



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA
RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO

FRANCIELLY PINHEIRO DA SILVA BORGES

**Citomegalovírus em pacientes submetidos a transplante de células
progenitoras hematopoiéticas**

Goiânia

2016

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ Dissertação ☐ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação

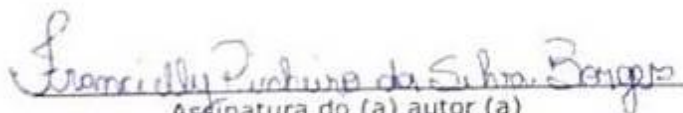
Nome completo do autor: Francielly Pinheiro da Silva Borges

Título do trabalho: Citomegalovírus em pacientes submetidos a transplante de células progenitoras hematopoiéticas

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do (a) autor (a)

Data: 31 / 04 / 2016

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

FRANCIELLY PINHEIRO DA SILVA BORGES

**Citomegalovírus em pacientes submetidos a transplante de células
progenitoras hematopoiéticas**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia da Relação Parasito-
Hospedeiro da Universidade Federal
de Goiás para obtenção do Título de
Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Menira
Borges de Lima Dias e Souza

Goiânia

2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Pinheiro da Silva Borges, Francielly

Citomegalovírus em pacientes submetidos a transplante de células progenitoras hematopoiéticas [manuscrito] / Francielly Pinheiro da Silva Borges. - 2016.

14, 113 f.

Orientador: Profa. Dra. Menira Borges de Lima Dias e Souza.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, 2016.
Bibliografia. Anexos. Apêndice.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Citomegalovírus. 2. Alogênico. 3. Antigenemia. 4. Nested-PCR. 5. PCR em tempo real. I. Borges de Lima Dias e Souza, Menira , orient. II. Título.

CDU 578

**Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro da
Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno (a): Francielly Pinheiro da Silva Borges

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Menira Borges de Lima Dias e Souza

Membros:

1. Prof^a. Dr^a. Menira Borges de Lima Dias e Souza

2. Prof^a. Dr^a. Megmar Aparecida dos Santos Carneiro

3. Prof^a. Dr^a. Vera Aparecida Saddi

Data: 15/04/2016

*“As nuvens mudam sempre de posição,
mas são sempre nuvens no céu. Assim
devemos ser todo dia, mutantes, porém
leais com o que pensamos e sonhamos;
lembre-se, tudo se desmancha no ar,
menos os pensamentos.” – Paulo Beleki*

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às principais pessoas que contribuíram com meu trabalho.

Agradeço a *Deus* pelo amor, proteção, força e porque nEle posso crer no dia de amanhã.

Aos meus amados pais *Nilber* e *Mara*, pelo amor, carinho, atenção e incentivo ao longo não somente da minha jornada acadêmica, mas também da minha vida.

À minha família em geral, meu irmão *Júnior*, vovó *Maria*, vovô *Romildo* (*in memorian*), tios, tias e primos, pelos momentos descontraídos e pela alegria.

Ao meu noivo *Johnathan*, por estar comigo sempre e por ser tão compreensivo nos momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

À professora e orientadora Dr^a. Menira Souza, que tive o prazer de conhecer melhor, não somente como orientadora, mas também como ser humano, que além da dedicação à pesquisa e aos seus alunos, é uma pessoa espontânea, alegre e sempre disponível.

Às professoras Fabíola Fiaccadori e Divina Cardoso, que acrescentaram além de conteúdo, carinho e atenção.

À Keili Souza, que mais que uma pessoa que vi no dia-a-dia, se tornou uma amiga. Obrigada pela excelente convivência, pelos conselhos e claro, pela amizade.

Ao Dr. Adriano de Moraes Arantes, que se dispôs a ajudar na pesquisa, apesar do extenuante trabalho dedicado ao Hospital Araújo Jorge.

Às enfermeiras Larissa Pereira e Silva e Joyce Delabona, que auxiliaram no andamento do projeto, atuando na coleta das amostras clínicas e à secretária da seção de TMO Juliana, ou Ju, que me ajudou a conseguir os dados sempre que necessário.

À minha pupila Marina, sempre disposta a me ajudar e a aprender, que além de inteligente é miss Farmácia.

Aos amigos, Anniely, Kareem, Tâmera, Nathânia, Romário, João Paulo, Thainara, Thais Corrêa, Thais Santana, Thaynara, Raíssa, Thairiny, Teresinha, Ítalo, Tom e Hugo, pelo companheirismo e cooperação no desenvolvimento das atividades.

Ao professor André Kipnis, pelo auxílio no decorrer do trabalho.

À professora Patrícia Nagib, pela ajuda e pelo apoio.

Ao pessoal do Laboratório Margarida Dobler Komma, que prontamente se disponibilizaram a me ajudar com o microscópio de imunofluorescência.

Ao pessoal do Laboratório de Citocinas, principalmente ao professor Milton, por ceder a citocentrífuga sempre que necessário.

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, pelo apoio financeiro ao trabalho.

SUMÁRIO

TABELA, FIGURAS, APÊNDICES E ANEXOS	ix
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 TRANSPLANTE DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOIÉTICAS	1
1.1.2 Doença do enxerto contra o hospedeiro	4
1.2 HISTÓRICO DO CITOMEGALOVÍRUS HUMANO	5
1.3 CLASSIFICAÇÃO, ESTRUTURA E CICLO REPLICATIVO DO HCMV	7
1.3.1 Classificação	7
1.3.2 Estrutura viral	7
1.3.3 Ciclo de replicação e regulação gênica do HCMV	11
1.3.4 Propriedades biológicas	15
1.4 TRANSMISSÃO, PATOGENIA VIRAL, CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E IMUNIDADE AO HCMV	15
1.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	19
1.5.1 Diagnóstico sorológico	20
1.5.2 Detecção de partículas de HCMV ou seus antígenos	21
1.5.3 Teste de antigenemia	22
1.5.4 Diagnóstico molecular	23
1.6 ANTIVIRAIS COM ATIVIDADE CONTRA O HCMV	28
1.7 ESTRATÉGIAS UTILIZADAS NA PREVENÇÃO DA INFECÇÃO ATIVA PELO HCMV	30
1.8 EPIDEMIOLOGIA	31
1.9 INFECÇÃO POR HCMV EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RECEPTORES DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOIÉTICAS	33

2	JUSTIFICATIVA	36
3	OBJETIVOS	37
3.1	OBJETIVO GERAL	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4	MÉTODOS	38
4.1	POPULAÇÃO DE ESTUDO	38
4.2	DELINEAMENTO E MATERIAL DE ESTUDO	39
4.3	CRITÉRIOS CLÍNICOS ESTABELECIDOS PARA O ESTUDO	41
4.4	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	42
4.5	AVALIAÇÃO DE ANTIGENEMIA	42
4.5.1	Silanização das lâminas	42
4.6	REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) SEGUIDA DE NESTED-PCR PARA PESQUISA DE REGIÃO GENÔMICA PARCIAL (UL123) DO CITOMEGALOVÍRUS HUMANO	43
4.6.1	Extração de DNA a partir de pellet e soro	43
4.6.2	PCR consensual	43
4.6.3	Nested-PCR	44
4.7	PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL SYBR Green	46
4.7.1	Curva padrão para realização do ensaio de qPCR	46
4.7.2	qPCR SYBR Green para HCMV	48
4.8	PURIFICAÇÃO, SEQUENCIAMENTO GENÔMICO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS	48
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	49
5	RESULTADOS	50
5.1	CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DE ESTUDO	50
5.2	DETECÇÃO DE INFECÇÃO ATIVA POR CITOMEGALOVÍRUS HUMANO	52

5.2.1	Comparação da detecção de infecção ativa pelo HCMV por AGM, nPCR e qPCR	53
5.2.2	Comparação de sensibilidade das técnicas moleculares em relação ao tipo de amostra clínica	55
5.2.3	Infecção ativa por HCMV em relação ao tipo de fonte de células progenitoras hematopoiéticas e ao tipo de tratamento para condicionamento pré-transplante	56
5.3	COMPLICAÇÕES CLÍNICAS ASSOCIADAS À OCORRÊNCIA DE INFECÇÃO ATIVA POR HCMV	57
5.3.1	Manifestações clínicas/laboratoriais da síndrome de HCMV em relação às técnicas utilizadas	59
5.4	ÓBITOS OCORRIDOS DURANTE O SEGUIMENTO DOS PACIENTES	61
6	DISCUSSÃO	62
7	CONCLUSÕES	74
	REFERÊNCIAS	75
	APÊNDICES E ANEXOS	103

TABELAS, FIGURAS, APÊNDICES E ANEXOS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da estrutura do Citomegalovírus Humano	8
Figura 2. Esquema do genoma do HCMV	8
Figura 3. Ciclo replicativo do HCMV	14
Figura 4. Representação esquemática da cascata gênica do HCMV	14
Figura 5. Representação gráfica das fases da PCR em tempo real	25
Figura 6. Fluxograma da metodologia do estudo	41
Figura 7. Construção do plasmídeo recombinante pGEM-HCMV para ser utilizado na curva padrão de SYBR Green	47
Figura 8. Comparação do percentual de positividade para HCMV por diferentes metodologias, de amostras de sangue dos 21 pacientes	55
Figura 9. Representação das manifestações clínicas/laboratoriais apresentadas pelos doze pacientes que apresentaram síndrome de HCMV	58

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Iniciadores empregados na pesquisa de HCMV	45
Quadro 2. Sequência dos iniciadores empregados na reação de qPCR com SYBR Green	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características da população de estudo	51
Tabela 2. Comparação dos resultados de AGM, nPCR e qPCR das amostras de sangue dos 21 pacientes participantes do estudo	54
Tabela 3. Resultados comparativos entre detecção de infecção ativa por HCMV por nPCR e qPCR em relação ao tipo de amostra clínica dos 21 pacientes analisados	56
Tabela 4. Ocorrência de complicações vinculadas ao transplante em pacientes com e sem síndrome de HCMV	58

Tabela 5. Correlação da carga viral no pellet com manifestações clínicas/laboratoriais da síndrome de HCMV	60
---	----

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1. Termo de consentimento livre e esclarecido	103
---	-----

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFG	105
Anexo 2. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do HAJ/ACCG	108
Anexo 3. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFG, referente ao primeiro pedido de emenda ao projeto inicial	110
Anexo 4. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFG, referente ao segundo pedido de emenda ao projeto inicial	111

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ACCG	Associação de Combate ao Câncer em Goiás
ACV	Aciclovir
ACV-TP	Aciclovir Trifosfato
AD169	Linhagem de HCMV isolada em laboratório
AGM	Antigenemia
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Humana
AloTCPH	Transplante de Células Progenitoras Hematopoiéticas Alogênico
Apl.MO	Aplasia de Medula Óssea
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i> – Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CDV	Cidofovir
CID	Doença de Inclusão Citomegálica
cg	Cópias genômicas
CPH	Células progenitoras hematopoiéticas
CPSP	Células progenitoras de sangue periférico
CU	Cordão Umbilical
D+	Doador HCMV-positivo
D/R	Doador/Receptor
DECH	Doença do enxerto contra o hospedeiro
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> – ácido desoxirribonucleico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EIE	Ensaio imunoenzimático
FDA	<i>USA Food and Drug Administration</i>
FOS	Foscarnet
GCV	Ganciclovir
GCV-TP	Ganciclovir Trifosfato
HAI	Hospital Araújo Jorge
HCMV	Citomegalovírus Humano
HHV-5	Herpesvirus Humano tipo 5

HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	<i>Human Leucocitary Antigen</i> – Antígeno Leucocitário Humano
IBMTR	Centro Internacional de Pesquisa sobre Transplante de Sangue e Medula Óssea
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> – Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
IFN- β	Interferon beta
IgA	Imunoglobulina da classe A
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
IPTSP	Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública
IRL/IRS	Sequências invertidas repetidas do genoma do HCMV
Kb	Quilobases
kD	Quilodaltons
LB	Meio de cultura Luria Bertani
LH	Linfoma Hodgkin
LLA	Leucemia linfóide aguda
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMC	Leucemia mieloide crônica
LNH	Linfoma não-Hodgkin
MIE	<i>Major Immediate-Early Antigen</i> (Principal antígeno imediatamente precoce)
mL	Mililitro
MO	Medula óssea
NK	<i>Natural killer</i>
nm	Nanômetro
nPCR	Nested-PCR
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> – tampão fosfato salina
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> – Reação em cadeia pela polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico

PMN	Polimorfonuclear
pp65	Proteína menor de matriz de peso molecular 65 kD
pp150	Proteína de matriz de peso molecular 150 kD
R-	Receptor HCMV-negativo
R+	Receptor HCMV-positivo
RNA _m	Ácido Ribonucleico mensageiro
qPCR	<i>Real time polymerase chain reaction</i> – Reação em cadeia pela polimerase em tempo real
rpm	Rotações por minuto
SMD	Síndrome mielodisplásica
SP	Sangue Periférico
SV	<i>Shell-vial</i>
T.A.	Temperatura Ambiente
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCPH	Transplante de Células Progenitoras Hematopoiéticas
TRL/TRS	Sequências de terminações repetidas do HCMV
TCPH	Transplante de células progenitoras hematopoiéticas
UFG	Universidade Federal de Goiás
μL	Microlitro
UL	Regiões Únicas Longas
US	Regiões Únicas Curtas
VAC	Valaciclovir

RESUMO

O Citomegalovírus Humano (HCMV) constitui importante causa de morbimortalidade em receptores de transplantes de células progenitoras hematopoiéticas do tipo alogênico (AloTCPH). Entretanto, não existe ainda um consenso sobre que protocolo utilizar para o monitoramento da infecção por HCMV e, dados sobre a frequência e manifestações clínicas da infecção neste grupo populacional são bastante variáveis entre os diferentes centros de transplante em todo o mundo. Dessa forma, o principal objetivo do presente estudo foi realizar o monitoramento da infecção ativa por HCMV em pacientes submetidos ao AloTCPH por três metodologias distintas: antigenemia (AGM), nested-PCR (nPCR) e PCR em tempo real (qPCR), bem como determinar a carga viral, correlacionando a infecção ativa ao quadro clínico e prognóstico dos pacientes. Para tanto, foram monitorados (desde o período pré-transplante -5 dias antes do transplante- até um ano após o transplante) 21 pacientes submetidos ao AloTCPH. A pesquisa de HCMV foi realizada utilizando as metodologias de AGM, nPCR e qPCR, sendo que para as técnicas moleculares, houve comparação da detecção do HCMV em DNA extraído de pellet (creme leucocitário) e soro, de forma pareada. Os resultados mostraram que a infecção ativa pelo HCMV foi detectada por pelo menos uma das três metodologias em 95,2% (20/21) dos pacientes e 45% (9/20) destes foram positivos no período pré-transplante, tendo sido observada uma boa concordância entre os resultados de AGM e qPCR ($kappa = 0,65$). Dos 20 pacientes positivos para infecção ativa por HCMV, 85% (17/20) foram positivos pelas três metodologias e 15% (3/20) foram positivos apenas por AGM e qPCR e negativos por nPCR. Em relação ao tipo de amostra clínica, as técnicas moleculares apresentaram maior sensibilidade em amostras de pellet, em comparação ao soro. A principal alteração apresentada pelos pacientes foi a pancitopenia e a principal intercorrência, a doença do enxerto contra o hospedeiro. Seis pacientes foram a óbito durante o período de estudo, entretanto, não foi possível confirmar se a infecção ativa por HCMV estava diretamente associada à *causa mortis*. Os dados obtidos revelam um elevado índice de positividade e síndrome de HCMV em pacientes submetidos ao AloTCPH. Esperamos que os resultados possam auxiliar na tomada de medidas terapêuticas, bem como na escolha da melhor metodologia assim como o tipo de amostra clínica para detecção da infecção ativa por HCMV de forma a contribuir para que a pesquisa de HCMV seja incluída na rotina de exames desses pacientes.

PALAVRAS-CHAVE: HCMV; AloTCPH; AGM; nPCR; qPCR; SYBR Green.

ABSTRACT

The Human Cytomegalovirus (HCMV) is an important cause of morbi-mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (AloHSCT). However, there is not a consensus on which protocol to use for monitoring the infection by HCMV and, data on the frequency and clinical manifestations of the infection in this group population are quite variable among the distinct transplant centers in the world. Thus, the main objective of the present study was to proceed the monitoring of active HCMV infection in patients undergoing AloHSCT by three different methodologies: antigenemia (AGM), nested-PCR (nPCR) and real-time PCR (qPCR) and determine viral load, correlating active infection with the clinical manifestations and prognosis of patients. For this, 21 patients undergoing AloHSCT were monitored (from pre-transplant period -5 days prior to transplantation- until one year after transplantation). For HCMV detection three methodologies were used: AGM, nPCR and qPCR, and for molecular detection a comparison was made between detection of HCMV in DNA extracted from pellet (buffy coat) and serum, in a paired manner. The results showed that the active HCMV infection was detected by at least one of three methodologies in 95.2% (20/21) of patients and 45% (9/20) of these were positive in pre-transplantation period, having been observed good agreement between the results of AGM and qPCR ($kappa = 0.65$). Of the 20 patients positive for active HCMV infection, 85% (17/20) were positive for the three methods and only 15% (3/20) were positive for AGM and qPCR, and negative by nPCR. Regarding the type of clinical sample, molecular techniques showed higher sensitivity to the pellet over the serum. The main alteration of patients was pancytopenia and the main complication was graft-versus-host disease. Six patients died during the study period, however, it was not possible to confirm if HCMV active infection was directly associated with the cause of death. The obtained data reveal a high positivity index and the occurrence of HCMV syndrome in patients submitted to aloHSCT. We hope that the results may assist in the therapeutical measures, as well as in the methodology of choice and the type of clinical sample for detection of active HCMV infection, in order to contribute for the inclusion of HCMV monitoring is included in the routine testing of patients.

Keywords: Bone Marrow Transplantation; HCMV Monitoring; detection HCMV; AloHSCT.

1 INTRODUÇÃO

1.1 TRANSPLANTE DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOIÉTICAS

As células progenitoras encontram-se por todo o corpo e podem ser definidas como uma população de células indiferenciadas capazes de auto renovação indefinida e geração de uma progênie de células altamente especializadas. Estas células apresentam diferentes propriedades proliferativas e funções e, dependendo de sua localização física ou compartimento tecidual podem diferenciar-se em determinados tipos especializados de células (Bryder et al. 2006; Malaver-Ortega et al. 2012). A capacidade das células progenitoras de diferenciarem-se em linhagens específicas maduras é chamada de plasticidade e esta é a propriedade mais importante no que se refere à terapia baseada em células (Zomer et al. 2015).

O transplante de células progenitoras hematopoiéticas (TCPH) tornou-se um padrão de tratamento para doenças hematológicas malignas, doenças congênitas ou adquiridas do sistema hematopoiético, e também é aplicado como uma opção terapêutica em alguns tumores sólidos (Kanate et al. 2014; Pandey et al. 2014). O uso de transplantes tem se expandido em todo o mundo e evoluiu em sua tecnologia, como avanços técnico-científicos na supressão da alo-reatividade (Bejanyan et al. 2015). Atualmente, o transplante também é realizado para novas indicações, tais como doenças autoimunes e alterações metabólicas hereditárias (Pandey et al. 2014; Yesilipek 2014).

O TCPH pode ser dividido em dois tipos: 1) autólogo (AutoTCPH), em que o paciente doa as células progenitoras da medula para si mesmo, e 2) um processo mais complexo e elaborado de transplante, o tipo alogênico (AloTCPH), no qual o paciente recebe o enxerto de células progenitoras a partir de um doador compatível. De acordo com o Registro Europeu de Transplantes de Células Progenitoras Hematopoiéticas, em 2012, de todos os TCPH realizados, pelo menos 42% foram do tipo alogênico (Passweg et al. 2014).

Para a execução do transplante alogênico, é necessário encontrar um doador que apresente o sistema antígeno leucocitário humano (*human leucocyte antigen*-HLA) mais semelhante ao do receptor. O HLA pode ser de classe I (HLA -A, -B e -C), presente na maioria das células nucleadas, ou de classe II (HLA -DR, -DQ e -DP), presente nas células apresentadoras de antígenos profissionais. Os genes do HLA são localizados no cromossomo seis e são herdados como haplótipos. Dessa maneira, dois irmãos apresentam aproximadamente uma chance em quatro de serem HLA-idênticos (Hambach et al. 2007; Petersdorf 2007; Valcárcel et al. 2011). Na ausência de um doador compatível dentro da família, podem ser utilizadas células-tronco hematopoiéticas de doadores não-aparentados (Pidala et al. 2014) e, através de pesquisas direcionadas a transplantes, é possível utilizar células progenitoras provenientes de doadores alternativos, como doadores HLA parcialmente compatíveis (haploidênticos) (Bejanyan et al. 2015).

Atualmente, o AutoTCPH é indicado nos casos de mieloma múltiplo, linfoma não-Hodgkin, linfoma Hodgkin e leucemias. Outras indicações menos comuns para o AutoTCPH incluem doença autoimune (esclerose múltipla, esclerose sistêmica, e doença de Crohn) e tumores sólidos (sarcoma, tumores germinais, e neuro-blastoma). Leucemia mielóide aguda e leucemia linfoblástica aguda são as indicações mais comuns para AloTCPH, seguidas por síndrome mielodisplástica, neoplasias mieloproliferativas e síndrome de falência da medula óssea. Outras indicações menos comuns para o transplante alogênico incluem linfoma, mieloma e doenças hematológicas como anemia aplástica e talassemia (Pasquini et al. 2013).

Os fatores considerados ao recomendar o tipo de transplante (AutoTCPH ou AloTCPH) incluem potenciais diferenças nos índices de mortalidade relacionados ao tratamento, preocupações com a contaminação do enxerto no AutoTCPH, seja por microrganismos ou por células malignas que não foram totalmente eliminadas, incapacidade de mobilizar células progenitoras hematopoiéticas, e os benefícios esperados de um AloTCPH. Portanto, o transplante alogênico é considerado uma opção aos pacientes analisados com maior risco de recidiva ou progressão da doença (Pasquini et al. 2007; Lazarus et al. 2010).

As células progenitoras utilizadas nos transplantes podem ter origem na medula óssea (MO), sangue periférico (CPSP) ou cordão umbilical (CU). Células

progenitoras do sangue periférico são utilizadas para transplante alogênico e tem gradativamente substituído as células da medula óssea como fonte de CPH utilizada para AutoTCPH (Hatzimichael & Tuthill 2010).

As vantagens da utilização de CPSP, quando comparadas a células de medula óssea incluem: reconstituição hematopoiética mais rápida, menor número de transfusões de plaquetas e glóbulos vermelhos, período de antibioticoterapia mais curto e não utilização de anestesia geral ou técnicas mais invasivas (Pulsipher et al. 2009; Alwasaidi & Bredeson 2014). As desvantagens de CPSP em comparação com células de MO ou CU para transplante autólogo ou alogênico incluem a necessidade de várias coletas de sangue (especialmente para transplante autólogo), incapacidade de coletar amostras adequadas de todos os pacientes e doadores, e um risco um pouco maior de ocorrência de doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) (Mohty et al. 2002; Flowers et al. 2012).

A utilização de CPSP nos transplantes melhora a sobrevida em pacientes com malignidades hematológicas de alto risco, em comparação com a utilização de MO como fonte de células progenitoras (Bensinger et al. 2001; Haspel 2008). Os produtos de CPSP de doadores que recebem fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) contêm pelo menos dez vezes mais células T e monócitos que MO, e os números absolutos de linfócitos T $CD4^{+}$ e $CD8^{+}$ aumentam logo após o transplante de CPSP (Storek et al. 2001; Bojanic et al. 2009).

O condicionamento é considerado necessário para destruir as células alteradas, erradicando assim doença maligna hematológica, sendo o enxerto responsável por auxiliar na recuperação do receptor contra os efeitos letais do condicionamento na medula óssea e para a reconstituição do sistema imune (Little & Storb 2002). Atualmente, existem três tipos de regimes de condicionamento: mieloablativos, não-mieloablativos e regimes com intensidade reduzida. Regimes mieloablativos é uma combinação de agentes para produzir profunda mieloablação e pancitopenia dentro de 1-3 semanas a partir da administração e a pancitopenia é de longa duração, enquanto que regimes não-mieloablativos constituem um regime que irá causar citopenia mínima. Já os regimes de intensidade reduzida foram uma categoria intermediária de regimes que não se encaixam nas definições dos outros dois tipos. (Bacigalupo et al. 2009).

Os principais regimes de condicionamento empregam bussulfano, ciclofosfamida, melfalano e irradiação corporal total, isoladamente ou em associação, ou o complexo BEAM (BCNU) composto por carmustina, etoposide, citarabina e melfalano (Blaise & Castagna 2012). A escolha do melhor regime de condicionamento é realizada de acordo com a doença de base do paciente (Castro Jr. et al. 2001; Imamura & Shigematsu 2015).

Dentre as intercorrências que podem afligir os indivíduos submetidos a transplantes destacam-se as infecções virais, que são atualmente uma das principais causas de morbidade e mortalidade nesta população (Ljungman et al. 2007; Ljungman et al. 2010; Moses et al. 2011). A infecção por citomegalovírus humano (HCMV) é uma complicação frequente em pacientes imunocomprometidos com imunidade celular prejudicada, incluindo pacientes com neoplasias hematológicas e os receptores de transplante. Apesar dos avanços que têm ocorrido quanto ao monitoramento da infecção e tratamento, esta continua a ser uma importante e frequente complicação após a realização do TCPH (Ljungman et al. 2002a; Sharma et al. 2013).

1.1.2 Doença do enxerto contra o hospedeiro

A doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) é uma síndrome que apresenta características de autoimunidade e imunodeficiência e duas formas distintas são descritas: aguda e crônica. A forma aguda de DECH (aDECH) é observada em 50-70% de todos os pacientes de AloTCPH, enquanto DECH crônica (cDECH) é observada em 30-50% (Elad et al. 2010). No momento, a distinção entre essas duas formas de DECH é baseada nas características clínicas de cada caso (Filipovich et al. 2005; Dignan et al. 2012). A apresentação de aDECH é potencialmente fatal e tipicamente afeta a pele, trato gastrointestinal e fígado (Demarosi et al. 2005). Na forma crônica, a cavidade oral é uma das áreas mais lesionadas, e pode mesmo ser a única localização do corpo afectado pela doença (Treister et al. 2008). A cDECH geralmente se desenvolve durante os primeiros três anos após o transplante, e é normalmente precedida pela forma aguda. As características clínicas de cDECH são semelhantes aos de outras doenças mediadas

pelo sistema imunitário, tais como lúpus eritematoso sistêmico ou esclerose (Filipovich et al. 2005).

Razões para a incidência da doença podem incluir o tipo de regime de condicionamento e impacto da intensidade do regime, fonte do enxerto, o grau de incompatibilidade dos antígenos leucocitários humanos (HLA), utilização da irradiação corporal total, profilaxia para DECH e idade do receptor (Jagasia et al. 2012; Harris et al. 2013; Inamoto et al. 2014). Os pacientes submetidos ao TCPH que desenvolvem a DECH, além de grave morbidade, demonstram deficiências físicas e comportamento social alterado, tendo a qualidade de vida comprometida (Fraser et al. 2006; Lee et al. 2006).

Não há nenhum tratamento específico para DECH, sendo a opção de primeira linha para o tratamento da DECH o uso de corticosteróides, apresentando uma taxa de insucesso de 30-40% (Deeg 2007), enfatizando que a prevenção de aDECH não tem qualquer efeito preventivo sobre cGVHD (Linhares et al. 2013). Com efeito, a DECH refratária com a terapia de esteróides é um desafio clínico não resolvido com um alto impacto sobre a sobrevivência e a qualidade de vida dos pacientes (Abu-Dalle et al. 2014), sendo necessárias pesquisas para o desenvolvimento de outros tipos de tratamento para a DECH.

1.2 HISTÓRICO DO CITOMEGALOVÍRUS HUMANO

O citomegalovírus humano (HCMV) é o agente etiológico da “doença de inclusão citomegálica” (CID), caracterizada pelo efeito citopático peculiar resultando em aumento do volume das células do tecido infectado em decorrência de inclusões intranucleares e citoplasmáticas resultantes do ciclo replicativo viral (Maya & Azulay 2000; Mocarski et al. 2013). O HCMV foi identificado pela primeira vez por Ribbert através da observação de grandes inclusões celulares no rim de um natimorto em 1881, mas esta notação foi registrada apenas 23 anos depois, quando essas células semelhantes a protozoários foram observadas nos rins, pulmões e fígado de outro natimorto (Riley 1904 apud Riley 1997).

Goodpasture e Talbot, em 1921, (Goodpasture & Talbot 1921 apud Riley 1997) foram os primeiros a propor que as alterações celulares visualizadas eram

semelhantes às lesões de pele provocadas pela varicela e assim, poderiam ser provocadas por um efeito indireto de um agente similar. Também em 1921, Lipschutz descreveu inclusões análogas que foram associadas com lesões encontradas em coelhos e humanos infectados com herpes simples e foi o primeiro a atribuir etiologia viral à CID (Lipschutz 1921 apud Riley 1997).

O HCMV foi isolado em 1956 após inoculação em culturas celulares de amostras de urina e tecidos de crianças com doença de inclusão citomegálica generalizada por Weller e colaboradores. Smith (1956) reportou a detecção do agente em questão a partir das glândulas salivares de duas crianças, sendo que uma foi a óbito em decorrência de infecção citomegálica generalizada. No mesmo ano, Rowe e colaboradores conseguiram isolar três variantes do vírus através de tecido da adenóide de crianças submetidas à adenoidectomia e por meio desses experimentos, foram capazes de adaptar uma estirpe de HCMV (AD169) em laboratório, através da sua inoculação em fibroblastos humanos. A partir de 1960, com o progresso nos procedimentos relacionados a transplantes, a infecção pelo HCMV passou a ser reconhecida como uma doença de importância clínica (Weller et al. 1960). Nessa mesma época, Weller e colaboradores (1960) sugeriram a denominação de citomegalovírus para substituir denominações anteriormente utilizadas, tais como “vírus das glândulas salivares” ou “vírus da doença de inclusão citomegálica”.

Desde então, o HCMV passou a ser considerado um dos principais agentes virais em hospedeiros imunocomprometidos. Na década de 80, foram iniciados tratamentos (uso de antivirais) e intervenções imunológicas específicas para o HCMV e, atualmente, as pesquisas são voltadas para um melhor entendimento desta virose, os aspectos moleculares da infecção, tendo como foco principal os indivíduos que foram submetidos a algum tipo de transplante (Riley 1997; De Keyzer 2011; Hodson et al. 2013; Kotton 2013).

1.3 CLASSIFICAÇÃO, ESTRUTURA E CICLO REPLICATIVO DO HCMV

1.3.1 Classificação

O HCMV pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Betaherpesvirinae* e gênero *Cytomegalovirus* (Comitê Internacional de Taxonomia Viral - ICTV 2012). Este agente é também denominado Herpesvírus Humano 5 (HHV-5) em razão de seu genoma ser composto por DNA dupla-fita e partícula ser semelhante estruturalmente a outros herpesvírus. Essa classificação é fundamentada nas características do vírus em relação à especificidade ao hospedeiro, características do genoma viral e tipos de efeitos citopáticos. O HCMV é espécie-específico, considerando a replicação e patogênese viral infectando, portanto, somente humanos (Boeckh & Geballe 2011; Mocarski et al. 2013; Ariza-Heredia et al. 2014).

1.3.2 Estrutura viral

O HCMV apresenta uma estrutura típica dos herpesvírus, possui um grande genoma e partícula viral amorfa, devido a presença do tegumento entre o capsídeo e o envelope (Mocarski et al. 2013). O capsídeo viral de simetria icosaédrica, mede cerca de 230 nm, composto por 162 capsômeros que envolvem o genoma viral (Mustafa 1994; Mocarski et al. 2013). O capsídeo é envolto por uma camada de revestimento de proteínas denominadas proteínas do tegumento e por um envelope composto por uma bicamada lipídica e glicoproteínas (Mocarski et al. 2013) (**Figura 1**).

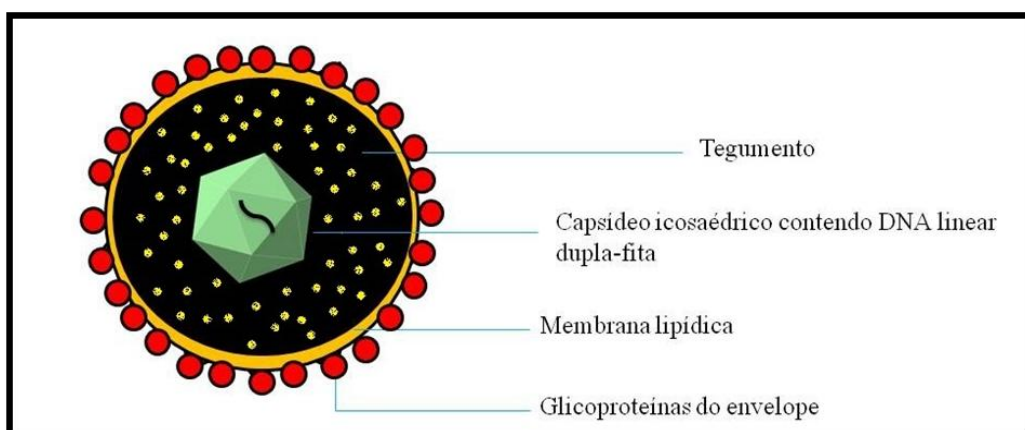


Figura 1. Representação esquemática da estrutura do Citomegalovírus Humano (HCMV). Fonte: Tomtishen 2012 (Adaptado).

O genoma do HCMV consiste em duas fitas lineares de DNA com aproximadamente 230 Kilobases que codificam para mais de 200 proteínas (Motta & Martins 2008; Mocarski et al. 2013; Ariza-Heredia et al. 2014). A organização deste genoma inclui regiões únicas longas (UL) e únicas curtas (US), flanqueadas por sequências invertidas repetidas internas (IRL e IRS) e terminais (TRL e TRS) (Crough & Khanna 2009; Towler et al. 2012; Mocarski et al. 2013). Apesar da região UL conter a maioria dos genes virais encontrados em diferentes betaherpesvírus, é a região US que codifica proteínas com funções específicas, como a restrição a determinado tipo de hospedeiro (Landolfo et al 2003; Britt & Bopana 2004) (**Figura 2**).

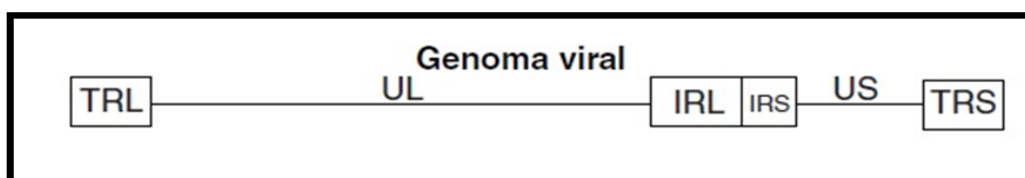


Figura 2. Esquema do genoma do HCMV. IRL: “*internal repeat-long*”; IRS: “*internal repeat-short*”; TRL: “*terminal repeat-long*”; TRS: “*terminal repeat-short*”; UL: “*unique long*”; US: “*unique short*”. Fonte: Gámez et al 2014.

O capsídeo viral é composto principalmente por cinco proteínas: UL86, UL48-49, UL85, UL46 e UL80, sendo que a UL86 é a principal proteína componente do capsídeo. O tegumento viral é uma camada de revestimento amorfa

que se situa entre o envelope e o capsídeo. Durante o ciclo replicativo, observa-se que determinadas proteínas do tegumento se localizam somente no núcleo da célula (ppUL69) e outras apenas no citoplasma (pp150), enquanto outras proteínas são localizadas no núcleo da célula pouco tempo após a infecção e, mais tardiamente no ciclo viral, localizam-se predominantemente no citoplasma (pp65 - fosfoproteína de 65 kD) (Yu et al. 2003; Ferreira et al. 2010; Mocarski et al. 2013).

A fosfoproteína pp65 é a proteína mais abundante do tegumento, no entanto, a pp65 não é essencial para a produção de novas partículas virais infecciosas, como evidenciado em variantes virais que não possuem o gene de pp65 (UL83), que podem replicar-se em cultura de células contínua. A pp65 é a proteína do tegumento com maior função de modulação/evasão da resposta imune da célula hospedeira durante infecções pelo HCMV, sendo implicada na luta contra ambas as respostas imune inata e adaptativa durante infecções por HCMV (Kalejta 2008; Chevillotte et al. 2009; Tomtishen 2012; Reyda et al. 2014). Demonstrou-se que a pp65 não só impede que as proteínas imediatamente precoces sejam reconhecidas pelos componentes do sistema imune, mas também inibe a síntese de vários componentes envolvidos na resposta imune da célula hospedeira (Odeberg et al. 2003; Reyda et al. 2014).

Uma das maneiras pelas quais a pp65 atua neutralizando a imunidade adaptativa é através da sua atividade de cinase. Estudos têm demonstrado que pp65 medeia a fosforilação de proteínas imediatamente precoces virais, bloqueando assim a apresentação de antígenos virais por moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I (Gilbert et al. 1996; Tomtishen 2012). Além disso, vários estudos têm apresentado evidências de que a pp65 está envolvida na mediação de diminuição na expressão de moléculas do MCH de classe II. (Odeberg et al. 2003; Li et al. 2013).

A pp65 também atua na diminuição da resposta do interferon. Pensa-se que a pp65 está envolvida na modulação de interferon- β (IFN- β) e de quimiocinas, através da observação de uma expressão elevada de IFN- β em infecções com um isolado sem a proteína pp65 (Abate et al. 2004; Li et al. 2013). Assim, o papel que a pp65 exerce na evasão ao sistema imune, em infecções por HCMV, é o de evitar que as células infectadas sejam destruídas pelo sistema imune (Arnon et al. 2005).

Além da pp65, também se destaca a pp150, que atua no processo de envelopamento. A proteína pp150 que é altamente imunogênica se desloca para o núcleo, liga-se ao capsídeo e permanece associada ao nucleocapsídeo durante a translocação do núcleo para o citoplasma celular. A pp150 é a única proteína do tegumento do HCMV que é conhecida por ser absolutamente essencial para a maturação do vírus. Acredita-se que a adição de pp150 ao capsídeo antes da aquisição do tegumento no núcleo, promova a estabilidade do capsídeo durante a translocação para o citoplasma, onde as etapas de maturação acontecem no compartimento de montagem (AuCoin et al. 2006; Yu et al. 2011; Tandon & Mocarski 2012).

O envelope viral é constituído por uma bicamada lipídica onde estão inseridas glicoproteínas que desempenham um papel importante no processo de entrada na célula hospedeira, na propagação célula a célula e na maturação viral. Essas glicoproteínas formam complexos que são divididos em: gCI (gB), gCII (gM/gN) e gCIII (gH, gL, gO). As glicoproteínas gM e gN encontram-se em número considerável no envelope e, juntamente com gH e gB, são fundamentais para a infectividade viral. Recentemente, foram demonstrados polimorfismos genéticos que originam seis diferentes genótipos da proteína gB (gB1, gB2, gB3, gB4, gB6 e gB7), oito diferentes genótipos da proteína gN (gN1, gN2, gN3a, gN3b, gN4a, gN4b, gN4c e gN4d) (Trincado et al. 2000; Lisboa et al. 2012; Tomtishen 2012; Mocarski et al. 2013).

Além de vírions, dois outros tipos de partículas, partículas envelopadas não-infecciosas (NIEPS) e corpos densos, também são produzidos em células infectadas com HCMV. As NIEPS são muito semelhantes aos vírions e são compostos essencialmente por envelope, tegumento e proteínas do capsídeo, mas não possuem genoma. Corpos densos são partículas envelopadas que apresentam as proteínas do tegumento, mas não apresentam capsídeo e nem genoma. Eles são compostos principalmente pela proteína pp65 viral. Apesar de essas outras partículas terem sido observadas durante uma infecção natural, a sua importância para a patogênese viral ainda é desconhecida (Kalejta 2008; Mocarski et al. 2013; Stahl et al. 2013).

Alguns dos genes que codificam glicoproteínas do envelope são essenciais para o ciclo de vida do vírus, tais como as glicoproteínas gB, gH, gN e gO, que são

conhecidas por desempenhar um papel crucial na adesão, disseminação célula-a-célula e interação com o sistema imune do hospedeiro. Outros genes que também exibem variabilidade estão localizados na região UL/b' (UL139, UL144, UL146, UL147, UL148 e UL149), e alguns deles têm atraído uma atenção especial por causa da natureza dos produtos de genes que codificam. Por exemplo, o gene UL146 codifica uma quimiocina CXCL viral, e o gene UL144 codifica um homólogo do receptor do fator de necrose tumoral (TNF). O gene UL139 codifica uma glicoproteína de membrana, e variações neste gene também podem ter o potencial de influenciar o curso da infecção ou doença (Dunn et al. 2002; Pignatelli et al. 2004; Dargan et al. 2010).

No entanto, existem diferentes fatores que limitam o estabelecimento de uma relação clara entre um genótipo específico de HCMV e o desenvolvimento de infecções e doenças. Identificando o genótipo de apenas um gene não é suficiente para prever o impacto que o vírus pode ter no hospedeiro, considerando a variabilidade genética de uma estirpe de HCMV. Assim, pelo menos os genótipos de diferentes genes essenciais devem ser determinados simultaneamente para demonstrar a relação entre certas combinações de genótipos e os resultados clínicos (Retiere et al. 2003; Ishibashi et al. 2007).

1.3.3 Ciclo de replicação e regulação gênica do HCMV

O HCMV circula com frequência dentro de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos), em decorrência da sua fagocitose por estas células de defesa e se replica em células, como leucócitos, células precursoras mielóides, células endoteliais, epiteliais, neuronais, fibroblastos, hepatócitos (Söderberg-Naucler 2006; Ariza-Heredia 2013), sendo que para o cultivo *in vitro* as células mais utilizadas são os fibroblastos (Griffiths 2012; Gaméz et al. 2014). A natureza da infecção por HCMV sugere que mais de um tipo de receptor pode estar envolvido no processo da entrada viral na célula (Chan et al. 2012). Estudos têm demonstrado que o HCMV é capaz de se ligar a diversos receptores celulares, incluindo aqueles que não estão diretamente envolvidos na mediação da entrada do vírus, tais como moléculas de MHC de classe 1, anexina II, CD13, e TLR2 (Boehme et al. 2006; Chan et al. 2012)

e aqueles que são necessários para a entrada do vírus, incluindo HSPGs, PDGFR, EGFR, heterodímeros de integrinas ($\alpha 2\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, e $\alpha V\beta 3$) e o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (Soroceanu et al. 2008; Chan et al. 2012; Nogalski et al. 2013).

O tropismo celular não é dependente somente dos elementos virais que facilitam a replicação viral, é preciso levar em consideração os mecanismos que suprimem as respostas imunológicas das células do hospedeiro. O período de incubação do HCMV é por volta de quatro a doze semanas, e é após este período que região parcial do gene da glicoproteína B já pode ser detectada no sangue periférico pela metodologia de PCR (Zanghellini et al. 1999; Ljungman 2004).

Na infecção produtiva, o genoma do HCMV é expresso de maneira sequencial e coordenadamente regulada por uma cascata de eventos transcricionais que conduzem à síntese de três classes de proteínas virais: imediatamente precoces (IE ou α), precoces (E ou β) e tardias (L ou γ). As proteínas que são originadas nos períodos imediatamente precoce e precoce exercem papel regulador da replicação viral e expressão de genes, enquanto as proteínas sintetizadas no período tardio estão relacionadas aos elementos estruturais (Rasmussen 1990; Kalejta 2008; Mocarski et al. 2013; Gámez et al. 2014).

O ciclo replicativo inicia-se com a adsorção do HCMV à superfície das células do hospedeiro por meio da ligação das suas proteínas de superfície, como a glicoproteína gpUL55 (gB), com os receptores celulares. A penetração do vírus na célula hospedeira ocorre por intermédio de uma série de interações entre proteínas celulares e virais que levam à fusão do envelope viral com a membrana plasmática celular, permitindo assim a liberação do nucleocapsídeo e das proteínas do tegumento no citoplasma celular. Posteriormente, estes são transportados até o núcleo celular, onde ocorre a passagem do genoma viral para o interior do núcleo, por meio de poros na membrana nuclear. No interior do núcleo celular sucede-se a transcrição de genes virais e a replicação do DNA genômico (Landolfo et al. 2003; Mettenleiter 2004; Tomtishen 2012) (**Figura 3**).

O DNA viral é transcrito pela RNA polimerase II do hospedeiro resultando na síntese de três categorias de proteínas, as imediatamente precoces (IE) ou α , as precoces (E) ou β e as tardias (L) ou γ (**Figura 4**). A transcrição dos genes IE e a

tradução dos respectivos RNA mensageiros (RNAm) que levam à formação das proteínas IE atuam na transcrição e modulação da resposta do hospedeiro à infecção. A expressão das proteínas E depende da presença de proteínas IE funcionais, sendo que os seus genes codificam para fatores de replicação de DNA viral e proteínas envolvidas na evasão a resposta imune. Por fim, há a formação de RNAs necessários para a codificação de proteínas estruturais na fase tardia do ciclo replicativo. A replicação do HCMV provoca um efeito citopático típico, caracterizado pelo arredondamento celular e com inclusões intra e perinucleares (Landolfo et al. 2003; Mocarski et al. 2013; Gámez et al. 2014).

Finalmente, no núcleo, acontece a junção das proteínas estruturais e o encapsidamento do genoma viral. Subsequentemente ocorre um processo recentemente aceito, em que o nucleocapsídeo adquire primeiramente um envelope por fusão com a membrana nuclear interna, perdendo-o logo depois da passagem pela membrana nuclear externa. No citoplasma, o vírus obtém o tegumento final e o envelope é novamente adquirido através de vesículas derivadas do complexo de Golgi. Por fim ocorre a liberação das partículas virais da célula por exocitose e brotamento (Mettenleiter et al. 2009; Womack & Shenk 2010; Tandon & Mocarski 2012).

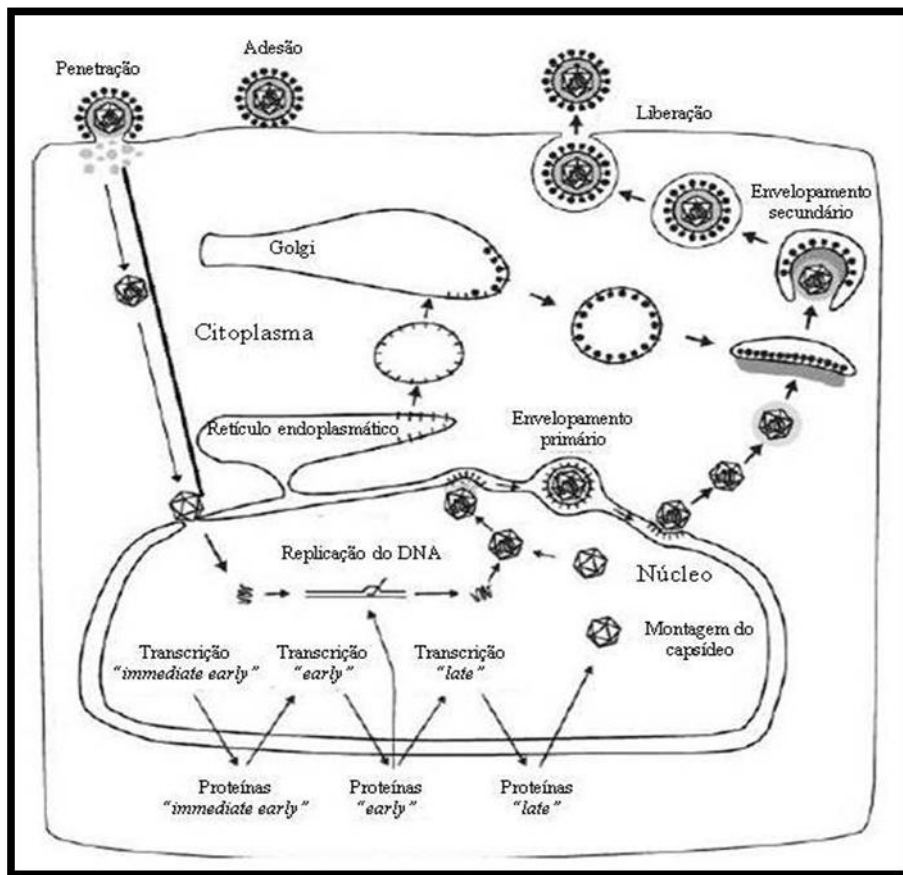


Figura 3. Ciclo replicativo do HCMV. Fonte: Mettenleiter 2004 (Adaptado).

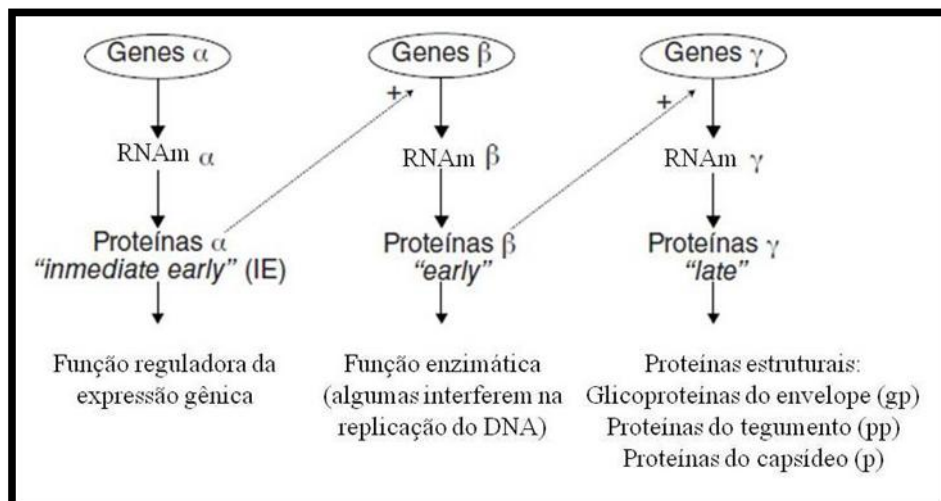


Figura 4. Representação esquemática da cascata gênica do HCMV. RNAm: RNA mensageiro; gp: glicoproteínas; pp: fosfoproteínas; p: proteínas. Fonte: Gámez et al. 2014 (Adaptado).

1.3.4 Propriedades biológicas

O HCMV pode ser inativado por: incubação em solução com baixo pH (pH<5) ou éter (20%) por duas horas, luz ultravioleta por 5 minutos, ciclos sucessivos de congelamento e descongelamento e aquecimento a 56° C por 30 minutos. A partícula de HCMV pode manter sua infecciosidade por até 45 minutos após aquecimento a 37° C, pode ainda persistir, de forma viável, em superfícies umedecidas por saliva de pelo menos seis horas a até sete dias e entre uma a duas horas em superfícies secas. O HCMV mantém a sua infecciosidade em soluções de bicarbonato de sódio com 35% de sorbitol e estocagem a -90° C (Huang et al. 1980; Méndez & Sia 1999; Stowell et al. 2012; Gámez et al. 2014).

1.4 TRANSMISSÃO, PATOGENIA VIRAL, CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E IMUNIDADE AO HCMV

O HCMV pode ser transmitido a um indivíduo susceptível por meio do contato com urina, saliva, sêmen e outros fluidos corporais de indivíduos infectados; pelo transplante de órgãos infectados; transplante de células precursoras da linhagem hematopoiética com o vírus latente; pela via vertical (transmissão da mãe para o filho durante a gestação, parto ou amamentação), pela via parenteral (principalmente através de transfusão sanguínea) e através de fômites (Cannon et al. 2011; Stowell et al. 2012; Mocarski et al. 2013).

Recém-nascidos e crianças podem ser infectados durante o nascimento por meio da passagem pelo cérvix uterino da mãe infectada, durante o período pós-natal através do leite materno ou durante a infância através de contato direto com outras crianças em berçários ou creches e pode estar associado com sequelas graves, como microcefalia, retardo mental e perda auditiva neurosensorial (Harvey & Dennis 2008; Rafailidis et al. 2008; Soper 2013; Smiechura et al. 2014). Após a puberdade, o HCMV é transmitido principalmente através da saliva e por contato sexual (Motta & Martins 2008).

A doença clínica pelo HCMV pode ser resultante de: *infecção primária* em indivíduos previamente soronegativos, que está geralmente associada com a excreção

viral persistente por semanas, meses e até anos; infecção secundária por *reativação* de partículas virais em estado de latência e ainda secundária por *reinfeção* por outra estirpe do vírus (Hibberd & Snyderman 1995; Patel & Paya 1997; Maya & Azulay 2000; Soper 2013).

Um termo abrangente que pode ser utilizado para caracterizar indivíduos cujas amostras clínicas são positivas para HCMV é “infecção ativa pelo HCMV”, que é definida pela literatura como a detecção do HCMV a partir de sangue total e/ou seus derivados (soro, pellet e plasma) em um paciente negativo para anticorpos anti-HCMV (infecção primária) ou em um paciente positivo para anticorpos anti-HCMV (infecção secundária por reativação do vírus latente ou por reinfeção com outra estirpe de HCMV) (Manuel et al. 2009; Ljungman 2011).

O curso da infecção por HCMV pode ser definido em três tipos: infecção assintomática, em que pacientes apresentam viremia para o HCMV, mas sem sintomas clínicos característicos; doença não-invasiva ou infecção sintomática, em que pacientes apresentam viremia para o HCMV associada a sintomas característicos da síndrome viral como astenia e febre, podendo ocorrer alterações hematológicas como leucopenia ou plaquetopenia, bem como alterações das enzimas hepáticas; e doença invasiva ou sistêmica, caracterizada pela demonstração do vírus em tecido ou órgão associado ao quadro clínico relativo ao qual o tecido ou órgão está relacionado (Ljungman et al. 2002a; Gentile et al. 2006; Cariani et al. 2007; Azevedo et al. 2015).

Aproximadamente 10% das infecções primárias em pacientes imunocompetentes estão associadas com a síndrome da mononucleose, caracterizada por mal-estar, febre e linfocitose atípica e clinicamente indistinguível da infecção primária pelo vírus Epstein-Barr (EBV) (Motta & Martins 2008; Crough & Khanna 2009; Mocarski et al. 2013; Gámez et al. 2014).

A infecção congênita por HCMV é causa de grave morbidade podendo ser fatal para o recém-nascido e, é a principal causa infecciosa de surdez e um grande contribuinte de anormalidades do desenvolvimento neurológico em crianças (Ross & Boppana 2005; Fowler & Boppana 2006; Gámez et al. 2014). A frequência de infecção congênita por HCMV resulta de infecção primária da gestante durante a

gravidez ou da reativação de HCMV na gestante (Kenneson & Cannon 2007; Crough & Khanna 2009).

Em pacientes imunocomprometidos, como portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e receptores de transplantes, seja de órgãos sólidos ou de precursores hematopoiéticos, o HCMV atua como um vírus altamente oportunista, causando morbidade e mortalidade nesses indivíduos e a gravidade da infecção por HCMV em imunocomprometidos está diretamente relacionada com o grau de imunossupressão (Crough & Khanna 2009; Gámez et al. 2014).

Tem sido proposto que o HCMV seja capaz de afetar o sistema cardiovascular dos seres humanos. A maioria dos estudos, especialmente aqueles com maior população de pacientes e mais dados apresentam tal relação (Karbasi-Afshar et al. 2013; Heybar et al. 2015). No entanto, alguns estudos também falharam em detectar a presença de HCMV em placas ateroscleróticas ou mostrar qualquer associação entre esse vírus e doença cardiovascular. Por isso, o papel de HCMV em DCV permanece controverso (Yaiw et al. 2013).

A infecção por HCMV pode ainda ter efeitos indiretos que influenciam na rejeição crônica do enxerto e predispor os indivíduos imunocomprometidos a superinfecções oportunistas causada por uma variedade de microrganismos, como bactérias e fungos (Crough & Khanna 2009; Freeman 2009; Smedbraten et al. 2014).

O HCMV pode induzir efeitos citopáticos provocando a destruição completa do tecido infectado. Como a grande maioria das infecções primárias tem caráter subclínico, não são diagnosticadas e o vírus permanece latente em células endoteliais e em células mononucleares do sangue periférico, podendo permanecer por toda a vida do hospedeiro, controlada pela imunovigilância mediada pelos linfócitos T CD8⁺ citotóxicos, cuja principal função é a lise de células alvo infectadas, e assim, essas células que abrigam o vírus latente servem de reservatório para a reativação viral e possivelmente de fonte de infecção para outros indivíduos susceptíveis (Gerna et al. 2008; Mocarski et al. 2013; Razonable & Humar 2013; Smith & Khanna 2013; Gámez et al. 2014).

A infecção latente é caracterizada por um baixo nível ou até ausência da replicação detectável do vírus, sendo que o nível de HCMV no sangue é muito baixo e os ensaios de PCR são quase invariavelmente negativos em pessoas saudáveis, com

a manutenção de genomas virais na forma de epissomas em algumas células mononucleares CD14⁺ do sangue periférico e nas células CD34⁺ e CD33⁺ da medula óssea, podendo estas células sofrer reativação da replicação viral em algum momento após a infecção (Reeves et al. 2005; Bego & Jeor 2006; Hargett & Shenk 2010; Huang et al. 2012; Vollmer et al. 2015).

A capacidade do HCMV para estabelecer a infecção latente e reativar a sua replicação com consequências que podem ser devastadoras ressalta a importância de entender os mecanismos de reativação em células mielóides maduras. A diferenciação das células dendríticas (CD) depende de ativação de vias celulares de sinalização e expressão de genes inflamatórios. Durante a diferenciação em macrófagos e CD, reativação é observada, com indução de transcrição lítica, replicação do DNA e, em última análise, produção de progênie viral (Limaye et al. 2008; Huang et al. 2012; Sinclair & Reeves 2014). Reeves e Compton (2011) comprovaram importante papel da interleucina-6 (IL-6) na sinalização para diferenciação das CD que é determinante para a reativação do HCMV. A IL-6 conduz a reativação por suprarregulação transcricional dos principais genes imediatamente-precoces (IE), que resulta na progressão eficiente do ciclo replicativo do vírus e, em última análise, títulos mais elevados de partículas infecciosas (Reeves & Compton 2011).

A imunidade mediada por células é essencial para controlar a infecção por HCMV. Os principais alvos dos linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺ são a proteína viral pp65 (UL83) e a proteína *immediate early 1* (IE1). Em transplantados esta subpopulação de linfócitos é praticamente inexistente até o sexto mês após o transplante dependendo da dose e do tipo de imunossupressor utilizado durante o condicionamento do paciente, enquanto que crianças com infecção congênita ou perinatal apresentam linfócitos T CD4⁺ com baixo nível de atividade e sem a atuação destes, os linfócitos T CD8⁺ são incapazes de conter a replicação viral (Chen et al. 2004; Griffiths 2009; Gámez et al. 2014). Uma possível explicação para a diminuição da função das células T CD4⁺ é que no processo de realização de coexistência com seu hospedeiro, o HCMV desenvolveu estratégias para escapar do sistema imune do hospedeiro (Lidehall et al. 2013). Entre os mecanismos relatados com efeito direto ou indireto sobre as células T CD4⁺ está a regulação da expressão

de MHC II em CD, diminuição do número de CD do tipo Langerhans e inibição da diferenciação de monócitos em CD (Gredmark et al. 2003; Odeberg et al. 2003; Moutaftsi et al. 2004; Lee et al. 2006).

Tanto a imunidade humoral quanto a celular, incluindo células como as *Natural Killer* (NK), estão implicadas no controle da infecção. O papel dos anticorpos na proteção e controle do HCMV tem sido debatido. No entanto, estudos indicam que a imunidade humoral é crucial para restringir a disseminação viral e provavelmente contribui para minimizar as manifestações clínicas da doença (Gerna et al. 2008). No entanto, a gravidade da doença está relacionada a deficiências da imunidade celular, isto é, indivíduos que apresentam linfopenia tendem a demonstrar quadros mais graves da doença disseminada por HCMV (Griffiths 2009; Gámez et al. 2014).

A infecção por HCMV induz a produção de anticorpos específicos IgM e IgA que aparecem quase simultaneamente a excreção do vírus em saliva e urina, além de anticorpos IgG. Os anticorpos IgM são detectáveis por métodos sorológicos já ao final da primeira semana de infecção e podem persistir por 2 a 8 meses em indivíduos imunocompetentes, enquanto IgA pode ser detectada até um ano após a infecção. Os anticorpos IgG também aparecem logo após as seis primeiras semanas da infecção, sendo o seu aumento progressivo, seguido por declínio, perdurando em baixos títulos por toda a vida. Os anticorpos IgG que têm como alvo principalmente epítopos das glicoproteínas do envelope gB e gH são neutralizantes. Em mulheres grávidas, a presença de IgG antes da gravidez está relacionada com a redução do risco de transmissão do vírus ao feto (Méndez & Sia 1999; Gámez et al. 2014).

1.5 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

As amostras clínicas utilizadas para a detecção do HCMV ou seus componentes são: soro, plasma, sangue total, urina, saliva, fluido de lavagem broncoalveolar (LBA) e células progenitoras hematopoiéticas. As amostras enviadas para diagnóstico devem ser mantidas refrigeradas (4-10°C) até o processamento (Gámez et al. 2014). A recomendação de processamento das amostras varia de acordo com o método empregado. Os testes para anticorpos anti-HCMV estão

atualmente limitados pelas diretrizes dos fabricantes para amostras armazenadas por sete dias ou menos. Assim, amostras armazenadas em geladeira por mais de sete dias não podem ser testadas para a presença de anticorpos anti-HCMV (Roberts et al. 1997). Da mesma forma, para o ensaio de antigenemia, recomenda-se processamento das amostras em até 6 horas após a coleta, ocorrendo perda da sensibilidade do teste após este período para o processamento (Schafer et al. 1997). Já para os métodos moleculares, estudos relatam certa estabilidade do DNA do HCMV quando estocado em plasma ou em sangue total por 14 dias a uma temperatura de 4°C (Abdul-Ali et al. 2011).

1.5.1 Diagnóstico sorológico

Detecção da resposta imune humoral. Técnicas sorológicas para a detecção de anticorpos específicos IgM e IgG contra HCMV são úteis principalmente para o diagnóstico de infecção primária sintomática (mononucleose, hepatite, retinite, dentre outras) e na determinação do estado sorológico de doadores e receptores de órgãos. A pesquisa de anticorpos IgM específicos para diagnóstico de infecção aguda, ou da classe IgG para demonstração de soroconversão, ou infecção pregressa, podem ser utilizadas para demonstrar contato prévio com o HCMV (Griffiths 2009; Kadambari et al. 2011; Lazzarotto et al. 2011). No entanto, a pesquisa somente de anticorpos IgM muitas vezes leva a resultados de difícil interpretação, já que estes anticorpos podem permanecer detectáveis por meses. Assim, é útil apenas para o diagnóstico de infecção primária sintomática em crianças (Gámez et al. 2014).

As infecções primárias por HCMV na gravidez são geralmente assintomáticas e detectadas por sorologia. O anticorpo IgM-HCMV é gerado após a infecção primária, mas também pode aparecer durante uma infecção secundária e é, portanto, de uso limitado de diagnóstico por si só. Em contraste, a presença de baixa avididade de IgG-HCMV tem demonstrado ser um indicador sorológico único e confiável da infecção primária pelo HCMV (Dollard et al. 2011; Enders et al. 2013).

As mulheres com infecção primária pelo HCMV durante a gravidez estão em maior risco de ter uma criança com HCMV congênita com transmissão intrauterina de HCMV ocorrendo em cerca de 40% das infecções primárias durante a

gravidez (Fowler et al. 2003). No entanto, a reinfecção materna com uma estirpe diferente de HCMV pode ocorrer e tais reinfecções têm sido associadas com a transmissão intrauterina, infecção fetal prejudicial, e sequelas a longo prazo (Yamamoto et al. 2010). Existem várias técnicas sorológicas para a pesquisa de anticorpos para HCMV: reação de fixação complementar, aglutinação com partículas de látex, ELISA, imunofluorescência indireta, imunocromatografia, a fluorescência anticomplemento, quimioluminescência e imunoblotting. Como técnicas manuais, as mais simples são a aglutinação com partículas de látex e a imunocromatografia. Estas técnicas são mais utilizadas nos serviços de emergência nos laboratórios de hospitais para sorologia de doadores de órgãos (Griffiths 2009; Gámez et al. 2014).

Avaliação da resposta imune celular. Avaliar a resposta imune celular contra o HCMV permite determinar a capacidade do paciente transplantado de responder à reativação do HCMV no período pós-transplante, sendo que a maioria dos estudos inicia a investigação da reconstituição imunológica somente a partir de 30 dias após o transplante (Lilleri et al. 2009; Guerrero et al. 2012).

Existem diferentes métodos para contagem e caracterização de linfócitos $CD8^+$ e $CD4^+$ que reconhecem epítomos específicos do HCMV: coloração de tetrâmeros ou citocinas intracelulares, citometria de fluxo, ELISPOT e QuantiFERON®-CMV. Destes, provavelmente, o último é o método mais recomendado, por várias razões: é um teste simples, requer manipulação mínima das amostras clínicas, e disponibilidade comercial. O ensaio QuantiFERON®-CMV quantifica o IFN- γ produzido por células T $CD8^+$, quando estimuladas *in vitro* com antígeno de HCMV, quantificando assim, as respostas imunológicas frente aos peptídeos imunogênicos do HCMV, pela presença de linfócitos T $CD8^+$ específicos (Hebart 2002; Giulieri & Manuel 2011; Tormo et al. 2011).

1.5.2 Detecção de partículas de HCMV ou seus antígenos

Amostras clínicas podem ser utilizadas para inoculação em monocamadas celulares a fim de se multiplicar partículas virais viáveis, para posterior identificação, por algum método de detecção do vírus completo ou algum de seus componentes,

tais como microscopia eletrônica, Ensaio Imunoenzimático (EIE), imunofluorescência ou métodos moleculares. O HCMV replica-se eficientemente em fibroblastos humanos. As linhagens celulares mais frequentemente utilizadas são de fibroblastos de pulmão de embrionário, como MRC-5. Em geral, o cultivo tradicional é lento e são necessários pelo menos 21 dias para se confirmar que uma amostra é negativa para a presença do vírus (Méndez & Sia 1999). A melhor alternativa para a propagação do vírus em cultura de células é o emprego da técnica de *shell-vial* (SV), que permite um diagnóstico em 18-48h. A amostra é inoculada por centrifugação sobre uma monocamada da linhagem celular MRC-5 que crescerá em lâmina. Após incubação de 18-48h, uma imunofluorescência é realizada sobre a monocamada, utilizando-se anticorpos monoclonais específicos para o antígeno de fase inicial p72 (Griffiths & Emery 1997).

A detecção precoce do HCMV pela técnica de SV se aplica a todo tipo de amostra. A detecção na urina do recém-nascido, nas duas primeiras semanas de vida, é útil para o diagnóstico de infecção congênita. A cultura de urina positiva para HCMV realizada após 21 dias de vida não pode assegurar que a infecção é congênita, uma vez que a aquisição possa ter sido perinatal. Além disso, um resultado positivo de SV no sangue de pacientes transplantados tem um alto valor preditivo positivo de doença sintomática por HCMV (Griffiths & Emery 1997; Razonable et al. 2002).

1.5.3 Teste de antigenemia

O teste de antigenemia (AGM) baseia-se na utilização de anticorpos monoclonais para detectar a proteína do tegumento viral pp65, produto do gene UL83, que é o principal antígeno viral presente em leucócitos do sangue periférico durante a infecção por HCMV (Grefte et al. 1992; Méndez & Sia 1999). Nesta técnica, se separa o pellet (creme leucocitário) do sangue com anticoagulante. Um número determinado de leucócitos é depositado sobre uma lâmina de vidro utilizando uma citocentrífuga e estas lâminas são incubadas com anticorpos monoclonais contra a proteína pp65, conjugados a um fluorocromo. A presença de pelo menos um núcleo positivo no teste de antigenemia já é indicativo de infecção (Gámez et al. 2014).

A pesquisa do antígeno pp65 (AGM) do HCMV em leucócitos de sangue periférico é muito utilizada para monitorar a replicação do HCMV e está associada ao risco de doença pelo HCMV (Boeckh et al. 2004a; Kalpoe et al. 2004; Schroeder et al. 2004; Cariani et al. 2007). Apesar de ser uma técnica relativamente simples e padronizada para o monitoramento e tratamento da infecção por HCMV em transplantados, a labilidade da amostra de sangue, que deve ser processada em poucas horas, a possível falha na interpretação dos resultados em amostras de pacientes neutropênicos, e a elevada simplificação e automatização, além de sensibilidade e especificidade das técnicas moleculares quantitativas recentes, que não estão sujeitas às desvantagens da AGM, têm forçado muitos laboratórios a substituir os testes clássicos de AGM pela quantificação do DNA para o controle de infecção por HCMV no paciente transplantado (Gámez et al. 2014).

1.5.4 Diagnóstico molecular

A amplificação gênica pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) é um método de biologia molecular que possibilita a produção de grande quantidade de fragmentos específicos de DNA a partir de substratos complexos e em concentrações diminutas. Sendo assim, a técnica de PCR permite que a detecção do genoma do HCMV seja específica e sensível, podendo ser utilizada como ferramenta no diagnóstico precoce da infecção provocada por este vírus (Saiki et al. 1985; Pollack et al. 2011).

A técnica de PCR consiste na amplificação seletiva de uma sequência-alvo de DNA específica, utilizando um par de iniciadores que são complementares a uma região parcial, conservada ou variável, do genoma viral. Demmler et al. (1988) e Shibata et al. (1988), possibilitaram através de seus trabalhos a introdução da técnica de PCR no diagnóstico precoce da infecção pelo HCMV. Se o objetivo é a detecção do genoma viral, a escolha de iniciadores para amplificação requer o uso de sequências genômicas altamente conservadas entre HCMV distintos, pois isto irá garantir sensibilidade e especificidade para o teste (Albuquerque 2006).

Devido à alta sensibilidade do método de PCR, os principais problemas são os resultados falso-positivos decorrentes da contaminação na execução do teste.

Resultados falso-negativos podem ter como causa a variabilidade genética do vírus ou pela presença de inibidores na amostra clínica (The et al. 1992).

Maior sensibilidade e especificidade podem ser alcançadas com a técnica de “Nested PCR” (nPCR), utilizada por Porter-Jordan et al. (1990) e Brytting et al. (1991). Esta variação da PCR tradicional é uma técnica que amplifica uma sequência alvo em dois passos: na primeira amplificação, utiliza-se um par de iniciadores específicos para uma sequência-alvo; a partir do produto desta primeira reação, um novo par de iniciadores é utilizado para uma região interna à sequência anterior, por isso o aumento da sensibilidade e especificidade da reação (Xu et al. 1993; Brainard et al. 1994; Fox et al. 1995; Ehrnst 1996).

Entre as regiões mais utilizadas como alvo nas reações de nPCR encontra-se a região UL123, que codifica o antígeno *Major immediate early (MIE)*, por ser uma região altamente conservada e além disso, durante a infecção ativa, este gene é um dos genes rapidamente expressos, levando-se em consideração que os genes do HCMV são expressos em uma cascata temporal e os genes imediatamente precoces do HCMV incluem o gene UL123 (Zhang et al. 2010; Mocarski et al. 2013).

Como já mencionado, a expressão dos genes virais é um resultado da interação do vírus e dos componentes das células infectadas. Em geral, o vírus utiliza os mecanismos celulares para alcançar uma expressão gênica bem sucedida. No momento inicial da infecção pelo HCMV, dois passos de regulação gênica viral são fundamentais: 1) a regulação do gene IE através da interação de fatores celulares com o *major promotor IE* (MIEP) e 2) a ativação de genes precoces por proteínas IE (Stinski & Isomura 2008). Neste contexto, a proteína IE1 é uma proteína-chave produzida pelo HCMV. A proteína IE1 é uma proteína não-estrutural que é rapidamente expressa após a infecção e durante todo o ciclo de replicativo e serve uma função reguladora chave. Em pacientes internados com infecção pelo HCMV, uma proporção substancial de linfócitos T reagem com epítomos da IE1 (Kern et al. 1999; Lacey et al. 2005). É provável que a pressão imunológica favoreça o desenvolvimento de diversidade genética, como células CD8⁺ IE1-específicas sejam capazes de interromper o ciclo de reativação da transcrição que leva à infecção lítica iniciada pela expressão do produto principal do gene IE (Simon et al. 2006). Até à

data, quatro genótipos diferentes de IE1 foram descritos (I, II, III, IV) com base no polimorfismo do exon-4 do gene IE1 (Lisboa et al. 2012).

Outra variante da PCR tradicional, o procedimento da técnica de PCR em tempo real (RT-PCR) ou PCR quantitativa (qPCR). Para a pesquisa de HCMV, pode ser utilizado tanto o SYBR Green, corante intercalante de DNA fita dupla, quanto a metodologia de TaqMan, sendo que esta última emprega além dos iniciadores sondas homólogas à sequência alvo do genoma viral (Heid et al. 1996; Oliveira 2010) (Figura 5).

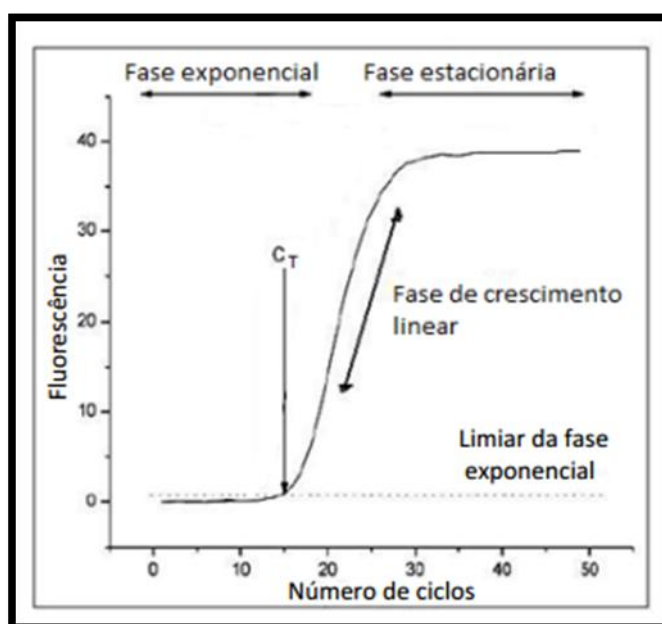


Figura 5. Representação gráfica das fases da PCR em tempo real. C_T : *cycle threshold*, corresponde ao número de ciclos necessários para que a fluorescência da reação seja detectável. Oliveira 2010.

As principais vantagens da qPCR incluem a elevada sensibilidade do teste, uma menor chance de contaminação entre as amostras, rapidez e a possibilidade de quantificação do número de cópias genômicas do agente em questão, sendo também menos susceptível ao problema da leucopenia nestes pacientes, já que é capaz de detectar um baixo número de sequências alvo do DNA viral, constituindo importante ferramenta diagnóstica para o acompanhamento e avaliação do prognóstico do

paciente (Kim et al. 2007; Allice et al. 2008; Oliveira 2010). Entretanto, esta técnica também apresenta algumas desvantagens, como o elevado custo (Oliveira 2010).

Especialmente nos receptores de transplantes de medula óssea, a técnica qPCR parece ser mais eficaz do que o ensaio de AGM como suporte para as decisões relativas ao início de tratamento antiviral (Mori et al. 2004; Gimeno et al. 2008). O ensaio ideal permite obter resultados que possam ser aplicados nas instituições como um todo, permitindo o estabelecimento de valores universais de corte, tanto para a iniciação quanto para interrupção de terapia em diferentes grupos de pacientes submetidos a transplante (Babady et al. 2015). Entretanto, problemas como o elevado custo da utilização desta metodologia para o monitoramento de pacientes atendidos em centros de transplantes públicos, e a falta de consenso entre os grupos de pesquisas com relação a que regiões do genoma viral devem ser pesquisadas e qual o protocolo a ser seguido, dificultam a sua utilização em ampla escala.

Técnicas de detecção rápida (tanto de antígenos quanto de ácido nucleico) são comumente e efetivamente usadas para monitorar os indivíduos em risco de infecção ativa por HCMV e para um início precoce da terapêutica antiviral preemptiva. Receptores de AloTCPH geralmente são monitorados de forma semanal durante os primeiros 100 dias pós-transplante (Ceballos et al. 2014). O ensaio de AGM é, geralmente, utilizado para monitorizar infecção ativa por HCMV e a definição de AGM positiva varia entre os centros hospitalares, desde a qualquer célula positiva a até >10 células infectadas por 2×10^5 leucócitos (Takenaka et al. 1997; Choi et al. 2009).

Tipicamente, a terapia antiviral preemptiva é iniciada com um resultado positivo por AGM. No entanto, esta técnica pode estar propensa a resultados falso-negativos nessa população devido a neutropenia comumente observada após o transplante. Mais recentemente, os ensaios de qPCR têm sido introduzidos para a detecção do DNA viral como uma forma de rastrear a infecção ativa por HCMV, bem como para se estimar o número de cópias genômicas na amostra analisada. No entanto, ainda não há um consenso quanto aos valores-limite de carga viral, devido à ausência de um protocolo padronizado de qPCR entre os diferentes centros e laboratórios. Em geral, o limiar de qPCR para o início da terapia antiviral varia entre

cerca de 2.000 a 10.000 cópias virais/ml de sangue (Mori et al. 2002; Verkruyse et al. 2006; Boeckh & Ljungman 2009; Ross et al. 2011; Takenaka et al. 2015).

A variabilidade significativa no resultado de carga viral de HCMV entre os métodos moleculares atualmente utilizados limita a comparação interlaboratorial desses resultados. Buscando minimizar essa limitação, o Comitê de Peritos em Normalização Biológica da Organização Mundial da Saúde estabeleceu recentemente o Primeiro Padrão Internacional para testes de DNA de HCMV, que consiste em um padrão da estirpe Merlin na concentração 5×10^6 UI/ml. Os resultados serão apresentados em unidades internacionais (UI)/ml, que pode ser comparado entre os centros de transplantes. A disponibilidade desses controles permitirá que os centros de transplantes avaliem o desempenho das metodologias utilizadas e os resultados obtidos permitirão definir um padrão para orientações em relação à terapia preemptiva de HCMV (Fryer et al. 2010). No entanto, Hayden e colaboradores (2015), ao avaliar a comutatividade (equivalência de resultados de exames quando realizados em diferentes equipamentos ou sistemas analíticos) deste padrão utilizando dez diferentes testes de qPCR realizados por oito diferentes laboratórios observaram que dependendo do ensaio utilizado, o padrão demonstrou fraca ou ausente comutatividade com até 50% dos ensaios, assim, a falta de comutatividade utilizando este padrão com vários dos ensaios sugere que mais estudos são necessários para trazer a instituição de um consenso.

Devido à falta de padronização entre centros e laboratórios em relação às técnicas a serem utilizadas e também à amostra clínica, os resultados de ensaios *in-house* não podem ser comparados entre os diferentes centros de transplante. Embora ensaios de diagnóstico que utilizam pellet de células estejam bem estabelecidos na maioria dos centros de transplante, o qPCR no plasma é cada vez mais utilizado para o monitoramento de HCMV. O monitoramento de HCMV no plasma pode ser mais fácil para padronizar e executar em comparação com ensaios utilizando o pellet. No entanto, os ensaios utilizando plasma geralmente parecem ser menos sensíveis (Limaye et al. 2001; Herrmann et al. 2004; Zhang et al. 2010). É importante ressaltar, que na maioria dos centros brasileiros onde se realiza o TCPH pelo Sistema Único de Saúde (SUS), só é realizado o qPCR em amostras de pacientes que possuem condições financeiras para pagar pelo serviço.

1.6 ANTIVIRAIS COM ATIVIDADE CONTRA O HCMV

Atualmente, são aprovadas pelo FDA (*US Food and Drug Administration*) sete antivirais para profilaxia ou terapia frente à infecção por HCMV: Ganciclovir, Valganciclovir, Aciclovir, Valaciclovir, Foscarnet, Cidofovir e Fomivirsen. Estes antivirais podem ser utilizados de forma terapêutica ou mesmo profilática, quando o risco de estabelecimento da doença por HCMV é alto, como nos pacientes transplantados (Lautenschlager 2009).

De forma geral, esses agentes antivirais são análogos de nucleosídeos. Nos casos de pró-droga, esta deve ser convertida intracelularmente para sua forma trifosfatada por uma cinase viral, que é codificada pelo vírus durante a infecção. Subsequentemente, quinases celulares catalisam a formação da droga em formas difosfato e trifosfatadas, que estão presentes em uma concentração maior nas células infectadas pelo HCMV do que em células não infectadas. A forma trifosfatada, modificada na sua extremidade 3', atua como inibidor competitivo da incorporação de nucleotídeos trifosfatados, e quando incorporada à cadeia interrompe a síntese do DNA viral, interrompendo assim a replicação (Faulds & Heel 1990; Markham & Faulds 1994; Crumpacker 1996).

O ganciclovir (GCV) foi o primeiro agente antiviral aprovado para o tratamento da infecção pelo HCMV. É amplamente utilizado para o tratamento de infecções por HCMV em pacientes com a imunidade celular baixa, em particular pessoas com o HIV e os receptores de transplante de medula óssea e de órgão sólido, que estão em alto risco para a doença por HCMV invasivo (Pollack et al. 2011). O valganciclovir é a pró-droga do GCV, é metabolizado no fígado e é o medicamento de escolha na profilaxia preemptiva contra o HCMV (Hodson et al 2005). O aciclovir (ACV) é um substrato menos eficiente do que GCV, o que em parte explica a menor potência *in vitro* de ACV em comparação com GCV em células infectadas pelo HCMV. Outro fator que diferencia claramente ACV e GCV é o tempo de meia vida do medicamento. Pelo fato da meia vida do ACV-TP ser de quatro a cinco vezes menor quando comparada à de GCV-TP nas células infectadas, resulta em menor nível intracelular do ACV-TP. Tal como acontece com GCV, resistência de variantes de HCMV ao medicamento ACV resulta de mutações no gene UL54 (DNA

polimerase viral) ou no gene UL97 (fosfoquinase viral) (Biron 2006). O valaciclovir (VAC) é rápida e extensivamente convertido em ACV após a administração. Isso resulta em aumento da biodisponibilidade de ACV em comparação com a obtida com ACV oral (três a cinco vezes mais elevada) (Emery et al. 2013). Em um estudo retrospectivo, Vusirikala e colaboradores (2001), concluíram que o tratamento com VAC reduziu significativamente o risco de infecção por HCMV após TCPH do tipo alogênico com minimização de efeitos colaterais.

O foscarnet (FOS) inibe a atividade da DNA polimerase viral pela ligação ao local de ligação do pirofosfato na enzima, bloqueando a clivagem do pirofosfato, interrompendo assim o alongamento da cadeia de DNA. A resistência a FOS tem sido mapeada por mutações pontuais no gene UL54. FOS é considerado terapia de segunda linha, mas é o medicamento recomendado para os pacientes que estão em falha terapêutica com o GCV devido à resistência viral, ou aqueles que não podem ser tratados com GCV devido à neutropenia ou leucopenia dose-limitante (Razonable & Emery 2004). O cidofovir (CDV) é um fosfonato nucleosídeo acíclico. CDV é um agente antiviral com elevada potência contra herpesvírus e outros vírus de DNA, tais como vírus da varíola. Quinases hospedeiras convertem CDV na forma difosforil ativa, e então, o CDV difosfato atua como um inibidor competitivo da DNA polimerase viral, causando a terminação da cadeia do DNA viral (De Clercq 2005).

O fomivirsen é um oligonucleotídeo que bloqueia a tradução de mRNA viral, por ligação à sequência complementar do mRNA transcrito a partir do segmento codificante da região *major immediate early* do HCMV. Fomivirsen é administrado de forma intra-ocular, principalmente nos casos de retinite por HCMV (Biron 2006). Foi o primeiro antiviral *anti-sense* aprovado pela FDA (Geary et al. 2006).

O desenvolvimento de novos medicamentos, preferencialmente na formulação oral, é necessário para o tratamento da doença por HCMV, especialmente doença congênita em neonatos. Os medicamentos sistêmicos aprovados compartilham um mecanismo de ação semelhante e, como consequência, a resistência viral cruzada é um problema em relação ao atual arsenal de medicamentos (Biron 2006).

Embora eficazes, estes tratamentos estão associados com efeitos clinicamente significativos, incluindo mielossupressão (neutropenia ou trombocitopenia com ganciclovir, valganciclovir, e cidofovir) e toxicidade renal (com foscarnet e cidofovir) que complicam a utilização destes agentes de forma geral (Chemaly et al. 2014). Por isso, os principais objetivos do monitoramento da infecção pelo HCMV em TCPH são reduzir a necessidade de profilaxia e a utilização de tratamento antiviral com comprovação de infecção por HCMV (Jang et al. 2012).

1.7 ESTRATÉGIAS UTILIZADAS NA PREVENÇÃO DA INFECÇÃO ATIVA PELO HCMV

Existem duas principais estratégias para prevenir a doença por HCMV em TCPH: profilaxia e terapia preemptiva. A profilaxia para o HCMV é baseada na administração de medicamentos antivirais como ganciclovir ou valganciclovir a pacientes que estejam em risco de desenvolver a doença por HCMV (Lautenschlager 2009). Essa estratégia é recomendada para todos os receptores negativos (R-) quando os doadores são positivos (D+) para prevenir infecções primárias. Para profilaxia, a medicação é administrada desde o período pré-transplante até três meses após o transplante (Levitsky et al. 2008). As vantagens de incluir a profilaxia são a redução da incidência de HCMV na fase inicial após o transplante e, possivelmente, menos efeitos indiretos da infecção por HCMV, tais como infecções oportunistas e rejeição do transplante (Paya et al. 2004; Razonable et al. 2005; Slifkin et al. 2005).

Terapia preemptiva é baseada no monitoramento da reativação do HCMV antes do início dos sintomas clínicos. Essa estratégia é recomendada principalmente para os pacientes de risco moderado ou baixo, como a receptores positivos (R+). No entanto, esta estratégia vem sendo utilizada com sucesso também para pacientes de alto risco (D+/R-) (Singh et al. 2008). A administração precoce de antivirais, ganciclovir ou valganciclovir, com base no monitoramento da carga viral em sua maioria por testes que estime o número de cópias genômicas virais, como métodos o qPCR, pode evitar o desenvolvimento de doença por HCMV (Boeckh & Ljungman 2009; Lautenschlager 2009).

As vantagens da terapia preemptiva incluem menor tempo de exposição aos medicamentos, já que o antiviral é iniciado baseado em um teste diagnóstico positivo, e baixa toxicidade, bem como menos problemas de resistência (Singh et al. 2004; Singh et al. 2008). Estudos de meta-análises de ensaios controlados com placebo têm demonstrado que a profilaxia pode ser uma estratégia superior em comparação a terapia preemptiva ao HCMV em relação aos efeitos indiretos da infecção (Hodson et al. 2005; Kalil et al. 2005; Strippoli et al. 2006; Zhang et al. 2011), mas tanto a profilaxia quanto a terapia preemptiva foram eficazes na redução da incidência da doença por HCMV (Small et al. 2006).

Ambas as estratégias apresentam desvantagens (Meylan & Pascual 2006; Fishman et al. 2007; Razonable 2008). As desvantagens da profilaxia incluem exposição prolongada ao medicamento, o desenvolvimento de resistência e, acima de tudo, o desenvolvimento de início tardio da doença por HCMV (Limaye et al. 2004; Limaye et al. 2006; Park et al. 2006; Eid et al. 2008; Razonable 2008). A profilaxia não impede o desenvolvimento da infecção primária pelo HCMV, ela apenas retarda o início da replicação viral e infecções primárias por HCMV são relativamente comuns após a interrupção da profilaxia (Lautenschlager 2009).

Por outro lado, o desenvolvimento de um protocolo de terapia preemptiva é mais complicado, sendo altamente dependente do monitoramento laboratorial dos pacientes e rápida logística dos espécimes. Se os pacientes são monitorados semanalmente ou uma vez em duas semanas, isto pode resultar no aparecimento de doença clínica antes da detecção laboratorial do HCMV. Isto pode ser observado rapidamente, particularmente, em casos D+/R-, em razão da cinética de replicação viral. Além disso, tratamentos preemptivos longos ou intermitentes podem predispor o desenvolvimento de estirpes resistentes aos medicamentos para HCMV (Emery et al. 2000; Biron 2006). A estratégia de monitoramento laboratorial, a normalização de métodos de acordo com níveis de detecção de carga viral e regimes ótimos do medicamento ainda estão longe de consenso internacional (Razonable & Emery 2004; Preiksaitis et al. 2005; Griffiths et al. 2008). Até que esses problemas sejam resolvidos, a maioria dos centros de transplante ou executam suas próprias estratégias locais, ou simplesmente usam a profilaxia, sendo o ganciclovir e o

valganciclovir os medicamentos mais utilizados tanto na profilaxia quanto na terapia preemptiva (Lautenschlager 2009; Emery 2013).

1.8 EPIDEMIOLOGIA

As infecções causadas por HCMV são frequentes, porém observa-se que a infecção sintomática é considerada rara em crianças e adultos imunocompetentes. Entretanto, estima-se que de 30% a 90% dos adultos imunocompetentes apresentem anticorpos IgG-HCMV circulantes, sendo considerados soropositivos para HCMV (Mussi-Pinhata & Yamamoto 1999; Taylor 2003; Griffiths 2004; Cannon et al. 2010).

A partir de estudos de soroprevalência em diversas populações, é possível afirmar que o HCMV ocorre em todas as regiões do mundo (Cannon et al. 2010), e sua presença está relacionada de forma inversamente proporcional ao status socioeconômico da população local e diretamente proporcional à idade (Staras et al. 2006; Crough & Khanna 2009; Cannon et al. 2010), o que leva a grandes variações de prevalência, mesmo em uma mesma região (Cannon et al. 2010).

Recentemente, foi reportado que a soroprevalência de anticorpos anti-HCMV nos Estados Unidos é de 50% entre os adultos em geral (Bate et al. 2010), mas as taxas em algumas populações são ainda maiores. Aproximadamente 90% dos mexicanos que vivem nos Estados Unidos são soropositivos aos 50 anos, assim como 88% dos pacientes submetidos a transplante de células-tronco na Itália (Ljungman & Brandan 2007; Hyde et al 2010).

No Brasil, estudos que abordam a soroprevalência para HCMV variam em relação à população de estudo, mas os resultados são congruentes. Matos e colaboradores (2010; 2011) analisaram a soroprevalência para HCMV em doadores de sangue (DS) e em pacientes com distúrbios hematológicos (PDH) procedentes de banco de sangue público do estado da Bahia. Os resultados mostraram que a soroprevalência geral foi de 87,9% em DS e de 89,4% em PDH (Matos et al. 2010; Matos et al. 2011). Souza e colaboradores (2010) demonstraram uma soroprevalência de 96% entre doadores de sangue da região Sul do Brasil (Souza et al. 2010). Em

pacientes transplantados renais tanto no Pará quanto Paraná, a positividade para anticorpos anti-HCMV foi de 100% (Silva et al. 2007; Okubo et al. 2014).

No estado de Goiás, os estudos se concentram na soroprevalência em gestantes ou mulheres na fase reprodutiva. Ferreira e colaboradores (2005) encontraram uma soroprevalência de anticorpos anti-HCMV de 99% em gestantes atendidas pelo Hospital Materno Infantil (Ferreira et al. 2005). Resultado similar foi encontrado por Barbaresco e colaboradores (2014), que ao analisar a soroprevalência de anticorpos anti-HCMV em mulheres que sofreram aborto espontâneo completo ou incompleto, encontraram anticorpos específicos para o HCMV em 97% desta população (Barbaresco et al. 2014).

Apesar da sua elevada prevalência em todo o mundo, as infecções por HCMV são geralmente imperceptíveis, exceto em recém-nascidos e indivíduos imunocomprometidos, nos quais a infecção pode resultar em complicações como pneumonia e doenças gastrointestinais e até mesmo óbito (Boeckh & Geballe 2011).

1.9 INFECÇÃO POR HCMV EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RECEPTORES DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOIÉTICAS

O HCMV é considerado um vírus oportunista em pacientes imunocomprometidos e uma das mais importantes complicações após o transplante de células progenitoras hematopoiéticas (TCPH). Representa uma das principais causas de morbidade e mortalidade, pode causar doença em múltiplos órgãos que possuem receptores para o vírus, tais como rins, fígado, coração e medula óssea, sendo que a doença pode se desenvolver tanto precoce quanto tardiamente após o transplante (Krause et al. 1997; Zaia et al. 1997; Ljungman et al. 2002b; Boeckh et al. 2003; Boeckh & Ljungman 2009). A soropositividade para HCMV continua a ser um fator de risco para a mortalidade relacionada ao transplante em pacientes que recebem um transplante de um doador não aparentado, apesar dos grandes avanços no diagnóstico e do tratamento precoce (Broers et al. 2000; Craddock et al. 2001; Meijer et al. 2002; Boeckh & Ljungman 2009).

O estado sorológico em relação ao HCMV do doador e do receptor (D/R) antes do transplante também está correlacionado com a incidência e gravidade da

infecção. Receptores soronegativos de um órgão HCMV-positivo (D^+/R^-) irão desenvolver infecção primária. Contudo, nos receptores soropositivos (D^+/R^+ ou D^-/R^+), ocorre a reativação da infecção latente, provocada pela imunossupressão, que parece ser o principal fator para a reativação do HCMV (Glenn 1981; Adler et al. 1983; van der Bij & Speich 2001; van Burik et al. 2007). Mas a relação do estado sorológico ao HCMV do doador e do receptor HCMV-soropositivo (R^+) ainda é um assunto controverso. Ljungman et al. (2003) sugeriram que a seleção de um doador não aparentado HCMV-soropositivo para um receptor HCMV-soropositivo pode estar associado com uma taxa de sobrevida aumentada em cinco anos e mortalidade reduzida relacionadas ao transplante.

Dentre os fatores de risco associados à infecção ativa viral e/ou doença destaca-se a positividade para anticorpos específicos para o HCMV em pacientes que irão receber o transplante de células progenitoras hematopoiéticas, pois se estima que aproximadamente 75% dos pacientes HCMV-soropositivos irão manifestar a infecção por HCMV após o transplante (Boeckh et al. 2004b; Zhou et al. 2009; Ljungman et al. 2011; Lin & Liu 2013). Outros fatores de risco incluem idade avançada, transplante de sangue de cordão umbilical, irradiação de corpo inteiro, doença do enxerto contra o hospedeiro, dentre outros (Matsumura et al. 2007; Ozdemir et al. 2007; Cummins et al. 2009; George et al. 2010). Dentre as complicações clínicas associadas à infecção ativa pelo HCMV estão: pneumonia intersticial, doença gastrointestinal, retinite, pancitopenia, febre e demora na enxertia (Crough & Khanna 2009; Ariza-Heredia et al. 2013; Gámez et al. 2014).

A maioria dos estudos são realizados com indivíduos submetidos a transplante alogênico devido a infecção ativa do HCMV ser comumente associada a este tipo de transplante, embora também possa ocorrer em transplantes autólogos, mas com uma incidência inferior (Ljungman et al. 1998; Ruell et al. 2007).

A infecção por HCMV é a causa viral líder de morbidade e mortalidade em pacientes receptores de células-tronco hematopoéticas. Cerca de 75% dos pacientes de alto risco apresentam infecção ativa de HCMV pós-transplante, e sem profilaxia ou terapia preventiva, 20-30% destes desenvolvem a doença sistêmica por HCMV. A terapia preemptiva baseada na antigenemia ou detecção do DNA do HCMV tem reduzido significativamente o desenvolvimento de doença por HCMV em pacientes

AloTCPH. No entanto, a mortalidade da doença pelo HCMV é relatada de até 50%, mesmo com tratamentos (Boeckh et al. 2003; Yanada et al. 2003; Sharma et al. 2013).

Diante do exposto, tornam-se necessários estudos que comparem diferentes amostras clínicas e metodologias para que seja feito o diagnóstico sensível e específico para HCMV desempenhando assim um papel essencial na prevenção da infecção e doença por HCMV durante o período inicial após o transplante, representando um papel fundamental para o melhor prognóstico da doença e na resposta terapêutica (Kotton et al. 2010; Razonable 2013).

2 JUSTIFICATIVA

As infecções virais constituem uma das principais causas de morbimortalidade em pacientes submetidos ao transplante de células progenitoras hematopoiéticas (TCPH) e, por conseguinte, o monitoramento viral tem um grande impacto sobre o prognóstico destes pacientes (Ljungman et al. 2010; Moses et al. 2011). A infecção por citomegalovírus humano (HCMV) é atualmente reconhecida como a principal causa de fatalidade após o TCPH do tipo alogênico (AloTCPH), sendo frequentemente associada a infecção de múltiplos órgãos, resultando em diversas síndromes tais como: pneumonia, hepatite, gastroenterite, retinite e encefalite (Paris et al. 2009; Mori & Kato 2010).

Apesar da elevada ocorrência de HCMV na referida população, o momento ideal para o início do monitoramento dos pacientes, o tipo de amostra clínica mais apropriada (soro, células mononucleares do sangue periférico ou sangue total), bem como a metodologia mais adequada para o diagnóstico precoce e auxílio para a tomada de decisão da necessidade do início do tratamento preemptivo não estão ainda definidos. Ademais, estudos sobre o monitoramento da infecção ativa por HCMV em pacientes submetidos a transplante de células progenitoras hematopoiéticas comparando diferentes metodologias de diagnóstico e em mais de um tipo de amostra clínica, são ainda escassos no país.

Diante do exposto, este estudo teve como principal motivação realizar um estudo comparando diferentes metodologias para detecção da infecção ativa por HCMV em pacientes submetidos a transplante alogênico de células progenitoras hematopoiéticas no Hospital Araújo Jorge/AACGO, assim como identificar o melhor período para a realização do monitoramento, a amostra clínica e a técnica mais sensível e com melhor custo-benefício para a detecção do HCMV.

Os dados obtidos serão repassados aos responsáveis pela Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital Araújo Jorge, podendo assim auxiliar diretamente na tomada de decisões clínicas que possam contribuir para um melhor prognóstico dos pacientes atendidos na referida unidade de transplante.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- ❖ Realizar o monitoramento, por diferentes metodologias, de pacientes submetidos ao AloTCPH para a detecção de infecção ativa por citomegalovírus humano (HCMV) em um dos centros de referência de transplantes de medula do Brasil.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Monitorar pacientes submetidos à AloTCPH em relação à infecção ativa e síndrome do HCMV utilizando três técnicas distintas: Antigenemia (AGM), Nested-PCR (nPCR) e PCR em tempo real (qPCR);
- ❖ Comparar a sensibilidade entre as técnicas e amostras clínicas utilizadas: pellet (creme leucocitário) e soro;
- ❖ Determinar a carga viral de pacientes infectados;
- ❖ Correlacionar dados clínicos e prognósticos dos pacientes com a positividade para infecção ativa por HCMV.

4 MÉTODOS

4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

A população de estudo foi constituída de 21 pacientes submetidos a transplante alogênico de células progenitoras hematopoiéticas no Hospital Araújo Jorge (Associação de Combate ao Câncer), situado na cidade de Goiânia, estado de Goiás. O HAJ é uma unidade de saúde privada e filantrópica, atendendo em média 80% dos pacientes pelo Sistema Único de Saúde (SUS). O HAJ atende pacientes de todas as idades, oferecendo tratamento para todos os tipos de câncer com os mais modernos recursos da atualidade, sendo considerado centro de referência no tratamento do câncer no Centro-Oeste, mas também atende pacientes de outras regiões brasileiras, como Norte e Nordeste (Acre, Pará, Rondônia, Tocantins, Bahia). Há mais de 50 anos o hospital e é um dos maiores e melhores hospitais brasileiros especializados em cancerologia, atendendo por mês cerca de 30.000 pacientes de todas as idades e realiza uma média de 22 transplantes do tipo alogênico e 35 do tipo autólogo por ano.

Os protocolos de condicionamento dos pacientes para o preparo dos transplantes foi realizado de acordo com as diretrizes do Hospital:

- Leucemia mieloide crônica (LMC), leucemia mielóide aguda (LMA) e síndrome mielodisplásica (SMD), aplicou-se Bussulfano a 16 mg/kg (1 mg/kg a cada 6 hrs) do dia -7 ao dia -4 e Ciclofosfamida a 60 mg/kg (2x por dia) e Mesna (dose integral de ciclofosfamida) no dia -3 e -2 ou Bussulfano a 16 mg/kg (1 mg/kg a cada 6 hrs) e Fludarabina a 40 mg/m² (a cada 24 hrs) do dia -5 ao -2;
- Linfoma não-Hodgkin (LNH), o protocolo baseou-se em Fludarabina a 40 mg/m² (a cada 24 hrs) do dia -7 ao dia -4 e Ciclofosfamida a 60 mg/kg (2x por dia) e Mesna (dose integral de ciclofosfamida) no dia -3 e -2, enquanto que para linfoma Hodgkin (LH), apenas alterou-se Ciclofosfamida e Mesna

para Melfalano a 140 mg/m² (a cada 24 hrs), nos mesmos dias em relação ao transplante;

- Leucemia linfóide aguda (LLA), ou aplicou-se o mesmo protocolo para LMC ou então se aplicou irradiação corporal total (200 cGy) do dia -6 ao -4 e Ciclofosfamida a 60 mg/kg (2x por dia) e Mesna (dose integral de ciclofosfamida) no dia -3 e -2;
- Anemia aplástica, empregou-se apenas Ciclofosfamida 60 mg/kg (2x por dia) e Mesna (dose integral de ciclofosfamida) do dia -5 ao -2 ou Bussulfano a 16 mg/kg (1 mg/kg por via oral a cada 6 hrs) e Fludarabina a 40 mg/m² (a cada 24 hrs) dia -5 ao -2.

Para profilaxia da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) empregou-se Ciclosporina (15 mg/kg/dia) iniciado no dia -2 e Metotrexato (3 mg/kg/dia) nos dias +1, +3, +6 e +11. Para profilaxia de doença veno-oclusiva hepática (VOD), aplicou-se Enoxaparina (1,5 mg/kg/dia) e Ácido Ursodesoxicólico (8 mg/kg/dia). Desde o período de condicionamento e após o transplante, todos os pacientes também receberam profilaxia antimicrobiana baseada na aplicação de Sulfametoxazol-trimetropim (400/80 mg) (a cada 12 hrs), Fluconazol (200 mg) (a cada 12 hrs), Aciclovir (10 mg/kg de 8/8 hrs) (visando profilaxia herpesvírus do tipo 1 e 2e vírus varicela-zoster) e Albendazol (400 mg) (a cada 24 hrs), sendo que a profilaxia antimicrobiana continua até cerca de 120 dias pós transplante, com alterações na posologia.

O protocolo de terapia preemptiva de infecção ativa pelo HCMV foi administrado quando o teste de antígenoemia apresentou resultado positivo maior que duas células por duas amostras consecutivas com um intervalo de uma semana entre elas, utilizando Ganciclovir na dose de 5 mg/kg de 12/12h por 14 dias.

4.2 DELINEAMENTO E MATERIAL DE ESTUDO

Trata-se de um estudo prospectivo do tipo descritivo. Para este estudo foi proposto o monitoramento da infecção ativa por HCMV na referida população. Para tal foi proposta a coleta de uma amostra de sangue pré-transplante, de todos os

pacientes, e após o transplante, uma coleta semanal durante três meses, e após este período a cada 15 dias até completar seis meses após o transplante. Após esse período, foi realizada uma coleta de sangue mensal de cada paciente até um ano após o transplante (**Figura 6**). As amostras foram coletadas por enfermeiras especialistas em enfermagem oncológica.

Como critérios de inclusão, foi definido o tipo de transplante: transplante de células progenitoras hematopoiéticas do tipo alogênico, independentemente da doença de base que resultou no transplante. Foi estabelecido como critério de exclusão outros tipos de anomalias hematológicas em que o transplante do tipo alogênico não fosse recomendado, de acordo com critérios clínicos.

As amostras só foram coletadas após o preenchimento e assinatura do termo de consentimento de compromisso livre e esclarecido por cada paciente ou seu responsável (Apêndice 1). O projeto foi aprovado pelos comitês de ética do Hospital Araújo Jorge-ACC-GO e da Universidade Federal de Goiás (UFG) (Anexos 1 a 4).

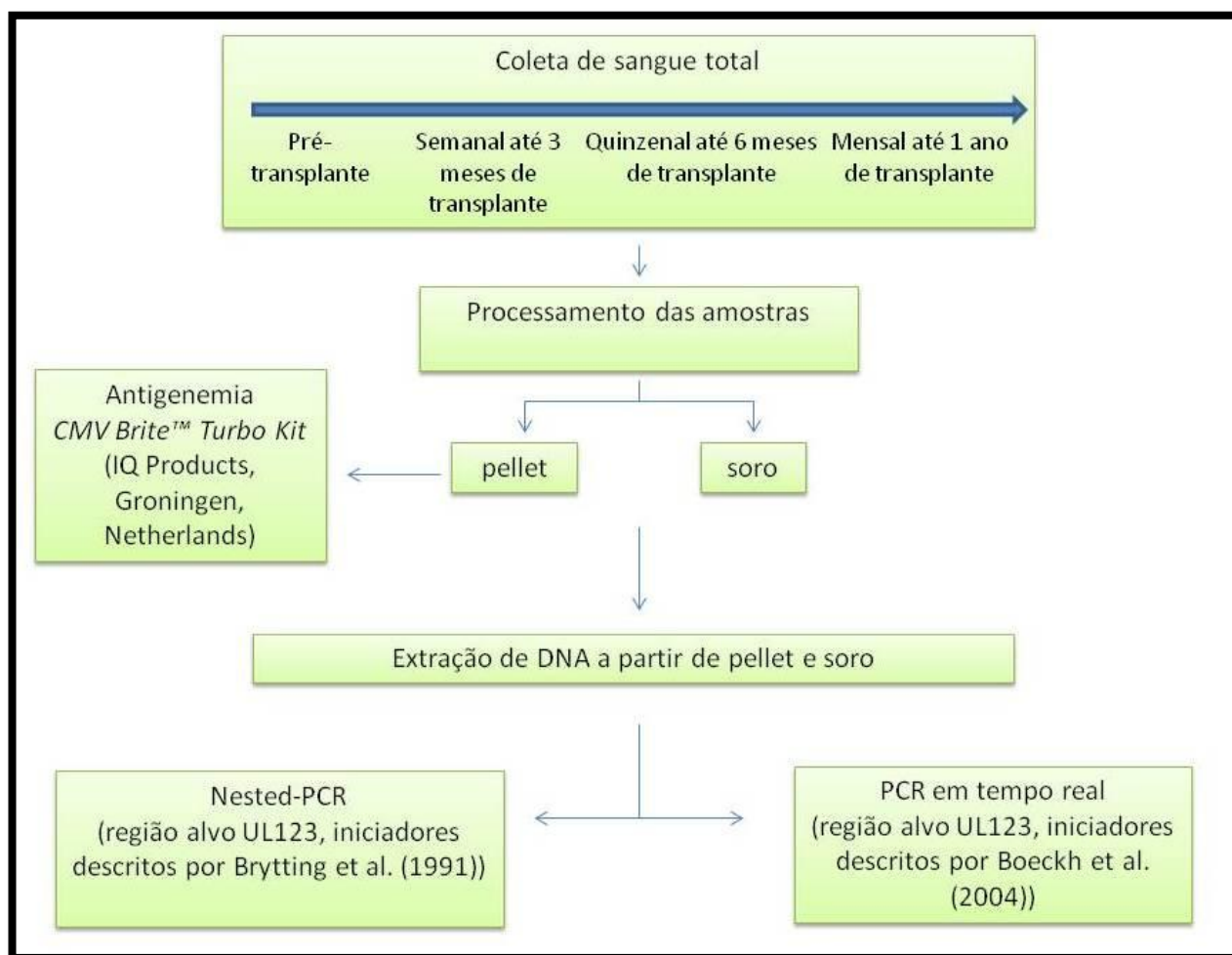


Figura 6. Fluxograma da metodologia do estudo.

4.3 CRITÉRIOS CLÍNICOS ESTABELECIDOS PARA O ESTUDO

A infecção ativa pelo HCMV foi definida como a detecção do HCMV, seja por AGM, nPCR ou qPCR, a partir de sangue total e/ou seus derivados (soro, pellet e plasma) em pacientes negativos para anticorpos anti-HCMV ou em pacientes positivos para anticorpos anti-HCMV (Manuel et al. 2009; Ljungman 2011).

A síndrome de HCMV foi considerada na presença de sintomas, como febre inexplicável ($>38^{\circ}\text{C}$), leucopenia, plaquetopenia, hepatite, enterite, retinite e pneumonia, com detecção do HCMV por qualquer uma das técnicas utilizadas, mas sem confirmação por biópsia (Azevedo et al. 2015).

4.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras de 2 mL de sangue total foram incubadas à temperatura ambiente até completa coagulação com posterior centrifugação a $1.400 \times g$ por 10 minutos (min) (Centrífuga 80-2B, Centribio) para a obtenção do soro. As amostras de soro foram então aliquotadas (duas aliquotas de cada amostra) em criotubos e armazenadas a -20°C e -80°C até o momento do uso. O sangue tratado com EDTA (dois mL) foi utilizado para o preparo das lâminas para a posterior pesquisa do antígeno pp65, no máximo até seis horas após a coleta, e o restante da amostra foi armazenado em criotubos a -80°C até o momento da extração do DNA viral.

4.5 AVALIAÇÃO DE ANTIGENEMIA

O ensaio de antigenemia (AGM) para detecção da proteína menor de matriz (pp65) do HCMV em leucócitos polimorfonucleares (PMNs), segundo descrição de Van der Bij et al. (1988), com modificações segundo o protocolo do kit utilizado, *CMV Brite™ Turbo Kit* (IQ Products, Groningen, Netherlands).

4.5.1 Silanização das lâminas

As lâminas foram silanizadas para melhorar a aderência das células “plotadas” nas lâminas, fazendo com que estas não saíssem durante as lavagens exigidas pela metodologia. O processo de silanização foi realizado de acordo com o protocolo a seguir, sendo que no dia anterior à silanização, as lâminas foram armazenadas submersas em etanol P.A. (Merck, Darmstadt, Germany).

As lâminas foram escorridas do etanol, e imersas em solução de silano a 3% (3-Aminopropiltriethoxisilano, Sigma®, Saint Louis, Missouri, USA) em acetona P.A. (Sigma®, Saint Louis, Missouri, USA) por 3 min. As lâminas foram escorridas e imersas em acetona P.A. por 3 min. As lâminas foram colocadas para secagem em estufa a 56°C por 12 a 14 horas. No dia seguinte, as lâminas foram guardadas em recipiente com tampa e mantidas a temperatura ambiente.

4.6 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR) SEGUIDA DE NESTED-PCR PARA PESQUISA DE REGIÃO GENÔMICA PARCIAL (UL123) DO CITOMEGALOVÍRUS HUMANO

4.6.1 Extração de DNA a partir de pellet e soro

As células provenientes da lise de hemácias e diluídas em PBS foram centrifugadas a 3600 x *g* por 10 min (Micro High Speed Centrifuge, Vision Scientific) e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 500 µL do reagente Brazol (LGC Biotecnologia, Cotia, São Paulo, Brasil) para cada 2 x 10⁶ células/mL. Agitou-se os tubos por inversão seguido por 2 min em vórtex e adicionou-se 250 µL de clorofórmio (Merck, Darmstadt, Germany) gelado. Agitou-se novamente em vórtex por 1 min. Os tubos foram centrifugados a 12.000 x *g* por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novo tubo contendo 500 µL de etanol P.A. (Merck, Darmstadt, Germany) gelado e o agitou-se os tubos por inversão manual por 2 min. Os tubos foram centrifugados a 12.000 x *g* por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o pellet lavado em 500 µL de etanol (Merck, Darmstadt, Germany) 70% gelado, homogeneizou-se por inversão e centrifugou-se a 12.000 x *g* por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e os tubos colocados para secar. O pellet foi dissolvido em 20 µL de água MQ estéril.

Para extração do DNA proveniente do soro dos pacientes, foi realizada a mesma metodologia, alterando-se o fato de ter sido feita uma pré-diluição do soro a 1:2 em água MQ estéril, totalizando 100 µL de soro diluído e o Brazol (LGC Biotecnologia, Cotia, São Paulo, Brasil) foi adicionado em um volume três vezes maior do que o soro diluído, ou seja, 300 µL do reagente.

4.6.2 PCR consensual

Para a amplificação do fragmento consensual de região parcial do genoma da pesquisa de HCMV, a PCR foi realizada conforme descrição de Brytting et al (1991), com modificações. Para cada amostra, 2,5 µL de DNA (apenas para a amostra utilizada como controle que foi aplicado 1 µL) foi adicionado ao tubo para

PCR (tubo plástico de 0,2µl) contendo mix de reação que foi composto de 12,5 µL de GoTaq Colorless Master Mix 2X (Promega corporation, *Madison, Wisconsin, USA*) (50 units/ml de *Taq* DNA polymerase, Reaction Buffer (pH 8.5), 400µM dATP, 400µM dGTP, 400µM dCTP, 400µM dTTP e 3mM MgCl₂), 0,24 µM de cada iniciador MIE4 e MIE5 (Invitrogen™ Life Technologies, Foster City, California, USA) e água ultrapura para volume final de 25 µl. Em todas as reações foi utilizado um controle positivo (amostra positiva para HCMV) e um controle negativo (amostra negativa para HCMV).

4.6.3 Nested-PCR

A Nested-PCR (nPCR) foi realizada nas mesmas condições descritas para a PCR, com modificações como a definição de temperatura ótima para anelamento dos primers através de um gradiente, adequação de concentrações dos reagentes e diluição de amostras a fim de controlar para inibição. A concentração de cada iniciador interno IE1 e IE2 (Invitrogen™ Life Technologies, Foster City, California, USA (Quadro 1) foi de 0,48 µM e, uma alíquota do produto da 1ª PCR (PCR consensual) (0,5 µL) foi utilizada como amostra para a segunda amplificação. Todas as amostras negativas, tanto do DNA a partir do pellet quanto do soro, foram repetidas na diluição 1/10 a fim de controlar a presença de inibidores da reação. Em todas as reações foi utilizado um controle negativo. Todas as etapas dos testes moleculares foram realizadas em cabines de biossegurança distintas e todos os cuidados foram tomados para se evitar a contaminação entre amostras.

Cerca de 10,0 µL do produto da nPCR acrescidos de 2,0 µL do tampão de amostras (Azul de bromofenol, Xilenocianol e Glicerol) foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose (Invitrogen™ Life Technologies, Foster City, California, USA) a 1,5% com 0,5 mg/ml de brometo de etídio por aproximadamente 40 min a 100 volts em tampão TBE 0,5X (Tris/Borato/EDTA) e visualizados em transiluminador (Gel Doc™ XR+ System, Bio-Rad). Os produtos (162 pb) foram comparados a um padrão de peso molecular de 100 pb (Jena Bioscience, Jena, Germany).

Quadro 1 – Iniciadores empregados na pesquisa de HCMV.

Sigla	Sequência	Sentido	*Localização
MIE4	5' CCAAGCGGCCTCTGATAACCAAGCC 3'	Antisense	172463-172439
MIE5	5' CAGCACCATCCTCCTCTTCCTCTGG 3'	Sense	172029-172053
IE1	5' CCACCGCTGGTGTGTCAGCTCC 3'	Antisense	172268-172249
IE2	5' CCCGCTCCTCCTGAGCACCC 3'	Sense	172107-172126

Sequências de primers descritas por Brytting et al (1991). *Localização referente ao isolado AD169 (ID: FJ527563.1).

O par de iniciadores MIE amplifica uma sequência de 435 pares de bases (pb) do DNA do HCMV, que corresponde a região UL123 exon 4, que codifica parte do antígeno *Major immediate early*, O par de iniciadores denominado IE amplifica uma sequência interna à sequência já amplificada pelo par de iniciadores MIE, uma sequência alvo de 162 pb que codifica para uma porção do gene *Immediate early*.

Para a amplificação do fragmento alvo, foram programados 30 ciclos em termociclador Swift™ Maxi (Esco):

PCR

Desnaturação inicial:	94°C – 5 min;	
Desnaturação:	94°C – 1 min;	} 30 ciclos
Anelamento:	62°C – 1 min;	
Extensão:	72°C – 1 min;	
Extensão final:	72°C – 7 min.	

Nested-PCR:

Desnaturação inicial:	94°C – 5 min;	
Desnaturação:	94°C – 40 segundos;	} 30 ciclos
Anelamento:	62°C – 40 segundos;	
Extensão:	72°C – 1 min.	
Extensão final:	72°C – 7 min.	

4.7 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL SYBR Green

4.7.1 Curva padrão para realização do ensaio de qPCR

O produto selecionado para ser utilizado na clonagem foi obtido por meio de reação com iniciadores sintetizados com base na sequência da região UL123 do HMCV (**Quadro 2**). A reação foi realizada nas seguintes condições: 2,0 mM de cloreto de magnésio, 0,4 mM de mix de desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,48 µM de cada primer UL123ex4 F e UL123ex4 R (Invitrogen™ Life Technologies, Foster City, California, USA), tampão da *Taq* DNA polimerase 10x, 0,12 unidade de *Taq* DNA polimerase (Sigma®, Saint Louis, Missouri, USA) e água MQ estéril para completar volume final de 25 µL de reação. As condições para a ciclagem foram as seguintes:

Desnaturação inicial:	95°C – 10 min	
Desnaturação:	95°C – 30 seg	} 40 ciclos
Anelamento:	60°C – 1 min	
Extensão:	72°C – 30 seg	
Extensão final:	72°C – 10 min	

O produto amplificado (84 pb) foi submetido à corrida eletroforética em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio. O fragmento foi então purificado utilizando-se o kit *Illustra™ ExoProStar™ 1-Step* (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), conforme as especificações do fabricante.

Quadro 2 - Sequência dos iniciadores empregados na reação de qPCR com SYBR Green

Sigla	Sequência	Localização*
UL123ex4 F	5' TCCCGCTTATCCTCRGGTACA 3'	172943-172963
UL123ex4R	5' TGAGCCTTTTCGAGGASATGAA 3'	173026-173006

Sequências de primers descritas por Boeckh et al. (2004a). *Localização referente ao isolado AD169 (ID: FJ527563.1).

A clonagem foi realizada conforme descrito em Green & Sambrook (2012). As células competentes utilizadas foram cultivadas a partir de uma alíquota de célula competente *E. coli* da linhagem XL1Blue que foi gentilmente cedida pelo professor André Kipnis do Laboratório de Bacteriologia Molecular do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública.

Após a clonagem, com a obtenção do plasmídeo recombinante pGEM-HCMV (**Figura 7**), estas bactérias foram propagadas em meio Luria-Bertani (LB) sólido contendo ampicilina na concentração final de 100 µg/mL. As colônias isoladas foram cultivadas em meio LB líquido, ao qual foi adicionado ampicilina na concentração final de 100 µg/mL. Um volume de 2 mL de bactérias em meio LB foi utilizado para a extração do DNA plasmidial pelo protocolo de lise alcalina (Green & Sambrook 2012) com posterior armazenamento a – 20 °C.

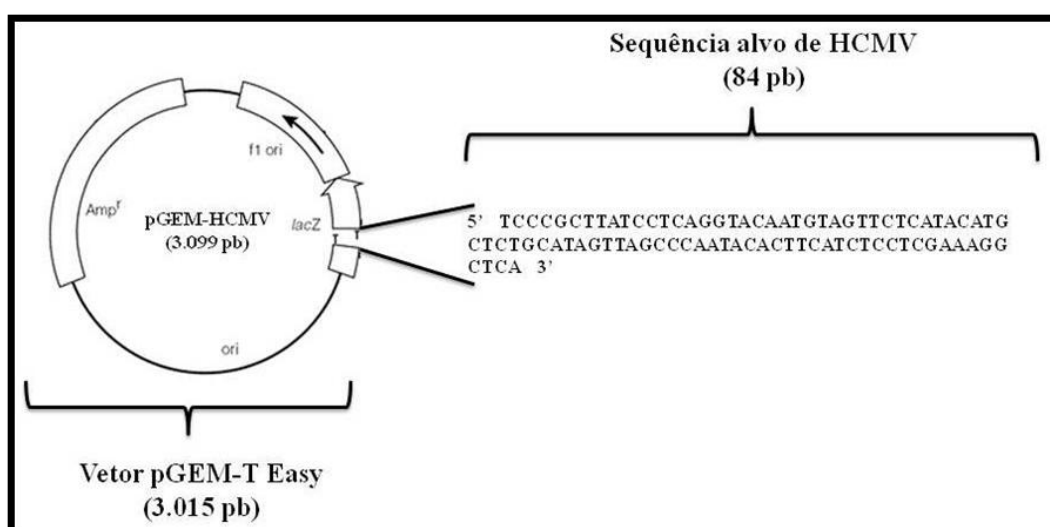


Figura 7 – Construção do plasmídeo recombinante pGEM-HCMV para ser utilizado na curva padrão de SYBR Green.

4.7.2 qPCR SYBR Green para HCMV

A reação de qPCR para HCMV foi realizada em termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen) nas seguintes condições: 5 µL do mix iQ™ SYBR® Green Supermix 2x (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) (iTaq DNA polimerase, dNTPs, MgCl₂, corante SYBR® Green I Dye, intensificadores, estabilizadores e fluoresceína); 0,5 µM de cada primer UL123ex4 F e UL123ex4 R (Invitrogen™ life technologies, Foster City, California, USA), 1,0 µL de plasmídeo recombinante, na construção da curva padrão e água MQ estéril para completar volume final de 10 µL de reação. A mesma reação foi realizada para as amostras, sendo estas diluídas na fração 1:10 em água MQ estéril. As condições para a ciclagem foram as seguintes:

Desnaturação inicial:	95°C – 3 min	
Desnaturação:	94°C – 45 seg	} 45 ciclos
Anelamento/Extensão:	62°C – 50 seg	

Para avaliação da temperatura de dissociação dos transcritos específicos, bem como para a verificação de formação de produtos inespecíficos foi realizada a curva de *melting*. Para esta etapa, o aparelho foi ajustado para iniciar a temperatura em 60°C e finalizando a 90°C, com variação de 0,5°C a cada 50 seg.

4.8 PURIFICAÇÃO, SEQUENCIAMENTO GENÔMICO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS

Quatro amostras positivas para HCMV, provenientes de quatro pacientes, foram selecionadas para sequenciamento genômico. As amostras foram purificadas a partir dos produtos resultantes da nPCR, utilizando-se isopropanol a 65% e etanol a 70%. De forma breve, foram adicionados dois volumes de isopropanol a 65% no produto obtido, seguido de centrifugação por quinze minutos a 12.000 rpm/10°C. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o tubo foi invertido em papel toalha. Adicionou-se mais dois volumes de etanol a 70% e centrifugou-se por quinze

minutos a 12.000 rpm/10°C. O sobrenadante foi desprezado novamente e os tubos foram invertidos em papel toalha durante uma hora ou até ficarem completamente secos e, após esta etapa, foram adicionados 15µL de água milliQ.

As amostras purificadas foram submetidas ao sequenciamento genômico, utilizando-se as mesmas condições e pares de iniciadores da reação de nPCR, em sequenciador automático (DNA ABI PRISM 3130, Applied Biosystems), e o sistema de reação de sequenciamento *Big Dye Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Foster City, CA).

As sequências obtidas foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados de sequências genéticas (*Genbank*) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) para confirmação da especificidade das reações moleculares para HCMV.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o *software* Analyze-it. As frequências para sensibilidade e especificidade foram determinadas utilizando o score de Wilson (intervalo de confiança de 95%). Níveis de concordância entre as técnicas utilizadas foram avaliados através de coeficiente *Kappa* de concordância (intervalo de confiança de 95%), sendo que valores acima de 0,75 indicam uma forte concordância; valores entre 0,60 e 0,75 representam boa concordância; valores entre 0,40 e 0,59 representam moderada concordância e valores abaixo de 0,40 refletem baixa concordância.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

Participaram do protocolo de acompanhamento 21 receptores alogênicos de células progenitoras hematopoiéticas, sendo dois destes receptores do tipo haploidêntico de transplante alogênico. Dos 21 receptores, 66,7% (14) eram do sexo masculino e 33,3% (sete) do sexo feminino. A idade dos receptores variou de 5 a 65 anos (média 41,8 anos), sendo que dos 21 pacientes três eram crianças. Dos 21 transplantes, 71,5% (15) tiveram o sangue periférico como fonte de células progenitoras e 28,5% (seis) a medula óssea. A leucemia linfóide aguda foi a doença de base mais comum e o tratamento para o condicionamento com Bussulfano e Ciclofosfamida foi o mais utilizado. Dados dos prontuários médicos demonstraram que todos os pacientes tiveram resultado de negativo para sorologia de fase aguda (pesquisa de IgM) para HCMV e todos, com exceção de um paciente, tiveram resultados de sorologia positivos para IgG anti-HCMV (dados dos prontuários médicos foram realizados cerca de três meses antes do transplante) (**Tabela 1**).

Tabela 1. Características da população de estudo

Características	
<i>Pacientes</i>	21
<i>Idade – média em anos (variação)</i>	41.8 (5-65)
<i>Sexo - masculino/feminino</i>	14/7
<i>Doença de Base - n (%)</i>	
Leucemia Linfóide Aguda (LLA)	5 (24.0)
Leucemia Mielóide Aguda (LMA)	4 (19.0)
Leucemia Mielóide Crônica (LMC)	2 (9.5)
Linfoma não-Hodgkin (LNH)	2 (9.5)
Linfoma Hodgkin (LH)	2 (9.5)
Anemia aplástica (AA)	2 (9.5)
<i>Fonte de células progenitoras - n (%)</i>	
Sangue periférico	15 (71.5)
Medula óssea	6 (28.5)
<i>Regime de condicionamento - n (%)</i>	
Mieloablativo	
BU + Cy	10 (47.6)
BU + FLU	1 (4.8)
TBI + Cy	1 (4.8)
Não-mieloablativo	
FLU + Melf	3 (14.3)
FLU + Cy	6 (28.5)

<i>Sorostatus para HCMV pré-transplante - n (%)</i>	
D+/R+	20 (95.2)
D+/R-	1 (4.8)
<i>Profilaxia para DECH - n (%)</i>	
CsP + MTX	21 (100)
<i>DECH aguda - n (%)</i>	
	4 (19.0)
<i>Óbitos - n (%)</i>	
	6 (28.6)

Legenda: **BU:** Bussulfano; **Cy:** Ciclofosfamida; **FLU:** Fludarabina; **Melf:** Melfalano; **TBI:** Irradiação de Corpo Total; **D:** Doador; **R:** Receptor; **CsP:** Ciclosporina; **MTX:** Metotrexato.

5.2 DETECÇÃO DE INFECÇÃO ATIVA POR CITOMEGALOVÍRUS HUMANO

Para a pesquisa de infecção ativa pelo HCMV por AGM, nPCR e qPCR foram testadas 180 amostras de sangue, obtidas durante o período de monitoramento (coleta de uma amostra de sangue pré-transplante, e após o transplante, uma coleta semanal durante três meses, e após este período a cada 15 dias até completar seis meses após o transplante) provenientes de todos os 21 pacientes (média de 8 amostras por paciente).

A infecção ativa pelo HCMV foi detectada por pelo menos uma das três metodologias em 95,2% dos pacientes (20/21), 85,7% dos pacientes (18/20) tiveram pelo menos dois resultados positivos por AGM e/ou PCR (nPCR ou qPCR) em amostras coletadas consecutivamente. As amostras consideradas positivas por AGM foram aquelas que apresentaram pelo menos uma célula corada em 2×10^5 células, as que foram consideradas positivas por qPCR foram aquelas com *cycle threshold* igual ou inferior a 38, o que corresponde a aproximadamente 100 cópias genômicas/mL (cg/mL). As quatro amostras selecionadas para sequenciamento genômico apresentaram 98% de identidade nucleotídica com a região parcial UL123 exon 4 do HCMV (código de acesso GenBank: M95636.1).

5.2.1 Comparação da detecção de infecção ativa pelo HCMV por AGM, nPCR e qPCR

Do total de 20 pacientes positivos para infecção ativa por HCMV, 85% foram positivos pelas três metodologias e 15% foram positivos apenas por AGM e qPCR, ou seja, estes foram negativos por nPCR (**Tabela 2**). Quando o tempo em relação ao transplante foi considerado, uma porcentagem considerável (45%) dos pacientes apresentou positividade antes do transplante. A maior positividade para HCMV ocorreu no primeiro trimestre após o transplante, com uma maior frequência de positividade observada nos dias 7, 14 e 35 pós-transplante, independente da metodologia utilizada. A positividade para HCMV por AGM precedeu a positividade por nPCR em até 21 dias (de 0 a 21 dias, média de 7 dias) e a positividade para HCMV por qPCR precedeu a positividade por AGM em -4 a 7 DPT (média de 5 dias). Das 180 amostras de sangue periférico provenientes dos 21 receptores incluídos no estudo, 68,8% foram positivas por AGM, 42,7% das amostras foram positivas pela metodologia de nPCR e 83,3% das amostras foram positivas por qPCR (**Figura 8**). A comparação dos resultados da positividade por AGM com a positividade por qPCR mostrou uma boa concordância entre o número de pacientes positivos e negativos obtidos por estas duas técnicas ($kappa = 0,65$) (**Tabela 2**).

Tabela 2. Comparação dos resultados de AGM, nPCR e qPCR das amostras de sangue dos 21 pacientes participantes do estudo.

	Antigenemia*		TOTAL	Kappa (DP)
	Positivo	Negativo		
Nested-PCR				
Positivo	17	0	17	0,47
Negativo	3	1	4	(0,37 – 0,58)
Total	20	1	21	
PCR em tempo real				
Positivo	20	0	20	0,65
Negativo	0	1	1	(0,53 – 0,77)
Total	20	1	21	

Legenda: *Antigenemia adotada como técnica de referência. Índice kappa obtido com intervalo de confiança (IC) de 95%; DP: desvio padrão.

O número de células positivas para HCMV por AGM variou de uma a 16 células, sendo que a média de células positivas por AGM foi de 1,5 células positivas/ 2×10^5 células. A carga viral no pellet variou de $1,20 \times 10^2$ a $3,90 \times 10^7$ cg/mL (média de $2,70 \times 10^4$ cg/mL), já no soro, a carga viral variou entre $1,70 \times 10^2$ e $3,90 \times 10^5$ cg/mL (média de $4,50 \times 10^3$ cg/mL). A partir da média da carga viral e o número de células positivas na AGM, foi estimado que uma célula positiva por AGM correspondeu a $1,15 \times 10^3$ cg/mL por qPCR em amostra de pellet. A sensibilidade de detecção da nPCR foi estimada em $2,30 \times 10^3$ cg/mL de HCMV.

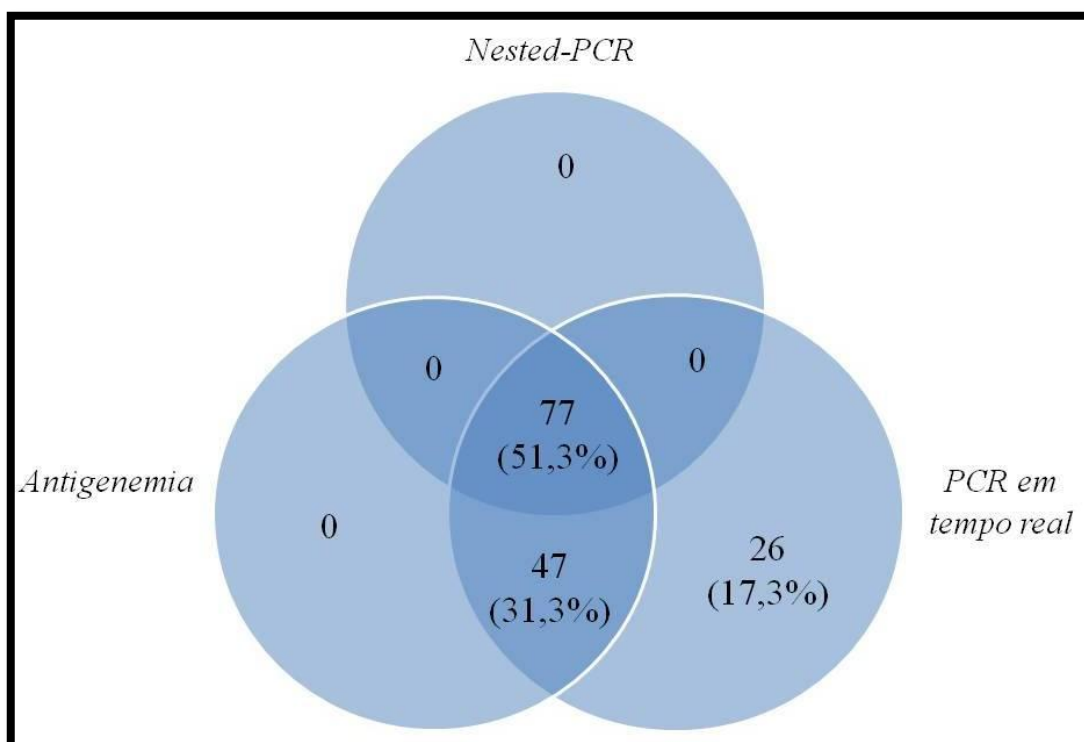


Figura 8. Comparação do percentual de positividade para HCMV por diferentes metodologias, de amostras de sangue dos 21 pacientes. Todos os testes foram realizados a partir de alíquotas da mesma amostra de sangue.

Quando a positividade para HCMV por diferentes metodologias é comparada, considerando a AGM como técnica padrão-ouro, a nPCR apresentou sensibilidade de 58%, especificidade de 100%, enquanto que a qPCR exibiu sensibilidade e especificidade de 100% e 58%, respectivamente.

5.2.2 Comparação de sensibilidade das técnicas moleculares em relação ao tipo de amostra clínica

Em relação à detecção de HCMV por nPCR utilizando pellet ou soro dos 21 pacientes, 81% dos pacientes foram positivos por nPCR em amostras de pellet enquanto que destes, apenas 64,7% dos pacientes também foram positivos por nPCR em amostras de soro, apresentando baixa concordância ($kappa$: 0,33; IC 95%). Em relação à detecção pela qPCR utilizando pellet ou soro, um total de 95,3% dos pacientes foram positivos por qPCR, sendo que das 150 amostras de sangue/soro destes pacientes que foram positivas para HCMV por qPCR, 37,3% das amostras

foram positivas somente na amostra de pellet e 5,3% somente na de soro. Portanto, foi possível detectar o vírus por qPCR em 94,6% das amostras de pellet de 20 pacientes, enquanto que no soro, foi possível detectar HCMV em 62,7% das amostras de 19 pacientes, o que demonstrou baixa correlação dos resultados da técnica com os dois tipos de amostra clínica (*kappa*: 0,32; IC 95%) (**Tabela 3**).

Tabela 3. Resultados comparativos entre detecção de infecção ativa por HCMV por nPCR e qPCR em relação ao tipo de amostra clínica dos 21 pacientes analisados.

Técnicas utilizadas	qPCR de pellet		qPCR de soro	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
nPCR de pellet				
Positivo	17	0	17	0
Negativo	3	1	2	2
Total	20	1	19	2
nPCR de soro				
Positivo	11	0	11	0
Negativo	9	1	8	2
Total	20	1	19	2

5.2.3 Infecção ativa por HCMV em relação ao tipo de fonte de células progenitoras hematopoiéticas e ao tipo de tratamento para condicionamento pré-transplante

Em relação à fonte de células progenitoras hematopoiéticas, dos 21 pacientes, o único paciente negativo para HCMV por todas as metodologias utilizadas foi um receptor de células progenitoras provenientes do sangue periférico (CPSP). No entanto, os receptores de CPSP apresentaram, em geral, maior frequência de resultados positivos consecutivos por AGM, variando entre quatro e 10 resultados positivos consecutivos, e maior carga viral, variando entre 2,00E+02 a 3,90E+07 cg/mL, em relação àqueles receptores de medula óssea (MO), que

apresentaram de quatro a seis resultados positivos consecutivos por AGM e carga viral entre $1,20\text{E}+02$ e $2,40\text{E}+07$ cg/mL.

Em relação ao tipo de tratamento para condicionamento pré-transplante, dos 21 pacientes, o único negativo em todas as técnicas para infecção ativa por HCMV recebeu tratamento constituído de irradiação de corpo total e ciclofosfamida (TBI + Cy), entretanto, os outros 11 pacientes com tratamento mieloablativo apresentaram maior frequência de resultados positivos consecutivos por AGM, variando entre cinco e 10 resultados positivos consecutivos, e maior carga viral, variando entre $4,20\text{E}+02$ a $3,90\text{E}+07$ cg/mL, em relação aos pacientes com o tratamento não-mieloablativo.

5.3 COMPLICAÇÕES CLÍNICAS ASSOCIADAS À OCORRÊNCIA DE INFECÇÃO ATIVA POR HCMV

A maior taxa de infecção ativa por HCMV foi observada no primeiro trimestre após o transplante, principalmente durante o primeiro e segundo mês pós-transplante (7-60 dias) com uma percentagem de infecção ativa por HCMV de 65%. Ademais, 60% dos pacientes que tiveram infecção ativa por HCMV também desenvolveram a síndrome de HCMV, sendo a pancitopenia a manifestação clínica/laboratorial mais comum, inclusive nos dias de maior positividade para a infecção ativa por HCMV (7 e 14 dias pós-transplante).

Desses 20 pacientes, 30% que apresentaram infecção ativa por HCMV receberam tratamento antiviral preemptivo, sendo que estes apresentaram recorrência da infecção ativa mesmo após o tratamento, 45% tiveram infecção oportunista por *Candida* sp. ou *Aspergillus* sp., 20% apresentaram a ocorrência DECH aguda e 30% foram a óbito. Um paciente provavelmente teve doença sistêmica por HCMV, apresentando pneumopatia grave, mas não houve confirmação por autópsia. Este paciente veio a óbito 29 dias após o transplante (**Tabela 4**) (**Figura 9**).

Tabela 4. Ocorrência de complicações vinculadas ao transplante em pacientes com e sem síndrome de HCMV.

Com síndrome de HCMV		Sem síndrome de HCMV		
	Ocorrência (%)	Variação (Média) (DPT)	Ocorrência (%)	Variação (Média) (DPT)
DECH aguda	33.3	45 – 173 (78.0)	0	-
Infecções oportunistas	58.3	06 – 22 (15.3)	16.7	4 – 12 (8.0)
Óbito	33.3	18 – 135 (58.4)	16.7	29 – 130 (79.5)

Legenda: DPT: dias pós transplante.

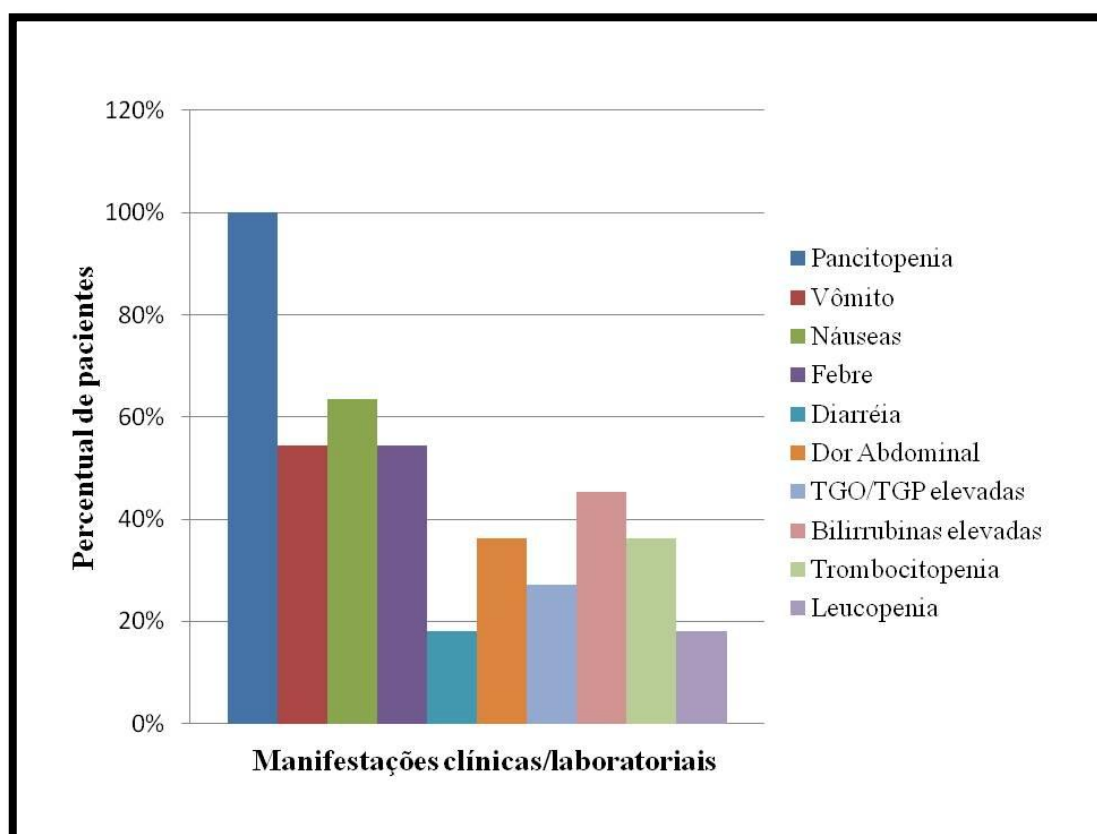


Figura 9. Percentual de pacientes que apresentaram manifestações clínicas/laboratoriais características da síndrome de HCMV. Legenda: TGO: Transaminase glutâmico-oxalacética; TGP: Transaminase glutâmica-pirúvica.

Nos doze pacientes que apresentaram a síndrome de HCMV, com mais de uma das manifestações clínicas/laboratoriais em associação, sendo trombocitopenia, náuseas e vômitos a associação mais frequente, encontrada em 33,3% dos pacientes, seguida por pancitopenia e febre, assim como por pancitopenia, náuseas, vômitos, TGO, TGP e bilirrubinas elevados, ambas as associações encontradas em 16,6% dos pacientes. As outras formas de associações encontradas, cada uma, em um paciente foram: pancitopenia, náuseas e vômitos (paciente 1); pancitopenia, diarreia e náuseas (paciente 2); trombocitopenia e dor abdominal (paciente 4); pancitopenia, dor abdominal e febre (paciente 7); leucopenia, vômito e diarreia (paciente 11); pancitopenia, TGO e TGP elevados (paciente 15).

5.3.1 Manifestações clínicas/laboratoriais da síndrome de HCMV em relação às técnicas utilizadas

Em relação à qPCR, as manifestações tanto clínicas quanto laboratoriais surgiram nos doze pacientes a partir de cargas virais consideradas baixas, correspondendo a $1,70E+02$ cg/mL. As manifestações que surgiram em pacientes com carga viral considerada média, foram as manifestações laboratoriais hepáticas, aparecendo em 41,6% dos pacientes a partir de $2,50E+03$ cg/mL e diarreia em 16,6% dos pacientes, a partir de $5,70E+03$ cg/mL. Entretanto, a dor abdominal foi a única manifestação clínica que se apresentou em pacientes com carga viral considerada alta (acima de $3,30E+05$ cg/mL) em 33,3% dos pacientes. Todas as outras manifestações clínicas/laboratoriais surgiram com carga viral baixa variando entre $1,70E+02$ e $5,30E+02$ cg/mL, sendo a pancitopenia a manifestação mais frequente nos doze pacientes com a carga viral mais baixa ($1,70E+02$ cg/mL) (**Tabela 5**).

Quando avaliamos a positividade para HCMV por AGM em relação aos sintomas característicos da síndrome por HCMV observou-se que nos 12 pacientes, que apresentaram pelo menos uma célula positiva/ 2×10^5 células, a pancitopenia foi a alteração laboratorial mais frequente, ocorrendo em 83,3% dos pacientes. A febre foi a manifestação clínica mais frequente, sendo detectada em 33,4% dos pacientes, que

pelo menos duas células positivas para o antígeno viral. Nos pacientes com mais de três células positivas para o antígeno a dor abdominal foi o sintoma mais frequente (33,4% dos pacientes). Em relação à nPCR, apenas três das manifestações clínicas/laboratoriais foram observadas em pacientes positivos por esta técnica molecular. A pancitopenia e a trombocitopenia foram as manifestações mais frequentemente observadas em pacientes positivos para nPCR, correspondendo a 41,6% dos pacientes cada uma e a febre, a manifestação mais incomum, ocorrendo em apenas um paciente.

Tabela 5. Correlação da carga viral no pellet com manifestações clínicas/laboratoriais da síndrome de HCMV.

Carga viral (cg/mL)	Manifestações clínicas/laboratoriais (% pacientes)
<i>Baixa</i> (1,70E+02 – 2,49E+03)	Pancitopenia (83.3)
	Náusea (63.6)
	Febre (54.5)
	Vômito (54.5)
	Trombocitopenia (36.3)
	Leucopenia (18.1)
<i>Média</i> (2,50E+03 – 3,29E+05)	Níveis elevados de TGO e TGP (41.6)
	Diarreia (16.6)
<i>Alta</i> ($\geq 3,30E+05$)	Dor Abdominal (33.4)

Legenda: TGO: Transaminase glutâmico-oxalacética; TGP: Transaminase glutâmica-pirúvica.

5.4 ÓBITOS OCORRIDOS DURANTE O SEGUIMENTO DOS PACIENTES

No decorrer do estudo, dos 21 pacientes monitorados, 28,5% foram a óbito, sendo que 66,6% destes apresentaram a síndrome de HCMV e foram receptores de CPSP. De maneira geral, todos os seis pacientes apresentaram positividade para infecção ativa por HCMV durante todo o período de acompanhamento e 83,3% destes pacientes foram positivos para infecção ativa por HCMV no período pré-transplante e também demonstraram positividade prolongada por pelo menos duas semanas com cargas virais elevadas, variando entre $5,30E+04$ e $2,40E+07$. Um achado a ser considerado é o fato de que todos os quatro pacientes que apresentaram a forma aguda da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) (se manifestando principalmente no fígado e pele), além de apresentarem positividade para a infecção ativa por HCMV, desenvolveram a síndrome do HCMV e foram a óbito.

Todos os seis pacientes tiveram amostras positivas por qPCR e AGM positivas algumas semanas antes de sua morte, sendo que cinco destes permaneceram HCMV-positivos com o aumento de carga viral até o óbito. Os resultados de AGM e nPCR foram negativos e a carga viral diminuiu expressivamente no quarto paciente. Apesar disso, não houve diferença entre o tempo de positividade e carga viral entre estes pacientes que vieram a óbito e os que não foram a óbito. Todos estes pacientes foram tratados com antibióticos de amplo espectro, esteróides e ganciclovir, mas evoluíram a óbito, sem comprovação por autópsia da causa exata. As causas de óbito relatadas foram: pneumonia não-especificada, insuficiência respiratória, choque séptico, septicemia, arritmia e aplasia de MO.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, a infecção ativa pelo HCMV foi detectada por pelo menos uma das três metodologias utilizadas em 95,2% (20/21) dos pacientes, sendo que 45% destes pacientes apresentaram positividade antes do transplante. A AGM e a qPCR apresentaram boa correlação, diferentemente da nPCR, que apresentou menor sensibilidade quando comparada às outras duas metodologias. Em relação à amostra clínica, as técnicas moleculares apresentaram maior sensibilidade quando o pellet foi utilizado, em detrimento do soro.

Quanto às características demográficas da população, a maioria (66,7%) era do sexo masculino, e a média de idade dos receptores foi de 41,8 anos, sendo somente dois pacientes considerados crianças. Estudos mostram que a maioria dos receptores de transplante de CPH são homens (aproximadamente 63%) com média de idade de 45 anos (Ruell et al. 2007; Takenaka et al. 2015).

A maioria (71,5%) dos pacientes teve o sangue periférico como fonte de células e leucemia linfóide aguda foi a indicação mais comum para o transplante. O condicionamento com Bussulfano e Ciclofosfamida foi o mais utilizado. Em 2006, o Centro Internacional de Pesquisa sobre Transplante de Sangue e Medula Óssea (IBMTR) obteve dados de mais de 400 centros de transplante em todo o mundo e reportou que para AloTCPH, a leucemia mielóide aguda é a indicação mais comum (Hatzimichael & Tuthill 2010). O transplante do tipo autólogo continua a ser o mais realizado, mas em 2012, pelo menos 42% dos TCPH foram do tipo alogênico (Passweg et al. 2014). O TCPH está associado significativamente com morbidade e mortalidade tanto precoce (<100 dias pós-transplante) quanto tardiamente (>100 dias após o transplante). Cerca de 4% dos pacientes morrem dentro de 100 dias de TCPH autólogo ou alogênico (Gribben et al. 2005).

Todos os pacientes participantes foram positivos para sorologia (pesquisa de IgG) para HCMV, de acordo com prontuários médicos. Estudos de soroprevalência mundial mostram que o HCMV possui distribuição global e elevados índices de soroprevalência na população adulta, sendo que cerca de 40-100% da população apresenta anticorpos séricos anti-HCMV (Freeman Jr 2009; Marshall & Koch 2009). Em imunocomprometidos este fato é preocupante e deve ser acompanhado com

atenção, pois o HCMV pode causar doença grave nesses pacientes, seja por infecção primária ou por reativação da replicação viral (Rafailidis et al. 2008).

Atualmente, não há consenso sobre qual teste laboratorial e qual amostra clínica deve ser utilizada como padrão ouro para que o diagnóstico de infecção ativa por HCMV seja feito antes do aparecimento das manifestações clínicas. Neste estudo, os objetivos contemplaram a comparação da infecção ativa por HCMV por três metodologias diferentes, assim como diferentes amostras clínicas para as técnicas moleculares. Dos 21 pacientes, 95,2% (20) foram positivos para infecção ativa por HCMV por qualquer uma das técnicas utilizadas, sendo que na maioria dos estudos, a percentagem de pacientes com infecção ativa varia de 70 a 80% (Qiu et al. 2012; Li et al. 2013; Ceballos et al. 2014). Entretanto, nossos resultados corroboram com os resultados de Peres e colaboradores (2010), que ao investigar a infecção ativa em AloTCPH, encontraram resultados positivos em 27 de 30 pacientes, o que corresponde a 90% dos pacientes analisados. O elevado número de pacientes com infecção ativa neste estudo e no de Peres pode ser explicado pelo fato dos pacientes estarem classificados no grupo de alto risco (positivos para anticorpos anti-HCMV antes do transplante) e também, aos tipos de condicionamento pré-transplante, a profilaxia para DECH, o grau de imunossupressão e a duração deste e a não aplicação de tratamento profilático com ganciclovir desde o período pré-transplante (Szczepura et al. 2006; George et al. 2010).

Neste estudo, os pacientes receptores de AloTCPH foram monitorados para infecção por HCMV, desde o período de condicionamento (antes do transplante) até cerca de um ano após o transplante. Nossos resultados mostram que, independentemente da técnica utilizada para a pesquisa de HCMV, aproximadamente 50% dos pacientes foram positivos para infecção ativa por HCMV antes do transplante. Dados da literatura revelam que a maioria dos centros de transplante realizam o acompanhamento (pesquisa de HCMV) a partir do dia da infusão (D0) até o dia +100 (Allice et al. 2008), entretanto, poucos trabalhos avaliam a infecção ativa de HCMV no período pré-transplante. Yang e colaboradores (2012), ao realizar monitoramento de reativação de HCMV antes de AutoTCPH, observaram através de seus resultados que a infecção ativa pode ocorrer com frequência, sendo detectada em 43,2% de seus pacientes e, portanto, os receptores de AutoTCPH devem ser

regularmente avaliados para infecção ativa de HCMV. Neste aspecto, os resultados do nosso estudo corroboram com os dados de Yang e cols., que enfatizam a importância da triagem de infecção ativa de HCMV antes do transplante, a fim de obter efeitos terapêuticos satisfatórios, principalmente em receptores de AloTCPH. O monitoramento da infecção ativa por HCMV desde o período pré-transplante é fundamental, uma vez que pacientes que apresentem infecção ativa por HCMV neste período podem apresentar leucopenia grave e atraso na recuperação da produção de plaquetas, o que pode levar ao desenvolvimento de infecções secundárias (Yang et al. 2012). Além disso, o acompanhamento dos pacientes para a positividade para HCMV pode levar ao tratamento profilático mesmo nos casos assintomáticos, o mais precocemente possível, a fim de conseguir efeitos satisfatórios da terapia anti-HCMV com controle da replicação viral. Entretanto, outros fatores devem ser também considerados antes que o tratamento profilático seja instituído (Ljungman et al. 2011).

A detecção quantitativa do DNA de HCMV por qPCR é preconizada por muitos para o diagnóstico de pacientes imunossuprimidos e alguns estudos têm defendido que este ensaio oferece várias vantagens sobre o ensaio de AGM, tais como ser uma técnica que permite uma quantificação mais objetiva do número de partículas virais em circulação, apresentar uma maior sensibilidade para a detecção de infecção ativa por HCMV (redução de falso-negativos), e da possibilidade de detecção da infecção ativa por HCMV durante neutropenia grave no período imediatamente pós-transplante, em razão da sua sensibilidade, uma menor chance de contaminação entre amostras (Razonable et al. 2002; Hardie et al. 2013).

Assim, um dos objetivos do presente estudo foi verificar se a qPCR realmente apresenta benefícios em comparação com resultados obtidos a partir de ensaios de PCR qualitativa (nPCR) e AGM. Dos 20 pacientes, 15% (três) destes foram positivos apenas por AGM e qPCR, enquanto que 85% (17) dos pacientes foram positivos também por nPCR. A concordância entre as técnicas de AGM e qPCR foi considerada boa e a qPCR teve sensibilidade avaliada em 100%, enquanto que a concordância entre a AGM e nPCR moderada e a sensibilidade da nPCR foi de 58%. Poucos estudos testaram as três metodologias de forma comparativa. No estudo de Peres e colaboradores (2010), dos 27 pacientes analisados, 37% foram positivos

pelos três ensaios (AGM, nPCR e qPCR), 9,5% dos pacientes foram positivos por AGM e qPCR, 26% dos pacientes foram positivos por nPCR e qPCR, 15% dos pacientes foram positivos somente por qPCR, 11% foram positivos apenas por nPCR e um paciente foi positivo por AGM e nPCR demonstrando uma variedade de combinações possíveis quando comparadas as três metodologias.

No presente estudo, a qPCR foi a técnica com maior taxa de detecção da infecção ativa por HCMV, seguida por AGM e por último, a nPCR. Apesar de ser considerada a técnica mais sensível para detecção da infecção ativa por HCMV, alguns estudos demonstram que nem sempre todas as amostras positivas por HCMV são detectadas por qPCR. Choi e colaboradores (2009) ao utilizar qPCR e AGM para detecção da infecção ativa por HCMV em 555 amostras, observaram que a infecção ativa foi detectada em 15% das amostras por qPCR, quando comparada a 26% das amostras por AGM. Da mesma forma, Zhang e colaboradores (2010) ao utilizar qPCR e nPCR para detecção da infecção ativa por HCMV, observaram que das 106 amostras analisadas, 18,9% das amostras foram positivas por nPCR e apenas 12,3%, com qPCR. Em relação à AGM e nPCR, Martiny e colaboradores (2011) utilizaram AGM e nPCR em 216 amostras, e destas, 37,5% foram positivas para infecção ativa por HCMV pela técnica de nPCR, em detrimento, 22,3% das amostras foram positivas por AGM.

Apesar de estes estudos demonstrarem diversidade de resultados em relação às técnicas utilizadas, nossos resultados de que a qPCR foi a técnica com maior número de detecção do HCMV corrobora com o estudo de Marchetti e colaboradores (2011), que comparou a detecção por AGM e qPCR e 6,7% das amostras foram positivas por ambos os ensaios; 72,7% foram negativas pelas duas metodologias e em 20,6% os dois métodos apresentaram resultados discordantes, pois o DNA viral foi detectado por qPCR, porém as amostras foram negativas por AGM, sendo apenas uma amostra foi positiva por AGM e negativa por qPCR. Da mesma forma, Beckmann e colaboradores (2011), determinaram a carga viral de HCMV por qPCR em 34% das amostras, enquanto que apenas 16% das amostras foram positivas por AGM. Dos resultados concordantes 14% foram positivas e 64% foram negativas por ambas as técnicas. Dos resultados discordantes 91% foram positivos apenas pela qPCR e 9% foram positivos apenas por AGM.

A variabilidade nos resultados obtidos nos diferentes estudos que usaram uma ou mais de uma metodologia pode estar associada a:

- 1) Características inerentes da metodologia de escolha, como: a possibilidade da qPCR de detectar quantidades baixíssimas de cópias genômicas, leituras falso-negativas pelo ensaio de AGM, devido à subjetividade da técnica e também limitação de células positivas fixadas em cada lâmina, assim como os kits utilizados na AGM;
- 2) Características da amostra ou tempo de coleta em relação ao transplante: amostra de escolha, pellet ou soro, visto que as duas amostras clínicas apresentaram sensibilidade distinta; a técnica de extração do DNA viral; momento da coleta da amostra em relação a imunossupressão, pois têm sido observado que em amostras com neutropenia a probabilidade de se detectar o vírus se torna menor;
- 3) Fatores inerentes ao vírus como: baixa replicação viral no momento da coleta de amostra e variabilidade genética do HCMV, principalmente em algumas regiões genômicas, que poderiam contribuir para a “falha” na detecção do HCMV.

Como referido, a detecção quantitativa do DNA do HCMV utilizando qPCR tornou-se um método cada vez mais aceito para o monitoramento de infecção ativa por HCMV e para a determinação do tempo ótimo para o início de terapia antiviral em receptores de TCPH (Hardie et al. 2013; Tan et al. 2015). Neste estudo, as técnicas de AGM e qPCR apresentaram boa concordância nos resultados. Estudos recentes com receptores de AloTCPH ou transplante de órgãos têm demonstrado que o ensaio de qPCR e AGM são precisamente correlacionados (Choi et al. 2009; Khansarinejad et al. 2012), respeitando os limites de cada técnica e levando em consideração os pontos de corte aplicados.

O ensaio de AGM é um dos métodos mais recomendados para o monitoramento da infecção ativa por HCMV e vários estudos de infecção ativa por HCMV em pacientes AloTCPH adotaram este método, mas a repetida e prolongada neutropenia causada por quimioterapia podem impedir a sua aplicação clínica (Boeckh et al. 1997; Ross et al. 2011). No presente estudo, a qPCR revelou carga viral elevada, mesmo em amostras avaliadas como negativas pelo ensaio de AGM, indicando que a qPCR é mais sensível do que a AGM e que o ensaio de AGM pode ser pouco confiável, quando o número de células antígeno-positivas baixo.

A comparação dos resultados de número de cópias genômicas por qPCR e número de células positivas para o antígeno viral por AGM mostrou uma correlação entre estes valores, na qual pacientes com AGM positiva tiveram maiores cargas virais. Por esse motivo, o ensaio de AGM vem sendo substituído por qPCR para o monitoramento da infecção ativa por HCMV.

Da mesma forma, neste estudo o ensaio de qPCR apresentou maior sensibilidade quando comparado à nPCR, resultado este já relatado pela literatura (Caliendo et al. 2001; Tanaka et al. 2002; Ikewaki et al. 2003). Os resultados da nPCR indicam que esta técnica é menos sensível, não sendo possível a detecção viral quando o número de cópias genômicas é baixo.

Embora a qPCR seja considerada como a melhor técnica para monitoramento da infecção ativa por HCMV, certas questões precisam ser analisadas, pois outros fatores podem interferir na escolha do protocolo a ser adotado para pesquisa de HCMV, como a determinação do espécime clínico ideal para ser testado por qPCR. Há na literatura vários relatos que abordam a questão da melhor amostra clínica para o ensaio qPCR (Garrigue et al. 2008; Lisboa et al. 2011).

Neste estudo, de maneira geral, as técnicas moleculares foram mais sensíveis quando a amostra utilizada foi o pellet, em detrimento do soro, havendo baixa correlação na sensibilidade de detecção para os dois espécimes clínicos, tanto na nPCR quanto na qPCR. Embora o HCMV circule primordialmente dentro dos leucócitos polimorfonucleares, o DNA do HCMV também pode ser detectado no plasma e soro, provavelmente na forma de partículas livres durante a replicação ativa do vírus. Estudos anteriores demonstraram que a pesquisa do vírus em amostras de sangue total é mais sensível do que aqueles em plasma ou pellet (Smith & Paya 2002; Garrigue et al. 2006; Deback et al. 2007).

Outros autores relataram que os testes utilizando pellet são mais sensíveis (von Muller et al. 2007; Zhang et al. 2010; Andrade et al. 2013). Duas razões podem contribuir para a maior sensibilidade utilizando DNA a partir do pellet: (1) a concentração de DNA extraído a partir de pellet provavelmente é muito maior do que a partir da mesma quantidade de plasma, e (2) com as características biológicas da infecção latente, o HCMV pode ser abrigado em leucócitos do sangue periférico, assim, quando o vírus se replica nos leucócitos a um baixo nível, pequena

concentração de vírus é liberada no plasma, causando a menor sensibilidade de detecção utilizando DNA do plasma ou soro.

Considera-se que a detecção de DNA no soro/plasma esteja mais estreitamente relacionada à síndrome de HCMV (Kanaan et al. 2004; Tang et al. 2008), porque o DNA no soro/plasma reflete replicação viral ativa e a detecção de DNA de HCMV a partir de leucócitos polimorfonucleares poderia limitar a interpretação do resultado, uma vez que o DNA viral poderia ser detectado mesmo na ausência da síndrome (vírus em latência) (Zhang et al. 2010; Andrade et al. 2013).

A detecção precoce do DNA do HCMV é de grande importância, pois pode refletir o início da replicação viral refletindo a necessidade de acompanhamento cuidadoso da cinética de carga viral a fim de se detectar, o mais precocemente possível, a disseminação viral que pode resultar em doença sistêmica (Weinberg et al. 2002; Bonon et al. 2005; Ghaffari et al. 2008). No nosso estudo, seis pacientes foram negativos para o DNA de HCMV em soro por nPCR, mas positivos para o DNA em pellet, indicando a alta sensibilidade de ambas as técnicas, quando a amostra clínica foi pellet.

Como referido, todos os pacientes que receberam células progenitoras hematopoiéticas oriundas de MO (6) e praticamente todos que receberam CPSP (14) apresentaram amostras positivas para HCMV, sendo que o único paciente negativo para HCMV teve como enxerto CPSP. Pela diferença do número de pacientes que receberam cada um desses tipos de enxerto, fica difícil comparar positividade, síndrome por HCMV e ocorrência de óbito em relação ao tipo de CPH recebida. Walker et al. (2007) demonstraram um atraso (*delay*) na positividade de HCMV, por antigenemia, em receptores de CPSP, mas nenhuma diferença global na incidência de antigenemia entre receptores de MO e CPSP. Trenchel et al. (2000) relataram uma incidência de antigenemia para o HCMV semelhante entre os dois grupos, mas a antigenemia foi menos persistente e menos pacientes manifestaram a doença por HCMV em receptores de CPSP. Por outro lado, Guerrero e colaboradores (2012) encontraram maior taxa de infecção e doença por HCMV em receptores de CPSP e Manteiga et al. (1998) encontraram taxas mais altas de infecção (55%) e doença por HCMV em receptores de CPSP. Existem alguns fatores que podem ter contribuído para as diferenças relatadas nestes estudos, tais como o uso de depleção de células T

em alguns estudos, dose mais elevada de medicamentos imunossupressores utilizados na profilaxia e na terapia preemptiva, e diferenças nas populações de pacientes em relação à idade e sexo (Guerrero et al. 2012).

Neste estudo, 66,6% dos pacientes que vieram a óbito (4/6) foram receptores de CPSP. Entretanto, tem sido observado por alguns autores que a utilização de CPSP para o transplante melhora a sobrevida em pacientes com malignidades hematológicas de alto risco em comparação com a utilização de MO como uma fonte de células estaminais (Bensinger et al. 2001; Haspel et al. 2008). É sabido que a MO e o SP contêm diferentes proporções de subpopulações de células T *naive*, de memória e reguladoras que poderiam influenciar na recuperação de células T funcionais específicas para HCMV após o transplante (Tayebi et al. 2001; Di Rosa & Pabst 2005). Assim, as diferenças na composição celular de produtos de MO e CPSP podem levar a diferentes taxas de infecção por HCMV depois do transplante por ambos os tipos de TCPH, influenciando na recuperação imunológica e reativação do vírus (Guerrero et al. 2012).

Apesar de não termos avaliado a reconstituição imunológica frente ao HCMV, o impacto do transplante de CPSP na reconstituição imunológica específica contra o HCMV, síndrome de HCMV, e doença é difícil de prever devido às propriedades únicas do HCMV. A infecção ativa por HCMV após o transplante é controlada por células T auxiliares CD4⁺ (T helper - Th) específicas e pela ação de linfócitos T citotóxicos CD8⁺ (LTC) (Lacey et al. 2004; Widmann et al. 2008). Existem evidências da transferência da imunidade específica contra o HCMV através do enxerto, porque os receptores HCMV-soropositivos que recebem MO de doadores soropositivo reconstituem a imunidade de células T específicas para o HCMV mais cedo do que os receptores de MO soronegativa (Boland et al. 1992; Li et al. 1994).

A maioria dos pacientes neste estudo recebeu regime mieloablativo para o condicionamento pré-transplante, não sendo observada diferença de positividade para HCMV entre os pacientes submetidos aos dois tipos de regime. Junghanss e colaboradores (2002) ao analisar a incidência da infecção por HCMV após AloTCPH utilizando regimes mieloablativos e não-mieloablativos encontraram incidências de 78% e 53%, respectivamente. Nos trabalhos de Oh e colaboradores (2004) e Nakamae e colaboradores (2009), não houve diferença significativa para infecção por

HCMV nos dois grupos de regime de condicionamento, além disso, no último trabalho, também foram encontradas menores cargas virais em pacientes em regime não-mieloablativo, o que corrobora com os resultados encontrados no presente estudo. Possíveis explicações para esses resultados são o pequeno tamanho amostral e, ou, assim como sugere Nakamae e colaboradores (2009), as células de memória residuais específicas para HCMV apresentam um efeito limitado ou até mesmo nenhum efeito na infecção ativa por HCMV, mas contribuem para prevenir a progressão para níveis mais elevados de carga viral, pelo menos logo após o transplante quando o regime de condicionamento é menos intensivo. No entanto, depois de completo o quimerismo das células do doador com as do receptor com regime não-mieloablativo, os benefícios de proteção contra a infecção por HCMV parece desaparecer. Estudos anteriores mostraram que em relação à imunidade contra o HCMV, após 100 dias de transplante, não houve diferença na imunidade das células T específicas para HCMV entre os receptores que receberam regimes mieloablativos e não-mieloablativos (Maris et al. 2003; Baron et al. 2006).

Com relação à detecção da infecção ativa ser mais comum no primeiro trimestre após o AloTCPH, nosso trabalho corrobora com dados de Liu e colaboradores (2012), que detectaram a infecção ativa em AloTCPH com uma média de 32 dias (variando entre 7 e 167 dias) e de Takenaka e colaboradores (2015), no qual a infecção ativa por HCMV foi detectada em média 42 dias pós-transplante (variando de 3 a 767 dias).

Dos 20 pacientes positivos para infecção ativa por HCMV, 60% desenvolveram a síndrome por HCMV, o que corresponde a um elevado percentual quando comparados a estudos anteriores, como o de Hazar e colaboradores (2006), no qual 12,4% dos pacientes demonstraram sintomas compatíveis com a síndrome por HCMV. As possíveis explicações para a elevada taxa de síndrome de HCMV encontrada neste estudo podem ser as mesmas utilizadas para justificar a elevada detecção de infecção ativa por HCMV.

Ademais, no estudo de Hazar et al., foi observada síndrome por HCMV, mesmo em pacientes que foram submetidos a tratamento profilático com elevada dose de aciclovir (500 mg/m^2 3x ao dia). O tratamento profilático com aciclovir é bastante controverso. Alguns estudos salientam que o aciclovir apresenta

relativamente baixa potência como um agente anti-HCMV (Goral et al. 1996; Duncan et al. 2008) e o aciclovir não consegue evitar a síndrome/doença por HCMV em pacientes que se submeteram a Auto TCPH (Boeckh et al. 1995), e, em um estudo retrospectivo de utilização de curto prazo, a terapia com elevada dose de aciclovir antes do enxerto em pacientes que tinham sido submetidos a AloTCPH, o aciclovir não influenciou nas taxas de sobrevivência (Boeckh et al. 1998). Outros estudos demonstram que a profilaxia com aciclovir (nas mesmas doses utilizadas neste estudo para profilaxia contra os outros herpesvirus, a saber, 10 mg/kg 3x) apresentaram atividade contra a infecção ativa e síndrome/doença por HCMV (Burns et al. 2002; Hazar et al. 2004). No presente estudo, enfatizamos que o aciclovir foi utilizado para profilaxia para outros herpesvirus, mas de qualquer maneira, pelos resultados, observamos que a dose utilizada não demonstrou atividade anti-HCMV, sendo provavelmente mais recomendada para uso a dose postulada por Boeckh e colaboradores (2009), 500 mg/m² 3x ao dia seguidos por 800 mg 4x ao dia após a alta do hospital, caso o aciclovir seja adotado como antiviral anti-HCMV.

O HCMV já é reconhecido como uma causa de pancitopenia em pacientes submetidos à TCPH, o que explica esta alteração ter sido a mais comumente apresentada pelos pacientes (Dominietto et al. 2001; Montesinos et al. 2009; Kanvinde et al. 2014). Em relação à presença de infecções oportunistas, ocorrência de DECH aguda e óbito, nossos resultados apresentaram resultados semelhantes ou inferiores à literatura (Peres et al. 2010; Sharma et al. 2013), reforçando a importância das práticas profiláticas contra essas complicações.

Neste estudo, tentamos correlacionar a carga viral de HCMV com os sintomas apresentados pelos pacientes. Pôde ser observado que à medida que a carga viral foi aumentando, os sintomas foram se agravando e mais órgãos foram sendo acometidos, sendo que em períodos de carga viral mais elevada, a dor abdominal esteve presente, sugerindo provável manifestação gastroentérica por HCMV tardiamente na síndrome por HCMV, já que o HCMV pode afetar o trato gastrointestinal (Ljungman et al. 2011). Com relação à evolução do quadro clínico, os resultados da AGM foram consistentes com os resultados relacionados à carga viral, enquanto a nPCR apresentou baixa correlação com as outras técnicas em relação aos sintomas. Cariani e colaboradores (2007) encontraram correlação entre os

resultados de carga viral e AGM e presença de sintomas, sendo estes presentes quando as amostras clínicas foram positivas AGM, variando entre três e 100 células positivas por ensaio, e com elevada carga viral, variando entre 2,80E+02 e 4,13E+05 cg/mL.

O número de cópias genômicas, assim como o aumento progressivo da carga viral devem ser considerados na previsão de risco do desenvolvimento da síndrome/doença por HCMV. Com base nisso, salientamos que acompanhar a carga viral do HCMV é importante para a avaliação do risco de síndrome/doença, o diagnóstico da síndrome/doença, bem como no monitoramento da resposta à terapia. A interpretação dos valores de carga viral do HCMV pode ser complexa e alguns fatores devem ser levados em consideração em relação à carga viral e aos sintomas, como, os valores de carga viral baixa são comuns e seu significado clínico pode ser difícil de avaliar (Kraft et al. 2012).

Fatores de risco associados à viremia por HCMV em AloTCPH incluem sorostatus pré-transplante do doador e do receptor, desenvolvimento da DECH, depleção de células T *ex vivo* ou *in vivo*, e o uso de enxertos de doadores alternativos quando não são encontrados doadores com HLA compatível, sendo a DECH e a presença de anticorpos anti-HCMV do doador e/ou do receptor os fatores de risco mais comumente identificados pela maioria dos estudos (Boeckh & Nichols 2004; Takami et al. 2005; Marty et al. 2007; Ozdemir et al. 2007; Buyck et al. 2010; Cantoni et al. 2010; George et al. 2010).

Dos pacientes que evoluíram para óbito, 66,6% (4/6) apresentaram síndrome de HCMV e DECH aguda. Todos os pacientes tiveram amostras positivas por qPCR algumas semanas antes do óbito, sendo que quatro permaneceram HCMV-positivos com o aumento de carga viral até o óbito. Com base nos nossos achados laboratoriais, suspeitamos que em quatro pacientes, devido ao aumento da carga viral, o óbito pode ter sido uma consequência do efeito indireto do HCMV. Além disso, como já foi mencionado, após o TCPH, as respostas T CD4⁺ específicas para o HCMV estão associadas com a proteção contra a síndrome/doença por HCMV e, consequentemente, a falta dessas células é associada com a síndrome/doença por HCMV e óbito em pacientes que se submeteram ao transplante (Li et al. 1994; Hebart et al. 2002; Boeckh et al. 2003; Lilleri et al. 2009), sendo que esta última

situação pode ter ocorridos nestes pacientes, entretanto não foi confirmada neste estudo.

Outras questões importantes são o fato de a profilaxia não ser amplamente utilizada devido a potenciais efeitos mielossupressores do ganciclovir, situação que pode mudar com novos medicamentos, como o maribavir, levando a uma menor taxa de positividade e síndrome/doença por HCMV nesses pacientes (Winston et al. 2008); e o HCMV e DECH serem complicações importantes após o AloTCPH e estarem patogeneticamente associados: vários estudos mostram que a DECH e seu tratamento colocam os pacientes em risco para a reativação da replicação do HCMV (Miller et al. 1986; Martino et al. 2001; Ljungman et al. 2006). Em contraste, o papel da replicação do HCMV como uma causa de DECH é controversa. Wang e colaboradores (2008) encontraram em seu estudo nenhum efeito da replicação do HCMV sobre o desenvolvimento posterior de DECH aguda, enquanto que no estudo de Cantoni e colaboradores (2010) demonstra que os pacientes com elevada carga viral estariam em maior risco de desenvolvimento de DECH e os dados sugerem que estudos prospectivos de tratamento profilático para HCMV visando reduzir a incidência DECH aguda devem ser realizados.

Apesar de o presente estudo ter conseguido recrutar todos os pacientes que foram submetidos ao transplante alogênico nesse hospital no período de dois anos, são necessários mais estudos envolvendo o acompanhamento de um maior número de pacientes para obter resultados mais consistentes e conclusivos em relação ao prognóstico e à sintomatologia. Estudos sobre o acompanhamento da reconstituição imunológica de pacientes submetidos a AloTCPH, por meio da identificação das principais subpopulações celulares envolvidos na reconstituição do sistema imune e na resolução da infecção viral, avaliando seus respectivos fenótipos funcionais serão iniciados em breve no laboratório de Virologia Humana/IPTSP/UFG, a fim de entender o perfil de reconstituição do sistema imune frente à infecções virais.

7 CONCLUSÕES

- Os dados deste estudo revelam uma alta taxa de positividade de infecção ativa de HCMV, pelas metodologias utilizadas, em receptores de transplante de células progenitoras hematopoiéticas do tipo alogênico em um dos centros de referência de transplantes de medula óssea do Brasil. Sendo observada considerável positividade para HCMV antes do transplante;
- As três metodologias utilizadas foram capazes de detectar o HCMV, sendo que a qPCR teve maior sensibilidade e maior concordância com AGM, quando comparada à nPCR. Com relação ao tipo de amostra clínica, houve diferença de detecção entre pellet e soro, sendo que o pellet foi considerado a amostras de escolha para a pesquisa do HCMV por técnicas moleculares;
- Foram observadas cargas virais mais elevadas em amostras de pellet (média de $2,70E+04$ cg/mL) quando comparadas às de soro (média de $4,50E+03$ cg/mL), sugerindo que o monitoramento de HCMV no pellet seja mais adequado para ser utilizado no diagnóstico precoce da infecção;
- A principal alteração apresentada pelos pacientes foi a pancitopenia e a principal intercorrência observada foi a DECH, entretanto, não foi possível estabelecer uma associação direta entre a positividade para HCMV e a *causa mortis*;
- Acreditamos que os resultados foram ainda determinantes para uma melhor compreensão do papel da infecção ativa pelo vírus no prognóstico dos receptores alogênicos, sendo observada positividade para infecção ativa por HCMV mesmo no período pré-transplante, o que reforça a importância do monitoramento precoce dos pacientes, o que não é feito de rotina pela maioria dos centros.

REFERÊNCIAS

Abate DA, Watanabe S, Mocarski ES. Major human cytomegalovirus structural protein pp65 (ppUL83) prevents interferon response factor 3 activation in the interferon response. *J Virol*.78:10995–11006, 2004.

Abdul-Ali D, Kraft CS, Ingersoll J, Frempong M, Caliendo AM. Cytomegalovirus DNA stability in EDTA Anti-Coagulated Whole Blood and Plasma Samples. *J Clin Virol*. 52: 222–224, 2011.

Abu-Dalle I, Reljic T, Nishihori T, Antar A, Bazarbach A, Djulbegovic B, Kumar A, and Kharfan-Dabaja MA. Extracorporeal Photopheresis in Steroid-Refractory Acute or Chronic Graft-versus-Host Disease: Results of a Systematic Review of Prospective Studies. *Biol blood and marrow transplantation* 20: 1677-86, 2014.

Adler SP, Chandrika T, Lawrence L, Baggett J. Cytomegalovirus infections in neonates acquired by blood transfusions. *Ped Infect Dis* 2: 114, 1983.

Albuquerque DM. *Aspectos moleculares do citomegalovírus humano durante infecção ativa em pacientes submetidos ao transplante de medula óssea*. Campinas, SP, 117p. 2006.

Allice T, Cerruti F, Pittaluga F. Evaluation of a novel real-time PCR system for cytomegalovirus DNA quantitation on whole blood and correlation with pp 65-antigen test in guiding pre-emptive antiviral treatment. *J Virol Methods* 148:9–16, 2008.

Alwasaidi T, Bredeson C. Peripheral blood stem cells or bone marrow as the graft source for allogeneic hematopoietic cell transplantation? *J of Taibah Univ Medical Sciences* 9:91-99, 2014.

Andrade PD, Fioravanti MT, Anjos EBV, de Oliveira C, Albuquerque D, Costa S. Peripheral blood leukocytes and serum nested polymerase chain reaction are complementary methods for monitoring active cytomegalovirus infection in transplant patients. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 24, 2013.

Ariza-Heredia EJ, Neshor L, Chemaly RF. Cytomegalovirus diseases after hematopoietic stem cell transplantation: a mini-review. *Cancer Lett*. 342:1-8, 2014.

Arnon TI, Achdout H, Levi O, Markel G, Saleh N, Katz G, Gazit R, Gonen-Gross T, Hanna J, Nahari E. Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus. *Nat Immunol*. 6:515–523, 2005.

AuCoin DP, Smith GB, Meiering CD, Mocarski ES. Betaherpesvirus-conserved cytomegalovirus tegument protein ppUL32 (pp150) controls cytoplasmic events during virion maturation. *J. Virol*. 80:8199–8210, 2006.

Azevedo LS, Pierrotti LC, Abdala E, Costa SF, Strabelli TMV, Campos SV, Ramos JF. Cytomegalovirus infection in transplant recipients. *Clinics* 70:515-523, 2015.

Babady NE, Cheng C, Cumberbatch E, Stiles J, Papanicolaou G, Tang YW. Monitoring of cytomegalovirus viral loads by two molecular assays in whole-blood and plasma samples from hematopoietic stem cell transplant recipients. *J Clin Microbiol* 53:1252–1257, 2015.

Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, Giralt S, Lazarus H, Ho V, Apperley J. Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. *Biol Blood Marrow Transplant*. 15:1628-33, 2009.

Barbaresco AA, Costa TL, Avelar JB, Rodrigues IMX, Amaral WN, Castro AM. Infecções de transmissão vertical em material abortivo e sangue com ênfase em Toxoplasmose gondii. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 36:17-22, 2014.

Baron F, Storer B, Maris MB, Storek J, Piette F, Metcalf M. Unrelated donor status and high donor age independently affect immunologic recovery after nonmyeloablative conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant* 12:1176–1187, 2006.

Bate S, Dollard S, Cannon M. Cytomegalovirus seroprevalence in the United States: the national health and nutrition examination surveys, 1988–2004. *Clin. Infect. Dis.* 50: 1448–1449, 2010.

Beckmann C, Dumoulin A, Rinaldo CH, Hirsch HH. Comparison of a UL111a real-time PCR and pp65 antigenemia for the detection of cytomegalovirus. *J of Med Virol* 83: 2143-2150, 2011.

Bego MG, St Jeor S. Human cytomegalovirus infection of cells of hematopoietic origin: HCMV-induced immunosuppression, immune evasion, and latency. *Exp Hematol* 34: 555-570, 2006.

Bejanyan N, Weisdorf DJ, Logan BR, Wang HL, Devine SM, de Lima M, Bunjes DW, Zhang MJ. Survival of Patients with Acute Myeloid Leukemia Relapsing after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: A Center for International Blood and Marrow Transplant Research Study. *Biol of Blood and Marrow Transpl* 21:454-459, 2015.

Bensinger WI, Martin PJ, Storer B. Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers. *N Engl J Med*. 344:175-181, 2001.

Bensinger WI, Martin PJ, Storer B. Transplantation of bone marrow as compared with peripheral-blood cells from HLA-identical relatives in patients with hematologic cancers. *N Engl J Med*. 344:175-181, 2001.

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

van der Bij W, Speich R. Management of cytomegalovirus infection and disease after solid-organ transplantation. *Clin Infect Dis*. 33: 32-37, 2001.

Biron KK. Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. *Antiviral Res.* 71:154-163, 2006.

Blaise D, Castagna L. Do different conditioning regimens really make a difference? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2012:237-245, 2012.

Boeckh M, Fries B, Nichols WG. Recent advances in the prevention of CMV infection and disease after hematopoietic stem cell transplantation. *Ped Transpl* 8: 19–27, 2004b.

Boeckh M, Geballe AP. Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. *J Clin Invest.* 121:1673-1680, 2011.

Boeckh M, Gooley TA, Bowden RA. Effect of high-dose acyclovir on survival in allogeneic marrow transplant recipients who received ganciclovir at engraftment or for cytomegalovirus pp65 antigenemia. *J Infect Dis* 178:1153-7, 1998.

Boeckh M, Gooley TA, Reusser P. Failure of high-dose acyclovir for prevention of CMV disease after autologous marrow transplant. *J Infect Dis* 172:939-43, 1995.

Boeckh M, Huang M, Ferrenberg J, Steven-Ayers T, Stensland L, Nichols WG, Corey L. Optimization of quantitative detection of cytomegalovirus DNA in plasma by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 42:1142–1148, 2004a.

Boeckh M, Leisenring W, Riddell SR. Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and T-cell immunity. *Blood* 101:407-414, 2003.

Boeckh M, Ljungman P. How I treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients. *Blood* 113:5711-5719, 2009.

Boeckh M, Nichols WG. The impact of cytomegalovirus serostatus of donor and recipient before hematopoietic stem cell transplantation in the era of antiviral prophylaxis and preemptive therapy. *Blood.* 103:2003-8, 2004.

Boehme KW, Guerrero M, Compton T. Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells. *J. Immunol.* 177: 7094–7102, 2006.

Bojanić I, Cepulić BG, Mazić S. Collection of hematopoietic progenitor cells from healthy donors. *Acta Med Croatica,* 63:237–244, 2009.

Boland GJ, Vlieger AM, Ververs C, De Gast GC. Evidence for transfer of cellular and humoral immunity to cytomegalovirus from donor to recipient in allogeneic bone marrow transplantation. *Clin Exp Immunol.* 88:506-511, 1992.

Bonon S, Menoni S, Rossi CL, de Souza CA, Vigorito AC, Costa DB, Costa SC. Surveillance of cytomegalovirus infection in haematopoietic stem cell transplantation patients. *J Infection* 50:130-137, 2005.

Brainard JA. Detection of Cytomegalovirus in liver transplants biopsies. *Transplantation* 57: 1753-1757, 1994.

Britt WJ, Boppana S. Human cytomegalovirus virion proteins. *Hum Immunol*. 65:395-402, 2004.

Broers AE, van Der Holt R, van Esser JW. Increased transplant-related morbidity and mortality in CMV-seropositive patients despite highly effective prevention of CMV disease after allogeneic T-cell-depleted stem cell transplantation. *Blood* 95:2240-2245, 2000.

Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol*. 169: 338–346, 2006.

Brytting M, Sundqvist VA, Stålhandske P, Linde A, Wahren B. Cytomegalovirus DNA detection of an immediate early protein gene with nested primer oligonucleotides. *J Virol Methods* 32: 127–138, 1991.

van Burik JA, Carter SL, Freifeld AG, High KP, Godder KT, Papanicolaou GA, Mendizabal AM. Higher risk of cytomegalovirus and aspergillus infections in recipients of T cell-depleted unrelated bone marrow: analysis of infectious complications in patients treated with T cell depletion versus immunosuppressive therapy to prevent graft-versus-host disease. *Biol of Blood and Marrow Transpl* 13: 1487–1498, 2007.

Burns LJ, Miller W, Kandaswamy C, DeFor TE, MacMillan ML, van Burik JA, Weisdorf DJ. Randomized clinical trial of ganciclovir vs acyclovir for prevention of cytomegalovirus antigenemia after allogeneic transplantation. *Bone Marrow Transpl* 30: 945–951, 2002.

Buyck H.C., Griffiths P.D., Emery V.C. Human cytomegalovirus (HCMV) replication kinetics in stem cell transplant recipients following anti-HCMV therapy. *J. Clin. Virol*. 49:32–36, 2010.

Caliendo AM, Schuurman R, Yen-Lieberman B, Spector SA, Andersen J, Manjiry R, Crumpacker C. Comparison of quantitative & qualitative PCR assays for cytomegalovirus DNA in plasma. *J Clin Microbiol* 39: 1334-8, 2001.

Cannon MJ, Hyde TB, Schmid DS. Review of cytomegalovirus shedding in bodily fluids and relevance to congenital cytomegalovirus infection. *Rev. Med. Virol*. 21:240–255, 2011.

Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *RMV*. 20:202-213, 2010.

Cantoni N, Hirsch HH, Khanna N, Gerull S, Buser A, Bucher C, Halter J. Evidence for a bidirectional relationship between cytomegalovirus replication and acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 9:1309–1314, 2010.

- Cariani E, Pollara CP, Valloncini B. Relationship between pp65 antigenemia levels and real-time quantitative DNA PCR for Human Cytomegalovirus (HCMV) management in immunocompromised patients. *BMC Infectious Diseases* 7:138, 2007.
- Castro Jr. CG, Gregianin LJ, Brunetto AL. Transplante de medula óssea e transplante de sangue de cordão umbilical em pediatria. *Pediatr.* 77: 345-360, 2001.
- Ceballos ME, Vizcaya C, Pavez D, Cerda J, Martínez-Valdebenito C, Montecinos L, Ferrés M. Detección precoz de infección por citomegalovirus en pacientes sometidos a trasplante alogéneo de precursores hematopoyéticos por reacción de polimerasa en cadena cuantitativa en tiempo real. *Rev Chilena Infectol* 31:153-159, 2014.
- Chan G, Nogalski MT, Yurochko AD. Human Cytomegalovirus Stimulates Monocyte-to-Macrophage Differentiation via the Temporal Regulation of Caspase 3. *J Virol.* 86: 10714–10723, 2012.
- Chemaly RF, Ullmann AJ, Stoelben S, Richard MP, Bornhauser M, Groth C. Letermovir for Cytomegalovirus Prophylaxis in Hematopoietic-Cell Transplantation. *N Engl J Med* 370:19, 2014.
- Chen SF, Tu WW, Sharp MA, Tongson EC, He XS, Greenberg HB, Holmes TH. Antiviral CD8 T Cells in the Control of Primary Human Cytomegalovirus Infection in Early Childhood. *The J of Infect Dis* 189:1619–27, 2004.
- Chevillotte M, Landwehr S, Linta L, Frascaroli G, Luske A. Major tegument protein pp65 of human cytomegalovirus is required for the incorporation of pUL69 and pUL97 into the virus particle and for viral growth in macrophages. *J Virol* 83, 2480–2490, 2009.
- Choi KY, Schimmenti LA, Jurek AM, Sharon B, Daly K, Khan C. Detection of cytomegalovirus DNA in dried blood spots of Minnesota infants who do not pass newborn hearing screening. *Pediatr Infect Dis J.* 28:1095–1098, 2009.
- de Clerq E. Recent highlights in the development of new antiviral drugs. *Current Op in Microbiol* 8: 552-560, 2005.
- Craddock C, Szydlo RM, Dazzi F. Cytomegalovirus seropositivity adversely influences outcome after T-depleted unrelated donor transplant in patients with chronic myeloid leukaemia: the case for tailored graft-versus-host disease prophylaxis. *Br J Haematol.* 112:228-236, 2001.
- Crough T, Khanna R. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol.* 22:76-98, 2009.
- Crumpacker CS. Ganciclovir. *N Engl J Med.* 335:721–729, 1996.
- Cummins NW, Deziel PJ, Abraham RS, Razonable RR. Deficiency of cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+ T cells in patients presenting with late-onset CMV disease several years after transplantation. *Transpl Infect Dis.* 11:20–27, 2009.

Dargan DJ, Douglas E, Cunningham C, Jamieson F, Stanton RJ, Baluchova K. Sequential mutations associated with adaptation of human cytomegalovirus to growth in cell culture. *J Gen Virol*. 91:1535–1546, 2010.

De Keyzer K, Van Laecke S, Peeters P, Vanholder R. Human Cytomegalovirus and kidney transplantation: A clinician's update. *Am J Kidney Dis*. 58:118-126, 2011.

Deback C, Fillet AM, Dhedin N, Barrou B, Varnous S. Monitoring of human cytomegalovirus infection in immunosuppressed patients using real-time PCR on whole blood. *J Clin Virol* 40:173-9, 2007.

Deeg HJ. How I treat refractory acute GVHD. *Blood* 109: 4119-4126, 2007.

Demarosi F, Lodi G, Carrassi A, Soligo D, Sardella A. Oral malignancies following HSCT: graft versus host disease and other risk factors. *Oral Oncol*. 41: 865-77, 2005.

Demmler GJ, Buffone GJ, Schimbor CM, May RA. Detection of Cytomegalovirus in Urine from Newborns by Using polymerase Chain Reaction DNA Amplification. *J of Infect Dis* 158: 1177-1184, 1988.

Di Rosa F, Pabst R. The bone marrow: a nest for migratory memory T cells. *Trends Immunol*. 26:360-366, 2005.

Dignan FL, Amrolia P, Clark A, Cornish J, Jackson G, Mahendra P, Scarisbrick JJ, Taylor PC, Shaw BE, Potter MN, Haemato-oncology Task Force of British Committee for Standards in Haematology, British Society for Blood and Marrow Transplantation. Diagnosis and management of chronic graft-versus-host disease. *Br J Haematol*. 158: 46-61, 2012.

Dollard SC, Staras SAS, Amin MM, Schmid DS, Cannon MJ. National Prevalence Estimates for Cytomegalovirus IgM and IgG Avidity and Association between High IgM Antibody Titer and Low IgG Avidity. *Clin. Vaccine Immunol*. 18:1895, 2011.

Dominietto A, Raiola AM, van Lint MT, Lamparelli T, Gualandi F. Factors influencing haematological recovery after allogeneic haemopoietic stem cell transplants: graft-versus-host disease, donor type, cytomegalovirus infections and cell dose. *British J of Haematology* 112:219-227, 2001.

Duncan N, Stocken D, Osman H. High-dose aciclovir fails to prevent cytomegalovirus infection and disease after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 93:182, 2008.

Dunn HS, Haney DJ, Ghanekar SA, Stepick-Biek P, Lewis DB. Dynamics of CD4 and CD8 T cell responses to cytomegalovirus in healthy human donors. *J Infect Dis* 186: 15–22, 2002.

Ehnst A. The clinical relevance of different laboratory test in CMV diagnosis. *Journal of Infectious Disease* 100: 64-71, 1996.

Eid AJ, Arthus SK, Deziel SK, Wilhelm MP, Razonable RR. Emerge of drug-resistant cytomegalovirus in the era of valganciclovir prophylaxis: therapeutic implications and outcomes. *Clin Transplant* 22: 162, 2008.

Elad S, Zeevi I, Or R, Resnick IB, Dray L, Shapira MY. Validation of the National Institutes of Health (NIH) scale for oral chronic graft-versus-host disease (cGVHD). *Biol Blood Marrow Transplant*. 16: 62-69, 2010.

Emery CV, Sabin CA, Cope AV, Gor D, Hassan-Walker AF, Griffiths PD. Application of viral-load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation. *Lancet* 355: 2032, 2000.

Emery V, Zuckerman M, Jackson G, Aitken C, Osman H. Management of cytomegalovirus infection in haemopoietic stem cell transplantation. *British J of Haematology* 162: 25–39, 2013.

Enders G, Daiminger A, Baeder U. The value of CMV IgG avidity and immunoblot for timing the onset of primary CMV infection in pregnancy. *J Clin Virol* 56: 102–107, 2013.

Faulds D, Heel RC. Ganciclovir. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in cytomegalovirus infections. *Drugs* 39:597–638, 1990.

Ferreira RG, Franzino FC, Guimarães EMB, Avelino MM, Cardoso DDP. Seroprevalence of cytomegalovirus in pregnant women of Maternity Hospital of Goiânia (Brazil). *Progr de Obst y Ginec* 48: 121, 2005.

Ferreira WFC, Sousa JCF, Lima N. *Microbiologia*, Lidel, 622 p. Lisboa: 2010.

Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, Martin P, Chien J, Przepiorka D, Couriel D, Cowen EW, Dinndorf P, Farrell A, Hartzman R, Henslee-Downey J, Jacobsohn D, McDonald G, Mittleman B, Rizzo JD, Robinson M, Schubert M, Schultz K, Shulman H, Turner M, Vogelsang G, Flowers ME. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 11: 945-56, 2005.

Fishman JA, Emery V, Freeman R. Cytomegalovirus in transplantation – challenging the status quo. *Clin Transplant* 21: 149, 2007.

Flowers ME, Parker PM, Johnston LJ. Comparison of chronic graft-versus-host disease after transplantation of peripheral blood stem cells versus bone marrow in allogeneic recipients: long-term follow-up of a randomized trial. *Blood* 100:415–419, 2012.

Fowler KB, Stagno S, Pass RF. Maternal immunity and prevention of congenital cytomegalovirus infection. *JAMA*. 289:1008–1011, 2003.

Fowler KB, Boppana SB. Congenital cytomegalovirus (CMV) infection and hearing deficit. *J Clin Virol*. 35:226-231, 2006.

Fox JD, Zuckerman MA, Gazzard BG, Neild P, Gazzard BG. Detection of herpesvirus DNA by nested polymerase chain reaction in cerebrospinal fluid of human immunodeficiency virus-infected persons with neurologic disease. A prospective evaluation. *J of Infect Dis* 172: 1087-1090, 1995.

Fraser CJ, Bhatia S, Ness K, Carter A, Francisco L, Arora M, Parker P, Forman S, Weisdorf D, Gurney JG, Baker KS. Impact of chronic graft-versus-host disease on the health status of hematopoietic cell transplantation survivors: a report from the Bone Marrow Transplant Survivor Study. *Blood* 108: 2867-2873, 2006.

Freeman Jr. RB. The ‘Indirect’ Effects of Cytomegalovirus Infection. *Amer J of Transpl* 9: 2453–2458, 2009.

Fryer JF, Heath AB, Anderson R, Minor PD. Collaborative Study to Evaluate the Proposed 1st WHO International Standard for Human Cytomegalovirus (HCMV) for Nucleic Acid Amplification (NAT)-Based Assays. *EXPERT COMMITTEE ON BIOLOGICAL STANDARDIZATION*, Geneva, 18 to 22 October 2010.

Gámez SS, Ruiz MP, Navarro JM. Infección por citomegalovirus humano. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 32:15-22, 2014.

Garrigue I, Boucher S, Couzi L, Caumont A, Dromer C, Neau-Cransac M. Whole blood real-time quantitative PCR for cytomegalovirus infection follow-up in transplant recipients. *J Clin Virol*. 36:72–5, 2006.

Garrigue I, Doussau A, Asselineau J, Bricout H, Couzi L, Rio C. Prediction of Cytomegalovirus (CMV) Plasma Load from Evaluation of CMV Whole-Blood Load in Samples from Renal Transplant Recipients. *J Clin Microbiol*. 46: 493–498, 2008.

Geary RS, Bradley JD, Watanabe T, Kwon Y, Wedel M. Lack of pharmacokinetic interaction for ISIS 113715, a 2'-O-methoxyethyl modified antisense oligonucleotide targeting protein tyrosine phosphatase 1B messenger RNA, with oral antidiabetic compounds metformin, glipizide or rosiglitazone. *Clin. Pharmacokinet* 45: 789-801, 2006.

Gentile G, Picardi A, Capobianchi A, Spagnoli A, Cudillo L. A prospective study comparing quantitative Cytomegalovirus (CMV) polymerase chain reaction in plasma and pp65 antigenemia assay in monitoring patients after allogeneic stem cell transplantation. *BMC Infectious Diseases* 6:167, 2006.

George B, Kerridge I, Gilroy N, Huang G, Hertzberg M. Fludarabine-based reduced intensity conditioning transplants have a higher incidence of cytomegalovirus

reactivation compared with myeloablative transplants. *Bone Marrow Transpl* 45: 849–855, 2010.

Gerna G, Lilleri D, Caldera D, Furione M, Zenone BL. Validation of a DNAemia cutoff for preemptive therapy of cytomegalovirus infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transpl* 41: 873-9, 2008.

Ghaffari SH, Obeidi N, Dehghan M, Alimoghaddam K, Gharehbaghian A, Ghavamzadeh A: Monitoring of cytomegalovirus reactivation in bone marrow transplant recipients by real-time PCR. *Pathol Oncol Res* 14:399-409, 2008.

Gilbert MJ, Riddell SR, Plachter B, Greenberg BD. Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product. *Nature*. 24:720-722, 1996.

Gimeno C, Solano C, Latorre JC, Hernandez-Boluda JC, Clari MA. Quantification of DNA in plasma by an automated real-time PCR assay (Cytomegalovirus PCR KIT) for surveillance of active Cytomegalovirus infection and guidance of preemptive therapy for allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.* 46: 3311-3318, 2008.

Giulieri S, Manuel O. QuantiFERON®-CMV assay for the assessment of cytomegalovirus cell-mediated immunity. *Expert Rev Mol Diagn.* 11:17-26, 2011.

Glenn J. Cytomegalovirus infections following renal transplantation. *Reviews of Infectious Diseases* 3: 1151-1178, 1981.

Goodpasture EW, Talbot FB. Concerning the nature of protozoan-like cells in certain lesions of infancy. *Am J Dis Child*, 21: 415-425, 1921.

Goral S, Ynares C, Dummer S, Helderma JH. Acyclovir prophylaxis for cytomegalovirus disease in high-risk renal transplant recipients: is it effective? *Kidney International* 57:S62-5, 1996.

Gredmark, S, Söderberg-Nauclér C. Human cytomegalovirus inhibits differentiation of monocytes into dendritic cells with the consequence of depressed immunological functions. *J. Virol.* 77:10943, 2003.

Green MR, Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Fourth Edition). 154 p., 2012.

Grefte JM, Van der Gun BT, Schmolke S, Van der Giessen M, Van Son WJ, Plachter B. The lower matrix protein pp65 is the principal viral antigen present in peripheral blood leukocytes during an active cytomegalovirus infection. *J Gen Virol.* 73:2923-2932, 1992.

Gribben J, Zahrieh D, Stephans K, Bartlett-Pandite L, Alyea AP. Autologous and allogeneic stem cell transplantations for poor-risk chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 106: 4389–4396, 2005.

Griffiths P, Whitley R, Snyderman DR, Singh N, Boeckh M. Contemporary management of cytomegalovirus infection in transplant recipients: guidelines from an IHMF Workshop 2007. *Herpes* 15: 4, 2008.

Griffiths PD. Burden of disease associated with human cytomegalovirus and prospects for elimination by universal immunisation. *Lancet Infect Dis.* 12:790-798, 2012.

Griffiths PD. CMV vaccine trial endpoints. *J Clin Virol.* 46:64-7, 2009.

Griffiths PD. Cytomegalovirus. In: Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattison JR, Griffiths PD, Schoub BD. *Principles and Practice of Clinical Virology*. Fifth Edition, John Wiley and Sons Ltd., p.85-122, West Sussex: 2004.

Griffiths PD, Emery VC. Cytomegalovirus. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG, editors. *Clinical virology*. Churchill Livingstone Inc, p. 445-70, New York, 1997.

Guerrero A, Riddell SR, Storek J, Stevens-Ayers T, Storer B. Cytomegalovirus Viral Load and Virus-Specific Immune Reconstitution after Peripheral Blood Stem Cell versus Bone Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transpl* 18:66-75, 2012.

Hambach L, Spierings E, Goulmy E. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: Minor histocompatibility antigens. *Best Pract & Research Clin Haematology* 20: 171-187, 2007.

Hardie DR, Korsman NSJ, Hsiao NY. Cytomegalovirus load in whole blood is more reliable for predicting and assessing CMV disease than pp65 antigenaemia. *J of Virol Met* 193: 166– 168, 2013.

Hargrett D, Shenk TE. Experimental human cytomegalovirus latency in CD14+ monocytes. *Proc Natl Acad Sci.* 16: 107-146, 2010.

Harris AC, Ferrara JL, Levine JE. Advances in predicting acute GVHD. *Br j haematology* 160: 288-302, 2013.

Harvey J, Dennis CL. Hygiene interventions for prevention of cytomegalovirus infection among childbearing women: systematic review. *J Adv Nurs.* 63:440-450, 2008.

Haspel R.L, Kao G, Yeap BY, Cutler C, Soiffer RJ, Alyea EP. Preinfusion variables predict the predominant unit in the setting of reduced-intensity double cord blood transplantation. *Bone Marrow Transpl.* 41:523-529, 2008.

Haspel RL, Kao G, Yeap BY, Cutler C, Soiffer RJ, Alyea EP. Preinfusion variables predict the predominant unit in the setting of reduced-intensity double cord blood transplantation. *Bone Marrow Transpl.* 41:523-529, 2008.

Hatzimichael E, Tuthill M. Hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications* 3: 105-117, 2010.

Hayden RT, Preiksaitis J, Tong Y, Pang X, Sun Y, Tang L. Commutability of the first World Health Organization international standard for human cytomegalovirus. *J Clin Microbiol* 53:3325–3333, 2015.

Hazar V, Kansoy S, Kupesiz A, Aksoylar S, Kantar M. High-dose acyclovir and pre-emptive ganciclovir in prevention of cytomegalovirus disease in pediatric patients following peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transp.* 33:931-5, 2004.

Hazar V, Ugur A, Colak D, Saba R, Tezcan G, Kupesiz A. Cytomegalovirus Antigenemia and Outcomes of Patients Undergoing Allogeneic Peripheral Blood Stem Cell Transplantation: Effects of Long-Term High-Dose Acyclovir Prophylaxis and Preemptive Ganciclovir Treatment. *Jpn. J. Infect. Dis.* 59:216-221, 2006.

Hebart H. Sensitive detection of human cytomegalovirus peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by interferon-gamma -enzyme-linked immunospot assay and flow cytometry in healthy individuals and in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 99:3830-3837, 2002.

Heid CA, Livak SJ, Williams KJ. Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6: 986-994, 1996.

Herrmann B, Larsson VC, Rubin CJ, Sund F, Eriksson BM. Comparison of a duplex quantitative real-time PCR assay and the COBAS Amplicor CMV Monitor test for detection of cytomegalovirus. *J Clin Microbiol* 42:1909-14, 2004.

Heybar H, Alavi SM, Nejad MF, Latifi M. Cytomegalovirus Infection and Atherosclerosis in Candidate of Coronary Artery Bypass Graft. *Jundishapur J Microbiol.*8: e15476, 2015.

Hibberd PL, Snyderman DR. Cytomegalovirus infection in organ transplant recipients. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 9:863–877, 1995.

Hodson EM, Jones CA, Webster AC. Antiviral medication to prevent cytomegalovirus disease and early death in recipients of solid-organ transplants; A systematic review of randomized controlled trials. *Lancet* 365: 2105, 2005.

Hodson EM, Ladhani M, Webster AC, Strippoli GFM, Craig JC. Antiviral medications for preventing cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Coch Database of Syst Reviews* 2:1-119, 2013.

Huang ES, Huang SM, Tegtmeier GE, Alford C. Cytomegalovirus: genetic variation of viral genomes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 354: 332-346, 1980.

Huang MM, Kew VG, Jestice K, Wills MR, Reeves MB. Efficient human cytomegalovirus reactivation is maturation dependent in the Langerhans dendritic cell lineage and can be studied using a CD14⁺ experimental latency model. *J Virol* 86: 8507–8515, 2012.

Hyde TB, Schmid DS, Cannon MJ. Cytomegalovirus seroconversion rates and risk factors: Implications for congenital CMV. *Rev Med Virol* 20:311–326, 2010.

Ikewaki J, Ohtsuka E, Kawano R, Ogata M, Kikuchi H, Nasu M. Real-Time PCR Assay Compared to Nested PCR and Antigenemia Assays for Detecting Cytomegalovirus Reactivation in Adult T-Cell Leukemia-Lymphoma Patients. *J. Clin. Microbiol.* 41:4382, 2003.

Imamura M, Shigematsu A. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adult acute lymphoblastic leukemia: potential benefit of medium-dose etoposide conditioning. *Exp Hematol Oncol.* 4: 20, 2015.

Inamoto Y, Martin PJ, Storer BE, Palmer J, Weisdorf D, Pidala J, Flowers ME, Arora M, Jagasia M, Arai S, Chai X, Pavletic SZ, Vogelsang GB, Lee SJ. Association of organ severity with mortality and recurrent malignancy in chronic graft-versus-host disease. *Haematologica* 99: 1618-23, 2014.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/>>. Acesso em 10 de dezembro de 2015.

Ishibashi K, Tokumoto T, Tanabe K, Shirakawa H, Hashimoto K. Association of the outcome of renal transplantation with antibody response to cytomegalovirus strain-specific glycoprotein H epitopes. *Clin Infect Dis* 45: 60–67, 2007.

Jagasia M, Arora M, Flowers ME, Chao NJ, McCarthy PL, Cutler CS, Urbano-Ispizua A, Pavletic SZ, Haagenson MD, Zhang MJ, Antin JH, Bolwell BJ, Bredeson C, Cahn JY, Cairo M, Gale RP, Gupta V, Lee SJ, Litzow M, Weisdorf DJ, Horowitz MM, Hahn T. Risk factors for acute GVHD and survival after hematopoietic cell transplantation. *Blood* 119: 296-307, 2012.

Jang JE, Hyun SY, Kim YD, Yoon SH, Hwang DY. Risk factors for progression from cytomegalovirus viremia to cytomegalovirus disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transpl.*18:881-6, 2012.

Junghanss C, Boeckh M, Carter RA, Sandmaier BM, Maris MB. Incidence and outcome of cytomegalovirus infections following nonmyeloablative compared with myeloablative allogeneic stem cell transplantation, a matched control study. *Blood.* 99:1978-85, 2002.

Kadambari S, Williams EJ, Luck S, Griffiths PD, Sharland M. Evidence based management guidelines for the detection and treatment of congenital CMV. *Early Hum Dev.* 87: 723-728, 2011.

Kalejta RF. Tegument Proteins of Human Cytomegalovirus. *Microbiol and Mol Biol Reviews* 72: 249–265, 2008.

Kalil AC, Levitsky J, Lyden E. Meta-analysis: the efficacy of strategies to prevent organ disease by cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. *Ann Intern Med* 143: 870, 2005.

Kalpoe JS, Kroes AC, de Jong MD. Validation of clinical application of cytomegalovirus plasma DNA load measurement and definition of treatment criteria by analysis of correlation to antigen detection. *J Clin Microbiol.* 42: 1498-504, 2004.

Kanaan A, Cour I, Alvarez-Lafuente R, Benedicto M, Culebras E. Significance of nested PCR and quantitative real time PCR for cytomegalovirus detection in renal transplant recipients. *Int J Antimicrob* 24:455-462, 2004.

Kanate AS, Pasquini MC, Hari PN, Hamadani M. Allogeneic hematopoietic cell transplant for acute myeloid leukemia: Current state in 2013 and future directions. *World J Stem Cells.* 6:69-81, 2014.

Kanda Y, Yamashita T, Mori T. A randomized controlled trial of plasma real-time PCR and antigenemia assay for monitoring CMV infection after unrelated BMT. *Bone Marrow Transpl.* 45:1325-32, 2010.

Kanvinde S, Bhargava P, Patwardhan S. Cytomegalovirus infection as a cause of cytopenia after chemotherapy for hematological malignancies. *Indian Pediatrics* 50: 197-201, 2013.

Karbasi-Afshar R, Khedmat H, Fazel M. Cytomegalovirus infection and Atherosclerosis: A Systematic Review. *Int J of Travel Med and Global Health* 1, 2013.

Kenneson A, Cannon MJ. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Virol.* 17:253-276, 2007.

Kern F, Surel IP, Faulhaber N, Frommel C. Target structures of the CD8⁺-T-cell response to human cytomegalovirus: the 72-kilodalton major immediate-early protein revisited. *J Virol* 73: 8179–8184, 1999.

Khansarinejad B, Soleimanjahi H, Mirab Samiee S, Hamidieh AA, Paryan M, Sanahmadi Y. Quantitation of human cytomegalovirus DNA in plasma using an affordable in-house qPCR assay. *J Virol Methods* 183:170–5, 2012.

Kim DJ, Kim SJ, Park J, Choi GS, Lee S. Realtime PCR assay compared with antigenemia assay for detecting cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients. *Transplant Proc* 39: 1458-1460, 2007.

Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S, Snyderman DR. International consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transpl* 89: 779-795, 2010.

Kotton CN, Kumar D, Caliendo AM, Asberg A, Chou S. Updated International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid-Organ Transplantation. *Transpl* 96: 333-360, 2013.

Kraft CS, Armstrong WS, Caliendo AM. Interpreting Quantitative Cytomegalovirus DNA Testing: Understanding the Laboratory Perspective. *Clin Infect Dis* 54:179–9, 2012.

Krause H, Hebart H, Jahn G, Muller CA, Einsele H. Screening for CMV-specific T cell proliferation to identify patients at risk of developing late onset CMV disease. *Bone Marrow Transpl*. 19: 1111-1116, 1997.

Lacey SF, Diamond DJ, Zaia JA. Assessment of cellular immunity to human cytomegalovirus in recipients of allogeneic stem cell transplants. *Biol Blood Marrow Transpl* 10:433-447, 2004.

Lacey SF, Martinez J, Gallez-Hawkins G. Simultaneous reconstitution of multiple cytomegalovirus-specific CD8⁺ cell populations with divergent functionality in hematopoietic stem-cell transplant recipients. *J of Infect Dis*, 191: 977–984, 2005.

Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, Lembo D. The human cytomegalovirus. *Pharmacology & Therapeutics* 98: 269-297, 2003.

Lautenschlager I. CMV infection, diagnosis and antiviral strategies after liver transplantation. *Transplant international: official journal of the European Society for Organ Transplantation* 22: 1031–40, 2009.

Lazarus HM, Zhang MJ, Carreras J. A comparison of HLA-identical sibling allogeneic versus autologous transplantation for diffuse large B cell lymphoma: a report from the CIBMTR. *Biol Blood Marrow Transpl* 16: 35-45, 2010.

Lazzarotto T, Guerra B, Gabrielli L, Lanari M, Landini MP. Update on the prevention, diagnosis and management of cytomegalovirus infection during pregnancy T. *Clin Microbiol and Infect* 17: 286-293, 2011.

Lee AW, Hertel L, Louie RK, Burster T, Lacaille V. Human cytomegalovirus alters localization of MHC class II and dendrite morphology in mature Langerhans cells. *J Immunol* 177: 3960–3971, 2006a.

Lee SJ, Kim HT, Ho VT, Cutler C, Alyea EP, Soiffer RJ, Antin JH. Quality of life associated with acute and chronic graft-versus-host disease. *Bone marrow transplantation* 38: 305-310, 2006b.

Levitsky J, Singh N, Wagener MM, Stosor V, Abecassis M. A survey of CMV prevention strategies after liver transplantation. *Am J Transplant* 8: 158, 2008.

Li CR, Greenberg PD, Gilbert MJ. Recovery of HLA-restricted cytomegalovirus (CMV)-specific-T-cell responses after Allogeneic bone marrow transplant:

correlation with CMV disease and effect of ganciclovir prophylaxis. *Blood* 83:1971–1979, 1994.

Li T, Chen J, Cristea IM. Human cytomegalovirus tegument protein pUL83 inhibits IFI16-mediated DNA sensing for immune evasion. *Cell host & microbe* 14:10, 2013.

Lidehall AK, Engman ML, Sund F. Cytomegalovirus-Specific CD4 and CD8 T Cell Responses in Infants and Children. *Scandinavian J of Immuno* 77:135–143, 2013.

Lilleri D, Gerna G, Fornara C, Chiesa A, Comolli G. Human cytomegalovirus-specific T cell reconstitution in young patients receiving T cell-depleted, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Infect Dis.* 199:829-36, 2009.

Limaye AP, Bakthatsalam R, Kim HW. Late-onset cytomegalovirus disease in liver transplant recipients despite antiviral prophylaxis. *Transplantation* 78: 1390, 2004.

Limaye AP, Bakthavatsalam R, Kim HW. Impact of cytomegalovirus in organ transplant recipient in the era of antiviral prophylaxis. *Transplantation* 81: 1645, 2006.

Limaye AP, Kirby KA, Rubenfeld GD, Leisenring WM, Bulger EM. Cytomegalovirus reactivation in critically ill immunocompetent patients. *JAMA*.300:413-22, 2008.

Limaye AP, Huang ML, Leisenring W. Cytomegalovirus (CMV) DNA load in plasma for the diagnosis of CMV disease before engraftment in hematopoietic stem-cell transplant recipients. *J. Infect. Dis.* 183: 377–382, 2001.

Lin R, Liu Q. Diagnosis and treatment of viral diseases in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Hematol Oncol.* 6: 94, 2013.

Linhares YP, Pavletic S, Gale RP. Chronic GVHD: Where are we? Where do we want to be? Will immunomodulatory drugs help? *Bone Marrow Transplant.* 48: 203-9, 2013.

Lipschutz B. Untersuchungen über die Aetiologie der Krankheiten d. herpes genitalis, etc. *Arch Dermatol Syphilol*, 136: 428-482, 1921.

Lisboa LF, Asberg A, Kumar D, Pang X, Hatmman A. The clinical utility of whole blood versus plasma cytomegalovirus viral load assays for monitoring therapeutic response. *Transplantation.* 91:231-6, 2011.

Lisboa LF, Tong Y, Kumar D. Analysis and clinical correlation of genetic variation in cytomegalovirus. *Transpl Infect Dis.* 14:132-40, 2012.

Little MT, Storb R. History of haematopoietic stem-cell transplantation. *Nat. Rev. Cancer* 2: 231–238, 2002.

Liu YC, Lu PL, Hsiao HH, Chang CS, Liu TC, Yang WC, Lin SF. Cytomegalovirus infection and disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: experience in a center with a high seroprevalence of both CMV and hepatitis B virus. *Ann Hematol* 91:587–595, 2012.

Ljungman P, Aschan J, Lewensohn-Fuchs I. Results of different strategies for reducing cytomegalovirus-associated mortality in allogeneic stem cell transplant recipients. *Transplantation* 66: 1330–1334, 1998.

Ljungman P, Brand R, Einsele H, Frasconi F. Donor CMV serologic status and outcome of CMV-seropositive recipients after unrelated donor stem cell transplantation: an EBMT megafilter analysis. *Blood* 102: 4255–4260, 2003.

Ljungman P, Brandan R. Factors influencing cytomegalovirus seropositivity in stem cell transplant patients and donors. *Haematologica* 92:1139–1142, 2007.

Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 34: 1094–1097, 2002a.

Ljungman P, Larsson K, Kumlien G. Leukocyte depleted, unscreened blood products give a low risk for CMV infection and disease in CMV seronegative allogeneic stem cell transplant recipients with seronegative stem cell donors. *Scand J Infect Dis.* 34:347–350, 2002b.

Ljungman P, Perez-Bercoff L, Jonsson J. Risk factors for the development of cytomegalovirus disease after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 91: 78–83, 2006.

Ljungman P, Hakki M, Boeckh M. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Hematology/oncology Clin of North Amer* 25: 151–169, 2011.

Ljungman P. Molecular monitoring of viral infections after hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol.* 91:596–601, 2010.

Ljungman P. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: viral status. *Best Practice Res Clin Haematol.* 20:209–217, 2007.

Ljungman P. Risk of cytomegalovirus transmission by blood products to immunocompromised patients and means for reduction. *British Journal of Haematology* 125:107–116, 2004.

Lugert R, Reichard U, Hufert F, Grob U. Comparison between pp65 antigenemia assay and quantitative real-time polymerase chain reaction for detection of active cytomegalovirus infection in routine diagnostics. *Diagn. Microb. Infect. Dis.* 65: 192–195, 2009.

Malaver-Ortega LF, Sumer H, Liu J, Verma PJ. The state of the art for pluripotent stem cells derivation in domestic ungulates. *Theriogenology* 78:1749–1762, 2012.

Manteiga R, Martino R, Sureda A, Labeaga R, Brunet S. Cytomegalovirus pp65 antigenemia-guided pre-emptive treatment with ganciclovir after allogeneic stem cell transplantation: a single-center experience. *Bone Marrow Transplant*. 22:899-904, 1998.

Manuel O, Pang XL, Humar A. An assessment of donor-to-recipient transmission patterns of human cytomegalovirus by analysis of viral genomic variants. *J Infect Dis*. 199:1621–8, 2009.

Marchetti S, Santangelo R, Manzara S, D'onghia S, Fadda G, Cattani P. Comparison of real-time PCR and pp65 antigen assays for monitoring the development of Cytomegalovirus disease in recipients of solid organ and bone marrow transplants. *NEW MICROBIOLOGICA* 34: 157-164, 2011.

Maris MB, Niederwieser D, Sandmaier BM. HLA-matched unrelated donor hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning for patients with hematologic malignancies. *Blood* 102:2021–2030, 2003.

Markham A, Faulds D. Ganciclovir. An update of its therapeutic use in cytomegalovirus infection. *Drugs* 48:455-484, 1994.

Marshall BC, Koch WC. Antivirals for cytomegalovirus infection in neonates and infants: focus on pharmacokinetics, formulations, dosing, and adverse events. *Paediatr Drugs*. 11:309-21, 2009.

Martino R, Caballero MD, Canals C. Reduced-intensity conditioning reduces the risk of severe infections after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 28:341-7, 2001.

Martiny PB, de-Paris F, Machado ABMP, Mello RO, Senger MB. Comparison of the performance of polymerase chain reaction and pp65 antigenemia for the detection of human cytomegalovirus in immunosuppressed patients. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 44:286-289, 2011.

Marty FM, Bryar J, Browne SK. Sirolimus-based graft-versus-host disease prophylaxis protects against cytomegalovirus reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a cohort analysis. *Blood* 110: 490–500, 2007.

Matos SB, Meyer R, Lima FWM. Seroprevalence of cytomegalovirus infection among healthy blood donors in Bahia State, Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter* 32:45-9, 2010.

Matos SB, Meyer R, Lima FWM. Seroprevalence and Serum Profile of Cytomegalovirus Infection Among Patients With Hematologic Disorders in Bahia State, Brazil. *J Med Virol* 83:298-304, 2011.

Matsumura T, Narimatsu H, Kami M. Cytomegalovirus infections following umbilical cord blood transplantation using reduced intensity conditioning regimens for adult patients. *Biol Blood Marrow Transpl*. 13:577–583, 2007.

Maya TC, Azulay DR. Infecção pelo Citomegalovírus. In: LUPI O, SILVA AS, PEREIRA Jr. AC. *Herpes – Clínica, Diagnóstico e Tratamento*, 1º edição, Medsi Editora Médica e Científica Ltda, p. 135-156. Rio de Janeiro: 2000.

Meijer E, Dekker AW, Rozenberg-Arska M, Weersink AJL, Verdonck LF. Influence of cytomegalovirus seropositivity on outcome after T celldepleted bone marrow transplantation: contrasting results between recipients of grafts from related and unrelated donors. *Clin Infect Dis*. 35:703-712, 2002.

Mendez JC, Sia IG, Paya CV. Human cytomegalovirus. In: Dekker M, Lennette EH, Smith TF. *Laboratory diagnosis of viral infections*. New York: 1999.

Mettenleiter TC, Klupp BG, Granzow H. Herpesvirus assembly: an update. *Virus Res* 143: 222–234, 2009.

Mettenleiter TC. Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res* 106: 167–180, 2004.

Meylan PR, Pascual M. Preemitive versus prophylactic approaches in the management of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. What we know and what we do not know. *Clin Infect Dis* 43: 881, 2006.

Miller WM, Flynn P, Mccullough J, Balfour HH, Goldman A. Cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation: As association with acute graft-vs-host disease. *Blood* 67:1102-1107, 1986.

Mocarski ES, Shenk T, Griffiths P, Pass RF. Cytomegalovirus. In: Knipe DM, Howley PM, Cohen JI, Griffith DE, Lamb RA, Martin MA, Racaniello V, Roizman B. *Fields Virology*, 6th edition, Lippincott Williams & Wilkins, p. 1960–2014, Philadelphia: 2013.

Mohty M, Kuentz M, Michallet M. Chronic graft-versus-host disease after allogeneic blood stem cell transplantation: long-term results of a randomized study. *Blood* 100:3128–3134, 2002.

Montesinos P, Sanz J, Cantero S. Incidence, Risk Factors, and Outcome of Cytomegalovirus Infection and Disease in Patients Receiving Prophylaxis with Oral Valganciclovir or Intravenous Ganciclovir after Umbilical Cord Blood Transplantation. *Biol of blood and marrow transpl* 15: 730–740, 2009.

Mori T, Kato J. Cytomegalovirus infection/disease after hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol*. 91:588-95, 2010.

Mori T, Mori S, Kanda Y, Yakishiji K, Mineishi S. Clinical significance of cytomegalovirus (CMV) antigenemia in the prediction and diagnosis of CMV gastrointestinal disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 33, 431-434, 2004.

Mori T, Okamoto S, Watanabe R. Doseadjusted preemptive therapy for cytomegalovirus disease based on real-time polymerase chain reaction after

allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 29: 777-82, 2002.

Moses SE, Lim Z, Zuckerman MA. Hepatitis B virus infection: pathogenesis, reactivation and management in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 9:891-899, 2011.

Motta VN, Martins SL. Impairment of cytomegalovirus-specific cellular immune response as a risk factor for cytomegalovirus disease in transplant recipients. *Braz J Med Biol Res*. 41: 5-11, 2008.

Moutaftsi M, Mehl AM, Borysiewicz LK, Tabi Z. Impaired lymphoid chemokine-mediated migration due to a block on the chemokine receptor switch in human cytomegalovirus-infected dendritic cells. *J. Virol*. 78: 3046-3054, 2004.

von Muller L, Hinz J, Bommer M et al. CMV monitoring using blood cells and plasma: a comparison of apples with oranges? *Bone Marrow Transplant* 39: 353-7, 2007.

Mussi-Pinhata MM, Yamamoto AY. Congenital and perinatal infections. *J. pediatr*. 75: 15-30, 1999.

Mustafa MM. Cytomegalovirus infection and disease in the immunocompromised host. *Pediatr. Infect. Dis. J*. 13: 249–259, 1994.

Nakamae H, Kirby KA, Sandmaier BM. Effect of Conditioning Regimen Intensity on CMV Infection in Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 15: 694–703, 2009.

Nogalski MT, Chan GC, Stevenson EV, Collins-McMillen DK, Yurochko AD. The HCMV gH/gL/UL128-131 complex triggers the specific cellular activation required for efficient viral internalization into target monocytes. *PLoS pathogens*. 9:e1003463, 2013.

Odeberg J, Plachter B, Branden L. Human cytomegalovirus protein pp65 mediates accumulation of HLA-DR in lysosomes and destruction of the HLA-DR alpha-chain. *Blood*. 101:4870-4877, 2003.

Oh SJ, Lee KH, Lee JH. The Risk of Cytomegalovirus Infection in Non-myeloablative Peripheral Stem Cell Transplantation Compared with Conventional Bone Marrow Transplantation. *J Korean Med Sci* 19: 172-6, 2004.

Okubo P, Silva Jr WV, Reiche EMV, Ramos M, Borelli SD, Bedendo J. Seroprevalence for Human Cytomegalovirus in samples from dialysis and kidney transplanted patients. *Rev Rene*. 15:753-9, 2014.

Oliveira TMS. PCR em tempo real: métodos e aplicações. Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro. 2010.

Ozdemir E, Saliba RM, Champlin RE. Risk factors associated with late cytomegalovirus reactivation after allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant*. 40: 125-36, 2007.

Pandey T, Maximin S, Bhargava P. Imaging of complications from hematopoietic stem cell transplant. *Indian J Radiol Imaging* 24:327-38, 2014.

Paris C, Kopp K, King A. Cytomegalovirus Infection in Children Undergoing Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Chile. *Pediatr Blood Cancer* 253:453-458, 2009.

Park JM, Lake KD, Arenas JD, Fontana RJ. Efficacy and safety of low-dose valganciclovir in the prevention of cytomegalovirus disease in adult liver transplantation. *Liver Transpl* 12: 112, 2006.

Pasquini M, Wang Z, Horowitz MM, Gale RP. 2013 report from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR): current uses and outcomes of hematopoietic cell transplants for blood and bone marrow disorders. *Clin Transpl*. 187-197, 2013.

Pasquini MC, Wang Z, Schneider L. Current use and outcome of hematopoietic stem cell transplantation. *CIBMTR* 13:5-9, 2007.

Passweg JR, Baldomero H, Peters C. Hemato-poietic SCT in Europe: data and trends in 2012 with special consideration of pediatric transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 49: 744-750, 2014.

Patel R, Paya CV. Infections in solid-organ transplant recipients. *Clin Microbiol Rev* 10: 86-124, 1997.

Paya C, Humar A, Dominguez E. Valganciclovir Solid Organ Transplant Study Group. Efficacy and safety of valganciclovir vs. oral ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant* 4: 611, 2004.

Peres RMB, Costa CRC, Andrade PD, Bonon SH, Albuquerque DM, de Oliveira C, Costa SC. Surveillance of active human cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell transplantation (HLA sibling identical donor): search for optimal cutoff value by real-time PCR. *BMC Infectious Diseases* 10:147, 2010.

Petersdorf EW. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: Histocompatibility. *Best Pract Res Clin Haematol*. 20: 155-170, 2007.

Pidala J, Lee SJ, Ahn KW. Nonpermissive HLA-DPB1 mismatch increases mortality after myeloablative unrelated allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*. 124:2596-2606, 2014.

Pignatelli S, Dal Monte P, Rossini G, Landini MP. Genetic polymorphisms among human cytomegalovirus (HCMV) wild-type strains. *Rev Med Virol*. 14:383-410, 2004.

Pollack M, Heugel J, Xie H. An international comparison of current strategies to prevent herpesvirus and fungal infections in hematopoietic cell transplant recipients. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 17: 664–673, 2011.

Porter-Jordan K, Rosenberg EI, Keiser JF. Nested polymerase chain reaction assay for the detection of cytomegalovirus overcomes false positives caused by contamination with fragmented DNA. *J. med. Virol.* 30: 85-91, 1990.

Preiksaitis J, Brennan D, Fishman J. Canadian society of transplantation consensus workshop on cytomegalovirus management in solid organ transplantation final report. *Am J Transplant* 5: 218, 2005.

Pulsipher MA, Chitphakdithai P, Miller JP. Adverse events among 2408 unrelated donors of peripheral blood stem cells: results of a prospective trial from the National Marrow Donor Program. *Blood* 113:3604–3611, 2009.

Qiu Z, Maher L, Adler B, Khanna K. Cytomegalovirus-based vaccine induces protective immunity against melanoma. *The J of Immuno* 188: 162, 2012.

Rafailidis PI, Mourtzoukou EG, Varbobitis IC, Falagas ME. Severe cytomegalovirus infection in apparently immunocompetent patients: a systematic review. *Virol J* 5:47-54, 2008.

Rasmussen L. Immune Response to Human Cytomegalovirus Infectious. *Current Topics in Microbiol and Immuno*, 154: 221-254, 1990.

Razonable RR, Brown RA, Humar A. Herpesvirus infections in solid organ transplant patients at high risk of primary cytomegalovirus disease. *J Infect Dis* 192: 1331, 2005.

Razonable RR, Emery VC. Consensus article – IHMF management recommendations. Management of CMV infection and disease in transplant patients. *Herpes* 11: 77, 2004.

Razonable RR, Humar A. Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation. *The AST Infect Dis Comm of Pract* 13: 93–106, 2013

Razonable RR, Paya CV, Smith TF. Role of the laboratory in diagnosis and management of cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell and solidorgan transplant recipients. *J Clin Microbiol.* 40:746-752, 2002.

Razonable RR. Cytomegalovirus infection after liver transplantation: current concepts and challenges. *World J Gastroeneterol* 14: 4849, 2008.

Reeves M, Sissons P, Sinclair J. Reactivation of human cytomegalovirus in dendritic cells. *Discov Med* 5: 170–174, 2005.

Reeves MB, Compton T. Inhibition of inflammatory interleukin-6 activity via extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase signaling

antagonizes human cytomegalovirus reactivation from dendritic cells. *J. Virol.* 85:12750–12758, 2011.

Retiere C, Lesimple B, Lepelletier D. Association of glycoprotein B and immediate early-1 genotypes with human leukocyte antigen alleles in renal transplant recipients with cytomegalovirus infection. *Transplantation.* 75:161–165, 2003.

Reyda S, Buscher N, Tenzer S, Plachter B. Proteomic Analyses of Human Cytomegalovirus Strain AD169 Derivatives Reveal Highly Conserved Patterns of Viral and Cellular Proteins in Infected Fibroblasts. *Viruses* 6:172-188, 2014.

Riley JR.. History of the Cytomegalovirus. *Southern Med J*: 90: 184-190, 1997.

Roberts TC, Buller RS, Gaudreault-Keener M. Effects of storage temperature and time on qualitative and quantitative detection of cytomegalovirus in blood specimens by shell vial culture and PCR. *J Clin Microbiol.* 35:2224–2228, 1997.

Ross SA, Novak Z, Pati S. Diagnosis of Cytomegalovirus Infections. *Infect Disord Drug Targets.* 11: 466–474, 2011.

Ross SA, Boppana SB. Congenital cytomegalovirus infection: outcome and diagnosis. *Semin Pediatr Infect Dis.* 16:44-49, 2005.

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

Rubin RH. Impact of cytomegalovirus infection on organ transplant recipients. *Rev of Infect Dis* 7:754–766, 1990.

Ruell J, Barnes C, Mutton K. Active CMV disease does not always correlate with viral load detection. *Bone Marrow Transplant.* 40: 55-61, 2007.

Saiki RK, Scharf SJ, Fallona F. Enzymatic amplification of beta-globin sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350–1354, 1985.

Sanghavi SK, Abu-Elmagd K, Keightley MC, St George K, Lewandowski K. Relationship of cytomegalovirus load assessed by real-time PCR to pp65 antigenemia in organ transplant recipients. *J Clin Virol.* 42:335-342, 2008.

Schafer P, Tenschert W, Gutensohn K. Minimal effect of delayed sample processing on results of quantitative PCR for cytomegalovirus DNA in leukocytes compared to results of an antigenemia assay. *J. Clin. Microbiol.* 35:741–744, 1997.

Schroeder R, Michelon T, Fagundes I. Comparison between RFLP-PCR and antigenemia for pp65 antigen for diagnosis of cytomegalovirus after kidney transplantation. *Transplant Proc* 36:891-3, 2004.

Sharma A, Kayal S, Iqbal S. Comparison of BEAM vs. LEAM regimen in autologous transplant for lymphoma at AIIMS. *SpringerPlus* 2:489, 2013.

Shibata D, Martin WJ, Appleman MD, Causey DM, Leedom JM, Arnheim N. Detection of Cytomegalovirus DNA in Peripheral Blood of Patients Infected with Human Immunodeficiency Virus. *Journal of Infectious Diseases* 158: 1185-1192, 1988.

Silva DFL, Gomes RHS, Moraes MM, Medeiros RLF, Santos ECO. Peril sorológico e molecular da infecção pelo Citomegalovírus em pacientes transplantados de Belém-PA. *Ca D. Saúde Colet* 15: 369-378, 2007.

Simon CO, Seckert C, Grzimek NK. Murine model of cytomegalovirus latency and reactivation: the silencing/desilencing and immune sensing hypothesis. In *Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunology*, pp. 483–500. Edited by M. J. Reddehase. Wymondham, UK: Caister Academic Press, 2006.

Sinclair J, Reeves M. The intimate relationship between human cytomegalovirus and the dendritic cell lineage. *Front Microbiol.* 5: 389, 2014.

Singh N, Wannstedt C, Keyes L. Impact of evolving trends in recipient and donor characteristics on cytomegalovirus infection in liver transplant recipients. *Transplantation* 77: 106, 2004. Hodson EM, Jones CA, Webster AC. Antiviral medication to prevent cytomegalovirus disease and early death in recipients of solid-organ transplants; A systematic review of randomized controlled trials. *Lancet* 365: 2105, 2005.

Singh N, Wannstedt C, Keyes L. Valganciclovir as preemptive therapy for cytomegalovirus in cytomegalovirus-seronegative liver transplant recipients of cytomegalovirus-seropositive donor allografts. *Liver Transpl* 14: 240, 2008.

Slifkin M, Ruthazer R, Freeman R. Impact of cytomegalovirus prophylaxis on rejection following orthotopic liver transplantation. *Liver Transpl* 11: 1597, 2005.

Small LN, Lau J, Snyderman DR. Preventing post-organ transplant cytomegalovirus disease with ganciclovir: a meta-analysis comparing prophylactic and preemptive therapies. *Clin Infect Dis* 43: 869, 2006.

Smedbraten YV, Sagedal S, Leivestad T. The impact of early cytomegalovirus infection after kidney transplantation on long-term graft and patient survival. *Clin Transplant*.28:120–6, 2014.

Śmiechura M, Strużycka M, Konopka W. Congenital and acquired cytomegalovirus infection and hearing evaluation in children. *Otolaryngologia Polska* 68: 303–307, 2014.

Smith C, Khanna R. Immune regulation of human herpesviruses and its implications for human transplantation. *Am J Transplant.* 3:9-23, 2013.

Smith MG. Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. *Proc Soc Exp Biol Med*, 92: 418-424, 1956.

Smith TF, Paya CV. The clinical use of various blood compartments for cytomegalovirus (CMV) DNA quantitation in transplant recipients with CMV disease. *Transplantation*.73:968–73, 2002.

Söderberg-Nauclér C. Does cytomegalovirus play a causative role in the development of various inflammatory diseases and cancer? *J Intern Med*.259:219-246, 2006.

Soper DE. Congenital Cytomegalovirus Infection: An Obstetrician's Point of View. *Clin Infect Dis* 57: 171-173, 2013.

Soroceanu L, Akhavan A, Cobbs CS. Platelet-derived growth factor-alpha receptor activation is required for human cytomegalovirus infection. *Nature*. 455:391-395, 2008.

Souza MA, Passos AM, Treintiger A. Seroprevalence of cytomegalovirus antibodies in blood donors in southern, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 43:359-361, 2010.

Stahl S, Burkhart JM, Hinte F, Tirosh B, Mohr H, Zahedi RP, Sickmann A, Ruzsics Z, Budt M, Brune W. Cytomegalovirus Downregulates IRE1 to Repress the Unfolded Protein Response. *PLoS Pathog*. 9(8), 2013.

Staras SA, Dollard SC, Radford KW. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988–1994. *Clin Infect Dis*. 43:1143–1151, 2006.

Stinski MF, Isomura H. Role of the cytomegalovirus major immediate early enhancer in acute infection and reactivation from latency. *Med Microbiol Immunol*. 197:223–231, 2008.

Storek J, Dawson MA, Storer B. Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *Blood* 97: 3380-3389, 2001.

Stowell JD, Forlin-Passoni D, Din E. Cytomegalovirus survival on common environmental surfaces: opportunities for viral transmission. *J Infect Dis*.205:211–214, 2012.

Strippoli GF, Hodson EM, Jones C, Craig JC. Preemptive treatment for cytomegalovirus viremia to prevent cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Transplantation* 81: 139, 2006.

Szczepura A, Westmoreland D, Vinogradova Y. Evaluation of molecular techniques in prediction and diagnosis of cytomegalovirus disease in immunocompromised patients. *Health Tech Assessment* 10: 1-176, 2006.

Takami A, Mochizuki K, Asakura H. High incidence of cytomegalovirus reactivation in adult recipients of an unrelated cord blood transplant. *Haematologica* 90:1290–2, 2005.

Takenaka K, Gondo H, Tanimoto K. Increased incidence of cytomegalovirus (CMV) infection and CMV-associated disease after allogeneic bone marrow transplantation from unrelated donors The Fukuoka Bone Marrow Transplantation Group. *Bone Marrow Transplant* 19: 241-248, 1997.

Takenaka K, Nishida T, Asano-Mori Y, Oshima K, Ohashi K, Mori T. Cytomegalovirus Reactivation after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation is Associated with a Reduced Risk of Relapse in Patients with Acute Myeloid Leukemia Who Survived to Day 100 after Transplantation: The Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation Transplantation-related Complication Working Group. *Biol Blood Marrow Transplant* 21: 2008-2016, 2015.

Tan SK, Waggoner JJ, Pinsky BA. Cytomegalovirus load at treatment initiation is predictive of time to resolution of viremia and duration of therapy in hematopoietic cell transplant recipients. *J of Clin Virol* 69:179–183, 2015.

Tanaka Y, Kanda Y, Kami M. for the Japan Hematology and Oncology Clinical Study Group (J-HOCS). Monitoring cytomegalovirus infection by antigenemia assay and two distinct plasma real-time PCR methods after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 30:315–319, 2002.

Tandon R, Mocarski ES. Viral and host control of cytomegalovirus maturation. *Trends Microbiol*. 20: 392-401, 2012.

Tang WH, Elmore SH, Fan HX, Thorne LB, Gulley ML. Cytomegalovirus DNA measurement in blood and plasma using Roche Lightcycler CMV quantification reagents. *Diagn Mol Pathol* 17:166-173, 2008.

Tayebi H, Tiberghien P, Ferrand C. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation results in less alteration of early Tcell compartment homeostasis than bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 27:167-175, 2001.

Taylor GH. Cytomegalovirus. *Am Fam Physician*. 67:519-524, 2003.

The TH, Van der Ploeg M, Van der Berg AP. Direct detection of cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes: a review of the antigenemia assay and polymerase chain reaction. *Transplantation* 54: 193-198, 1992.

Tomtishen JP. Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). *Virol J* 9: 22, 2012.

Tormo N, Solano C, Benet I, Nieto J, de la Cámara R, Lopez J, Garcia-Noblejas A, Munoz-Cobo B, Costa E, Clari MA, Hernandez-Boluda JC, Remigia MJ, Navarro XX. Reconstitution of CMV pp65 and IE-1-specific IFN- γ CD8(p) and CD4(p) T-

cell responses affording protection from CMV DNAemia following allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant* 46: 1437–1443, 2011.

Towler JC, Ebrahimi B, Lane B, Davison AJ, Dargan DJ. Human cytomegalovirus transcriptome activity differs during replication in human fibroblast, epithelial and astrocyte cell lines. *J Gen Virol.* 93: 1046–1058, 2012.

Treister NS, Cook EF Jr, Antin J, Lee SJ, Soiffer R, Woo SB. Clinical evaluation of oral chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 14: 110-5, 2008.

Trenschel R, Ross S, Husing J. Reduced risk of persisting cytomegalovirus pp65 antigenemia and cytomegalovirus interstitial pneumonia following allogeneic PBSCT. *Bone Marrow Transplant.* 25:665-672, 2000.

Trincado DE, Scott GM, White, PA, Hunt C, Rasmussen L, Rawlinson WD. Human cytomegalovirus strain associated with congenital and perinatal infections. *J. med. Virol.*, 61: 481-487, 2000.

Valcárcel D, Sierra J, Wang T. One antigen mismatched related VS. HLA-matched unrelated donor hematopoietic transplantation in adults with acute leukemia: CIBMTR results in the era of molecular HLA typing. *Biol Blood Marrow Transplant.* 17: 640–648, 2011.

Verkruyse LA, Storch GA, Devine SM. Once daily ganciclovir as initial pre-emptive therapy delayed until threshold CMV load > or =10000 copies/ml: a safe and effective strategy for allogeneic stem cell transplant patients. *Bone Marrow Transplant* 37:51-6, 2006.

Vollmer T, Knabbe C, Dreier J. Systematic evaluation of different NAT assays for cytomegalovirus detection: feasibility for blood donor screening. *J. Clin. Microbiol.* doi:10.1128/JCM.01091-15, 2015.

Vusirikala M, Wolff SN, Stein RS. Valacyclovir for the prevention of cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation: a single institution retrospective cohort analysis. *Bone Marrow Transplantation* 28: 265–270, 2001.

Walker CM, van Burik JA, De For TE. Cytomegalovirus infection after allogeneic transplantation: comparison of cord blood with peripheral blood and marrow graft sources. *Biol Blood Marrow Transplant.* 13:1106-1115, 2007.

Wang LR, Dong LJ, Zhang MJ. Correlations of human herpesvirus 6B and CMV infection with acute GVHD in recipients of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 42:673-677, 2008.

Weinberg A, Schissel D, Giller R. Molecular methods for cytomegalovirus surveillance in bone marrow transplant recipients. *J Clin Microbiol* 40:4203-4206, 2002.

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

Widmann T, Sester U, Gartner BC. Levels of CMV specific CD4 T cells are dynamic and correlate with CMV viremia after allogeneic stem cell transplantation. *PLoS One*. 3:e3634, 2008.

Womack A, Shenk T. Human cytomegalovirus tegument protein pUL71 is required for efficient virion egress. *mBio* 1:e00282-10, 2010.

Xu W, Sundqvist VA, Brytting M. Diagnosis of cytomegalovirus infections using polymerase chain reaction, virus isolation and serology. *Scandinavian J of Infect Dis* 25: 311-316, 1993.

Yaiw KC, Ovchinnikova O, Taher C. High prevalence of human cytomegalovirus in carotid atherosclerotic plaques obtained from Russian patients undergoing carotid endarterectomy. *Herpesviridae* 4:3, 2013.

Yamamoto AY, Mussi-Pinhata MM, Boppana SB. Human cytomegalovirus reinfection is associated with intrauterine transmission in a highly cytomegalovirus-immune maternal population. *Am J Obstet Gynecol*. 202:297.e1-8, 2010.

Yanada M, Yamamoto K, Emi N. Cytomegalovirus antigenemia and outcome of patients treated with pre-emptive ganciclovir: retrospective analysis of 241 consecutive patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 32 801–807, 2003.

Yang M, Gao H, Zhang X. Active cytomegalovirus infection in autologous stem cell transplant recipients: Incidence and clinical impact. *African J of Microbiol Research* 6:3534-3538, 2012.

Yesilipek MA. Hematopoietic stem cell transplantation in children. *Turk Pediatri Ars*. 49:91-98, 2014.

Yu D, Silva MC, Shenk T. Functional map of human cytomegalovirus AD169 defined by global mutagenesis analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 100:12396–12401, 2003.

Yu X, Shah S, Lee M, Dai W, Lo P, Britt W, Zhu H, Liu F, Zhou ZH. Biochemical and structural characterization of the capsid-bound tegument proteins of human cytomegalovirus. *J Struct Biol*. 174:451-60, 2011.

Zaia JA, Gallez-Hawkins GM, Tegtmeier BR. Late cytomegalovirus disease in marrow transplantation is predicted by virus load in plasma. *J Infect Dis*. 176:782-785, 1997.

Zanghellini F, Boppana SB, Emery VC. Asymptomatic Primary Cytomegalovirus Infection: Virologic and Immunologic Features. *The J of Infect Dis* 180:702–707, 1999.

Zhang S, Zhou YH, Li L. Monitoring human cytomegalovirus infection with nested PCR: comparison of positive rates in plasma and leukocytes and with quantitative PCR. *Virol J* 7:73, 2010.

Zhou W, Longmate J, Lacey SF. Impact of donor CMV status on viral infection and reconstitution of multifunction CMV-specific T cells in CMV-positive transplant recipients. *Blood* 113: 6465–6476, 2009.

Zomer HD, Vidane AS, Gonçalves NN. Mesenchymal and induced pluripotent stem cells: general insights and clinical perspectives. *Stem Cells Cloning* 8: 125–134, 2015.

APÊNDICES E ANEXOS

Apêndice 1. Termo de consentimento livre e esclarecido.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você, ou a pessoa pela qual você é responsável, está sendo convidado a participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido sobre as informações a seguir, se você concordar que o mesmo faça parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias, uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável que também deverá assinar o documento. Em caso de dúvidas, esclareça-as junto à equipe, para decidir se participa ou não do estudo. Em caso de recusa, você não será penalizado de nenhuma forma.

1- Instituição: Universidade Federal de Goiás

2- Órgão: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública

Projetos de Pesquisa: ESTUDO PROSPECTIVO DE INFECÇÃO POR CALICIVÍRUS (NOROVÍRUS E SAPOVÍRUS) EM PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE ALOGÊNICO OU AUTÓLOGO DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOIÉTICAS (TACPH)

3- Coordenadora: Prof^a Dr^a Menira Borges de Lima Dias e Souza
Telefones para contato: (62) 3209-6122 (62) 9992-7608

4- Participantes: Prof^a Dr^a Menira Borges de Lima Dias e Souza, Prof. Dr. Adriano de Moraes Arantes, Prof^a Dr^a Fabíola Souza Fiaccadori; Prof^a Dr^a Divina das Dóres de Paula Cardoso, Lucianna Gonçalves Nepomuceno Lemes, Denisy Marques Mendanha, Hugo César Pereira Santos.

5- Informações gerais: é importante a leitura deste documento sobre os princípios gerais que se aplicam aos participantes:

a) a sua participação é voluntária; Será realizada uma entrevista pelos pesquisadores, após consentimento dos participantes. O questionário a ser utilizado será constituído de duas partes, sendo a primeira referente aos dados pessoais e a segunda parte sobre fatores de riscos associados às infecções causadas pelos vírus a serem pesquisados.

b) a coleta se dará no hospital (unidade de transplante ou ambulatório) pelos enfermeiros da Unidade. Serão utilizados para a coleta: coletores plásticos, agulhas e seringas descartáveis e o procedimento não confere risco à integridade física do paciente, caso o mesmo se oponha, a coleta não será realizada;

c) o material clínico (fezes ou soro) colhido ficará sob nossa guarda e responsabilidade (será armazenado a - 20°C no laboratório de virologia humana/IPTSP) e será utilizado somente na execução desta pesquisa.

d) o(a) senhor(a) possui total liberdade para retirar o seu consentimento a qualquer momento, deixando apenas de participar do estudo e sem prejuízos para a sua pessoa;

6- Objetivo geral: Monitorar 40 pacientes submetidos ao transplante de medula óssea (ou transplante de células progenitoras hematopoiéticas –TCPH), para a infecção por calicivírus (norovírus/sapovírus).

7-Referencial Teórico/Justificativas:

Os calicivirus (norovirus e sapovirus) são importantes agentes causadores de diarreia aguda, podendo causar doença grave em pacientes imunocomprometidos, como os pacientes que sofreram transplante e se encontram em tratamento imunossupressor. A excreção assintomática de NoVs por indivíduos saudáveis, a excreção viral prolongada em pacientes imunocomprometidos, a elevada carga viral excretada, baixa dose infecciosa, além da estabilidade dos NoVs no ambiente e resistência à inativação são fatores que contribuem para a ocorrência de surtos em ambiente hospitalar com rápida disseminação viral entre pacientes e profissionais da área de saúde (enfermeiros e médicos). O diagnóstico da infecção por NoV/SaV não faz parte da rotina do acompanhamento de pacientes que foram submetidos ao transplante e o uso de terapia imunossupressora nestes pacientes pode levar ao agravamento de sua condição clínica, podendo resultar em óbito. Sendo, portanto, importante o diagnóstico precoce de infecção por estes agentes para que o tratamento mais eficaz seja definido e avaliado.

8- Considerações finais: Os resultados obtidos nesta pesquisa poderão ser utilizados na totalidade para fins exclusivos de divulgação científica da pesquisa, garantindo-se a privacidade dos dados individuais. Não será efetuado qualquer tipo de remuneração durante ou após os procedimentos de coleta e se porventura existirem gastos adicionais relacionados à investigação estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa.

9- Eu,....., nascido em/...../....., RG....., abaixo assinado, tendo recebido as informações acima e ciente dos meus direitos, concordo com a participação no estudo.

10 -Direitos do entrevistado: a) garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa; b) segurança de não ser identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada com a sua privacidade;

..... de de 2013

Assinatura do Coordenador da Pesquisa

Assinatura do entrevistado

Anexo 1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CEP - UFG



PARECER CONSUBSTANCIADO

I – Identificação

Título do projeto: "ESTUDO PROSPECTIVO DE INFECÇÃO POR CALICIVÍRUS (NOROVÍRUS E SAPOVÍRUS) EM PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOIÉTICAS".

Pesquisador responsável

Nome: Menira Borges de Lima Dias e Souza

<http://lattes.cnpq.br/0054562567103606>

Instituição: Universidade Federal de Goiás

Endereço para correspondência: Rua 235, esquina com 1ª Avenida, sem número, Setor Universitário

Telefone: 62-32096122

Fax: 62-35211839

E-mail: menirasouza@gmail.com

Pesquisadores participantes

Nome: Divina das Dores de Paula Cardoso/ <http://lattes.cnpq.br/9770835116155857>

Instituição: Universidade Federal de Goiás

Nome: Fabiola Souza Fiaccadori/ <http://lattes.cnpq.br/0993842409303174>

Instituição: Universidade Federal de Goiás

Nome: Lucianna Gonçalves Nepomuceno Lemes/ <http://lattes.cnpq.br/0816025025526987>

Instituição: Universidade Federal de Goiás

Nome: Denisy Marques Mendanha/ <http://lattes.cnpq.br/0916158945285630>

Instituição: Universidade Federal de Goiás

Nome: Hugo César Pereira Santos <http://lattes.cnpq.br/2936658105441688>

Instituição: Universidade Federal de Goiás

Nome: Adriano de Moraes Arantes <http://lattes.cnpq.br/2074071976957154>

Instituição: Hospital Araújo Jorge/Associação de Combate ao Câncer em Goiás

Instituição onde se realizará: Universidade Federal de Goiás/ Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP/UFG).

➤ Data de apresentação ao CEP: 21/12/2011; N° 429/2011

II – Resumo do projeto

Os calicivírus (norovírus e sapovírus) são importantes agentes etiológicos da gastroenterite aguda epidêmica não bacteriana, causando surtos em diferentes grupos populacionais e em diversas partes do mundo. Estudos recentes mostram a importância destes agentes como causadores de diarreia crônica grave em pacientes imunodeprimidos, como os que foram submetidos a transplante renal ou transplante alogênico de células progenitoras hematopoiéticas (TACPH), podendo a infecção por calicivírus levar ao agravamento do quadro.



de imunossupressão destes pacientes, resultando em óbito. Pretende-se com este estudo avaliar a ocorrência de norovírus (NoV) e sapovírus (SaV) em pacientes que foram submetidos a TACPH, proceder à caracterização molecular das amostras positivas para NoV/SaV, investigar a ocorrência de viremia por estes vírus nestes pacientes, avaliar a susceptibilidade/resistência à infecção por estes agentes em relação ao seu grupo sanguíneo e fenótipo Lewis e secretor, a fim de fornecer subsídios que possam auxiliar na inclusão de um teste diagnóstico sensível e específico para o diagnóstico diferencial nos casos de suspeita de doença do enxerto contra o hospedeiro.

III – Objetivos

3.1- Geral:

- Monitorar 40 pacientes submetidos ao TACPH, para a infecção por NoVs/SaVs

3.2- Específicos:

- Realizar o acompanhamento clínico dos pacientes para a avaliação dos principais sinais e sintomas apresentados após o TACPH. Detectar NoVs/SaVs em amostras fecais coletadas de pacientes submetidos ao TACPH
- Realizar o sequenciamento genômico de um segmento da região codificadora do capsídeo viral das amostras positivas para NoV/SaV
- Pesquisar RNA viral (NoVs/SaVs) no soro dos pacientes (determinação de viremia)
- Determinar o grupo sanguíneo e do fenótipo secretor e de Lewis dos pacientes
- Realizar análise comparativa dos dados obtidos para avaliar: sinais e sintomas mais comuns, duração da excreção viral, presença ou não de viremia, maior ou menor susceptibilidade à infecção por NoVs/SaVs em relação ao grupo sanguíneo/fenótipo secretor e de Lewis dos pacientes, piora do quadro clínico em relação à terapia imunossupressora
- Relacionar os dados obtidos com os de outros estudos já realizados

IV – Comentários do relator, frente à Resolução CNS 196/96 e complementares em particular sobre:

Estrutura do Protocolo: (verificação dos documentos solicitados): a documentação está adequada (folha de rosto CEP-UFG, folha de rosto CONEP, comprovante de aprovação do projeto pela Diretoria da Instituição, termo de compromisso dos pesquisadores, modelos de questionários para entrevistas); o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi adequadamente escrito, de forma clara e sucinta. O termo de anuência do Hospital Araújo Jorge não foi apresentado (entretanto, citam que o projeto será apresentado, também, ao Comitê de Ética em Pesquisa da ACCG).

Resumo do projeto e indicação dos objetivos: o resumo está claro e os objetivos são adequados para as pretensões do projeto e coerentes com a abordagem metodológica.

Projeto de pesquisa:

Análise das questões éticas: Os autores tecem comentários acerca preceitos ético-legais de acordo com a Resolução CNS 196/96, ressaltando a confidencialidade e a não identificação dos participantes. Adicionalmente, descreve como será a aplicação do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).



_ **Avaliação de riscos e benefícios:** adequada; ressaltam o baixo risco, já que haverá aplicação do questionário e análise de material fecal e do sangue, sendo o primeiro coletado de forma não invasiva e, o segundo, com agulhas e seringas convencionais (ressaltam o risco de algum desconforto e a possibilidade de formação de hematoma no local da punção); para reduzir a chance de constrangimento, os aplicadores dos questionários e aqueles que lidarão com os pacientes e com as amostras, são devidamente treinados. O benefício direto refere-se aos resultados dos exames, que poderão ser úteis aos pacientes imunossuprimido, já que a pesquisa dos vírus já citados não é atividade, ainda, rotineira.

_ **Análise da metodologia e sua adequação aos objetivos da pesquisa:** a metodologia foi muito bem descrita, e obedece a protocolos já estabelecidos para este tipo de estudo, de inquérito epidemiológico prospectivo.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:

_ **Avaliação do processo de obtenção do Termo de Consentimento:**

_ **Análise do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** (adequação da linguagem e observância dos aspectos solicitados no item 4 do Protocolo): a linguagem está adequada, direta, com termos apropriados para a população (letrada) em geral. É explicado que, após o esclarecimento sobre a pesquisa, os sujeitos assinarão o TCLE, no local onde será aplicado o questionário, e que as amostras de fezes e de sangue serão utilizadas, apenas, para esta pesquisa.

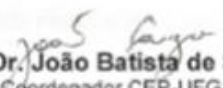
_ **Verificação das garantias de privacidade e confidencialidade:** os autores destacam a não-identificação dos sujeitos (uso de códigos alfanuméricos e questionário sem identificação do sujeito) e a restrição de manipulação de dados pessoais (somente os pesquisadores terão acesso). As amostras serão armazenadas, codificadas, em freezer -20° C no Laboratório de Virologia do IPTSP.

V – Parecer do CEP

O parecer é pela **APROVAÇÃO** do presente projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFG.

VI – Data da reunião

Goiânia, 19 de março de 2012.


Prof. Dr. João Batista de Souza
Coordenador CEP-UFG

Prof. João Batista de Souza
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Departamento de Biologia e Meio Ambiente (DBM)

Anexo 2. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do HAJ/ACCG.

ASSOCIAÇÃO DE COMBATE AO CÂNCER EM GOIÁS - ACCG		
PROJETO DE PESQUISA		
Título:	ESTUDO PROSPECTIVO DE INFECÇÃO POR CALICIVÍRUS (NOROVÍRUS E SAPOVÍRUS) EM PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLU	
Área Temática:	Área 5. Novos procedimentos ainda não consagrados na literatura.	
Versão:	5	
CAAE:	04048712.0.0000.0031	
Pesquisador:	Adriano de Moraes Arantes	
Instituição:	Associação de Combate ao Câncer em Goiás/Inst. Ens. e Pesq/Hospital Araújo Jorge	
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP		
Número do Parecer:	108.396	
Data da Relatoria:	04/12/2012	
Apresentação do Projeto:	O calicivírus (norovírus e sapovírus) são importantes agentes etiológicos da gastroenterite aguda epidêmica não bacteriana, causando surtos em diferentes grupos populacionais e em diversas partes do mundo. Estudos recentes mostram a importância destes agentes como causadores de diarreia crônica grave em pacientes imunodeprimidos, como os que foram submetidos a transplante renal ou transplante alogênico de células progenitoras hematopoiéticas (TACPH), podendo a infecção por calicivírus levar ao agravamento do quadro de imunossupressão destes pacientes, resultando em óbito. Pretende-se com este estudo avaliar a ocorrência de norovírus (NoV) e sapovírus (SaV) em pacientes que foram submetidos a TACPH, proceder à caracterização molecular das amostras positivas para NoV/SaV, investigar a ocorrência de viremia por estes vírus nestes pacientes, avaliar a susceptibilidade/resistência à infecção por estes agentes em relação ao seu grupo sanguíneo e fenótipo Lewis e secretor, a fim de fornecer subsídios que possam auxiliar na inclusão de um teste diagnóstico sensível e específico para o diagnóstico diferencial nos casos de suspeita de doença do enxerto contra o hospedeiro.	
Objetivo da Pesquisa:	Geral: Monitorar 40 pacientes submetidos ao transplante alogênico de células progenitoras hematopoiéticas (TACPH), para a infecção por NoVs/SaVs Específicos: 1 Realizar o acompanhamento clínico dos pacientes para a avaliação dos principais sinais e sintomas apresentados após o TACPH. Detectar NoVs/SaVs em amostras fecais coletadas de pacientes submetidos ao TACPH. 2 Realizar o sequenciamento genômico de um segmento da região codificadora do capsídeo viral das amostras positivas para NoV/SaV. 3 Pesquisar RNA viral (NoVs/SaVs) no soro dos pacientes (determinação de viremia) 4 Determinar o grupo sanguíneo e do fenótipo secretor e de Lewis dos pacientes 5 Realizar análise comparativa dos dados obtidos para avaliar: sinais e sintomas mais comuns, duração da excreção viral, presença ou não de viremia, maior ou menor susceptibilidade à infecção por NoVs/SaVs em relação ao grupo sanguíneo/fenótipo secretor e de Lewis dos pacientes, piora do quadro clínico em relação à terapia imunossupressora 6 Relacionar os dados obtidos com os de outros estudos já realizados.	
Endereço:	239	
Bairro:	SETOR LESTE UNIVERSITARIO	
UF:	GO	
Município:	GOIANIA	
CEP:	74.605-070	
Telefone:	(62)3243-7050	
Fax:	(62)3243-7050	
E-mail:	cepaccg@accg.org.br	

ASSOCIAÇÃO DE COMBATE AO CÂNCER EM GOIÁS - ACCG



Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A avaliação de riscos e benefícios esta adequada. O risco para os pacientes é baixo pois relatam que serão coletadas amostras de fezes e de sangue por profissionais treinados e especializados, utilizando material descartável. Ressaltam ainda que um médico hematologista responsável pela unidade de transplante alogênico de células progenitoras hematopoiéticas estara disponível a prestar assistência em caso de necessidade. Em relação aos benefícios os dados obtidos podem auxiliar no fornecimento subsídios para que um teste sensível e específico para a detecção de NoVs/SaVs que possa ser utilizado durante o acompanhamento de pacientes que receberam o TACPH.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O pesquisador responsável apresenta folha de rosto CONEP; folha de rosto CEP-ACCG; carta de aprovação do CEP -UFG; comprovante de aprovação do projeto pela diretoria do Hospital Araujo Jorge; Carta do chefe do arquivo medico autorizando acesso aos documentos; Carta do chefe do serviço de transplante de medula óssea para desenvolvimento da pesquisa; Termo de compromisso dos pesquisadores garantindo sigilo sobre identidade dos pacientes e dados da pesquisa; modelos de questionario para entrevista. Carta de financiamento Conselho Nacional de Desenvolvimento e Tecnologia (CNPq) Nº 14/2011 .

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto CEP-ACCG arroneamente preenchida foi justificada e esclarecida no documento "carta ao CEP_24092012.pdf".
Consideramos pesquisadora principal Consideramos pesquisadora principal Dra Menira Borges Dias de Lima e Souza e instituição proponente Universidade federal de Goiás.

Recomendações:

Folha de rosto CEP-ACCG arroneamente preenchida foi justificada e esclarecida no documento "carta ao CEP_24092012.pdf".
Consideramos pesquisadora principal Dra Menira Borges e instituição proponente Universidade Federal de Goiás.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Folha de rosto CEP-ACCG arroneamente preenchida foi justificada e esclarecida no documento "carta ao CEP_24092012.pdf".
Consideramos pesquisadora principal Consideramos pesquisadora principal Dra Menira Borges Dias de Lima e Souza e instituição proponente Universidade Federal de Goiás.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado.

Endereço: 239

Bairro: SETOR LESTE UNIVERSITARIO

CEP: 74.605-070

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3243-7050

Fax: (62)3243-7050

E-mail: cepacccg@accg.org.br

Anexo 3. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFG, referente ao primeiro pedido de emenda ao projeto inicial.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Goiânia, 10 de maio de 2013.

**PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO RELATÓRIO PARCIAL E
AO PEDIDO DE EMENDA AO PROJETO DE PESQUISA**

Protocolo n. 429/11

I – Identificação

- Título do projeto: Estudo prospectivo de infecção por calicivírus (norovírus e sapovírus) em pacientes submetidos a transplante alogênico de células progenitoras hematopoiéticas.
- Pesquisador Responsável: Menira Borges de Lima Dias e Souza
- Pesquisadores Participantes: Divina das Dores de Paula Cardoso; Fabíola Souza Fiaccadori; Luciana Gonçalves Nepomuceno Lemes; Denisy Marques Mendanha; Hugo César Pereira Santos; Adriano de Moraes Arantes;
- Instituição onde será realizado o estudo: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP/ /UFG)
- Data de apresentação ao CEP/UFG: 21/12/11
- Área Temática: Grupo III

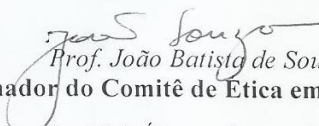
II – Projeto de pesquisa

Trata-se do Relatório Parcial sobre calicivírus (norovírus e sapovírus) que são importantes agentes etiológicos da gastroenterite aguda epidêmica não bacteriana, causando surtos em diferentes grupos populacionais e em diversas partes do mundo, o qual tem como objetivo avaliar a ocorrência de norovírus (NoV) e sapovírus (SaV) em pacientes que foram submetidos a Transplante Alogênico de Células Progenitoras Hematopoiéticas.

III – Parecer do CEP

Protocolo: Aprovado o relatório Parcial que traz informações pertinentes ao encaminhamento da pesquisa. Solicitam a inclusão da detecção de outros vírus: o citomegalovírus e o adenovírus que seguirá a mesma metodologia descrita no protocolo inicial. Solicitam, também, a prorrogação para março de 2014, devido ao baixo número de participantes do estudo. Em razão do pequeno número de participantes no estudo, até o momento os dados obtidos não foram divulgados.

IV – Data da reunião: 20/05/2013


Prof. João Batista de Souza
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/UFG

Comitê de Ética em Pesquisa/CEP
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1,
Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1215.
Email: cep.prppg.ufg@gmail.com

Anexo 4. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFG, referente ao segundo pedido de emenda ao projeto inicial.

	UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	
Goiânia, 19 de dezembro de 2014.		
PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO RELATÓRIO PARCIAL E PEDIDO DE EMENDA DE PROJETO DE PESQUISA PROTOCOLADO <i>Protocolo nº. 429/11</i>		
I – Identificação:		
1. <i>Título do Projeto:</i> Estudo prospectivo de infecção por calicivírus (norovírus e sapovírus) em pacientes submetidos a transplante alogênico de células progenitoras hematopoiéticas		
2. <i>Pesquisadora Responsável:</i> Menira Borges de Lima Dias e Souza		
3. <i>Pesquisadores Participantes:</i> Divina das Dores de Paula Cardoso; Fabiola Souza Fiaccadori; Luciana Gonçalves Nepomuceno Lemes; Denisy Marques Medanha; Hugo César Pereira Santos; Adriano de Moraes Arantes; Thaís dos Santos Corrêa.		
4. <i>Unidade/Órgão Responsável:</i> Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/IPTSP-UFG		
5. <i>Data de apresentação ao CEP/UFG:</i> 11/12/2011		
6. <i>Data de Aprovação:</i> 19/03/2012		
7. <i>Data de Apresentação do Primeiro Relatório Parcial e Pedido de Emenda:</i> 19/04/2013		
8. <i>Data de Apresentação do Segundo Relatório Parcial e Pedido de Emenda:</i> 18/12/2014		
II – Projeto de pesquisa		
Trata-se do <i>Relatório Parcial e Pedido de Emenda</i> do projeto de pesquisa que inicialmente se propôs a avaliar a ocorrência de norovírus (NoV) e sapovírus (SaV) em pacientes que foram submetidos a TACPH, de modo a se investigar a ocorrência de viremia por estes vírus em pacientes imunodeprimidos que foram submetidos a transplante renal ou transplante alogênico de células progenitoras hematopoiéticas (TACPH). Pretender-se, ainda, avaliar a susceptibilidade/resistência à infecção por estes agentes em relação ao seu grupo sanguíneo e fenótipo Lewis e secretor, a fim de fornecer subsídios que possam auxiliar na inclusão de um teste diagnóstico sensível e específico para o diagnóstico diferencial nos casos de suspeita de doença do enxerto contra o hospedeiro. No entanto, em 19 de abril de 2013 foi apresentado e aprovado no CEP-UFG um pedido de emenda da pesquisadora responsável, o qual solicitou a inclusão da detecção de outros vírus (Citomegalovírus e Adenovírus), seguindo a mesma metodologia molecular utilizada para os demais causadores de infecções e complicações em pacientes transplantados. Foi também solicitada a prorrogação do cronograma do projeto com vistas ao encerramento do estudo em março de 2014, pedido este também aprovado. No que diz		
<i>Comitê de Ética em Pesquisa/CEP</i> Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso I, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1215. Email: cep.prppg.ufg@gmail.com		



respeito ao segundo pedido de emenda apresentado pela pesquisadora responsável, é importante destacar que o mesmo requer a aprovação de quatro emendas específicas, quais sejam: 1) a inclusão de um objetivo específico (detecção e caracterização de bocavírus humanos) para o qual será utilizada a mesma metodologia, somente novos pares de iniciadores serão utilizados para testar a amostra; 2) a inclusão de dois pares de iniciadores na metodologia para realização do PCR; 3) a inclusão de um membro participante – a aluna de PIBIC Thaís Dos Santos Corrêa; 4) nova prorrogação da vigência do cronograma do projeto para encerramento do estudo em 31 de dezembro de 2016. A pesquisadora responsável pelo projeto argumenta, para solicitação de tais emendas, que sua solicitação é imprescindível para que o projeto continue vigente para a finalização da coleta de amostras e análises, bem como para que possam ser solicitados alunos de Iniciação Científica para o próximo ano. Ademais, existe a necessidade de prestação de contas a Agências de Fomento, porque o projeto foi contemplado nas chamadas do PPSUS/FAPEG (R\$ 52.087,20) e Universal 2014/CNPq (R\$ 30.000,00) e, portanto, estes fatos por si são autoexplicativos para evidenciar a carência em dar andamento e encerramento ao projeto em uma data futura. Foram apresentadas, ainda, esclarecimentos com relação à produção de material científico e sobre as publicações dos resultados parciais alcançados pelo projeto em eventos científicos e em uma dissertação.

III- Parecer do CEP

Protocolo: **Aprovado** o *Relatório Parcial e Pedido de Emenda* que traz informações pertinentes ao encaminhamento da pesquisa. O cronograma do projeto inicial foi prorrogado até 31 de dezembro de 2016 e a aluna PIBIC Thaís Dos Santos Corrêa foi incluída no projeto como pesquisadora participante. Os demais pedidos de emenda supracitados também foram acatados. Reiteramos a importância deste Parecer, e lembramos ao pesquisador responsável que deverá encaminhar ao CEP-UFG o Relatório Final da pesquisa, com conclusões e publicações, de acordo com as recomendações da Resolução CNS nº. 466/12.

VI – Data da reunião: 19/12/2014

Prof. João Batista de Souza
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa/CEP

Profa. Dra. Sheila Araújo Teles
Coordenadora Geral de Pesquisa/UFG
Mat. SIAPE 0300203

Comitê de Ética em Pesquisa/CEP

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1215.
Email: cep.prppg.ufg@gmail.com

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE FRANCIELLY PINHEIRO DA SILVA BORGES - Aos quinze dias do mês de abril do ano de 2016 (15/04/2016), às 09:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profas. Dras. MENIRA BORGES DE LIMA DIAS E SOUZA, MEGMAR APARECIDA DOS SANTOS CARNEIRO e VERA APARECIDA SADDI, para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **"CITOMEGALOVÍRUS EM PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOIÉTICAS"**, em nível de MESTRADO, de autoria de FRANCIELLY PINHEIRO DA SILVA BORGES, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Orientadora, Profa. Dra. MENIRA BORGES DE LIMA DIAS E SOUZA, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1271/2014 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro a Banca, em sessão secreta, expressou seu julgamento, considerando a candidata **Aprovada** ou **Reprovada**:

Banca Examinadora

Profa. Dra. Menira Borges de Lima Dias e Souza

Profa. Dra. Megmar Aparecida dos Santos Carneiro

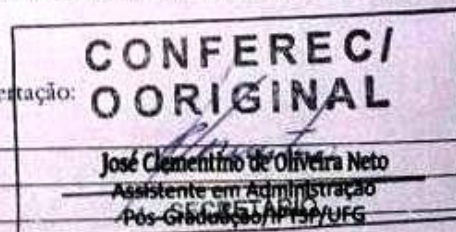
Profa. Dra. Vera Aparecida Saddi

Aprovada / Reprovada

Aprovada
Aprovada
APROVADA

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata Habilitada (**Habilitada ou não Habilitada**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRE EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 11 h 10 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação e para constar eu, KARINY VIEIRA SOARES E SILVA, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Dissertação:



Profa. Dra. Menira Borges de Lima Dias e Souza (IPTSP/UFG)
Profa. Dra. Megmar Aparecida dos Santos Carneiro (IPTSP/UFG)
Profa. Dra. Vera Aparecida Saddi (PUC/GO)
Secretário da Pós-Graduação:

Assinatura
Menira Dias
Megmar
Vera Aparecida Saddi
Kariny Soares