geram um número de eventos imunológicos celulares e humorais que resultam em rejeição do enxerto. Uma vez que as células T desempenham um papel importante nas vias imunológicas, as drogas imunossupressoras mais utilizadas no contexto do transplante são, tradicionalmente, direcionadas contra elas ⁵.

O tacrolimus, assim como a ciclosporina, é um inibidor da calcineurina que age primariamente interferindo na ativação das células T. A ciclosporina se liga a uma imunofilina citoplasmática específica, ciclofilina, e o tacrolimus se liga a uma proteína de ligação FK506. Estes complexos de ciclosporina-imunofilina ou tacrolimus-imunofilina inibem a atividade da calcineurina, uma fosfatase cálcio-dependente, inativando fatores de transcrição, particularmente do NFAT (fator nuclear de células T ativadas). O NFAT regula a transcrição de muitos genes, dentre eles os que codificam a interleucina-2 (IL-2), o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), o fator de necrose tumoral alfa (FNT- α), o interferon alfa (IFN- α) além de outras interleucinas. O resultado clínico desta inibição da NFAT é a imunossupressão. Além disso, o tacrolimus inibe a degranulação celular e apoptose, bloqueia a ativação da óxido nítrico sintetase, e potencializa os efeitos celulares de esteroides ⁶.

O risco de complicações relacionadas ao EBV tem sido relatado em pacientes transplantados e imunossuprimidos há mais de 20 anos. Pacientes

que possuem imunidade para EBV antes do transplante, ao atingirem um determinado estágio de imunossupressão, apresentam um aumento da carga viral resultante de uma proliferação de células B de memória infectadas pelo vírus ⁷. Esse fenômeno é provavelmente o resultado de um ciclo lítico de EBV nos imunossuprimidos permitindo o aparecimento de clones de células B latentes infectadas ⁸.

Devido à baixa idade, 60-80% das crianças transplantadas hepáticas não são ainda infectadas com EBV no momento do transplante. A maioria adquire a infecção primária dentro dos primeiros 3 meses pós-transplante, no momento em que a imunossupressão atinge altos níveis ^{9,10}. A infecção primária pelo EBV após transplante de órgãos sólidos constitui fator de risco para desenvolvimento de doença linfoproliferativa pós-transplante (PTLD). Outros fatores de risco incluem baixa faixa etária ao transplante, tipo de órgão transplantado e esquema de imunossupressão utilizado, bem como a intensidade do mesmo.

PTLD não se refere a uma única doença mas a uma família de desordens intimamente relacionadas e associadas a proliferação incontrolada de células B. A incidência de PTLD em crianças após transplante de órgãos sólidos varia de acordo com o órgão transplantado: rim-fígado 33%, coração 15%, fígado 10%, pulmão 6,4% e rim 1,2% ¹¹⁻¹³. O tipo de transplante pode ainda influenciar o prognóstico de pacientes que desenvolvem PTLD. Mortalidade em pacientes pediátricos transplantados renais tem sido relatada como maior que 48%, transplantados de fígado 44%, órgãos torácicos (coração/pulmão ou pulmão) 36%, e coração 25% ¹².

A apresentação clínica da PTLD é inespecífica e o prognóstico está diretamente relacionado ao diagnóstico precoce. Febre e estado geral debilitado, incluindo irritabilidade, anorexia e perda de peso são os sintomas mais comuns. Tonsilite necrótica, aumento de linfonodos ou hepatoesplenomegalia e sintomas gastrointestinais incluindo sangramento, diarreia ou vômitos, são frequentemente relatados ^{9,10,14-17}. Todos esses sinais e sintomas podem levar a um achado de infecção por EBV e linfoproliferação. Se nenhuma massa linfonodal for detectada enquanto os sintomas estão presentes, e infecção por EBV é confirmada, o diagnóstico de pré-PTLD ⁹ ou síndrome viral inespecífica ¹⁸ pode ser considerado e o paciente deve ser seguido cuidadosamente. A doença

pode afetar qualquer órgão sólido ou oco, com consequente disfunção desse órgão. O acometimento de PTLD pode ser abdominal (64%), torácico (50%), da cabeça e pescoço (25%), e cérebro (6%)¹⁹.

Para o diagnóstico de PTLD é necessária biópsia do tecido. Microscopicamente pode apresentar-se monomórfica ou polimórfica, sendo classificada de acordo com os critérios para neoplasias originadas de tecido linfóide e hematológico propostos pela Organização Mundial de Saúde em 2016, sendo dividida em quatro categorias^{20, 21}:

1. PTLD não-destrutiva - Três tipos histológicos são descritos:

- a. Hiperplasia plasmacítica: a arquitetura é normalmente preservada. O tecido linfóide mostra folhas de células plasmáticas com grandes imunoblastos dispersos por EBV.
- b. PTLD do tipo mononucleose infecciosa: a morfologia é semelhante à infecção por mononucleose; há uma expansão da zona de células T por imunoblastos e células plasmáticas. A atipia citológica das lesões precoces é mínima.
- c. Hiperplasia folicular florida – histologia mostra centros germinativos hiperplásicos proeminentes sem alteração arquitetural.

2. PTLD polimórfica - A histologia mostra o apagamento da arquitetura do tecido subjacente e um infiltrado misto com linfócitos de pequeno e médio porte, imunoblastos e células plasmáticas. Alta taxa mitótica e células linfóides atípicas podem ser observadas. As lesões precoces e o PTLD polimórfico são específicos para pacientes transplantados. Eles ocorrem principalmente na infância e geralmente estão relacionados à infecção primária por EBV. Os outros tipos de PTLD também podem ser diagnosticados em indivíduos imunocompetentes.

3. PTLD monomórfica – PTLD de células B é a forma mais comum de PTLD. A histologia mostra a destruição da arquitetura dos tecidos subjacentes e características citológicas malignas. Existem quatro categorias principais:

- a. Linfoma difuso de grandes células B apresentando morfologia imunoblástica, centroblástica ou pleomórfica.
 - b. Linfoma de Burkitt mostrando células monomórfica com apoptose proeminente.
 - c. O mieloma das células plasmáticas e as lesões do tipo plasmocitoma contêm folhas de células plasmáticas maduras.
 - d. O grupo PTLD de células T inclui lesões de células T / NK. A histologia mostra uma ampla variedade de aparências morfológicas, dependendo do tipo de linfoma de células T.
4. PTLD tipo linfoma de Hodgkin clássico - essa forma rara de PTLD mostra a histologia do linfoma de Hodgkin em pacientes imunocompetentes. A forma de celularidade mista é mais frequente.

Doença linfoproliferativa pós-transplante parece surgir como uma resposta ineficaz à infecção viral, mais comumente EBV. Esta resposta defeituosa é devido, em parte, a uma desregulação imunológica resultante da ausência de células T citotóxicas específicas para EBV. A incapacidade de clarear as células B infectadas por EBV leva a uma proliferação de células B com potencial transformação de malignidade²².

Várias séries de casos têm explorado a influência do EBV em relação à incidência de PTLD, tempo de início, classificação e prognóstico²³⁻²⁵. PTLD precoce ocorre nos 6 primeiros meses após o transplante, coincidindo com o período de maior imunossupressão. Nesse estágio é tipicamente polimórfica e geralmente responde à diminuição de imunossupressão, sem necessidade de terapia adicional. O segundo pico de incidência ocorre anos após o transplante (PTLD tardia) com alguns grupos definindo início tardio como 2-5 anos após o transplante²⁴, e outros, 12 meses após o transplante²⁶. PTLD tardia em algumas

publicações, é mais comumente relacionada a EBV negativo, monomórfica, podendo ser de origem de células T, necessitando terapia mais agressiva e tendo pior prognóstico ²³. Outros fatores prognósticos desfavoráveis incluem: acometimento de múltiplos órgãos (mais de 2 sítios), do sistema nervoso central (SNC) ou da medula óssea, disfunção orgânica, negatividade para EBV, origem de células T, e desidrogenase láctica (DHL) elevada (2 vezes maior que o limite superior de normalidade ou > 1000UI/L). A monoclonalidade é outro fator prognóstico desfavorável, embora até a doença polimérica policlonal possa se comportar como um linfoma franco ²⁷.

O objetivo do tratamento é controlar a proliferação de células B induzida pelo EBV e facilitar o desenvolvimento de uma resposta apropriada dos linfócitos T citotóxicos sem levar a rejeição do órgão ou perda do enxerto. A terapia inicial inclui a redução de imunossupressão, a fim de melhorar a imunidade alorreativa de células T e o desenvolvimento de linfócitos T citotóxicos específicos para EBV. Embora a redução da imunossupressão seja, por vezes, suficiente para eliminar a doença, particularmente nos casos com doença localizada ou policlonal, uma grande proporção de pacientes com PTLD requer quimioterapia. No entanto, os pacientes com PTLD após transplante de órgão sólido frequentemente apresentam tolerância diminuída à toxicidade induzida por quimioterapia por causa de suas condições médicas anteriores ao transplante bem como função renal ou hepática comprometida secundária a exposição prolongada a imunossupressores ²².

Na tentativa de reduzir os efeitos colaterais citotóxicos, várias combinações de quimioterapia de baixa intensidade têm sido utilizadas, no entanto, essa abordagem pode estar associada a resultados insatisfatórios a longo prazo. Esquema com baixas doses de ciclofosfamida e prednisona associada a rituximabe (imunoterapia direcionada à fosfoproteína CD20 encontrada em células B maduras)²² foi proposto pelo grupo de oncologia infantil e tem sido utilizado em crianças com PTLD EBV e CD20 positivos, com taxa de remissão completa da doença de 69% e sobrevida em dois anos livre de doença de 71% com sobrevida global de 83% em uma média de 4,8 anos de observação ²⁸. Pacientes cuja doença não tem expressão do antígeno CD20 parecem não

se beneficiar do uso do rituximabe e pouco tem sido descrito sobre o tempo de resposta da doença ²².

A apresentação multifacetada da PTLD dificulta a discriminação de casos leves e graves podendo levar à conduta mais agressiva em casos que podem remitir sem utilização de quimioterapia ou subtratar casos mais graves. Logo, alguns grupos utilizam critérios de gravidade a fim de selecionar pacientes para início de quimioterapia e rituximabe ou apenas para diminuição ou retirada de imunossupressão (Figura 2). ²⁷

Drogas anti-virais, como aciclovir e ganciclovir, podem ser dadas por via intravenosa, em adição à modulação da imunossupressão ¹⁸. Possível benefício desses agentes seria a interrupção do ciclo do EBV e do aparecimento de novos clones latentes infectados, além de efeito sobre a infecção concomitante por CMV ⁸. No entanto, publicação recente não encontrou diferença na duração da viremia ou carga viral de EBV após uso de ganciclovir endovenoso por aproximadamente 22 dias ²⁹.

Vários estudos têm mostrado uma correlação entre carga viral de EBV em sangue periférico, mensurada por PCR (*Polymerase Chain Reaction*), com PTLD ¹. Utilizando a técnica de PCR semi-quantitativo ou quantitativo, carga viral \pm 40 genomas / 10^5 PBL (*Peripheral Blood Lymphocytes*) em crianças com sorologia negativa para EBV antes do transplante e de \pm 200 genomas / 10^5 PBL em crianças infectadas antes do transplante, são consideradas risco aumentado para PTLD ³⁰. Estes valores não foram confirmados em outras séries e estudos adicionais necessitam ser realizados.

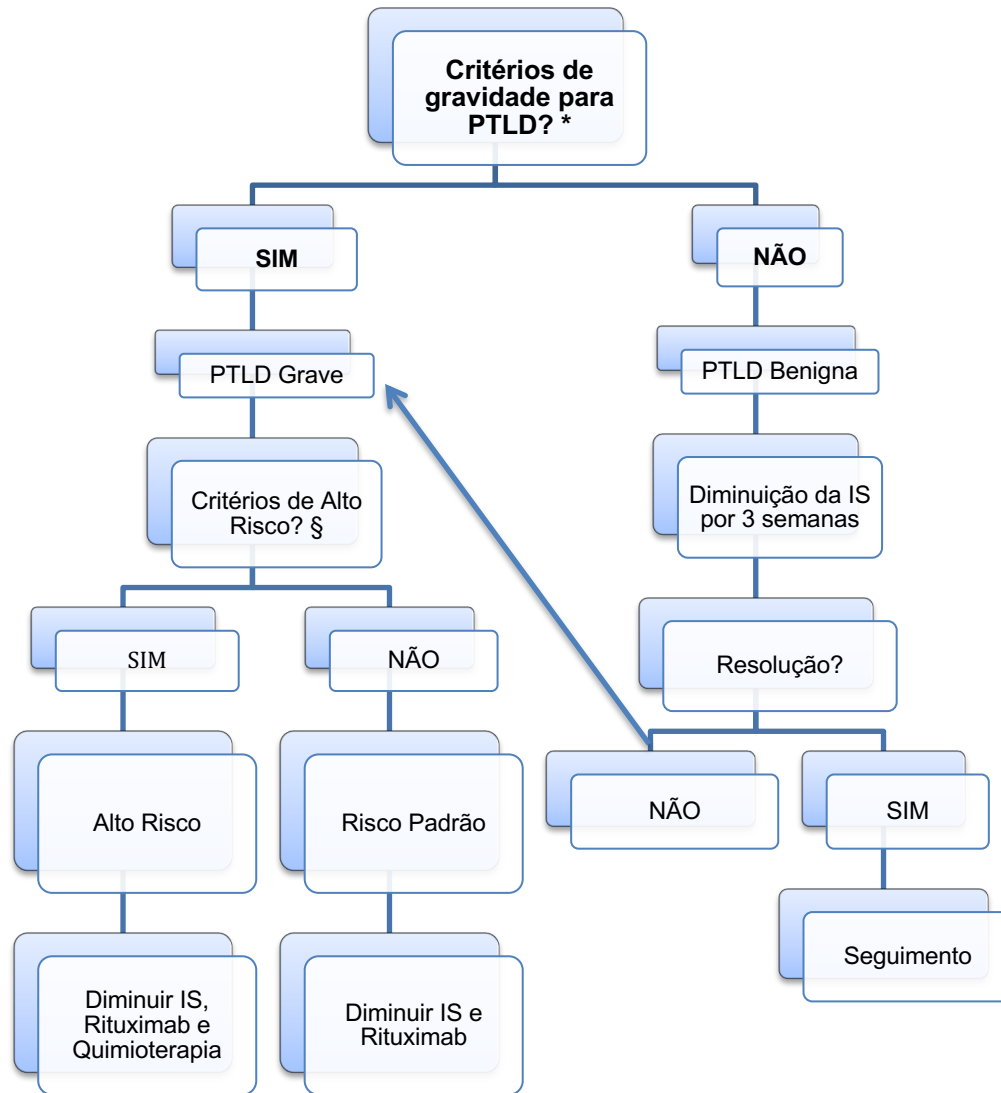


Figura 1. Tratamento da PTLD baseada na estratificação de gravidade do paciente. * PTLD grave considerada na presença de pelo menos 1 dos seguintes critérios: (i) envolvimento de mais de um órgão; (ii) envolvimento da medula óssea; (iii) disfunção de órgão; (iv) estado geral ruim; (v) histologia monomórfica; (vi) PTLD benigna não responsiva à diminuição da imunossupressão por 3 semanas. § PTLD de alto risco diagnosticada na presença de pelo menos 2 dos seguintes critérios: (i) estágio III ou IV; (ii) histologia monomórfica; (iii) estado geral ruim; (iv) DHL maior que duas vezes o limite superior de normalidade (ou \geq a 1000 UI/L). Adaptado de Gross T et al, 2012.

Mensuração do PCR seriado pode ser uma ferramenta útil para ajuste do nível de imunossupressão em resposta a carga genômica de EBV. Alta carga viral tem sido relatada em pacientes assintomáticos, especialmente na população pediátrica no momento da infecção primária, assim como em pacientes curados de PTLD sem recaída de doença, limitando a especificidade

do teste e seu uso em estratégias preventivas ³¹⁻³³. No entanto, a monitoração de EBV pré e pós-transplante tem diminuído a incidência de PTLD. Essa abordagem, juntamente com tratamento agressivo da doença, incluindo diminuição da imunossupressão, tem reduzido a taxa de mortalidade para 33% ³⁴.

O serviço de transplante hepático pediátrico do Instituto da Criança - Hospital das Clínicas de São Paulo, começou em setembro de 1989. Até setembro de 2020, 768 transplantes hepáticos foram realizados, sendo 363 com doador cadáver e 405 com doador vivo. Em junho de 1998 foi realizado o primeiro transplante intervivos. Levantamento realizado por nossa equipe até dezembro de 2007, mostrou uma prevalência de PTLD de 5,4% (13/242), com mediana de idade ao diagnóstico de 47 meses e tempo do transplante com mediana de 13 meses. Dez (76,9%) dessas crianças eram susceptíveis ao EBV antes do transplante. PTLD polimórfica foi diagnosticada em 6 pacientes; 7 tiveram o diagnóstico de linfoma. A taxa de mortalidade foi de 53,8% ³⁵.

2. JUSTIFICATIVA

Infecções e tumores constituem um dos maiores efeitos colaterais da terapia imunossupressora após transplante de órgãos sólidos. Crianças são extremamente susceptíveis à adquirir infecção primária por EBV nos primeiros meses após o transplante, quando os níveis de imunossupressão estão elevados, apresentando risco de desenvolver PTLD, condição clínica ainda relacionada a alta taxa de mortalidade. Logo, a monitorização da carga viral do EBV nas crianças permite que tão logo seja detectada replicação viral, medidas terapêuticas sejam instituídas, no intuito de diminuir a proliferação de células B infectadas e a chance de doença linfoproliferativa.

A principal medida terapêutica inicial é a diminuição ou retirada da imunossupressão com o objetivo de aumentar o número de linfócitos T citotóxicos e consequente clareamento viral evitando a evolução para PTLD. No entanto, essa medida pode levar à rejeição aguda ou crônica e perda do enxerto.

PCR quantitativo ou semi-quantitativo para EBV tem sido utilizado na prática do transplante há pouco tempo. A relação entre nível de carga viral do EBV e desenvolvimento de PTLD ou rejeição aguda tem sido estudada, porém com dados ainda conflitantes na literatura. Também não é descrito se o nível sérico da imunossupressão é proporcional à carga viral nem se a diminuição da dose tem ação direta sobre a replicação viral.

Diante do exposto, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos que visem esclarecer essas dúvidas.

3. OBJETIVOS

- Analisar a relação entre o nível de carga viral do EBV e desenvolvimento de PTLD, correlacionando com nível de imunossupressão;
- Avaliar a prevalência de PTLD nos pacientes que fizeram monitoração da carga viral de EBV pós-transplante hepático comparando com a prevalência daqueles que não foram monitorados;
- Correlacionar diminuição de imunossupressão e troca de droga imunossupressora utilizada com a carga viral de EBV comparando qual medida é mais eficaz na diminuição da carga viral;
- Analisar a média de PCR para EBV de pacientes que desenvolveram PTLD e daqueles que não desenvolveram comparando as duas medidas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Trata-se de uma análise retrospectiva, realizada através da coleta de dados de prontuários de 428 pacientes pediátricos submetidos a transplante hepático no Instituto da Criança - Hospital das Clínicas - FMUSP, no período de 1989 a dezembro de 2016.

4.1. Critérios de Inclusão

Foram incluídos no nosso estudo pacientes de zero a 18 anos submetidos a transplante hepático no período de 1989 a dezembro de 2016 no ICR-HC/FMUSP.

4.2. Critérios de exclusão

Pacientes que foram a óbito em até 2 meses após o transplante hepático.

4.3. Desenho do estudo

Os pacientes foram divididos em dois grupos principais:

Grupo 1 - pacientes transplantados antes da instituição do PCR para EBV como exame de rotina (antes do ano de 2006), investigados para infecção por EBV através de coleta de sorologia (anti-VCA IgM e IgG);

Grupo 2 - composto pelos pacientes submetidos à transplante hepático após início de coleta de PCR para EBV de rotina (depois do ano de 2006) na 2^a, 4^a, 6^a, 8^a, 12^a e 16^a semanas após transplante hepático.

Os grupos foram comparados quanto à prevalência de infecção por EBV e de PTLD, taxa de mortalidade, taxa de rejeição e nível de imunossupressão.

Foram avaliados também a evolução do PCR para EBV de acordo com a conduta tomada (diminuição de imunossupressão vigente ou substituição do tacrolimus por sirolimus) e fatores de risco para PTLD.

Os pacientes transplantados após 2006 que tinham o PCR para EBV monitorados foram classificados como replicador crônico ou esporádico, sendo considerado crônico todo paciente que mantinha PCR para EBV positivo mesmo após 6 meses da diminuição ou retirada da imunossupressão e esporádico aquele que positivou PCR para EBV porém em menos de 6 meses apresentou carga viral indetectável, independente do estado de imunossupressão. Foi avaliada relação de PTLD com replicação crônica ou esporádica.

4.4. Transplante hepático na criança

Até julho de 2006, a lista de espera por transplante no Brasil, era organizada por ordem cronológica. Isto é, a primeira pessoa da lista era aquela que foi registrada primeiro. Atualmente, a lista é classificada por gravidade, isto é, todos os candidatos recebem uma nota (*Pediatric End-stage Liver Disease* [PELD] para menores de 12 anos e *Model for End-Stage Liver Disease* [MELD] para maiores de 12 anos) que leva em consideração o nível sérico de albumina, tempo de protrombina, nível de bilirrubina, dentre outros dados. O primeiro da lista agora é aquele que apresenta situação mais grave.

O enxerto pode ser proveniente de doador vivo ou cadáver.

Para aceitar um potencial doador vivo, alguns requisitos tem que ser preenchidos: o doador deve, preferencialmente, ser parente de primeiro grau da criança, deve haver compatibilidade ABO e função hepática normal.

Quando um fígado adulto é transplantado para uma criança, é necessário reduzir o tamanho do fígado, transplantando apenas o lobo esquerdo. Quando há discrepância importante entre o peso do doador e do receptor (ou quando um doador vivo é utilizado), apenas o segmento lateral esquerdo do fígado é utilizado.

4.5. Imunossupressão

O protocolo de imunossupressão que nossa equipe segue não utiliza regularmente terapia de indução, exceto em 32 pacientes que foram transplantados de março de 2000 a outubro de 2001, que entraram em um protocolo de pesquisa e receberam basiliximab durante o transplante e no 4º dia pós-operatório. Esquema de imunossupressão é realizado com inibidores da calcineurina (CNI). Ciclosporina foi utilizada no período de 1989 a 2000 e tacrolimus foi estabelecido como imunossupressor padrão a partir de 2001 até o presente. Todas as crianças recebem metilprednisolona (20mg/kg) imediatamente após reperfusão; no dia seguinte, é administrado 5mg/kg divididos em 4 doses. Corticosteróides são gradualmente diminuídos no período pós-operatório, até alcançar uma dose de 1,5-5mg/d, dependendo do peso da criança, mantida por 1 ano. Em crianças transplantadas por doença auto-imune, uma dose de corticoide baixa é mantida continuamente. Uma terceira droga, micofenolato mofetil (MMF), é adicionada só em casos de episódios de rejeição de repetição ou refratários aos corticosteróides. MMF ou sirolimus é utilizada como única droga imunossupressora em pacientes com deterioração da função renal. Timoglobulina é administrado em crianças que apresentam rejeição resistente a corticóide.

4.6. Profilaxia Antiviral

Profilaxia antiviral é feita para todos os pacientes com ganciclovir endovenoso por 14 dias seguido de 4 meses de tratamento com aciclovir oral.

Sorologias para EBV (Anti-VCA IgG e IgM) e CMV são realizadas antes do transplante tanto para os doadores quanto para os receptores.

Desde 2006, PCR para EBV está disponível em nosso serviço. Dessa maneira, tornou-se rotina realizar PCR para EBV e CMV em todos os pacientes submetidos à transplante hepático na 2ª, 4ª, 6ª, 8ª, 12ª e 16ª semanas após o transplante. Caso PCR positivo em algum momento, nova dosagem de PCR é

solicitada em 1 mês a 3 meses a depender da clínica e do valor da carga viral, sendo coletado o mais cedo possível se clínica exuberante ou carga viral alta. Caso o PCR até a 16ª semana pós-transplante continue negativa, nova dosagem é solicitada apenas se paciente apresentar sinais clínicos.

Para pacientes com PCR para EBV positiva, diminuição da imunossupressão é realizada até queda da carga viral. Caso persista alta, ou em ascensão, tacrolimus é trocado por sirolimus.

Anteriormente a 2006, como não havia PCR disponível no serviço, realizava-se sorologia para EBV (anti-VCA IgG e IgM) diante da suspeita de infecção por EBV.

4.7. Suspeita de Infecção por EBV

Suspeita de infecção por EBV é levantada em crianças que iniciam quadro de febre de origem indeterminada, anemia persistente, sintomas de vias aéreas superiores, diarreia inexplicada e/ou sangramento gastrointestinal. Crianças com sorologia para EBV negativa no momento do transplante estão sob alto risco de desenvolver infecção primária pelo EBV. Logo, presença de sintomas leves, já levam a uma investigação maior, incluindo PCR para EBV ou sorologia (quando PCR ainda não disponível). De acordo com o sintoma apresentado, endoscopia, colonoscopia, assim como tomografia computadorizada de tórax ou abdomen podem ser realizadas.

4.8. Quantificação por PCR em tempo real do Vírus Epstein-Barr

As amostras de sangue total são coletadas em dois tubos contendo EDTA e são centrifugadas para separação do plasma. Para a quantificação de DNA do vírus do EBV no plasma é utilizado o ensaio em cadeia de polimerase (PCR) Abbott RealTime EBV que tem como alvo o gene BLLF1, o qual codifica a glicoproteína de envelope gp350/220. Esta glicoproteína é a mais amplamente expressa no envelope viral e é responsável pela endocitose do vírus nos linfócitos B.

O ensaio Abbott RealTime EBV utiliza tecnologia de PCR para gerar produto amplificado do genoma do DNA de EBV em amostras clínicas. A presença da sequência alvo de EBV é indicada pelo sinal fluorescente gerado por meio do uso de sondas de oligonucleotídeos marcadas com fluoresceína no equipamento Abbott *m2000rt*. As sondas não geram sinal se não estiverem especificamente ligadas ao produto amplificado. O ciclo de amplificação no qual o sinal fluorescente é detectado pelo Abbott *m2000rt* é inversamente proporcional à concentração de DNA de EBV presente na amostra original. Um controle interno é introduzido em cada amostra no início da preparação e é simultaneamente amplificado por PCR, a fim de demonstrar que o processo foi realizado corretamente.

O limite inferior de detecção do teste é de 40UI/mL e o superior de 200.000.000 UI/mL. O ensaio Abbott RealTime EBV foi concebido para atingir um desvio padrão (DP) inter-ensaio inferior ou igual a 0,50 log UI/mL para amostras de plasma contendo 40 a 2×10^8 UI/mL de DNA de EBV.

As amostras são processadas no departamento de biologia molecular do laboratório central do Hospital das Clínicas da FMUSP.

4.9. Diagnóstico de PTLD

Toda lesão suspeita, seja linfonodal, hepática ou do trato gastrointestinal, é biopsiada. Crianças que apresentam infecção amigdaliana de repetição são submetidas à adenoamigdalectomia. Os espécimes são preservados em formaldeído a 4% e embebidos em parafina. Análise imunohistoquímica é realizada. O diagnóstico é feito baseado nos achados patológicos; todos os espécimes avaliados são revisados por dois patologistas experientes em transplante. Para definir o espectro de PTLD, utiliza-se os critérios propostos pela Organização Mundial de Saúde para neoplasias originadas de tecido linfóide e hematológico.

4.10. Variáveis analisadas

Foram avaliados gênero, idade ao transplante hepático, indicação do transplante, tipo de transplante (intervivos, cadáver), sorologia para EBV pré-transplante do doador e receptor, imunossupressão utilizada, nível de imunossupressão, carga viral para EBV e episódios de rejeição aguda de todos os pacientes pediátricos submetidos à transplante hepático no período de 1989 a dezembro de 2016, bem como fatores de risco para PTLT.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas no software SPSS v.25 for Windows.

As variáveis quantitativas foram apresentadas pelos valores da média, mediana, desvio padrão, mínimo, máximo assim como o 1º e 3º quartil, e as qualitativas foram apresentadas pelos valores de frequências e porcentagens.

Na associação das variáveis qualitativas utilizou-se o teste qui-quadrado de Pearson. Quando mais de 25% das variáveis apresentaram valores esperados menores do que 5, o teste exato de Fisher foi utilizado.

Para testar a hipótese da distribuição normal dos dados quantitativos utilizou-se o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Quando não satisfeita esta hipótese, testes não paramétricos foram utilizados.

Para avaliar a relação dos valores de PCR para EBV medidos antes e após a realização de determinada medida (diminuição da imunossupressão ou troca de tacrolimus ou ciclosporina por sirolimus) utilizou-se o teste de Wilcoxon.

Nas comparações entre grupos independentes utilizou-se o teste de Mann-Whitney.

Na avaliação da correlação entre as medidas quantitativas, o coeficiente de correlação de Spearman foi calculado.

Todas as hipóteses foram testadas com um nível de significância de 5%.

O modelo de regressão logística foi utilizado para avaliar os fatores relacionados com PTLD. Foi usada a regressão logística simples para avaliar o *odds ratio* (OR) com seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC95%), para cada uma das variáveis de interesse. Posteriormente, as variáveis com valor de $p < 0,20$ foram consideradas como candidatas para a construção do modelo de regressão múltiplo (ou ajustado) permanecendo no modelo as variáveis com $p < 0,05$ e as variáveis de ajuste.

6. RESULTADOS

Um total de 428 crianças e adolescentes entre 0 e 18 anos foram incluídas no estudo.

A maioria era do sexo feminino (55,1%) e a idade média de realização do transplante foi de 56 meses. Pouco mais da metade dos pacientes foi submetido a transplante intervivos (51,9%) (tabela 1).

Sorologia para EBV era negativa antes do transplante em 42,3% dos receptores, enquanto que 83,8% dos doadores apresentavam sorologia positiva (tabela 1).

Tabela 1. Características das crianças participantes do estudo, Instituto da Criança, FMUSP, 2018.

Característica		n missing	n=428 n (%)
Gênero	Feminino		236 (55,1)
	Masculino		192 (44,9)
Idade ao transplante (meses)	Média (DP)		56,1(56,0)
	Mediana (vmín-vmáx)		32 (2-278)
Peso ao transplante (kg)	Média (DP)	5	16,2 (11,4)
	Mediana (vmín-vmáx)		11,8(4,8-61,2)
Tipo de doador	Cadáver		205 (47,9)
	Intervivo		222 (51,9)
	Cadáver/intervivo		1 (0,2)
Sorologia para EBV	Negativo	154	116 (42,3)
	Positivo		158 (57,7)
EBV doador	Negativo	200	35 (15,4)
	Positivo		191 (83,8)
	Inconclusivo		2 (0,9)

DP: desvio padrão; vmín: valor mínimo; vmáx: valor máximo.

Dezoito (4,2%) pacientes desenvolveram doença linfoproliferativa. Estes não apresentavam diferenças em comparação com aqueles que não desenvolveram a doença quando avaliados quanto ao gênero, idade ao

transplante, peso, tipo de doador, sorologia para EBV antes do transplante, imunossupressão utilizada ou taxa de rejeição. Também não houve diferença estatística entre o número de pacientes que desenvolveram PTLD antes ou depois do ano de 2006, quando a mensuração periódica de PCR para EBV passou a fazer parte do protocolo. Três crianças transplantadas antes do ano 2000 e que tinham relato de terem evoluído com doença linfoproliferativa foram excluídas por não apresentarem documentadas grande parte das informações necessárias para esta análise.

Sorologia para CMV apresentou associação estatística com doença linfoproliferativa. Não houve associação entre a qualidade de replicador viral crônico ou esporádico com a evolução para PTLD (tabela 2).

Tabela 2. Características das crianças submetidas a transplante hepático segundo a presença de doença linfoproliferativa, Instituto da Criança, FMUSP, 2018.

Característica		Doença linfoproliferativa		Valor de p
		Não n= 410 n (%)	Sim n= 18 n (%)	
Gênero	Feminino	226 (95,8)	10 (4,2)	1 ¹
	Masculino	184 (95,8)	8 (4,2)	
Idade ao transplante (meses)	Média (DP)	56,8 (56,3)	39,9 (47,8)	0,184 ²
	Mediana (vmín-vmáx)	33,5 (2-278)	17,5 (7-152)	
Peso ao transplante (kg)	Média (DP)	16,3 (11,4)	15,3 (12,0)	0,552 ²
	Mediana (vmín-vmáx)	11,9 (4,8-61,2)	10 (6-43)	
Ano do transplante	<2006	165 (94,8)	9 (5,2)	0,410 ¹
	≥2006	245 (96,5)	9 (3,5)	
Tipo de doador	Cadáver	199 (97,1)	6 (2,9)	0,267 ³
	Intervivos	210 (94,6)	12 (5,4)	
	Cadáver/intervivos	1 (100)	0	
Tacrolimus	Não	112 (98,2)	2 (1,8)	0,174 ³
	Sim	296 (94,9)	16 (5,1)	
Ciclosporina	Não	300 (94,9)	16 (5,1)	0,177 ³
	Sim	108 (98,2)	2 (1,8)	

<i>MMF</i>	Não	341 (95,5)	16 (4,5)	0,750 ³
	Sim	67 (97,1)	2 (2,9)	
<i>Sirolimus</i>	Não	404 (95,7)	18 (4,3)	1 ³
	Sim	4 (100)	0	
<i>Sorologia para EBV</i>	Negativo	107 (92,2)	9 (7,8)	0,088 ¹
	Positivo	153 (96,8)	5 (3,2)	
<i>Sorologia para CMV</i>	Negativo	36 (87,8)	5 (12,2)	0,015 ³
	Positivo	223 (97,4)	6 (2,6)	
<i>Replicador</i>	Crônico	63 (92,6)	5 (7,4)	0,769 ^{3¶}
	Esporádico	139 (93,9)	9 (6,1)	
<i>Rejeição</i>	Não	212 (97,2)	6 (2,8)	0,127 ¹
	Sim	198 (94,3)	12 (5,7)	

DP: desvio padrão; vmín: valor mínimo; vmáx: valor máximo; NA: não avaliável. ¹ Teste t de Student; ² Teste qui-quadrado de Pearson; ³ Teste exato de Fisher. [¶] Considerando os casos com informação de PCR durante o seguimento.

O perfil das crianças transplantadas antes de 2006 e após esse período foi estatisticamente diferente, bem como o tipo de imunossupressão utilizada. Após 2006 crianças de menor idade e menor peso tem sido submetidas ao transplante, em sua maioria com doador vivo. O tacrolimus tem sido mais utilizado após o ano 2006, enquanto a ciclosporina fazia parte do esquema de imunossupressão dos pacientes transplantados antes de 2006 (tabela 3).

Tabela 3. Características das crianças submetidas a transplante hepático segundo o período de realização do transplante, Instituto da Criança, FMUSP, 2018.

Característica		Período do transplante		Valor de p
		Antes de 2006 n= 174 n (%)	Após 2006 n= 254 n (%)	
<i>Gênero</i>	Feminino	93 (53,4)	143 (56,3)	0,560 ¹
	Masculino	81 (46,6)	111 (43,7)	
<i>Idade ao transplante (meses)</i>	Média (DP)	70,37 (56,22)	46,30 (53,89)	<0,001 ²
	Mediana (vmín-vmáx)	47 (7-278)	18,50 (2-224)	

<i>Peso ao transplante (kg)</i>	Média (DP)	18,83 (11,18)	14,53 (11,32)	<0,001 ²
	Mediana (vmín-vmáx)	14,2 (7,2-61,2)	9,5 (4,8-57)	
<i>Tipo de doador</i>	Cadáver	115 (66,1)	90 (35,4)	<0,001 ³
	Intervivo	58 (33,3)	164 (64,6)	
	Cadáver/intervivo	1 (0,6)	0	
<i>Tacrolimus</i>	Não	99 (57,2)	15 (5,9)	<0,001 ¹
	Sim	74 (42,8)	238 (94,1)	
<i>Ciclosporina</i>	Não	74 (42,8)	242 (95,7)	<0,001 ¹
	Sim	99 (57,2)	11 (4,3)	
<i>MMF</i>	Não	164 (94,8)	193 (76,3)	<0,001 ¹
	Sim	9 (5,2)	60 (23,7)	

DP: desvio padrão; vmín: valor mínimo; vmáx: valor máximo; NA: não avaliável. ¹ Teste qui-quadrado de Pearson; ² Teste de Mann-Whitney; ³ Teste exato de Fisher.

Oito pacientes (44%) apresentaram PTLD precoce (até seis meses do transplante) sendo a média de tempo entre o transplante e o diagnóstico da doença de 24,2 meses. Mais da metade dos pacientes (67%) apresentavam PCR para EBV positivo ao diagnóstico com uma média de 131.601 cópias/mL. A média do nível sérico de imunossupressão no momento do diagnóstico foi de 8,3 (Tabela 4).

Tabela 4. Características dos pacientes submetidos à transplante hepático que desenvolveram doença linfoproliferativa, Instituto da Criança, FMUSP, 2018.

Paciente	Idade ao Transplante	Idade ao desenvolver PTLD*	Tempo entre transplante e PTLD*	Sorologia EBV	PCR EBV	Nível IS
1	12	95	83	Positivo	0	4,9
2	31	33	2	Positivo	30.864	7,3
3	18	21	3	Negativo	118.373	19,7
4	15	19	4	Negativo	0	5
5	125	139	14	Inconclusivo	SI	SI
6	41	57	16	Positivo	5029	7
7	17	23	6	Inconclusivo	621.250	14,2
8	47	86	39	Inconclusivo	0	4,6
9	9	59	50	Negativo	0	SI
10	9	12	3	Negativo	3461	5,9
11	14	98	84	Negativo	0	4,8
12	26	31	5	Negativo	202203	5,3
13	25	26	1	Positivo	2960	SI
14	16	19	3	Negativo	240.000	7,8
15	19	26	7	Negativo	11300	SI
16	152	212	60	Positivo	964.134	10,9
17	7	51	44	Negativo	1500	2,4
18	16	29	13	Positivo	36149	SI

O trato gastrointestinal foi o sítio primário mais acometido, seguido das amígdalas. Mais da metade dos pacientes (67%) apresentavam CD 20+ na peça histológica e fizeram rituximabe. Metade dos pacientes que desenvolveram PTLD foram transplantados antes de 2006. Destes, a maioria (67%) apresentaram a forma mais branda da doença, respondendo apenas à redução de imunossupressão e/ou ao rituximabe. A média de idade ao transplante desses pacientes foi de 22,6 meses, menor do que a apresentada pelos que desenvolveram a forma mais grave da doença (38,5). A taxa de óbito pela doença foi de 5% (1 paciente). Metade dos pacientes apresentaram rejeição do enxerto após diminuição ou retirada da imunossupressão, a maioria deles (67%) pertencentes ao grupo de pacientes transplantados depois de 2006. A média de tempo entre a diminuição da imunossupressão e a rejeição hepática, foi de 5,8 meses (Tabela 5).

Tabela 5. Características da PTLD em pacientes submetidos a transplante hepático antes do ano de 2006 e depois, bem como relação com rejeição do enxerto e desfecho, Instituto da Criança, FMUSP, 2018.

Paciente	Tipo PTLD	CD 20	Sítio	Conduta	Rejeição/Tipo	Tempo PTLD –rejeição*	Desfecho
1	Linfoma de Burkitt	+	Intestinal	RI + RTX + QT LNH	Rejeição Aguda Leve	6	Óbito – não PTLD
3	PTLD	-	Amígdala	RI	Rejeição Aguda Leve	1	Seguimento
5	Linfoma Difuso de Grandes células B	+	Intestinal	RI + QT	Rejeição Aguda Moderada	2	Óbito - PTLD
7	PTLD	-	Amígdala	RI	Não	----	Seguimento
8	PTLD polimórfico	+	Linfonodo cervical	RI + RTX	Não	----	Óbito – não PTLD
10	PTLD	-	Amígdala	RI	Não	----	Seguimento
11	Linfoma de burkitt monomórfico	+	Intestinal	mTOR + QT + RTX	Não	----	Seguimento
12	PTLD	-	Linfonodo cervical	RI	Não	----	Óbito – não PTLD
15	PTLD	-	Cólon	RI	Não	----	Seguimento
2	Linfoma de células intestinais	+	Intestinal	RTX	Não		Óbito – não PTLD
4	Linfoma Difuso de Grandes células B monomórfico	+	Amígdala	RI + RTX	Rejeição Aguda Moderada	6	Seguimento
6	Linfoma Difuso de Grandes células B monomórfico	+	Orofaringe/estômago	RI + RTX	Rejeição Aguda Grave	2	Seguimento
9	Linfoma de Burkitt	+	Mesentério	RI + RTX + QT LNH	Não	----	Seguimento
13	Linfoma Difuso de Grandes células B monomórfico	+	Linfonodo Axilar	RI + RTX	Rejeição Aguda Leve	2	Seguimento
14	Linfoma Difuso de Grandes células B	+	Amígdala	RI + RTX	Rejeição Aguda Moderada	1	Óbito – não PTLD
16	Linfoma Difuso de Grandes células B monomórfico	-	Linfonodo Axilar	RI+RTX+ QT COG	Não	----	Seguimento
17	Linfoma de Burkitt	+	Massa Abdominal	RI+RTX+ QT COG	Rejeição Aguda	20	Seguimento
18	PTLD Monomórfico plasmoblástico	+	Linfonodo axilar	RI+RTX+ QT COG	Rejeição Aguda Moderada	13	Seguimento

Transplantado antes do ano 2006; Transplantado depois do ano de 2006* meses; RI: redução imunossupressor; mTOR: sirolimus; RTX: rituximabe; QT: quimioterapia; COG/LNH – protocolo QT

Após início de monitoramento dos pacientes com dosagem de PCR para EBV (depois do ano 2006), observou-se um predomínio da forma mais grave, monomórfica da doença linfoproliferativa ($p=0,009$) (tabela 6).

Tabela 6. *Caracterização da PTLD em pacientes submetidos a transplante hepático antes do ano de 2006 e depois, Instituto da Criança, FMUSP, 2018.*

Período	PTLD		Valor de p^1
	Monomórfica	Polimórfica	
Antes de 2006	3	6	0.009
Depois de 2006	9	0	

¹ Teste exato de Fisher

Um total de 240 crianças foram submetidas a 1778 aferições de PCR quantitativo para EBV (média de 7 PCRs por criança). Os valores de PCR medidos para cada criança foram avaliados antes e depois da redução do tacrolimus ou da ciclosporina ou da troca do tacrolimus por sirolimus. Houve mudança no nível de PCR após a redução do tacrolimus ($p=0,002$), assim como na troca do tacrolimus por sirolimus ($p=0,008$). Não houve significância estatística na redução da dose de ciclosporina ($p=0,441$). Observou-se diferença estatisticamente significativa dos níveis séricos antes e após a diminuição da dose de tacrolimus ($p<0,001$) e ciclosporina ($p=0,006$) (tabela 7).

Tabela 7. Comparação entre os níveis de PCR antes e depois da redução ou troca de medicamento imunossupressor, Instituto da Criança, FMUSP, 2018.

Medida tomada	Antes		Depois		Valor de p ¹
	Média (DP)	Mediana (1ºQ-3ºQ)	Média (DP)	Mediana (1ºQ-3ºQ)	
<i>Reduzir dose de tacrolimus</i>	78.552,33 (152.035)	11.471,50 (1.857,75-73.626)	21.733,31 (53.249,42)	6.678,00 (716-19.543,50)	0,002
<i>Reduzir dose de ciclosporina</i>	16.874,78 (38.154,50)	2.547 (659-12.655,50)	21.012,67 (47.779,64)	773 (0-19.512,50)	0,441
<i>Trocar tacrolimus por sirolimus</i>	110.236,36 (210.989)	17.845,50 (4.504,25-103.864,25)	40.751,35 (126.171)	2.952 (901-13.273)	0,008
<i>Dose de tacrolimus</i>	3,49 (1,77)	3 (0-9)	2,18 (1,44)	2 (0-8)	<0,001
<i>Dose de ciclosporina</i>	88,89 (17,64)	90 (70-120)	74,44 (14,88)	75 (50-90)	0,006

DP: desvio padrão; 1ºQ: primeiro quartil (Q25); 3ºQ: terceiro quartil (Q75). ¹ Teste de Wilcoxon.

Os valores de PCR também foram comparados segundo a presença de doença linfoproliferativa dentro de cada medida de avaliação. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa como observado na tabela 8. Porém observou-se que o número de cópias de EBV era significativamente maior ($p=0,029$) nos pacientes que desenvolveram PTLD (Figura 2).

Tabela 8. Comparação dos níveis de PCR entre pacientes que desenvolveram ou não doença linfoproliferativa segundo redução ou troca de medicamento imunossupressor, Instituto da Criança, FMUSP, 2018.

Medida tomada	Doença linfoproliferativa				Valor de p
	Não		Sim		
	Média (DP)	Mediana (1°Q-3°Q)	Média (DP)	Mediana (1°Q-3°Q)	
<i>Reduzir dose de tacrolimus</i>					
Antes	68.687,77 (142.482)	10.906 (1.449,75-53.183)	147.604,25 (205.657)	71.084 (10.311,75-196.652,25)	0,104
Depois	21.054,50 (56.209,88)	6.297 (564,50-14.121)	26.485 (25.787,15)	25.175 (2.753,50-44.946,25)	0,123
<i>Reduzir dose de ciclosporina</i>					
Antes	16.874,78 (38.154,50)	2.547 (659-12.655,50)			NA
Depois	21.012,67 (47.779,64)	773 (0-19.512,50)			NA
<i>Trocar tacrolimus por sirolimus</i>					
Antes	120.788,56 (227.766)	22.042 (5.965-103.864,25)	62.751,50 (118.192)	5.365 (1.317,50-181.572)	0,268
Depois	48.514,26 (138.158)	2.952 (1.022-22.503)	3.877,50 (4.489,76)	2.404,50 (591,50-8.636,50)	0,417

NA: não avaliável. DP: desvio padrão; 1°Q: primeiro quartil (Q25); 3°Q: terceiro quartil (Q75). ¹ Teste de Mann-Whitney.

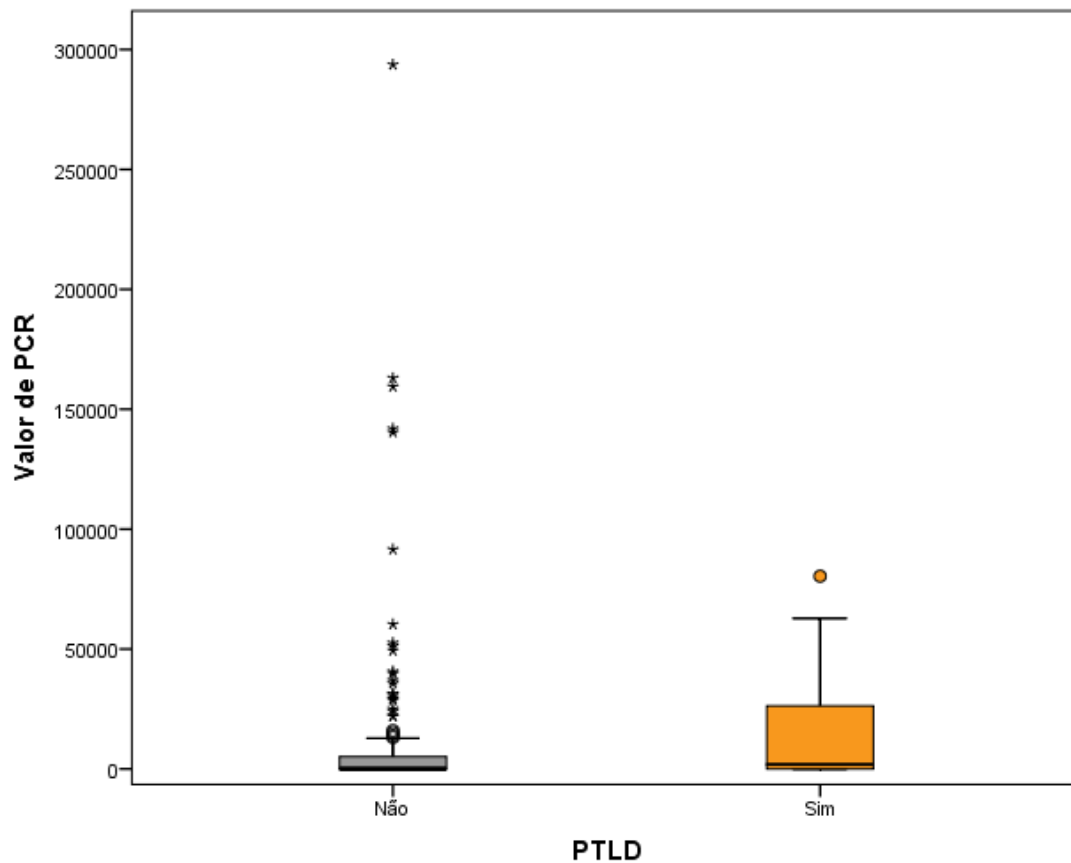


Figura 2. Distribuição dos valores de PCR segundo a presença de PTLD.

Com o intuito de avaliar se existe alguma associação linear entre o PCR para EBV e a dose ou nível sérico do imunossupressor foi calculado coeficiente de correlação de Spearman. Embora as correlações tenham apresentado valores estatisticamente significativos, pode-se observar que os valores representam associações fracas ou moderadas (Tabela 9).

Tabela 9. Correlação entre os níveis de PCR e as doses e nível sérico dos diferentes imunossupressores (tacrolimus, ciclosporina e sirolimus), Instituto da Criança, FMUSP, 2018.

Medida		PCR	Valor de p
<i>Tacrolimus</i>	Dose	-0,229	<0,001
	Nível sérico	-0,087	0,002
<i>Ciclosporina</i>	Dose	-0,477	<0,001
	Nível sérico	-0,195	0,013
<i>Sirolimus</i>	Dose	-0,137	0,012
	Nível sérico	-0,045	0,420

A sorologia positiva para CMV na ocasião do transplante apresentou associação com diminuição do risco para doença linfoproliferativa na análise univariada (OR não ajustado). Quando colocadas as variáveis no modelo de regressão múltipla, a soropositividade para CMV continuou a ser um fator de proteção independente para doença linfoproliferativa (OR= 0,24; IC95% 0,06-0,92), isto é, reduz em 76% a chance de ter PTLN ajustada pela sorologia para EBV (Tabela 10).

Tabela 10. Fatores associados com doença linfoproliferativa (PTLD) em crianças submetidas a transplante hepático, Instituto da Criança, FMUSP, 2018.

Fator	Não ajustada OR (IC95%)	Valor de p	Ajustada OR (IC95%)	Valor de p
<i>Idade ao transplante (meses)</i>	0,99 (0,98-1,00)	0,220		
<i>Peso ao transplante (kg)</i>	0,99 (0,95-1,04)	0,715		
<i>Período do transplante (ref: <2006) ≥2006</i>	0,67 (0,26-1,73)	0,412		
<i>Sorologia para EBV (ref: negativo) Positivo</i>	0,39 (0,13-1,19)	0,098	0,52 (0,14-1,94)	0,333
<i>Sorologia para CMV (ref: negativo) Positivo</i>	0,19 (0,06-0,67)	0,009	0,24 (0,06-0,92)	0,037
<i>CMV doador (ref: negativo) Positivo</i>		NA		NA
<i>EBV doador (ref: negativo) Positivo</i>	0,35 (0,08-1,45)	0,147		

OR: odds ratio; IC95%: intervalo de confiança de 95%.

7. DISCUSSÃO

O transplante de órgãos sólidos levou a uma significativa melhora na sobrevida e qualidade de vida de crianças com falência de órgãos por condições de saúde diversas. Essencial para esse sucesso foi o conhecimento e manejo adequado de drogas imunossupressoras que evitam a perda do enxerto, embora tragam consigo a possibilidade de infecções virais e suas complicações malignas ou pré-malignas. As desordens PTLD representam um grupo de doenças que surgem a partir de um sistema imunológico atenuado.

A doença linfoproliferativa ainda constitui importante causa de morbidade e mortalidade em pacientes pediátricos submetidos a transplante de fígado sendo relatado na literatura incidência de 6 – 20% e mortalidade que varia de 12-60% ³⁶. No Brasil, levantamento realizado no Instituto da Criança – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo até dezembro de 2007, mostrava prevalência de 5,4% e mortalidade de 53,9% ³⁵. No presente estudo, avaliando o total de pacientes pediátricos submetidos a transplante de fígado nessa mesma instituição até dezembro de 2016, encontrou-se uma prevalência de 4,2% de PTLD o que corrobora com dados levantados por outros centros. Porém, chama atenção a queda importante na taxa de mortalidade decorrente da doença linfoproliferativa para 5%. Uma provável explicação para este fato seria o melhor entendimento clínico desta condição patológica, um melhor monitoramento dos pacientes com fatores de risco, bem como o diagnóstico precoce daqueles com sinais e sintomas da doença, medidas que permitem intervenção terapêutica antes da patologia tornar-se avançada.

Já está bem documentado na literatura a relação da doença linfoproliferativa com a infecção pelo vírus Epstein-Barr. Receptor com sorologia negativa para EBV anterior ao transplante e doador com IgG positivo é relatada como um importante fator de risco para PTLD ³⁷. Chen et al avaliaram 39 crianças, com média de idade de 1,3 anos, submetidas a transplante hepático entre os anos de 2007 e 2013 na cidade de Taiwan. Cinco delas desenvolveram PTLD; dessas, 80% com sorologia negativa para EBV antes do transplante. Todos os doadores eram IgG positivo para EBV ³⁸. Em um estudo multicêntrico norte-americano e canadense realizado pelo grupo de estudos em transplante hepático pediátrico (SPLIT) que avaliou 2283 crianças submetidas a transplante de fígado, 75 apresentaram doença linfoproliferativa

sendo 85,3% dessas negativas para EBV no momento do transplante ³⁵. No presente estudo, 50% dos pacientes que desenvolveram PTLD apresentavam sorologia negativa para Epstein-barr vírus. Essa maior exposição ao EBV pode ser explicada pela média de idade maior ao transplante (3,3 anos) das crianças incluídas neste estudo quando comparada às crianças incluídas no estudo de Chen et al e no levantamento multicêntrico descrito pelo SPLIT (1,3 e 2,4 anos, respectivamente), uma vez que soroconversão e infecção por EBV aumenta com a idade na população geral ³⁹.

O vírus Epstein-Barr infecta células B e células epiteliais da orofaringe levando a uma ativação e proliferação de células B. Um sistema imunológico intacto pode controlar essa infecção por meio de apoptose das células B ou da atividade das células T citotóxicas ⁴⁰. Entretanto, no cenário do transplante, todos os receptores de órgãos recebem imunossupressores que tem como alvo as células T. O grau de imunossupressão contribui claramente para o desenvolvimento de PTLD. Pacientes que requerem um nível relativamente alto de inibidor de calcineurina ou aqueles que recebem terapia com anticorpos de depleção de células T têm uma incidência mais alta ⁴¹. No entanto, as análises que tentaram quantificar o risco associado a agentes imunossupressores específicos usados para indução ou terapia de manutenção observaram resultados inconsistentes ⁴²⁻⁴⁴. Na década de 1980 e no início da década de 1990, potentes globulinas anti-linfócitos monoclonais (OKT3) e policlonais foram usadas para terapia de indução e tratamento de rejeição, frequentemente em altas doses ou em cursos repetitivos. Estes agentes estão relacionados com o aumento de risco para PTLD ^{45, 46}.

Em nosso serviço não é utilizado de rotina terapia de indução (exceto 32 pacientes que utilizaram basiliximab entre março de 2000 e outubro de 2001 e três deles desenvolveram PTLD) ³⁵. Inibidores de calcineurina são utilizados desde 1989, sendo a ciclosporina a droga de escolha até 2001, quando passamos a utilizar tacrolimus. Todos os pacientes recebem metilprednisolona (20mg/Kg) no intra-operatório, após reperusão hepática. Dos pacientes que apresentaram PTLD, 89% (16/18) faziam uso do tacrolimus. A média de nível sérico da droga no momento do diagnóstico da doença foi de 8,3. Eshraghian et al realizaram um estudo transversal para avaliar a incidência e sobrevida de PTLD em pacientes submetidos a transplante hepático entre o ano de 2004 a

2015. Um total de 40 crianças foram diagnosticadas com PTLD (incidência de 6,25%), 90% delas faziam uso de tacrolimus. As doses de esteroide e tacrolimus não foram associadas à sobrevida de PTLD, enquanto um nível sérico mais elevado de tacrolimus foi associado a uma sobrevida menor (OR 1,07, IC95%: 1.006-1.15, p=0.032). Os autores ainda observaram que um valor de corte de tacrolimus sérico de mais de 11,1 ng / mL está associado à sobrevida pós-PTLD, tendo uma alta sensibilidade (90%), mas uma especificidade bastante baixa (52%) em pacientes pediátricos, sugerindo o nível de tacrolimus deva ser ajustado levando em consideração esse valor de corte ⁴⁷, o que, em nossa prática clínica representa um nível significativamente alto. Cacciarelli et al avaliaram 131 crianças submetidas a transplante hepático no período de 1989 a 1991 para avaliar a incidência e o risco a longo prazo de PTLD com o uso de tacrolimus. A incidência da doença foi de 13% (17/131), 82% tinham sorologia para EBV negativa no momento do transplante. A média da dose de tacrolimus e do nível plasmático no momento do diagnóstico foi de 0,32 +/- 0,06 mg / kg / dia e 1,3 +/- 0,3 ng / mL (<0,5 - 11,6 ng/mL), respectivamente. O risco cumulativo de PTLD aumentou ao longo do tempo: 3% em 6 meses, 8% em 1 ano, 12% em 2 anos, 14% em 3 anos e 15% em 4 e 5 anos. O uso de tacrolimus em TxH pediátrico apresenta um risco a longo prazo de PTLD de aproximadamente 15%, com a maioria dos episódios (78%) ocorrendo nos primeiros 2 anos, sugerindo que a vigilância intensa do EBV deve ocorrer logo após o transplante ⁴⁸.

A detecção do Epstein-Barr vírus no sangue periférico pode ser usado como suporte ao diagnóstico de EBV associado a PTLD ou para sinalizar aqueles pacientes em risco para PTLD ⁴¹. Alguns grupos têm ilustrado o sucesso dessa técnica em reduzir a incidência de PTLD através da diminuição precoce da imunossupressão em pacientes considerados de risco ⁴⁹⁻⁵². O uso de plasma para o ensaio de PCR revela a presença de DNA extracelular de EBV. O DNA extracelular do EBV pode ser o resultado de células previamente lisadas, como ocorre durante a morte celular espontânea ou induzida, ou do vírus EBV produzido durante a fase lítica ou replicativa ⁵³. A lise celular espontânea ou induzida ocorre tanto nas linfoproliferações benignas quanto no linfoma. Kanakry e colaboradores demonstraram que o EBV no plasma foi detectável em quase todos os 105 pacientes com doença induzida pelo EBV

(99%), como mononucleose infecciosa, linfo-histiocitose hemofagocítica e PTLD⁵⁴. Por outro lado, os autores também observaram que DNA de EBV foi detectado no plasma em menos de 10% das amostras de sangue de pacientes sem evidência de doença por EBV ativa. Portanto, a detecção de fragmentos de DNA de EBV no plasma de receptores de transplante de órgãos é um marcador diagnóstico útil podendo ser o teste mais específico para EBV associado a PTLD.

No nosso serviço, desde o ano de 2006, utiliza-se o teste de PCR para detecção do DNA viral do EBV no plasma para todos os pacientes pediátricos submetidos a transplante de fígado. Antes desse período apenas sorologia estava disponível. A fim de avaliar se a dosagem periódica do PCR para EBV no pós-transplante teve impacto na redução do número de PTLD, dividiu-se os pacientes em dois grupos, aqueles transplantados antes do ano de 2006, e aqueles submetidos a transplante após esse ano. Nota-se que os pacientes diferiram com relação a peso, idade, tipo de doador e imunossupressão utilizada. Isso é provavelmente decorrente da evolução da técnica cirúrgica e do ganho de experiência da equipe que permitiram a realização de transplantes em crianças cada vez menores. Para suprir a necessidade de órgãos cada vez mais escassos, o doador vivo tem sido utilizado desde 2001 com bons resultados. O tacrolimus vem sendo o imunossupressor de escolha com boa segurança e eficácia e diminuição dos efeitos colaterais estéticos relacionados à ciclosporina. Com relação ao número de pacientes que evoluíram para doença linfoproliferativa, observa-se que foi semelhante nos dois períodos. Porém, 89% dos casos de PTLD após 2006 foram classificados como linfoma, diferindo do período anterior a este ano quando tivemos uma taxa de 34% ($p=0,009$). As formas mais leves da doença (não-destrutiva e polimórfica) parecem ter sido evitadas e esse fato pode ter sido decorrente da intervenção precoce do paciente detectado com carga viral para EBV alta, evitando progressão para doença linfoproliferativa. Estudo semelhante foi realizado por Soriano-López e colaboradores na Cidade do México. Noventa e oito crianças foram divididas em dois grupos, aquelas transplantadas de 1998 a 2007, quando ainda não se fazia PCR para EBV, e as transplantadas de 2007 a 2015, quando iniciou a coleta de PCR par EBV. Observou-se uma redução na incidência de PTLD de 14,9% no primeiro grupo para apenas 1,9%

no grupo com monitoração para EBV e submetidos a redução agressiva da imunossupressão ⁴⁹.

Nenhum limite de carga viral para EBV foi estabelecido como preditor de evolução para PTLD. Nossos dados mostram que o número de cópias de EBV DNA é significativamente maior ($p=0,029$) nos pacientes que desenvolveram doença linfoproliferativa. Chen e colaboradores relataram que o pico de carga viral no grupo de pacientes que evoluíram com PTLD foi significativamente maior quando comparado ao grupo que não apresentou a doença [mediana 13.000 vs. 652,5 cópias/ μ g PBMC (células mononucleares de sangue periférico) DNA, $p=0,01$]. Esses mesmos pesquisadores identificaram, através do modelo de risco proporcional de Cox, dois preditores para PTLD: pico de carga viral para EBV em 3 meses pós-transplante > 4100 cópias / μ g PBMC DNA e pico de nível de tacrolimus em 3 meses pós-transplante $> 14,8$ ng / mL (Razão de risco = 17,14 e 11,54, $p=0,02$ e 0,03, respectivamente), sugerindo um monitoramento cuidadoso e ajuste de imunossupressores se a carga viral de EBV dentro de 3 meses pós-transplante atingir esse nível ³⁸.

Mais da metade dos pacientes que evoluíram para PTLD no nosso estudo (67%) apresentaram PCR positivo para EBV com uma média de 131.601 cópias/mL e uma média de nível sérico de tacrolimus no momento do diagnóstico de 8,3 ng/mL. Um total de 240 crianças foram submetidas a 1778 aferições de PCR quantitativo para EBV (média de 7 aferições por criança). Esses valores foram avaliados antes e após a tomada de alguma medida terapêutica como redução de tacrolimus ou da ciclosporina ou troca do inibidor de calcineurina para o inibidor de mTOR (sirolimus). As medidas resultaram em redução significativa do PCR para EBV ($p=0,002$ para redução de tacrolimus e $p=0,008$ para troca de medicamento). Para avaliar se haveria associação linear entre PCR para EBV e dose ou nível sérico de imunossupressor, foi calculado o coeficiente de Spearman, que mostrou resultados significativos, porém com associação fraca ou moderada.

Kullberg-Lindh e colaboradores avaliaram retrospectivamente 30 crianças submetidas a transplante hepático durante o primeiro ano pós-transplante para analisar como a redução da imunossupressão influenciava o

nível de DNA EBV em sangue periférico. O protocolo de imunossupressão deste grupo consistia em metilprednisolona peroperatória e timoglobulina como terapia de indução, seguido de tacrolimus como monoterapia. Os níveis mínimos de tacrolimus era de 10-15 ng / mL nas primeiras semanas sendo diminuído para 3-5 ng / mL durante os primeiros 3 meses, caso não houvesse rejeição aguda. A imunossupressão era reduzida em 10 a 20% da dose por semana até atingir níveis abaixo de 3 ng / mL, guiada pelo DNA de EBV, níveis séricos de tacrolimus, testes de função hepática, níveis de ALT e biópsia hepática quando necessário. O DNA de EBV foi detectado em pelo menos uma amostra de 87% dos pacientes (26/30). PTLD não foi observado em nenhum caso. Doze pacientes (40%) atingiram um número de cópias para EBV maior que 5.0 log Geq/mL no primeiro ano e 10 deles apresentavam critério para alta replicação crônica ($\geq 4.2 \log_{10}$ Geq/mL em sangue total em mais de 50% das amostras por mais de seis meses). O imunossupressor foi reduzido em 18 pacientes devido ao aumento de número de cópias de DNA EBV. Três pacientes tiveram a redução da imunossupressão suspensa por alteração de enzimas hepáticas. Nove, dos 15 pacientes restantes, tiveram a imunossupressão totalmente retirada. Apenas um paciente apresentou rejeição aguda, 1,5 meses após suspensão da medicação. A retirada total da imunossupressão resultou em uma redução do número de cópias de EBV em sangue periférico, porém os oito pacientes mantiveram replicação viral mesmo após 2 anos ou mais da suspensão ⁵⁵.

Com um mecanismo de ação diferente dos inibidores da calcineurina, por inibição da via de mTOR (*mammalian target of rapamycin*), o Sirolimus constitui uma opção terapêutica para pacientes que se recuperam de uma PTLD. Seus efeitos antiproliferativos contra doenças malignas ⁵⁶, decorrem de demonstrações *in vitro* da parada na progressão do ciclo celular e da indução de apoptose ⁵⁷. Em modelos animais, o sirolimus demonstrou suprimir o crescimento de células B positivas para EBV, além de inibir o crescimento de tumor metastático e a angiogênese, possivelmente, por promover diminuição da produção de VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular) ⁵⁸. O uso de sirolimus pode, portanto, reduzir a chance de novos episódios ou recorrência

de tumores malignos, efeito esse não evidenciado pelo uso de inibidores da calcineurina (tacrolimus e ciclosporina) ⁵⁹.

Para determinar o impacto do uso de sirolimus a longo prazo em pacientes submetidos a transplante hepático e que desenvolveram PTLD ou outras neoplasias malignas, um grupo de pesquisadores avaliou 8 crianças com média de idade de 10 anos. Seis delas tiveram indicação de sirolimus após episódio de PTLD e duas delas após hepatoblastoma. Os pacientes foram acompanhados por um período médio de 17 meses e a dose da medicação variou de 0,1 a 0,14 mg/Kg/dia (apenas um paciente necessitou de dose mais alta de 0,45 mg/Kg/dia). Nenhum paciente apresentou aumento de PCR EBV apresentando valores que variaram de negativos a 100 - 1000 cópias. Dos seis pacientes que desenvolveram PTLD, cinco permaneceram livres de doença em até 23 meses de acompanhamento clínico. Os dois pacientes com hepatoblastoma também permaneceram livres de doença e em monoterapia com sirolimus ⁶⁰.

Outro estudo que avaliou o sirolimus como droga de resgate ou imunossupressor primário observou 50 crianças transplantadas. Nove dessas crianças apresentaram rejeição celular aguda após diminuição de imunossupressão para tratar PTLD ou aumento de número de cópias de EBV em sangue periférico. Cinco crianças voltaram esquema de imunossupressão com sirolimus e prednisona e quatro com tacrolimus em baixa dose, sirolimus e prednisona. Durante uso de sirolimus pacientes continuaram a apresentar redução no número de cópias de EBV (810 ± 831 a 166 ± 216 cópias/PBMCs) e oito deles apresentaram resolução da rejeição celular aguda. A dose média de sirolimus foi de 1mg/dia (variando de 0.25-2) ⁶¹.

Os pacientes que acompanham em nosso serviço e apresentam PCR para EBV positivo são submetidos inicialmente a redução da imunossupressão em uso. Não havendo negatificação ou diminuição do número de cópias, troca-se o inibidor de calcineurina (tacrolimus) por inibidor de mTOR (sirolimus). Tanto a redução do tacrolimus como a troca por sirolimus foram satisfatórias em diminuir o número de cópias de EBV com resultados significantes ($p=0,002$ e $p=0,008$, respectivamente).

A doença linfoproliferativa pós-transplante engloba um amplo espectro de condições clínicas. Pode ser nodal, extra-nodal, geralmente no aloenxerto, ou amplamente disseminada ⁶². Dos pacientes avaliados nesse estudo, o trato gastrointestinal foi o sítio primário mais acometido, seguido das amígdalas e linfonodos. Mais da metade dos pacientes (67%) apresentaram expressão de CD 20 na peça histológica e fizeram uso de rituximabe (anticorpo anti-CD20). A maioria das PTLD polimórfica e monomórfica de células B expressam CD20, sendo um importante alvo para intervenção terapêutica. O mecanismo de morte de células B induzida por rituximabe inclui estimulação direta de CD20 pelo anticorpo, fixação do complemento e citotoxicidade celular dependente de anticorpo por meio do recrutamento de células T citotóxicas, natural killer e fagocíticas ⁴¹.

Uma das maiores coortes pediátricas que avaliaram 55 pacientes com PTLD, EBV e CD20 positivos, foi descrita por Gross e colaboradores. Os pesquisadores estudaram a eficácia de rituximabe associado a quimioterapia de baixa dose com ciclofosfamida e prednisona. A taxa de remissão completa da doença foi de 69% (IC 95%: 57 – 84%). A taxa de evento livre de doença em dois anos foi de 71% (IC 95%: 57 – 82%) e a taxa de sobrevida global de 71% (IC 95%: 69 – 91%) em seguimento médio de 4,8 anos. Este trabalho sugeriu que rituximabe associado a quimioterapia de baixa dose é efetivo no tratamento de PTLD EBV positivo em crianças ²⁸.

Um grupo de pesquisadores de Bérgamo na Itália avaliaram 17 crianças que desenvolveram PTLD grave após transplante de órgão. Para a doença ser classificada como grave, deveria apresentar ao menos um dos seguintes critérios: envolvimento de mais de um órgão, envolvimento da medula óssea, disfunção de órgão, estado geral debilitado, histologia monomórfica ou PTLD benigna não responsiva após 3 semanas de retirada da imunossupressão. As crianças foram tratadas de acordo com a seguinte estratificação: 1. risco padrão, submetidas à redução de imunossupressão e rituximabe e 2. alto risco, submetidas à retirada de imunossupressão, início de rituximabe e poliquimioterapia. Considerado de alto risco aquele paciente que preenchia ao menos dois dos seguintes critérios: estágio III ou IV, histologia monomórfica, estado geral debilitado ou DHL mais de duas vezes o limite superior de normalidade para idade (ou > 1000 UI/L). A sobrevida livre de

doença em 1 e 5 anos foi 94% (IC 95%: 65% - 99%) e 75% (IC 95%: 45 - 90%), respectivamente ²⁷.

Com o monitoramento da replicação do vírus Epstein-Barr em nossos pacientes transplantados tem se conseguido diminuir o número de PTLD não-destrutiva uma vez que possibilitou uma intervenção mais precoce antes do desenvolvimento da doença. No entanto, as formas mais graves da doença e não evitáveis apenas com a redução da imunossupressão, prevaleceram após o ano de 2006; dos nove pacientes que apresentaram PTLD, oito foram por linfoma de Burkitt ou de células B. Do total de pacientes com PTLD, onze desenvolveram a forma grave da doença. Dos onze pacientes com linfoma, sete trataram com retirada da imunossupressão, rituximabe e quimioterapia. Rejeição celular aguda foi mais evidenciada nesses pacientes que evoluíram para linfoma, muito provavelmente pelo tempo maior que esses pacientes ficaram sem imunossupressão. Uma vez retirada imunossupressão, a mesma deve ser reiniciada com cautela nos pacientes mais graves, pelo risco de reativação da PTLD. Girdali e colaboradores sugerem reiniciar a imunossupressão após três meses do término da quimioterapia em pacientes transplantados hepáticos ²⁷. Monitoramento laboratorial e/ou histológico frequente pode permitir um maior tempo sem medicamento e pode evitar rejeição celular grave. Levar em consideração episódios de rejeições prévios também pode ajudar na decisão de retorno do esquema imunossupressor, bem como qual classe de medicamento utilizar. O inibidor de mTOR, sirolimus, mostra-se interessante pelo seu efeito anti-proliferativo. No entanto, estudos prospectivos fazem-se necessários para definir se de fato previnem reativação de doença.

Infecção por citomegalovírus pode contribuir no estado de imunossupressão do paciente e tem sido descrito como fator de risco para PTLD ⁶². Estudo publicado recentemente sugere que a co-infecção por CMV e EBV diminui a frequência de células Natural-Killer contribuindo para o difícil controle do EBV em crianças imunossuprimidas com PTLD ⁶³. Huang e colaboradores avaliaram 18 crianças submetidas a transplante hepático e que evoluíram com PTLD. Análise univariada revelou como fatores de risco para desenvolvimento da doença linfoproliferativa: idade média ao transplante, idade menor que 2 anos ao transplante, infecção primária por CMV, receptor

com sorologia negativa para CMV. Em análise multivariada infecção primária por CMV, soronegatividade para CMV e rejeição celular aguda prévia à PTLD constituíram significantes fatores de risco para doença linfoproliferativa⁶⁴. Seo e colaboradores avaliaram 142 crianças submetidas a transplante hepático; 14 delas evoluíram com PTLD. Análise multivariada realizada por este grupo mostra como fatores de risco para doença linfoproliferativa doador cadáver, número de cópias elevadas de EBV e infecção primária por CMV⁶⁵.

Dados do nosso estudo corroboram com os encontrados por outros pesquisadores uma vez que mostra, em análise univariada, sorologia para CMV positiva prévia ao transplante como fator protetor para desenvolvimento de PTLD. Colocando as variáveis no modelo de regressão múltipla, a soropositividade para CMV continuou a ser um fator de proteção independente para doença linfoproliferativa (OR= 0,24; IC95% 0,06-0,92), isto é, reduz em 76% a chance de desenvolver PTLD. Uma vez que o receptor apresenta sorologia positiva para CMV ele não vai apresentar infecção primária por CMV, situação considerada de risco para PTLD conforme evidenciado por estudos citados anteriormente.

Uma das maiores limitações deste estudo advém do fato de ter caráter retrospectivo. Análise de prontuários ainda gera muito viés de aferição uma vez que muitas informações são perdidas por falta de registro. No entanto, esse foi o estudo transversal que envolveu maior número de crianças transplantadas de fígado em um único centro. A pequena parcela de pacientes que desenvolveu doença linfoproliferativa também limitou a análise estatística.

Os resultados aqui relatados embasam as tomadas de decisão diante do paciente transplantado que evolui com aumento de número de cópias para Epstein-Barr vírus, diminuindo dessa maneira a chance de evoluir para PTLD. Não obstante, novos estudos de caráter prospectivo, com grupo controle, fazem-se necessários para solidificar condutas e experiências.

8. CONCLUSÃO

Já está bem estabelecida a relação do vírus Epstein-Barr com o desenvolvimento de doença linfoproliferativa pós transplante, tanto pelo potencial oncogênico do vírus, quanto pelo efeito negativo da imunossupressão em conter a replicação viral quando uma infecção primária se instala.

A monitoração da carga viral por PCR permite avaliar quantitativamente o número de partículas virais no plasma do paciente e de acordo com o resultado possibilita uma intervenção precoce no sentido de reduzir a imunossupressão e permitir um clareamento viral ao reestabelecer o funcionamento dos linfócitos T, dessa maneira impedindo o surgimento de doenças linfoproliferativas.

Os resultados aqui apresentados ratificam essa hipótese na medida que mostra significância estatística entre diminuição de imunossupressão ou troca de inibidor de calcineurina por inibidor de mTOR e queda no nível de PCR para EBV.

O impacto tanto da monitoração quanto da intervenção precoce pode ser evidenciado pelo número de PTLD não destrutiva e benigna que caiu significativamente após PCR para EBV estar disponível em nossa instituição. Um melhor entendimento da doença e estratificação de risco dos pacientes possibilitou aprimoramento no tratamento dos mesmos refletindo em uma diminuição da taxa de óbito.

Apesar de retrospectivo, este foi um estudo que envolveu um grande número de pacientes refletindo e representando a população de pacientes pediátricos submetidos a transplante hepático.

9. REFERÊNCIAS

1. Holmes RD, Sokol RJ. Epstein–Barr virus and post-transplant lymphoproliferative disease. *Pediatric Transplantation* 2002; 6: 456–464.
2. Kerr BM, Lear AL, Rowe M, et al. Three transcriptionally distinct forms of Epstein–Barr virus latency in somatic cell hybrids: Cell phenotype dependence of virus promoter usage. *Virology* 1992; 187: 189–201.
3. Haque T, Amlot PL, Helling N, et al. Reconstitution of EBV-specific T cell immunity in solid organ transplant recipients. *J Immunol* 1998; 160: 6204–6209.
4. Rowe DT. Epstein–Barr virus immortalization and latency. *Front Biosci* 1999; 4: D346–D371.
5. European Medicines agency. Committee for medicinal products for human use (CHMP). Guideline on clinical investigation of immunosuppressants for solid organ transplantation. London, July 2008. Doc. Ref. CHMP/EWP/263148/06.
6. Coelho T, Tredger M, Dhawan A. Current status of immunosuppressive agents for solid organ transplantation in children. *Pediatr Transplantation* 2012;16: 106–122.
7. Babcock GJ, Decker LL, Freeman RB, Thorley-Lawson DA. Epstein–Barr virus-infected resting memory B cells, not proliferating lymphoblasts, accumulate in the peripheral blood of immunosuppressed patients. *J Exp Med* 1999; 190: 567–576.
8. Smets F, Sokal EM. Epstein-Barr virus-related lymphoproliferation in children after liver transplant: Role of immunity, diagnosis, and management. *Pediatr Transplantation* 2002; 6:280-287
9. Sokal EM, Antunes H, Beguin C, et al. Early signs and risk factors for the increased incidence of Epstein–Barr virus-related posttransplant lymphoproliferative diseases in pediatric liver transplant recipients treated with tacrolimus. *Transplantation* 1997; 64: 1438–1442.
10. Smets F, Bodeus M, Goubau P, Reding R, Otte JB, Buts JP. Characteristics of Epstein–Barr virus primary infection in pediatric liver transplant recipients. *J Hepatol* 2000; 32: 100–104.

11. Dror Y, Greenberg M, Taylor G, Superina R, et al. Lymphoproliferative disorders after organ transplantation in children. *Transplantation* 1999; 67: 990–998.
12. Collins MH, Montone KT, Leahey RL, et al. Post-transplant lymphoproliferative disease in children. *Pediatr Transpl* 2001; 5: 250–257.
13. Aris RM, Maia DM, Neuringer IP, et al. Post-transplantation lymphoproliferative disorder in the Epstein–Barr virus naïve lung transplant recipient. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 1712–1717.
14. Malatack JJ, Gartner JC, Urbach AH, Zitelli BJ. Orthotopic liver transplantation, Epstein–Barr virus, cyclosporine, and lymphoproliferative disease: A growing concern. *J Pediatr* 1991; 118: 667–675.
15. Sokal EM, Caragiozoglou T, Lamy M, Reding R, Otte JB. Epstein–Barr virus serology and Epstein–Barr virus-associated lymphoproliferative disorders in pediatric liver transplant recipients. *Transplantation* 1993; 56: 1394–1398.
16. Dror Y, Greenberg M, Taylor G, Superina R, Hebert D, West L. Lymphoproliferative disorders after organ transplantation in children. *Transplantation* 1999; 67: 990–998.
17. Younes BS, McDiarmid SV, Martin MG, Vargas JH, Goss JA, Busuttill RW. The effect of immunosuppression on posttransplant lymphoproliferative disease in pediatric liver transplant patients. *Transplantation* 2000; 70: 94–99.
18. Green M, Michaels MG, Webber SA, Rowe DT, Reyes J. The management of Epstein–Barr virus associated post-transplant lymphoproliferative disorders in pediatric solid-organ recipients. *Pediatr Transpl* 1999; 3: 271–281.
19. Pickhardt PJ, Siegel MJ, Hayashi RJ, Kelly M. Post-transplantation lymphoproliferative disorder in children: Clinical, histopathologic, and imaging features. *Radiology* 2000; 217: 16–25.
20. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375-2387.

21. Swerdlow SH, Webber SA, Ferry JA, et al. Post-transplant Lymphoproliferative disorders. In: Swerdlow S, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, eds. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (Revised)*. 4th ed. Lyon: AARC; 2017:453–464.
22. Orjuela MA, Alobeid B, Liu X, et al. CD20 expression predicts survival in paediatric post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD) following solid organ transplantation. *British Journal of Haematology* 2011;152:733-742
23. Nelson BP, Nalesnik MA, Bahler DW, Locker J, Fung JJ, Swerdlow SH. Epstein-Barr virus-negative post-transplant lymphoproliferative disorders: a distinct entity? *American Journal of Surgical Pathology* 2000; 24:375–385.
24. Bingler MA, Feingold B, Miller SA, Quivers E, Michaels MG, Green M, Wadowsky RM, Rowe DT, Webber SA. Chronic high Epstein-Barr viral load state and risk for late-onset posttransplant lymphoproliferative disease/lymphoma in children. *American Journal of Transplantation* 2008; 8: 442–445.
25. Toyoda M, Moudgil A, Warady BA, Puliyananda DP, Jordan SC. Clinical significance of peripheral blood Epstein-Barr viral load monitoring using polymerase chain reaction in renal transplant recipients. *Pediatric Transplantation* 2008; 12: 778–784.
26. Maecker B, Jack T, Zimmermann M, Abdul-Khaliq H, Burdelski M, et al. CNS or bone marrow involvement as risk factors for poor survival in post-transplantation lymphoproliferative disorders in children after solid organ transplantation. *Journal of Clinical Oncology* 2007; 25: 4902–4908.
27. Giraldi E, Provenzi M, Conter V, Colledan M, Balognini S et al. Risk-adapted treatment for severe B-lineage posttransplant lymphoproliferative disease after a solid organ transplantation in children. *Transplantation*, 2016;100:437-445.
28. Gross T, Orjuela M, Perkins S, Park J, Lynch J et al. Low-dose chemotherapy and rituximab for post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD): a children's oncology group report. *AM J Transplant*, 2012;12:3069-3075

29. Østensen A, Sanengeu T, Holter E, Line P-D, Almaas R. No effect of treatment with intravenous ganciclovir on Epstein-barr viremia demonstrated after pediatric liver transplantation. *Pediatric Transplantation*, 2017; e13010.
30. Green M, Cacciarelli TV, Mazariegos GV, et al. Serial measurement of Epstein–Barr viral load in peripheral blood in pediatric liver transplant recipients during treatment for post- transplant lymphoproliferative disease. *Transplantation* 1998; 66: 1641–1644.
31. Baldanti F, Grossi P, Furione M, Simoncini L, Sarasini A, Comoli P. High levels of Epstein–Barr virus DNA in blood of solid-organ transplant recipients and their value in predicting posttransplant lymphoproliferative disorders. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 613–619.
32. Smets F, Latinne D, Bazin H, et al. Ratio between Epstein–Barr viral load and anti-Epstein–Barr virus specific T-cell response as predictive marker of posttransplant lymphoproliferative disease. *Transplantation* 2002; 73: 1603–1610.
33. Green M, Cacciarelli TV, Mazariegos GV, Sigurdsson L, Qu L, Rowe DT. Serial measurement of Epstein–Barr viral load in peripheral blood in pediatric liver transplant recipients during treatment for posttransplant lymphoproliferative disease. *Transplantation* 1998; 66: 1641–1644.
34. Hurwitz M, Desai DM, Cox KL, Berquist WE, Esquivel CO, Millan MT. Complete immunosuppressive withdrawal as a uniform approach to post-transplant lymphoproliferative disease in pediatric liver transplantation. *Pediatric Transplantation* 2004;8:267-272.
35. Pinho-Apezato ML, Tannuri U, Tannuri ACA, Mello ES, Lima F et al. Multiple clinical presentations of lymphoproliferative disorders in pediatric liver transplant recipients: a single-center experience. *Transplantation Proceedings* 2010;42:1763-1768.
36. Narkewicz MR, Green M, Dunn S et al. Decreasing incidence of symptomatic EBV disease and PTLN in pediatric liver transplant recipients:

report of SPLIT experience. *Liver Transpl.* 2013 July ; 19(7): 730–740. doi:10.1002/lt.23659.

37. San-Juan R, Manuel O, Hirsch H et al. Current preventive strategies and management of Epstein–Barr virus- related post-transplant lymphoproliferative disease in solid organ transplantation in Europe. Results of the ESGICH Questionnaire-based Cross-sectional Survey. *Clin Microbiol Infect* 2015; 21: 604.e1–604.e9

38. Chen HS, Ho MC, Hu RH et al. Roles of Epstein Barr virus viral load monitoring in the prediction of posttransplant lymphoproliferative disorder in pediatric liver transplantation. [Journal of the Formosan Medical Association, 2018](#)

39. Dowd JB, Palermo T, Brite J, McDade TW, Aiello A. Seroprevalence of Epstein-Barr virus infection in U.S. children ages 6-19, 2003-2010. *PLoS One.* 2013;8(5):e64921.

40. Marques HH, Shikanai-Yasuda MA, Azevedo LS et al. Management of post-transplant Epstein-Barr virus-related lymphoproliferative disease in solid organ and hematopoietic stem cell recipients. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2014; 47(5):543-546

41. Absalon MJ, Khoury RA, Phillips CL. Post-transplant lymphoproliferative disorder after solid organ transplant in children. *Seminars in Pediatric Surgery* 2017.

42. Stojanova J, Caillard S, Rousseau A, Marquet P. Post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD): pharmacological, virological and other determinants. *Pharmacol Res.* 2011;63:1-7.

43. Dharnidharka VR. Epidemiology of PTLN. In: Dharnidharka VR, Green M, Webber S, Steven A, eds *Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders*. Berlin & Heidelberg: Springer; 2010:17-28.

44. Sprangers B, Nair V, Launay-Vacher V, Riella LV, Jhaveri KD. Risk factors associated with post-kidney transplant malignancies: an article from the Cancer-Kidney International Network. *Clinical Kidney Journal*. 2018;11(3):315-329.
45. Walker RC, Marshall WF, Strickler JG, et al. Pretransplantation assessment of the risk of lymphoproliferative disorder. *Clin Infect Dis*. 1995;20:1346-1353.
46. Cockfield SM. Identifying the patient at risk for post-transplant lymphoproliferative disorder. *Transpl Infect Dis*. 2001;3:70-78.
47. Eshraghian A, Imanieh M, Dehghani S, Nikeghbalian S, Shamsaeefar A, et al. Post-transplant lymphoproliferative disorder after liver transplantation: Incidence, long-term survival and impact of serum tacrolimus level. *World J Gastroenterol* 2017; 23(7): 1224-1232
48. Cacciarelli TV, Reyes J, Jaffe R, Mazariegos GV, Jain A et al. Primary tacrolimus (FK506) therapy and the long-term risk of post-transplant lymphoproliferative disease in pediatric liver transplant recipients. *Pediatric transplantation* 2001;5:359-64.
49. Soriano-Lopez DP, Alcantar-Fierros JM, Hernandez-Plata JA, Gonzalez-Jorge AL, Velazquez-Ramos S, Flores-Hernandez MA, et al. A Scheduled Program of Molecular Screening for Epstein-Barr Virus Decreases the Incidence of Post-transplantation Lymphoproliferative Disease in Pediatric Liver Transplantation. *Transplant Proc*. 2016;48(2):654-7.
50. Narkewicz MR, Green M, Dunn S, Millis M, McDiarmid S, Mazariegos G, et al. Decreasing incidence of symptomatic Epstein-Barr virus disease and posttransplant lymphoproliferative disorder in pediatric liver transplant recipients: report of the studies of pediatric liver transplantation experience. *Liver Transpl*. 2013;19(7):730-40.

51. Lee TC, Savoldo B, Rooney CM, Heslop HE, Gee AP, Caldwell Y, et al. Quantitative EBV viral loads and immunosuppression alterations can decrease PTLD incidence in pediatric liver transplant recipients. *Am J Transplant.* 2005;5(9):2222-8.
52. Ganschow R, Schulz T, Meyer T, Broering DC, Burdelski M. Low-dose immunosuppression reduces the incidence of post-transplant lymphoproliferative disease in pediatric liver graft recipients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2004;38(2):198-203.
53. Kanakry J, Ambinder R. The Biology and Clinical Utility of EBV Monitoring in Blood. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2015;391:475-99.
54. Kanakry JA, Hegde AM, Durand CM, Massie AB, Greer AE, Ambinder RF, et al. The clinical significance of EBV DNA in the plasma and peripheral blood mononuclear cells of patients with or without EBV diseases. *Blood.* 2016;127(16):2007-17.
55. Kullberg-Lindh C, Saalman R, Olausson M, Herlenius G, Lindh M. Epstein-Barr virus DNA monitoring in serum and whole blood in pediatric liver transplant recipients who do or do not discontinue immunosuppressive therapy. *Pediatric Transplantation* 2017; 00:e12875. doi:10.1111/petr.12875
56. Majewski M, Korecka M, Kossev P, et al. The immunosuppressive macrolide RAD inhibits growth of human Epstein–Barr virus-transformed B lymphocytes in vitro and in vivo: a potential approach to prevention and treatment of posttrans-plant lymphoproliferative disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 4285–4290.
57. Muthukkumar S, Ramesh TM, Bondada S. Rapamycin, a potent immunosuppressive drug, causes programmed cell death in B lymphoma cells. *Transplantation* 1995; 60: 264–270.

58. Guba M, Von Breitenbuch P, Steinbauer M, et al. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by anti-angiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med* 2002; 8: 128–135.
59. Kogan-Liberman D, Burroughs M, Emre S, et al. The role of quantitative Epstein–Barr virus polymerase chain reaction and preemptive immunosuppression reduction in pediatric liver transplantation: a preliminary experience. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 33: 445–449.
60. Jiménez-Rivera C, Avitzur Y, Fecteau AH, Jones N, Grant D, Ng VL. Sirolimus for pediatric liver transplant recipients with post-transplant lymphoproliferative disease and hepatoblastoma. *Pediatr Transplantation* 2004; 8: 243–248.
61. Sindhi R, Webber S, Venkataramanan R, McGhee W, Phillips S et al. SIROLIMUS FOR RESCUE AND PRIMARY IMMUNOSUPPRESSION IN TRANSPLANTED CHILDREN RECEIVING TACROLIMUS. *Transplantation* 2001;72;851-55
62. Allen UD, Preiksaitis JK; on behalf of the AST Infectious Diseases Community of Practice. Post-transplant lymphoproliferative disorders, Epstein-Barr virus infection, and disease in solid organ transplantation: Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clin Transplant*. 2019;33:e13652
63. Lam JK, Azzi T, Hui KF, Wong AM, McHugh D, Caduff N, et al. Co-infection of Cytomegalovirus and Epstein-Barr Virus Diminishes the Frequency of CD56^{dim} NKG2A⁺ KIR⁻ NK Cells and Contributes to Suboptimal Control of EBV in Immunosuppressed Children With Post-transplant Lymphoproliferative Disorder. *Frontiers in Immunology* 2020;11;1-12.
64. Huang J, Tan M, Quak SH, Aw MM. Risk factors and clinical outcomes of pediatric liver transplant recipients with post-transplant lymphoproliferative

disease in a multi-ethnic Asian cohort. *Transpl Infect Dis* 2018; 20(1). doi: 10.1111/tid.12798.

65. Seo E, Kim J, Oh SH, Kim KM, Kim DY, Lee J. Epstein-Barr viral load monitoring for diagnosing post-transplant lymphoproliferative disorder in pediatric liver transplant recipients. *Pediatr Transplant*. 2020;00:e13666 <https://doi.org/10.1111/ptr.13666>