



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



SÓCRATES BEZERRA DE MATOS

**INFECÇÃO POR CITOMEGALOVÍRUS APÓS O
TRANSPLANTE DE RIM OU DE CÉLULAS TRONCO
HEMATOPOIÉTICAS NO ESTADO DA BAHIA:
INCIDÊNCIA, ACHADOS CLÍNICOS E IMUNOLÓGICOS.**

Salvador, BA
2014

SÓCRATES BEZERRA DE MATOS

**INFECÇÃO POR CITOMEGALOVÍRUS APÓS O
TRANSPLANTE DE RIM OU DE CÉLULAS TRONCO
HEMATOPOIÉTICAS NO ESTADO DA BAHIA: INCIDÊNCIA,
ACHADOS CLÍNICOS E IMUNOLÓGICOS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Roberto J. Meyer Nascimento.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda W. de M. Lima.

Salvador, BA
2014

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde,
SIBI - UFBA.

M433 Matos, Sócrates Bezerra de

Infecção por citomegalovírus após o transplante de rim ou de células tronco hematopoiéticas no estado da Bahia: incidência, achados clínicos e imunológicos / Sócrates Bezerra de Matos. – Salvador, 2014.

87 f.

Orientador: Prof. Dr. Roberto José Meyer do Nascimento.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde, 2014.

1. Transplante de Medula Óssea. 2. Transplante renal. 3. Herpesvirus humano 5. I. Lima, Fernanda Washington de Mendonça. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 616.15

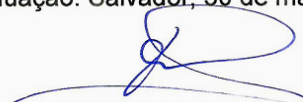



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA





ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA PARA JULGAMENTO DO TRABALHO DE TESE DO DOUTORANDO SÓCRATES BEZERRA DE MATOS.


Aos trinta dias do mês de maio do ano de dois mil e quatorze às quinze horas, se reúne em sessão pública no Auditório III, 2º andar do Instituto de Ciências da Saúde, a Banca Examinadora composta pelos Professores: Dra. Fernanda Washington de Mendonça Lima Co-orientadora, Dr. Ajax Mercês Atta, Dr. Lauro Juliano Marin, Dra. Luciana Santos Cardoso, Dr. Ricardo Riccio Oliveira com a finalidade de discutir, avaliar e julgar o trabalho de Tese intitulado: "INFECÇÃO POR CITOMEGALOVÍRUS APÓS O TRANSPLANTE DE RIM OU DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS NO ESTADO DA BAHIA: INCIDÊNCIA, ACHADOS CLÍNICOS E IMUNOLÓGICOS" do Doutorando **Sócrates Bezerra de Matos**. Após a apresentação, foram feitos os comentários pelos examinadores. Havendo cumprido as exigências para a defesa, a Banca Examinadora conclui que o pós-graduando **Sócrates Bezerra de Matos** teve a sua defesa de Tese APROVADA, emitindo pareceres individuais que serão anexados à ata. Nada mais havendo a tratar, encerra-se a sessão, da qual é lavrado a presente ata que após lida e aprovada vai assinada pelos componentes da Banca examinadora, pelo Doutorando e pela Coordenadora do Programa de Pós-Graduação. Salvador, 30 de maio de 2014.


Dra. Fernanda Washington de Mendonça Lima
Co-orientadora

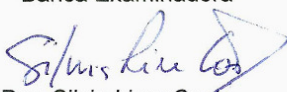

Dr. Ajax Mercês Atta
Banca Examinadora


Dra. Luciana Santos Cardoso
Banca Examinadora


Dr. Lauro Juliano Marin
Banca Examinadora


Dr. Ricardo Riccio Oliveira
Banca Examinadora


Sócrates Bezerra de Matos
Doutorando


Dra. Sílvia Lima Costa
Coordenadora do PPGIm

Dedico essa Tese à Minha Família pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

- ❖ A **Deus** por permitir que tudo acontecesse.
- ❖ À minha família, em especial ao meu pai **Nilo Florentino de Matos Filho** e à minha mãe **Rosângela Dionizio Bezerra de Matos**, que foram sempre minha fortaleza, acreditando e participando ativamente de todos os momentos.
- ❖ Aos meus irmãos **Nilo Florentino de Matos Filho** e **Soraya Bezerra de Matos** e à minha futura esposa **Helen Regina Silva Sodré**.
- ❖ A todos os amigos do SIDI, estagiários, técnicos, bioquímicos, professores, em especial à prof^a. Dr^a. **Fernanda W. M. Lima** por sempre acreditar no meu potencial e ser uma co-orientadora incrível durante todo o processo.
- ❖ Ao professor Dr. **Roberto Meyer** por ter aceitado ser meu orientador e ter possibilitado que esse doutorado acontecesse, sempre atencioso e disponível para comigo.
- ❖ À equipe de transplante de medula óssea do Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, em especial aos médicos **Marco Aurélio Salvino** e **Mônica Borges Botura**.
- ❖ À equipe de transplante renal do Hospital Ana Nery, em especial aos médicos **Ricardo Mattoso**, **Fátima Gesteira** e **Marília Bahiense**.
- ❖ Aos pacientes transplantados que foram o motivo principal pelo qual o trabalho existiu.
- ❖ Ao Biomédico **Geraldo Pedral Sampaio** e ao Prof. Dr. **Ricardo David Couto** pela parceria técnica e científica, imprescindíveis à execução do projeto.
- ❖ Aos colegas, professores e funcionários do PPGIm que foram fundamentais para essa importante fase da minha vida.
- ❖ Aos amigos da UESC - onde tudo começou - que foram fonte de aprendizado e inspiração para eu prosseguir na carreira acadêmica.
- ❖ Aos bioquímicos do Hospital Geral Roberto Santos, em especial à Dra. **Fátima Guanaes**, que permitiram o início da minha história em Salvador.
- ❖ A todas as pessoas (ex-professores, amigos, conhecidos, colegas) que sempre acreditaram que todos os meus sonhos seriam possíveis.

"A mente que se abre a uma nova idéia
Jamais volta ao seu tamanho original".

Albert Einstein.

"A utopia está lá no horizonte.
Me aproximo dois passos, ela se afasta dois passos.
Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos.
Por mais que eu caminhe, jamais a alcançarei.
Para que serve a utopia então?
Para que eu não deixe de caminhar".

Eduardo Galeano.

MATOS, Sócrates Bezerra de. Infecção por citomegalovírus após o transplante de rim ou de células tronco hematopoiéticas no estado da Bahia: incidência, achados clínicos e imunológicos. 87f. il. 2014. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

RESUMO

O Citomegalovírus é um dos principais agentes infecciosos causadores de morbimortalidade em paciente transplantado. É um vírus de soroprevalência superior a 85% na população baiana e de incidência desconhecida em muitos centros de transplante. O presente estudo objetivou monitorar a infecção ativa por CMV em pacientes transplantados no estado da Bahia, descrevendo características clínicas da infecção e avaliando níveis plasmáticos da PCR e de citocinas pró-inflamatórias, Th1 e Th2 em diferentes momentos da infecção. Foram incluídos no estudo 87 pacientes submetidos ao transplante renal e 28 pacientes submetidos ao transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH). A infecção ativa por CMV foi monitorada através do ensaio de antigenemia para pp65 e as dosagens plasmáticas da PCR e das citocinas IFN- γ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4 e TNF- α foram realizadas por ensaio turbidimétrico e por ensaio multiplex de citometria de fluxo, respectivamente. Os pacientes submetidos ao transplante renal apresentaram incidência de 63,2% de infecção ativa por CMV, diarreia e elevação de creatinina sérica como os principais sintomas associados e variação nos níveis plasmáticos da PCR e da IL-4 em diferentes momentos da infecção. Nos pacientes submetidos ao TCTH, houve incidência da infecção ativa de 67,9%, febre e diarreia como os principais sintomas e variação nos níveis plasmáticos da PCR, IL-17A, IFN- γ e IL-4 em diferentes momentos da infecção. Em conclusão, foi possível observar que a infecção ativa por CMV ocorre em alta incidência nos pacientes submetidos ao transplante renal ou ao TCTH no estado da Bahia, evidenciando a necessidade do monitoramento seriado para o diagnóstico precoce e tratamento adequado dessa infecção. A variação dos níveis plasmáticos da PCR e das citocinas supracitadas indica a participação delas na resposta imune sistêmica contra o vírus, além da possibilidade de serem utilizadas como fatores preditivos na infecção.

Palavras-chave: Transplante renal. Transplante de medula óssea. Herpesvirus humano 5. Diagnóstico. Citocinas.

MATOS, Socrates Bezerra de. Cytomegalovirus Infection after Kidney or Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Bahia state: incidence, clinical and immunological findings. 87pp. il. 2014. Doctoral Thesis – Health Sciences Institute, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia state, Brazil, 2014.

ABSTRACT

Cytomegalovirus is a major infectious agents causative of morbidity and mortality in transplant patients. It is a virus with seroprevalence higher than 85% in the Bahia state population and with unknown incidence in many transplant centers. This study aimed to monitor CMV active infection in transplant patients from Bahia state, Brazil, describing clinical features of infection and evaluating plasma levels of CRP and pro-inflammatory, Th1 and Th2 cytokines at different times of infection. Eighty seven patients underwent renal transplantation and 28 patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) were enrolled in this study. The CMV active infection was monitored by pp65 antigenemia assay and the plasma levels of CRP and cytokines IFN- γ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4 and TNF- α were quantified by turbidimetric immunoassay and multiplexed flow cytometric assay, respectively. Patients undergoing renal transplantation showed CMV active infection incidence of 63.2%, diarrhea and elevated serum creatinine levels as the main symptoms associated and variation in plasma levels of CRP and IL-4 at different times of infection. In HSCT patients, the active infection incidence was 67.9%, fever and diarrhea as the main symptoms and variation in plasma levels of CRP, IL-17A, IFN- γ and IL-4 at different times of infection. In conclusion, we observed that CMV active infection occurs in high incidence among renal and HSCT transplant recipients from Bahia state, which highlight the need of CMV serial monitoring for early diagnosis and appropriate treatment of this infection. The change in plasma levels of CRP and cytokines above indicate their participation in the systemic immune response against the virus and the possibility of being used as predictive factors in the infection.

Keywords: Kidney transplant. Bone marrow transplant. Human Herpesvirus 5. Diagnosis. Cytokines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA.

Figura 1. Esquematização do Ensaio de Antigenemia para CMV.....18

CAPÍTULO 1. Infecção Ativa por Citomegalovírus após o Transplante Renal: incidência, achados clínicos e ponto de corte da antigenemia.

Figura 1. Curva ROC e ponto de corte para infecção ativa sintomática por CMV.....34

CAPÍTULO 2. Níveis Plasmáticos de Citocinas e da Proteína C Reativa em Diferentes Momentos da Infecção por Citomegalovírus após o Transplante Renal.

Figura 1. Níveis plasmáticos de IL-4 em diferentes momentos da infecção por CMV.....47

Figura 2. Níveis plasmáticos da PCR em diferentes momentos da infecção por CMV.....47

Figura 3. Correlação entre o valor da antigenemia para pp65 e níveis plasmáticos de PCR (A) e IL-4 (B).....48

Figura 4. Correlação entre níveis plasmáticos de citocinas durante a infecção ativa por CMV.....49

CAPÍTULO 3. Infecção ativa por Citomegalovírus após o Transplante Alogênico de Células Tronco Hematopoiéticas: achados clínicos e imunológicos.

Figura 1. Níveis plasmáticos da PCR em diferentes momentos da infecção por CMV.....64

Figura 2. Razão entre as citocinas IL-17A, IFN- γ e IL-4 em pacientes com e sem infecção ativa por CMV.....65

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1. Infecção Ativa por Citomegalovírus após o Transplante Renal: incidência, achados clínicos e ponto de corte da antigenemia.

Tabela 1. Características dos pacientes submetidos ao transplante renal33

Tabela 2. Características dos pacientes com Infecção Ativa por CMV.....34

Tabela 3. Descrição dos sinais / sintomas apresentados pelos pacientes com infecção ativa por CMV.....35

CAPÍTULO 2. Níveis Plasmáticos de Citocinas e da Proteína C Reativa em Diferentes Momentos da Infecção por Citomegalovírus após o Transplante Renal.

Tabela 1. Níveis plasmáticos de citocinas em diferentes momentos da infecção por CMV.....46

CAPÍTULO 3. Infecção Ativa por Citomegalovírus após o Transplante Alogênico de Células Tronco Hematopoiéticas: achados clínicos e imunológicos.

Tabela 1. Características dos pacientes submetidos ao transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas.....62

Tabela 2. Perfil dos pacientes com infecção ativa por CMV.....63

Tabela 3. Níveis plasmáticos de citocinas em momentos diferentes da infecção por CMV.....64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAG	Anemia aplásica grave.
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome (Trad.: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida).
ATG	Globulina antitimocitária, anticorpos policlonais com função imunossupressora.
AUC	Área sob a curva.
Aza	Azatioprina.
CDV	Cidofovir.
CIR	Regime de condicionamento de intensidade reduzida.
CMV	Citomegalovírus.
CsP	Ciclosporina.
CTL	Cytolytic T Lymphocyte (Trad.: Linfócito T Citolítico).
CTMO	Centro de Transplante de Medula Óssea.
D+100	100º dia após o transplante.
DECH	Doença do Enxerto contra o Hospedeiro.
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Trad.: Ensaio imunoadsorvente ligado à enzima).
FK	Tacrolimus.
gB, gH	Glicoproteína B, glicoproteína H, proteínas do envelope do CMV.
gB1	Glicoproteína B variante 1.
GCV	Ganciclovir.
gM, gN	Glicoproteína M, glicoproteína N, proteínas do envelope do CMV.
HAART	Highly Active AntiRetroviral Treatment (Trad.: Tratamento anti-retroviral Altamente Ativo).
HHV-5	Human Herpesvirus type 5 (Trad.: Herpesvírus Humano tipo 5).
HIV	Human Immunodeficiency Virus (Trad.: Vírus da Imunodeficiência Humana).
HUPES	Hospital Universitário Professor Edgard Santos.
IIQ	Intervalo inter-quartilico.
ILD	Infusão de linfócitos do doador.
IE1	Immediate-early type 1 protein (Trad.: Proteína imediatamente precoce tipo 1 do CMV).
IL-4	Interleucina – 4, citocina.
IL-17A	Interleucina – 17A, citocina.
IFN-γ	Interferon γ , citocina.
LLA	Leucemia linfocítica aguda
LMA	Leucemia mielóide aguda.

LMC	Leucemia mielóide crônica.
kD	Kilodalton, unidade de peso.
MA	Regime de condicionamento mieloablativo.
MHC-I	Major Histocompatibility Complex type I (Trad.: Complexo principal de histocompatibilidade tipo 1).
MHC-II	Major Histocompatibility Complex type II (Trad.: Complexo principal de histocompatibilidade tipo 2).
MIP - 1β	Macrophage inflammatory protein 1 β (Trad.: Proteína inflamatória de macrófago 1 β , citocina).
MMF	Micofenolato mofetil.
MNA	Regime de condicionamento não-mieloablativo.
MTX	Metotrexato.
pb	Pares de Bases de Nucleotídeos.
PCR^{1,2}	Proteína C Reativa ¹ . Reação em cadeia da polimerase ² .
pp65	Phosphoprotein – 65 kD (Trad.: Fosfoproteína de 65 kD).
Pred	Prednisona.
pUL54	Protein Unic Long 54 (Trad.: Proteína codificada na região genômica do CMV única e longa 54, DNA polimerase do CMV).
pUL86	Protein Unic Long 86 (Trad.: Proteína codificada na região genômica do CMV única e longa 86).
pUL97	Protein Unic Long 97 (Trad.: Proteína codificada na região genômica do CMV única e longa 54, quinase).
Q1 – Q3	Quartil 1 (25% dos dados) – Quartil 3 (75% dos dados).
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction (Trad.: Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real).
SI	Sistema Imunológico.
SIDI	Serviço de Imunologia de Doenças Infecciosas.
SMD	Síndromes mielodisplásicas.
TLR	Toll Like Receptor (Trad.: Receptor semelhante a Toll).
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral α , citocina.
TOS	Transplante de Órgão Sólido.
TCTH	Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas.
TMO	Transplante de Medula Óssea.
UL	Unic Long (trad. Região genômica do CMV única e longa).
UFBA	Universidade Federal da Bahia.
VPN	Valor preditivo negativo.
VPP	Valor preditivo positivo.

SUMÁRIO

RESUMO.....	VI
ABSTRACT	VII
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	VIII
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	X
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	02
2.1 Estrutura Viral	02
2.2 Infecção por CMV: definições.....	03
2.3 Vias de Transmissão e Fatores de Risco	05
2.4 Epidemiologia.....	07
2.5 Imunologia da Infecção	09
2.6 Patogênese e Aspectos Clínicos.....	12
2.7 Diagnóstico Laboratorial.....	16
2.8 Terapia Antiviral	19
2.9 O CMV e o Transplante de Órgãos e Tecidos.....	23
3. HIPÓTESES.....	26
4. OBJETIVOS.....	27
4.1 Objetivo Geral	27
4.2 Objetivos Específicos	27
CAPÍTULO 1: Infecção Ativa por Citomegalovírus após o Transplante Renal: incidência, achados clínicos e ponto de corte da antigenemia	28
1. Introdução	29
2. Materiais e Métodos	31
2.1 Pacientes.....	31
2.2 Monitoramento da Infecção e Ensaio de Antigenemia	31
2.3 Definições.....	32
2.4 Análises Estatísticas.....	32
3. Resultados	32
4. Discussão.....	36
5. Referências	39

CAPÍTULO 2: Níveis Plasmáticos de Citocinas e da Proteína C Reativa em Diferentes Momentos da Infecção por Citomegalovírus após o Transplante Renal.41

1.	Introdução	42
2.	Materiais e Métodos	43
2.1	Pacientes e controles	43
2.2	Ensaio de Antigenemia para CMV	44
2.3	Dosagem de citocinas	44
2.4	Dosagem da proteína C reativa.....	44
2.5	Definições.....	45
2.6	Análises estatísticas	45
3.	Resultados	45
3.1	Características dos Pacientes	45
3.2	Níveis Plasmáticos de Citocinas	46
3.3	Níveis Plasmáticos da PCR.....	46
3.4	Correlações	46
4.	Discussão.....	49
5.	Referências	53

CAPÍTULO 3: Infecção ativa por Citomegalovírus após o Transplante Alogênico de Células Tronco Hematopoiéticas: achados clínicos e imunológicos55

1.	Introdução	56
2.	Materiais e Métodos	57
2.1	Pacientes.....	57
2.2	Processamento das amostras biológicas	58
2.3	Ensaio de Antigenemia para CMV	58
2.4	Dosagem de Citocinas	59
2.5	Dosagem da proteína C reativa.....	59
2.6	Definições.....	59
2.7	Análises estatísticas.....	60
3.	Resultados	60
4.	Discussão.....	65
5.	Referências	70

5. CONCLUSÃO GERAL.....73

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....74

7. ANEXO - FORMULÁRIO DE APROVAÇÃO CEP-HUPES87

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Citomegalovírus (CMV) pertence à família *Herpesviridae*, gênero *Citomegalovirus*, sendo classificado como herpesvirus humano tipo 5 (HHV-5) (SMITH, 1956; WELLER et al., 1957). Trata-se de um vírus ubíquo, ou seja, está presente em todas as regiões do mundo onde foi pesquisado, com prevalência variando entre 40% e 100%, diretamente proporcional à idade e inversamente proporcional às condições socioeconômicas da população (BATE et al., 2010; CANNON et al., 2010; BEAM & RAZONABLE, 2012; RAMANAN & RAZONABLE, 2013).

A possibilidade de ser transmitido por diversas formas contribui para a ampla disseminação do vírus (BALE, 2012). Em várias partes do mundo, as autoridades de saúde manifestam preocupação com a infecção por CMV, principalmente quando ocorre em indivíduos considerados de “alto risco” de desenvolverem manifestações clínicas graves. Esse grupo inclui pacientes imunodeficientes, recém-nascidos de baixo peso ou pacientes transplantados (CROUGH & KHANNA, 2009).

O CMV é o mais importante agente infeccioso causador de morbimortalidade em pacientes transplantados (KOWALSKY et al., 2013). O transplante consiste na reposição de um órgão (p. ex., rim, fígado, coração, pulmão) ou tecido (p. ex., medula óssea, ossos, córneas) de uma pessoa doente (receptor) por outro órgão ou tecido normal de um doador vivo ou morto. Trata-se de um procedimento clínico-cirúrgico que se configura como uma alternativa terapêutica segura e eficaz para o tratamento de diversas doenças, determinando melhoria na qualidade e na expectativa de vida dos pacientes (PEREIRA et al., 2009). Entretanto, a imunossupressão, à qual o paciente é submetido no período pré e pós-cirúrgico, favorece a ocorrência da infecção ativa por CMV (CROUGH & KHANNA, 2009).

A resposta imune celular é o principal mecanismo através do qual a replicação viral é controlada (KHAN 2007). A doença órgão invasiva ocorre principalmente em pacientes com profunda imunossupressão celular, como é o caso de alguns transplantados. As células T CD8+ têm um papel essencial no combate à infecção, além disso, alguns trabalhos evidenciam que o baixo número de células T CD4+ CMV-específicas é uma condição preditiva para infecção grave (SESTER et al., 2005; WIDMANN, 2008). Há controvérsias na literatura quanto ao perfil de

citocinas encontrado na resposta contra o CMV, alguns trabalhos destacam o papel protetor das citocinas pró-inflamatórias ou de perfil Th1, enquanto outros estudos apontam o perfil de citocinas Th2 como característico da resposta à infecção (ESSA et al., 2009; BERG et al., 2010).

A alta prevalência do CMV no Brasil ressalta a possibilidade frequente de reativação da infecção latente durante o período pós-transplante, o que sugere a importância do monitoramento da infecção para o diagnóstico precoce e para a redução da morbimortalidade associada ao vírus. Caracterizações clínicas e laboratoriais desses pacientes podem contribuir para melhorar estratégias de prevenção, diagnóstico, monitoramento e tratamento da infecção por CMV.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ESTRUTURA VIRAL

O genoma do CMV é constituído por DNA fita dupla linear, contendo aproximadamente 250.000 pb, que se organizam em pelo menos 165 genes (STERN-GINOSSAR et al., 2012). O proteoma é complexo e inclui proteínas regulatórias, estruturais, facilitadoras de evasão da resposta imune e proteínas moduladoras da transcrição. A partícula viral (vírion) é dividida estruturalmente em três regiões: Capsídio, Tegumento e Envelope (BRITT & BOPPANA, 2004; TOMTISHEN, 2012; FISHMAN, 2013).

O Capsídio viral é uma estrutura icosaédrica composta principalmente por cinco proteínas: UL86, UL48-49, UL85, UL46 e UL80. O vírus alberga seu material genético no interior do capsídio (BRITT & BOPANA, 2004; VARNUM et al., 2004).

O Tegumento viral é uma camada de revestimento amorfa que mantém a associação entre o envelope e o capsídio. Mais da metade de todas as proteínas do vírion está localizada no tegumento, o qual é constituído principalmente pelas proteínas fosforiladas pp71, pp150, pp28 e pp65 (TOMTISHEN, 2012). Depois que são inseridas no citoplasma celular, as proteínas do tegumento tornam-se funcionalmente ativas para desempenharem papéis importantes em todos os estágios do ciclo de vida viral, incluindo: entrada na célula, expressão gênica,

evasão imunológica, montagem do vírion e saída da célula (VARNUM et al., 2004; KALEJTA, 2008).

A pp65 (fosfoproteína de 65 kD) é a proteína mais abundante no tegumento e a principal constituinte da partícula viral extracelular (CHEVILLOTTE et al., 2009). Ela inibe a síntese de vários componentes envolvidos na resposta imunológica do hospedeiro, além de mediar tanto a diminuição da expressão do complexo principal de histocompatibilidade classe 2 (MHC-II) quanto a fosforilação de proteínas virais, o que dificulta a apresentação dessas proteínas via MHC-I (ODEBERG et al., 2003; TOMTISHEN, 2012). Por ser encontrada no núcleo da célula pouco tempo após a replicação viral, a detecção da pp65 tem sido utilizada para o diagnóstico e monitoramento da infecção ativa por CMV através de ensaios de imunofluorescência (LANDRY & FERGUSON, 2000; LANDOLFO et al., 2003).

O Envelope viral é formado por complexos glicoprotéicos de ligações dissulfídicas, divididos em gCI (gB), gCII (gM/gN) e gCIII (gH, gL, gO). As glicoproteínas gM e gN são as mais abundantes do envelope e, junto com gH e gB, são essenciais para a infectividade do CMV (BRITT & BOPANA, 2004). Polimorfismos genéticos originam quatro diferentes variantes genômicas da proteína gB (gB1, gB2, gB3, gB4), resultando em 4 (quatro) cepas distintas do CMV (CHOW & DENNISON, 1991; NOVAK et al., 2008; DIEAMANT et al., 2013).

2.2 INFECÇÃO POR CMV: DEFINIÇÕES

Na literatura há definições discordantes para caracterizar as fases e os perfis da infecção por CMV. Desse modo, serão listadas abaixo as definições utilizadas neste trabalho (LJUNGMAN et al., 2002; MATOS et al., 2011a).

- Infecção por CMV: denominação genérica que se refere à penetração do vírions viáveis em células do hospedeiro, independente do estágio ou tipo da infecção.
- Soropositivo para CMV: designa indivíduo no qual foi detectada a presença de anticorpo anti-CMV de qualquer classe.
- Infecção Ativa por CMV: termo utilizado para evidenciar que o CMV está em fase de replicação em células do hospedeiro.
- Doença por CMV: caracterizada por achados clínico-laboratoriais de lesão órgão-invasiva associada à detecção do CMV no órgão específico através de

isolamento viral, evidência histopatológica, análise imunohistoquímica ou por hibridização in situ.

- Antigenemia: é definida como a detecção do antígeno pp65 em leucócitos do hospedeiro. A antigenemia positiva indica que o paciente está com infecção ativa por CMV.
- Ensaio de Antigenemia para CMV: teste de imunofluorescência indireta que detecta o antígeno pp65 no leucócito do hospedeiro infectado.
- Viremia: período de multiplicação viral, aferido através de isolamento do CMV em fluidos biológicos por técnicas de cultura celular tradicionais ou shell vial.
- DNAemia: é a detecção do DNA do CMV em amostras de plasma, sangue total ou leucócitos isolados do hospedeiro. A técnica mais utilizada para detectar a DNAemia é a reação em cadeia da polimerase (PCR). A DNAemia positiva indica que o paciente está com infecção ativa por CMV.
- Infecção Primária por CMV: designa a primeira vez que o indivíduo foi infectado pelo CMV.
- Infecção Recorrente: é definida como uma nova infecção ativa em um paciente soropositivo para CMV cuja infecção ativa prévia fora detectada há pelo menos 4 semanas. A infecção recorrente é resultado da reativação do vírus latente (endógena) ou reinfeção por outra cepa viral (exógena).
- Reinfeção: designa nova infecção por cepa diferente da qual um indivíduo soropositivo para CMV foi infectado originalmente. Baseado na glicoproteína B, o CMV pode ser dividido em quatro cepas (gB1, gB2, gB3 e gB4). Por exemplo, a reinfeção ocorre quando um indivíduo, previamente infectado por CMV de genótipo gB1, sofre nova infecção por CMV de outra cepa que não seja gB1.
- Reativação: designa detecção de infecção ativa em paciente soropositivo para CMV que cursava com infecção latente.
- Infecção latente: ocorre em paciente soropositivo para CMV no qual o monitoramento não evidencia replicação viral, ou seja, paciente com antigenemia ou DNAemia negativos.
- Infecção precoce por CMV: refere-se à ocorrência de infecção ativa por CMV até o 100º dia após o procedimento cirúrgico do transplante (até D+100).
- Infecção tardia por CMV: refere-se à ocorrência de infecção ativa por CMV após o 100º dia do procedimento cirúrgico do transplante (após D+100).

2.3 VIAS DE TRANSMISSÃO E FATORES DE RISCO

A transmissão do citomegalovírus pode ocorrer através de diversos líquidos biológicos, tais como saliva, sêmen, secreção vaginal, urina, leite materno; também por via transplacentária, por transfusão sanguínea e por transplante de órgãos sólidos (TOS) ou células tronco hematopoiéticas (TCTH) (TAYLOR, 2003; CROUGH & KHANNA, 2009; BALE, 2012).

A infecção primária por CMV geralmente ocorre na primeira infância ou na adolescência (FOWLER & PASS, 2006). As creches são locais propícios à transmissão na infância pela presença de muitas crianças vivendo em grupo, o que facilita o contato com urina ou saliva infectada (HARVEY & DENNIS, 2008). Alguns hábitos durante a adolescência favorecem a transmissão do CMV, como o compartilhamento de copos de bebidas, beijos em diferentes parceiros, manuseio de crianças, ambientes coletivos e início da atividade sexual (STADLER et al., 2010).

Em um adulto com infecção ativa por CMV, a excreção do vírus, via fluidos biológicos, normalmente ocorre durante algumas semanas, entretanto, em crianças ou adolescentes, a excreção do vírus nos fluidos pode demorar meses ou até anos, o que aumenta a possibilidade da transmissão viral, explicando por que o manuseio de crianças é fator de risco para a infecção (HARVEY & DENNIS, 2008).

A relação sexual sem preservativo é a mais importante forma de transmissão entre adolescentes e adultos jovens (STARAS et al., 2008). A iniciação sexual precoce, o aumento de número de parceiros sexuais e o histórico de doenças sexualmente transmissíveis são fatores diretamente associados à elevação da prevalência do CMV (STADLER et al., 2010).

Exposição à saliva ou à urina de recém-nascidos é a principal causa da infecção por CMV em gestantes (SWANSON & SCHLEISS, 2013). A transmissão do CMV de gestante, parturiente ou lactante para seu filho é denominada transmissão vertical. A transmissão vertical pode ocorrer por meio de infecção congênita ou perinatal. A infecção congênita ocorre via placenta, quando leucócitos maternos infectados atravessam a placenta, através do cordão umbilical, e instalam-se no epitélio tubular renal fetal, onde acontece a replicação do vírus (LOH et al., 2006; MATOS et al., 2011a). A infecção perinatal pode ocorrer durante o trabalho de parto ou no pós-parto. No trabalho de parto, a infecção dá-se por transfusão materno-fetal; por acometimento das membranas amnióticas do cordão umbilical ou da placenta; por aspiração de líquido amniótico contaminado, e ainda, por contato com sangue,

secreções genitais ou saliva materna (TRINCADO & RAWLINSON, 2001). No pós-parto, o aleitamento materno é a principal forma de contaminação (HAMPRECHT et al., 2001). Apesar de o aleitamento materno ser uma importante forma de transmissão do CMV no pós-parto, a restrição à amamentação não é uma prática utilizada, uma vez que os benefícios do aleitamento são superiores à possibilidade de o recém-nascido apresentar sintomas clínicos graves após a aquisição do CMV via amamentação (TAYLOR, 2003).

O CMV é o principal agente infeccioso causador de problemas auditivos e anormalidades neurológicas em crianças (CHEERAN et al., 2009; SWANSON & SCHLEISS, 2013). O risco e a gravidade da doença por CMV são maiores quando ocorre infecção primária em gestante soronegativa durante o primeiro trimestre de gravidez. A reativação durante a gravidez também causa infecção congênita sintomática, entretanto, o risco é menor, já que existem anticorpos maternos que inibem a transmissão intrauterina (CROUGH AND KHANNA, 2009).

O envelope lipídico do CMV é facilmente degradado pela maioria dos detergentes, sabões ou álcoois, de modo que a utilização desses produtos é uma forma eficiente de inativar o vírus no ambiente (CANNON & DAVIS, 2005). Alguns trabalhos apontam que hábitos de higiene, como lavar as mãos, por exemplo, podem reduzir consideravelmente a transmissão do CMV, principalmente em ambiente com muitas crianças (TAYLOR, 2003; HARVEY & DENNIS, 2008).

A transfusão sanguínea também é um importante fator de risco para a infecção por CMV, principalmente por que a sorologia para esse agente não faz parte dos exames realizados em todas as bolsas de sangue nos hemocentros brasileiros. Entretanto, a legislação brasileira obriga a transfusão de hemocomponente soronegativo ou com redução de leucócitos para pacientes considerados com “alto risco” de desenvolverem doença grave por CMV, a exemplo dos soronegativos submetidos ao transplante de órgãos e dos recém-nascidos com peso inferior a 1,2 kg de mães soronegativas ou com resultado sorológico desconhecido (BRASIL, 2010). A prevalência do CMV é diretamente proporcional à quantidade de unidades transfundidas, o que ressalta a necessidade de atenção com pacientes politransfundidos (HARMENING, 2006; MATOS et al., 2011b).

Outra forma de transmissão do CMV é o transplante de órgãos sólidos ou de medula óssea. O perfil sorológico do doador (D) e do receptor (R) é um importante fator de risco para a infecção. As consequências mais graves ocorrem quando há

infecção primária no pós-transplante, contexto associado à combinação doador soropositivo (D+) / receptor soronegativo (R-) (ZHOU et al., 2009; BATAILLE et al., 2010).

O transplante realizado entre D+/R- permanece sendo o principal fator de risco associado à infecção ativa, doença ou até mortalidade por CMV no período pós-transplante (HEREDIA et al., 2014). Ljungman e cols. (2003) evidenciaram que o transplante entre D+/R+ estava associado ao aumento de 5 anos na sobrevida dos pacientes e à redução da mortalidade no pós-transplante quando comparado ao transplante entre D+/R-.

Em pacientes transplantados com células tronco hematopoiéticas (TCTH), os fatores de risco para o desenvolvimento da infecção ativa por CMV contemplam: idade avançada; doador não aparentado; transplante de células de cordão umbilical; irradiação corporal total; regime de condicionamento mieloablativo; quimioterapia com fludarabina, globulina antitimocitária ou alemtuzumabe; doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH); baixas contagens de células T CD4+; dentre outros (HEREDIA et al., 2014). Jang e colaboradores (2012) evidenciaram que o risco de uma infecção assintomática progredir para doença citomegálica está associado à carga viral inicial, à leucopenia, à neutropenia e ao tempo de detecção da viremia.

2.4 EPIDEMIOLOGIA

A prevalência da infecção por CMV varia entre 30% - 100% nas diversas localidades ao redor do mundo, sendo diretamente proporcional à idade e inversamente proporcional ao nível socioeconômico da população (AHMED et al., 2006; KHAN, 2007; CROUGH & KHANNA, 2009; BEAM & RAZONABLE, 2012).

O CMV é considerado a causa de infecção congênita mais frequentemente observada, ocorrendo em 0,2% a 2,2% de todos os recém-nascidos (BUONSENSO et al., 2012). Nos Estados Unidos da América (EUA), a prevalência dessa infecção congênita é de 0,7%, significando que, por ano, 30.000 recém-nascidos são infectados por CMV de forma congênita. Oitenta por cento (80%) desses neonatos são assintomáticos e permanecem assim (BRISTOW et al., 2011; CDC, 2013).

O risco de transmissão do CMV para o feto, em caso de infecção primária durante a gestação, é de 30-50%, entretanto, em caso de infecção recorrente, esse risco cai para 2%. Um estudo observou que em um total de 604 recém-nascidos de mães soronegativas para CMV antes da gravidez, 3% desenvolveram infecção

congenita, enquanto, dos 2.857 recém-nascidos de mães que já eram soropositivas para CMV, a infecção congênita ocorreu em 1% dos casos (HARVEY & DENNIS, 2008).

Existem poucos estudos que descrevem a prevalência para CMV na população brasileira, porém, dentre os existentes, todos observaram alta soroprevalência. No que se refere à infecção congênita no Brasil, os dados publicados evidenciaram ocorrência entre 0,8% a 1,08% (MIURA et al., 2006; PINHATA et al., 2009). Entretanto, há relato de uma unidade de tratamento intensivo para neonatos onde a prevalência chegou a 6,8% (SANTOS et al., 2000).

Outros trabalhos mostraram que a soroprevalência para CMV varia entre 60% e 95% em diferentes grupos populacionais brasileiros (SUASSUNA et al., 1995; ALMEIDA et al., 2001; MATOS et al., 2010; SOUZA et al., 2010; MATOS et al., 2011b). Almeida e cols. (2001) observaram soroprevalência de 60% e destacaram que a infecção primária tem picos de ocorrência principalmente aos 5 meses de vida e aos 19,8 anos. Yamamoto e cols. (2007) caracterizaram gestantes soropositivas para CMV de acordo à variante genômica da glicoproteína B (gB), verificando uma distribuição genotípica de gB1 (21,6%), gB2 (46%), gB3 (27%), gB4 (0%) e duas pacientes (5,4%) estavam infectadas por múltiplos genótipos.

Matos e cols. (2010 e 2011b) observaram soroprevalência para CMV de 87,9% e 89,4% em doadores de sangue e em pacientes com doenças hematológicas no estado da Bahia, respectivamente. Nos doadores de sangue, a prevalência do CMV foi diretamente proporcional à idade, além de ter sido maior em mulheres (94,7%) do que em homens (84,6%) (MATOS et al., 2010). Nos pacientes com doença hematológica, a prevalência foi diretamente proporcional à idade e ao número de hemotransfusões realizadas (MATOS et al., 2011b).

O CMV é historicamente um importante agente de morbidade em pacientes transplantados tanto de órgãos sólidos (fígado, rim, pulmão, coração) quanto de células tronco hematopoéticas (KOWALSKY et al., 2013; HEREDIA et al., 2014). Em localidades onde a soroprevalência para CMV é alta, muitos pacientes transplantados já são soropositivos e o impacto do CMV no período pós-transplante é devido à infecção recorrente, principalmente à reativação (LIU et al., 2012).

A incidência de infecção recorrente por CMV no período pós-transplante, principalmente nos três primeiros meses, é estimada em 54-92% em pacientes transplantados com pulmão, 60-100% em transplantados com rim ou fígado e 40-

90% em transplantados com células tronco hematopoiéticas (SCHROEDER et al., 2007; PERES et al., 2010; KOWALSKY et al., 2013; HEREDIA et al., 2014; RAZONABLE & HAYDEN, 2013).

2.5 IMUNOLOGIA DA INFECÇÃO

A defesa imunológica contra a infecção por CMV é constituída por mecanismos de resposta imune inata e adaptativa, com papel central das células T CD8⁺ e CD4⁺, mas com participação importante de células NK, células T $\gamma\delta$, macrófagos, neutrófilos e anticorpos específicos (KHAN, 2007; CROUGH & KHANNA, 2009).

Além do importante papel na defesa primária contra a infecção por CMV, a resposta imune inata contribui para o início da imunidade adaptativa. O CMV é reconhecido através de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), ativando receptores do tipo Toll (TLR's) presentes na membrana plasmática, citoplasma e carioteca de várias células, o que induz tanto a secreção de citocinas inflamatórias quanto a expressão de moléculas co-estimulatórias como o CD80 e CD86, importantes para a resposta imune adaptativa (BOEHME & COMPTON, 2004). Em camundongos infectados com o CMV, foi observado que os receptores TLR9 e TLR3 desempenham papel crítico na imunidade inata (TABETA et al., 2004). Em humanos, o heterodímero TLR2/TLR1 atua como sensor de ativação para a secreção de citocinas inflamatórias na resposta inata contra o CMV (BOEHME et al., 2006).

As células NK têm papel importante no combate às infecções virais. Deficiências na ativação dessas células estão associadas a infecções graves por CMV, como foi observado em um paciente cuja alta expressão de um inibidor de NK desencadeou o aparecimento de doença citomegálica recorrente (GAZIT et al., 2004; KHAN, 2007). Além do mais, a transferência adotiva de células NK tem se mostrado eficiente para garantir proteção contra o CMV (CROUGH & KHANNA, 2009).

A resposta imune celular é o mecanismo mais eficiente de controle da replicação viral. A doença grave por CMV ocorre principalmente em pacientes com profunda imunodeficiência celular (SYLWESTER et al., 2005). O desenvolvimento de linfócitos T citolíticos (CTLs) CMV-específicos após transplante de medula óssea tem sido relacionado à proteção e à recuperação do paciente (LOETH et al., 2012).

De modo semelhante, no período pós-transplante de órgãos sólidos, a resposta imune baseada em células T CD8+ geralmente limita a viremia e protege contra a doença órgão invasiva (KHAN, 2007; CROUGH & KHANNA, 2009).

A proporção de células T CD8+ comprometidas com a resposta CMV-específica é grande quando comparada ao que ocorre em resposta a outros vírus, a exemplo do Epstein-Barr vírus (JIN et al., 2000). CTLs CMV-específicos aparecem em frequência superior a 1% do total de CTLs, podendo chegar até 40% (GILLESPIE et al., 2000). A pp65 é o principal alvo identificado, correspondendo a 70-90% dos CTLs CMV-específicos (WILLS et al., 1996).

Apesar do papel central das células T CD8+ na infecção por CMV, muitos trabalhos têm demonstrado a importância de células T CD4+ para o controle da infecção. Evidências apontam que a persistência de níveis elevados de CTLs CMV-específicos depende da presença de células T CD4+ CMV-específicas (KHAN, 2007). Estudos em pacientes transplantados têm ratificado a participação das células T CD4+ no combate à infecção por CMV. Baixos níveis de células T CD4+ correlacionam-se com susceptibilidade à doença por CMV em pacientes submetidos ao transplante de pulmão (SESTER et al., 2005). Sinais e sintomas da infecção por CMV têm sido precedidos por aumento na viremia e por decréscimo nos níveis de células T CD4+ CMV-específicas, sugerindo a possibilidade de que os níveis de T CD4+ específicas sejam utilizados como marcadores preditivos de doença por CMV (SESTER et al., 2001; WIDMANN, 2008).

Uma característica surpreendente é que a deficiência em células T CD4+ correlaciona-se com a eliminação prolongada do CMV através dos fluidos corporais, entretanto, o mesmo não é observado em casos de deficiência de células T CD8+ (CHEN et al., 2004; TU et al., 2004). Em pacientes imunossuprimidos, a presença de células T CD4+ CMV-específicas produtoras de IFN- γ correlaciona-se fortemente com a recuperação pós-infecção, enquanto a presença de células T CD8+ sozinhas foi insuficiente para controlar a replicação viral (KHAN, 2007). As células T CD4+ CMV-específicas podem aparecer em frequência superior a 1% durante a infecção ativa, apresentando fenótipo de membrana diferenciado (CD57+CD27-CD28-) e secretando altos níveis de IFN- γ , TNF- α e MIP-1 β (POURGHEYSARI et al., 2007). Os antígenos pp65 e gB são os alvos virais mais frequentes dessas células (KHAN, 2007).

Muitos estudos descrevem a participação das citocinas durante a infecção por CMV, principalmente IFN- γ , IL-6, TNF- α , IL-4, IL-17 e IL-10. Foi observado que gestantes soropositivas para CMV apresentam índices maiores de IL-6 e TNF- α do que outras gestantes (ZHANG et al., 2008). Durante a miocardite murina induzida por CMV, houve produção predominante das citocinas TNF- α , IL-6 e IFN- γ (RITTER et al., 2010). Houve maior produção de IL-4 ao estimular células com antígenos do CMV (ESSA et al., 2009). Durante a infecção ativa por CMV, houve uma elevação controversa e simultânea nos níveis séricos de TNF- α e IL-10 em pacientes transplantados (CERVERA et al., 2007). Durante a infecção aguda por CMV, houve infiltração de células Th17 em tecido das glândulas salivares, o que possibilitou a associação entre produção de IL-17 com dano histológico local (LIU et al., 2013).

A importância da imunidade humoral contra o CMV ainda é alvo de muitos debates. Estudos destacam o papel crucial dos anticorpos para restringir a disseminação viral e minimizar processos patogênicos da doença por CMV (SCRIVANO et al., 2011). Durante a infecção primária, anticorpos específicos para muitas proteínas virais começam a ser produzidos, a exemplo das proteínas do tegumento pp65 e pp150, glicoproteínas do envelope gB e gH e proteínas não-estruturais IE1 (LA ROSA & DIAMOND, 2012). Dessas, o principal alvo da resposta imune humoral é a gB, glicoproteína envolvida na interação com a membrana celular e penetração do vírion, sendo o antígeno-alvo de 50% dos anticorpos neutralizantes produzidos durante a infecção por CMV (CROUGH & KHANNA, 2009).

Uma característica clássica do CMV, como todo herpesvírus, é sua capacidade de permanecer por longos períodos em infecção latente (NORIEGA et al., 2012). Após a infecção primária, o vírus e o sistema imune adequam-se a um equilíbrio homeostático que permite a ocorrência da latência viral, estabelecida inicialmente em células da linhagem mielóide (LA ROSA & DIAMOND, 2012). O CMV suspende a duplicação do seu DNA por tempo indeterminado até que estímulos específicos induzam replicação genômica e produção de partículas virais infecciosas (SINCLAIR, 2006).

O mecanismo pelo qual a replicação do CMV é reativada após o estado de latência ainda não é bem conhecido, embora pareça envolver o TNF- α e o anti-CD3 (PESCOVITZ, 2007). Geralmente, a reativação ocorre quando o indivíduo entra em estado de imunossupressão, a exemplo de pacientes transplantados, em uso de drogas imunossupressoras, com AIDS e etc. Entretanto, foi observado que pode

haver reativação do CMV em indivíduos imunocompetentes após uma situação de estresse ou até mesmo como reflexo do balanço entre o vírus e o sistema imunológico (SI) do hospedeiro, como foi observado em astronautas em missões espaciais e em outros indivíduos imunocompetentes, respectivamente (NAUCLER, 2006; COOK, 2007; KALIL & FLORECU, 2009).

O genoma do CMV codifica proteínas que interferem profundamente em componentes da resposta imunológica inata e adaptativa, possibilitando sua permanência no hospedeiro por longos períodos e prevenindo a completa eliminação do vírus (NAUCLER, 2006; NORIEGA et al., 2012). As principais estratégias do CMV para limitar a ação do sistema imunológico do hospedeiro incluem:

- Estabelecimento de um estado de latência da infecção e restrição do número de genes virais expressos a fim de minimizar a exposição ao sistema imune (NAUCLER, 2006; SINCLAIR, 2008).
- Replicação em tecidos específicos, que apresentam uma vigilância imunológica menos intensa (p. ex., glândulas salivares, onde as células não expressam MHC-I suficientes para mediar a eliminação do vírus através das células T CD8+) (SANTOS et al., 2002; NAUCLER, 2006; SINCLAIR & SISSONS, 2006).
- Comprometimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro através da expressão de fatores que silenciam a resposta imune (p. ex., receptores de Fc de imunoglobulinas e citocinas homólogas) ampliando o período disponível para a replicação (NAUCLER, 2006).
- Síntese de produtos gênicos que interagem nas vias de processamento do antígeno viral, dificultando sua apresentação via MHC I/II (NAUCLER, 2006; LA ROSE & DIAMOND 2012; NORIEGA et al., 2012).
- Alteração no imunofenótipo de células dendríticas e interferência na expressão do receptor de quimiocina linfóide CCR7 (NAUCLER, 2006).

2.6 PATOGÊNESE E ASPECTOS CLÍNICOS

O CMV tem a capacidade de infectar muitos tipos celulares, a exemplo das células endoteliais, epiteliais, neuronais, musculares, fibroblastos, leucócitos e células dendríticas (MINTON, 2010). Fibroblastos e células musculares são

importantes sítios de multiplicação viral, enquanto células hematopoiéticas e endoteliais promovem a disseminação sistêmica do CMV, além de servirem como reservatório durante a infecção latente (SINZGER et al., 2008).

A 37°C, o CMV permanece viável por até 45 minutos (JUNQUEIRA et al., 2008). O vírus tem ciclo de replicação lento em cultura celular e rápido no hospedeiro. Ele produz infecção latente (não-lítica) e infecção lítica com efeitos citopáticos, podendo produzir destruição tecidual em diferentes sítios, como trato gastrointestinal, pulmões, cérebro, rim e fígado (CROUGH & KHANNA, 2009). Os mecanismos moleculares de permissividade das células à replicação do CMV ainda não são bem entendidos, mas alguns estudos apontam a importante participação da p53 (CASAVANT et al., 2006).

O início da replicação do DNA viral ocorre entre 12-24 horas após a infecção primária. O processo dura por volta de 24h e envolve a produção de proteínas regulatórias, DNA polimerase viral, proteínas estruturais e, por fim, a montagem dos novos vírions. O tempo de incubação após a infecção é de 4-12 semanas (JUNQUEIRA et al., 2008). O CMV penetra nas células humanas tanto por fusão direta (fusão do envelope viral com a lamela externa da membrana citoplasmática) quanto por vias de endocitose. Os principais eventos ocorridos durante o ciclo lítico de replicação viral são (HUANG & JOHNSON, 2000; LANDOLFO et al., 2003; CROUGH & KHANNA, 2009):

1 - Ligação das glicoproteínas gB e gH do CMV a receptores da célula hospedeira (p. ex., fator de crescimento α derivado de plaquetas), o que ativa fatores de transcri o celulares (p. ex., NF- κ B e Sp1).

2 – O vírus em seguida entra na célula, libera no citoplasma seu DNA, algumas proteínas e transcritos de RNAm. O DNA viral e algumas proteínas são transportadas para o núcleo.

3 – No núcleo, genes virais e celulares são expressos com a ajuda dos fatores de transcri o ativados. O DNA viral inicia seu processo de replicac o.

4 – Após a replicac o, DNA viral, proteínas virais e celulares e transcritos de RNAm do CMV são empacotados em vírions por mecanismo que envolve o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi. Durante a saída dos vírions da célula, o envelope viral   reconstruído e as partículas virais infecciosas são liberadas por exocitose através da membrana plasmática da célula.

A patogênese da infecção por CMV é extremamente complexa, com muitas interações entre o vírus e o sistema imune do hospedeiro, mediadas por vários mecanismos, incluindo bloqueio na apresentação antigênica, produção de citocinas e moléculas de adesão, além de ciclos intermitentes de replicação e latência (NICHOLS et al., 2002; FREEMAN, 2009; MICHAELIS et al., 2009).

A infecção por CMV pode causar diferentes desfechos clínicos a depender do indivíduo infectado. Em pacientes imunocompetentes, a infecção primária geralmente é assintomática. Entretanto, em alguns casos, é possível observar sinais e sintomas, a exemplo da síndrome semelhante à mononucleose, que consiste em febre aguda, linfadenopatia, mialgia e acentuada linfocitose com atipia em 10% das células. Outros achados clínicos observados em pacientes imunocompetentes com infecção ativa incluem: cefaleia, exantema inespecíficos, tosse, epigastralgia, esplenomegalia, icterícia e anemia (LANDOLFO et al., 2003; CROUGH & KHANNA, 2009; ZIEMANN et al., 2010).

A reativação ou reinfecção em paciente imunocompetente geralmente é autolimitada e resolvida sem tratamento. Porém, já há vários relatos de doença órgão invasiva por CMV após reativação em paciente imunocompetente, acometendo principalmente o trato gastrintestinal, o sistema nervoso central e o sistema vascular (COOK, 2007; RAFAILIDIS et al., 2008; ARSLAN et al., 2012).

Muitos trabalhos associam a infecção por CMV com a patogênese de processos autoimunes (BARZILAI et al., 2007). Algumas infecções virais têm a capacidade de induzir uma resposta autoimune transitória, que inclui a produção de auto-anticorpos em baixos títulos, provavelmente por reatividade cruzada entre auto-antígenos e proteínas virais ou indução de apoptose (YAMAMOTO, 1994). Nesse sentido, surgem evidências de que o CMV, ao induzir a secreção de auto-anticorpos, contribui para a patogênese de diversas doenças autoimunes, como o lúpus eritematoso sistêmico, a síndrome antifosfolípide, esclerose sistêmica, doença inflamatória intestinal, poliomiosite, diabetes mellitus, síndrome de Sjogren e diferentes tipos de vasculites (BARZILAI et al., 2007). Além disso, a infecção por CMV induz inflamação sistêmica que também acentua processos aterogênicos em alguns pacientes (LUNARDI et al., 2007). Zhu e cols. (1999) observaram que indivíduos soropositivos para CMV e com elevação sistêmica dos níveis de PCR têm 4,3 vezes mais chances de desenvolver doença arterial coronariana.

O CMV é considerado o vírus mais comumente transmitido através do útero. Aproximadamente 10% das crianças com infecção congênita são sintomáticas ao nascimento e 10-17% apresentam, depois de algum tempo, defeitos auditivos ou sequelas de desenvolvimento neurológico (SWANSON & SCHLEISS, 2013). As manifestações clínicas mais comumente observadas após uma infecção congênita são: retardo mental, prematuridade, hepato-esplenomegalia, hepatite icterica, pneumonite intersticial, microcefalia, calcificações intracranianas, coriorretinite, perdas sensoriais e deficiência de acuidade visual e auditiva (CHEERAN et al., 2009; CROUGH & KHANNA, 2009).

A infecção grave por CMV é observada com mais frequência em pacientes imunocomprometidos (HEREDIA et al., 2013). A gravidade da infecção clínica correlaciona-se com a extensão da imunossupressão celular e com o perfil da infecção, se primária ou recorrente (QU & TRAN, 2007). Em pacientes com AIDS, o CMV ainda é um importante agente etiológico de lesão tecidual, apesar da histórica redução de incidência ocorrida após a introdução da terapia anti-retroviral potente (HAART). Os principais sinais / sintomas relacionados ao CMV nesse grupo de pacientes são: retinite, exantemas inespecíficos, lesões ulcerativas, colites, meningoencefalite, mielopatia e pneumonia intersticial. Essas manifestações são inversamente proporcionais à contagem de células T CD4+ do indivíduo (CROUGH & KHANNA, 2009; OLSON et al., 2010).

Dos pacientes transplantados, durante a infecção ativa, 10-50% apresentam sinais ou sintomas associados ao vírus (CROUGH & KHANNA, 2009). Durante a viremia, o paciente pode apresentar-se: assintomático, com sintomas de moderada intensidade ou com doença órgão invasiva (LEVITSKY et al., 2008; RAMANAN & RAZONABLE, 2013).

No período pós – transplante, os sinais / sintomas mais observados são: febre, diarreia, leucopenia, mal-estar, tosse, trombocitopenia, elevação de transaminases, dor abdominal e elevação de creatinina sérica (CROUGH & KHANNA, 2009; CORDERO et al., 2012). A doença órgão invasiva pode acometer virtualmente qualquer órgão, contudo, aparece com maior frequência no: trato gastrointestinal (enterocolite), pulmão (pneumonite), fígado (hepatite), rim (nefrite), coração (miocardite) e olho (retinite) (JEON et al., 2012; RAZONABLE & HAYDEN, 2013).

Acredita-se que, no paciente transplantado, a imunomodulação promovida pelo CMV favorece o aparecimento de alguns efeitos indiretos à infecção, como: eventos de rejeição aguda ou crônica; bronquiolite obliterante; *diabetes mellitus*; vasculopatia coronariana; fibrose túbulo-intersticial; trombose hepática; recaída da doença neoplásica e infecções oportunistas por bactérias, fungos e outros vírus (MICHAELIS et al., 2009; RAMANAN & RAZONABLE, 2013; RAZONABLE & HAYDEN, 2013).

2.7 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico da infecção por CMV pode ser realizado com diferentes técnicas laboratoriais, entretanto, é importante ressaltar que individualmente elas fornecem informações distintas e podem ser úteis em diferentes contextos clínicos. De acordo à sua finalidade, as técnicas objetivam: detectar anticorpos anti-CMV (soroprevalência), demonstrar replicação viral (infecção ativa) e confirmar infecção órgão-invasiva (doença por CMV) (LJUNGMAN et al., 2002; HEREDIA et al., 2014).

A detecção de anticorpos anti-CMV é utilizada como método de triagem populacional e, geralmente, é realizada por imunoensaio enzimático adsorvente (ELISA) ou quimioluminescente. Essas metodologias são utilizadas para a detecção qualitativa ou quantitativa de anticorpos específicos IgM e/ou IgG anti-CMV, marcadores de infecção aguda e crônica, respectivamente. São muito úteis para determinar a soroprevalência da infecção. Devido ao fato de não haver detecção de antígeno, não servem para evidenciar infecção ativa (BONON et al., 2006; MATOS et al., 2011b).

Em alguns pacientes, é possível a detecção de IgM anti-CMV residual por longo período após a infecção primária. Essa característica dificulta o diagnóstico preciso, pois, quando se detecta simultaneamente IgM e IgG anti-CMV, fica a dúvida se a IgM é oriunda da infecção primária recente ou se é apenas uma IgM residual. A alternativa para resolver a questão é o imunoensaio de avidéz da IgG anti-CMV, uma vez que, até os três primeiros meses após a infecção primária, as IgG's produzidas apresentam baixa avidéz ao reagir com os antígenos do CMV. Assim, a detecção de IgG anti-CMV de baixa avidéz evidencia uma infecção recente. Caso seja detectada IgG anti-CMV de alta avidéz, em concomitância com a IgM anti-CMV, fica caracterizada uma infecção de longo prazo com a presença de IgM residual

(DANGEL et al., 2006; CAVLEK et al., 2008; KANENGISSER et al., 2009; DOLLARD et al., 2011).

A replicação viral pode ser evidenciada através do isolamento do vírus (cultura), amplificação do DNA viral em espécimes do hospedeiro (DNAemia) e detecção de antígeno do CMV em leucócitos do sangue periférico (antigenemia) (ATKINSON & EMERY, 2011).

Por muito tempo, o isolamento viral era a técnica considerada padrão ouro para o diagnóstico e a urina era o principal fluido utilizado. Porém, a dificuldade de realização da técnica, aliada à demora em obter o resultado, fez com que os laboratórios optassem por outras metodologias (ATKINSON & EMERY, 2011). Na década de 1980, surgiram técnicas de cultivo celular baseadas na detecção de antígenos virais, os chamados Shell vial (GLEAVES et al., 1984; RABELLA & DREW, 1990). Esses ensaios permitem a determinação semi-quantitativa da carga viral, porém, geralmente são utilizados para análise qualitativa. O isolamento viral em espécimes clínicas, por meio de cultura celular, evidencia a presença do CMV em replicação, o que é associado à infecção ativa no paciente (ATKINSON & EMERY, 2011).

A partir do final da década de 1980, começaram a surgir ensaios semi-quantitativos que não utilizavam cultura celular para detecção do CMV, os chamados ensaios de antigenemia (ERICE et al., 1992) (Figura 1). Esses ensaios utilizam anticorpos monoclonais que se ligam à pp65 (fosfoproteína de 65 kD), uma proteína do tegumento viral cuja expressão ocorre no núcleo de leucócitos de indivíduos com infecção ativa por CMV. Em seguida, anticorpos monoclonais anti-Fc conjugados ao isotiocianato de fluoresceína são adicionados à reação, possibilitando a visualização fluorescente do núcleo das células infectadas (LANDRY & FERGUSON, 2000). Essa técnica de imunofluorescência indireta é muito utilizada para detecção precoce da infecção ativa por CMV, permitindo a terapia antiviral antes da doença órgão-invasiva (GREINER et al., 2012). As principais vantagens do ensaio de antigenemia são: obtenção do resultado em até 2 horas, alta sensibilidade e especificidade e bom custo-benefício ao realizar poucas amostras (LANDRY & FERGUSON, 2000). As principais desvantagens são: processamento obrigatório até 6 horas após a coleta da amostra, necessidade do microscópio de fluorescência, leitura dependente da perícia do técnico, processo manual, falta de um ponto de corte padronizado e necessidade de contagem de neutrófilos $> 1000/\text{mm}^3$ no sangue total do paciente

(ATKINSON & EMERY, 2011; HEREDIA et al., 2013). O resultado do ensaio de antigenemia para CMV é expresso em número de células positivas / 200.000 leucócitos (CMV Brite turbo Kit, IQ Products, Groningen, Netherlands) (Figura 1).

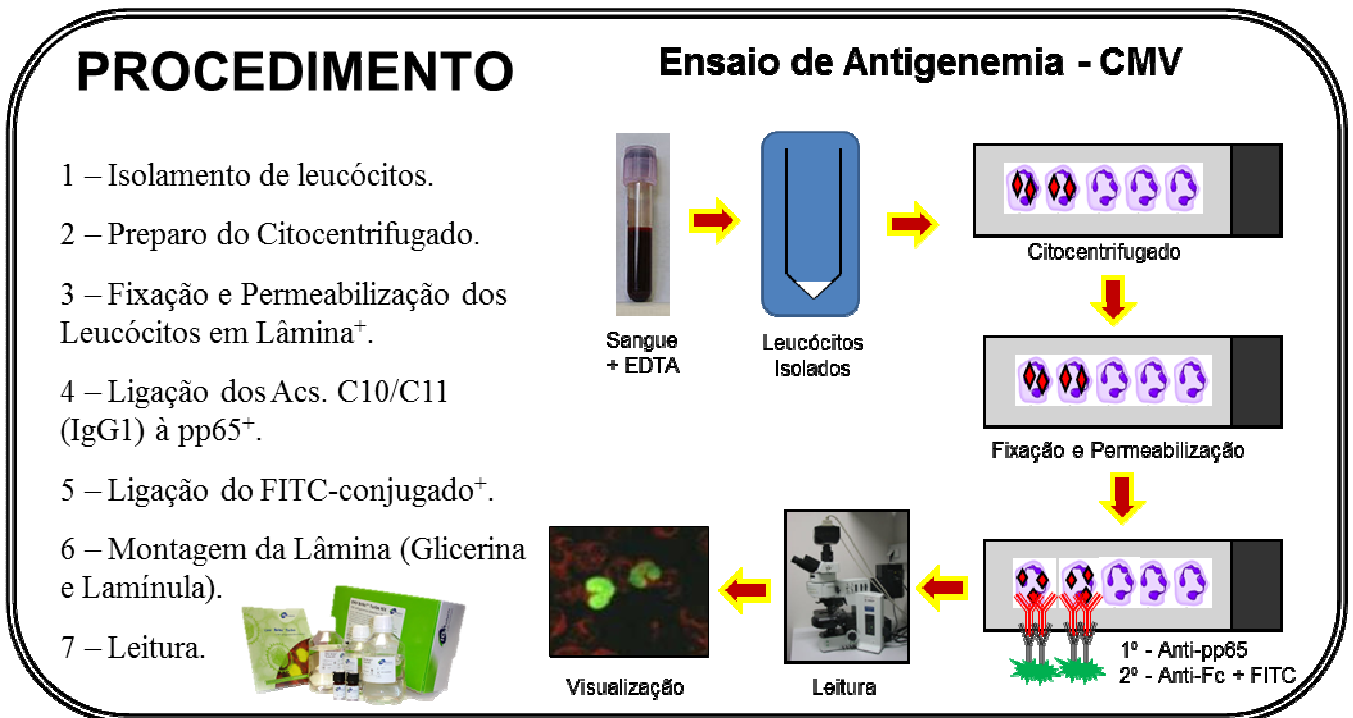


Figura 1. Esquematização do Ensaio de Antigenemia para CMV.

No início da década de 1990, surgiram testes que utilizam a reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar DNA do CMV. Por analogia, a detecção e amplificação de DNA do CMV por PCR foi chamada de DNAemia. Inicialmente eram realizados apenas ensaios qualitativos, entretanto, a técnica foi se modernizando e, por volta do ano 2000, surgiram os ensaios quantitativos de PCR em tempo real (RT-PCR) (GAULT et al., 2000; SCHAADÉ et al., 2000). As principais vantagens dessa técnica são: alta sensibilidade e especificidade, leitura automatizada, análise quantitativa, capacidade de processamento de muitas amostras simultâneas e possibilidade de armazenar a amostra para posterior processamento. As principais desvantagens são: falta de padronização na extração do DNA, baixo custo-benefício ao realizar poucas amostras, falta de um ponto de corte padronizado, amostra biológica ideal não definida (sangue total ou plasma ou leucócitos isolados) e alta variação inter-laboratório (GIMENO et al., 2008; PANG et al., 2009; PERES et al., 2010; ATKINSON & EMERY, 2011). O resultado do RT-PCR é expresso em número de cópias DNA viral / mL (CMV Q – PCR Alert Kit, Nanogen, Torino, Italy).

O diagnóstico da doença por CMV é realizado a partir de evidências clínico-laboratoriais de lesão órgão-invasiva associada à detecção do CMV em biopsia do órgão em questão. Em amostras de biopsia tecidual, o CMV pode ser detectado através de isolamento viral, evidência histopatológica, análise imunohistoquímica ou por hibridização in situ (LJUNGMAN et al., 2002).

No contexto do paciente transplantado, a caracterização da infecção por CMV ocorre em dois momentos: antes e depois do transplante. Antes do transplante faz-se a pesquisa de anticorpos anti-CMV para caracterizar o perfil sorológico tanto do doador quanto do receptor. Depois do transplante, faz-se o monitoramento da infecção ativa por CMV através da antigenemia ou DNAemia. Ambas as técnicas são reconhecidas pelos guidelines internacionais como satisfatórias para o monitoramento da infecção por CMV, entretanto, elas têm vantagens e limitações que devem ser consideradas antes de a equipe laboratorial optar por uma das duas (TOMBLYN et al., 2009; KOTTON et al., 2010; PILMORE et al., 2011).

2.8 TERAPIA ANTIVIRAL

Existem várias drogas antivirais que podem ser utilizadas contra a infecção por CMV (BOECKH & LJUNGMAN, 2009). Em pacientes imunocompetentes, o CMV geralmente causa infecção autolimitada, durante a qual os pacientes ficam assintomáticos ou apresentam sinais / sintomas de moderada intensidade, não necessitando de terapia antiviral (CROUGH & KHANNA, 2009).

Por outro lado, em indivíduos imunossuprimidos, a terapia é necessária para evitar que a infecção ativa evolua para doença órgão invasiva. Em pacientes transplantados, os consensos internacionais reconhecem duas estratégias terapêuticas: a profilaxia universal e a terapia preemptiva. A profilaxia universal consiste em administrar medicação antiviral em todos os pacientes até o terceiro ou sexto mês após o transplante. A terapia preemptiva consiste em monitorar a infecção por CMV através da antigenemia ou DNAemia e utilizar a medicação antiviral apenas quando detectada a infecção ativa (TOMBLYN et al., 2009; KOTTON et al., 2010; ANDREWS et al., 2011).

As principais drogas utilizadas na terapia anti-CMV são: ganciclovir (GCV), valganciclovir, foscarnet e cidofovir (CDV) (KOMATSU et al., 2014). A terapia anti-CMV inclui duas fases: a indução e a manutenção. Durante a fase de indução, são administradas doses maiores da droga, com o intuito de induzir a remissão da

infecção ativa. Na fase de manutenção, utiliza-se a dosagem padrão do antiviral. O período de cada fase varia de acordo às características dos pacientes (ex., resposta à doença, fatores de risco, efeitos colaterais) e aos protocolos de cada centro (HEREDIA et al., 2014).

O ganciclovir (GCV) é o principal antiviral utilizado para o tratamento da infecção por CMV, sendo indicado como droga de primeira escolha para os casos de infecção órgão-invasiva. O GCV é um análogo de nucleosídeo que compete pelo sítio da DNA polimerase, inibindo a síntese do DNA viral. Durante a terapia são observados efeitos colaterais como neutropenia e trombocitopenia, o que muitas vezes limita sua utilização. O esquema terapêutico comum para a profilaxia universal consiste em indução com GCV 5mg/kg/dose (7 dias, 2x/dia, i.v.), seguida pela manutenção com GCV 5 mg/Kg (até o 100º dia pós-transplante [D+100], 1x/dia, i.v.). Na terapia preemptiva, inicia-se a indução com GCV 5 mg/Kg/dose (7-14 dias, 2x/dia, i.v.), seguida pela manutenção com GCV 5 mg/Kg/dose (1x/dia, i.v.) até que se obtenha antigenemia/DNAemia negativa por 2 semanas consecutivas. Nesse esquema, o tempo de tratamento (indução e manutenção) deve durar pelo menos 14 dias (TOMBLYN et al., 2009; KOTTON et al., 2010; UPADHYAYULA & MICHAELS, 2013; HEREDIA et al., 2014).

O valganciclovir é um pró-fármaco do GCV, com biodisponibilidade oral maior do que a do próprio GCV, além de apresentar os mesmos efeitos colaterais. O valganciclovir não é recomendado para o tratamento de doença invasiva, sua principal utilidade é para a terapia de manutenção em pacientes com baixo risco de doença por CMV. Não é uma droga recomendada para profilaxia em transplante de células tronco hematopoiéticas, mas tem sido recomendado na dosagem de 900 mg (1x/dia até D+100) para profilaxia em transplantados com órgão sólido. Na terapia preemptiva, é usado em esquema de indução com 900 mg (2x/dia, 7 dias, v.o.), seguida pela manutenção com 900 mg (1x/dia, v.o.) até duas semanas sem detecção de infecção ativa. Nesse esquema, o tempo de tratamento (indução e manutenção) deve durar pelo menos 14 dias (BOECKH & LJUNGMAN, 2009; TOMBLYN et al., 2009; KOTTON et al., 2010; HEREDIA et al., 2014).

O Foscarnet é um análogo do pirofosfato inorgânico que inibe a ligação do pirofosfato à DNA polimerase do CMV, impedindo, conseqüentemente, a síntese do DNA viral. O uso do foscarnet tem sido associado a efeitos colaterais de nefrotoxicidade, anormalidades eletrolíticas (hipocalcemia, hipomagnesemia,

hipocalemia e hipofosfatemia), efeitos neurotóxicos e anemia. Pela nefrotoxicidade, é considerado um agente de segunda linha para tratar a infecção por CMV, mas é preferível ao GCV em pacientes com mielossupressão ou com resistência ao ganciclovir. O foscarnet é utilizado para profilaxia universal com esquema de indução (60 mg/kg, 2x/dia, 7 dias, i.v.) seguido pela manutenção (90-120 mg/kg, 1x/dia, i.v.) até o D+100. Na terapia preemptiva, pode ser usado em dose de 60 mg/kg (2x/dia, 7 dias, i.v.) na indução e 90mg/kg (1x/dia, i.v) na manutenção até duas semanas sem detecção da infecção ativa (BOECKH & LJUNGMAN, 2009; TOMBLYN et al., 2009; KOTTON et al., 2010; MORI & KATO, 2010; UPADHYAYULA & MICHAELS, 2013; HEREDIA et al., 2014).

O cidofovir (CDV) é um fosfonato de nucleosídeo acíclico que age como inibidor competitivo da DNA polimerase. O CDV é eliminado primariamente pelo rim (80%) em 24 horas, contudo, seu metabólito ativo permanece intracelularmente por longo período, permitindo um esquema de infusões em intervalos semanais. Seus efeitos colaterais são extensos, consistindo principalmente em nefrotoxicidade e mielossupressão, por isso, é considerado agente de terceira linha no tratamento da infecção por CMV. Não é recomendado para profilaxia universal nem para tratamento de crianças. Na terapia preemptiva, CDV é usado em esquemas com indução (5 mg/kg/semana, até 2 doses, i.v.) seguida pela manutenção (5 mg/kg/semana) até duas semanas sem antigenemia / DNAemia positiva. Pacientes tratados com CDV endovenoso devem ser hidratados (antes e depois da infusão para minimizar a nefrotoxicidade) e fazer uso de probenecida (que inibe a secreção no túbulo proximal, protegendo o epitélio tubular) (TOMBLYN et al., 2009; UPADHYAYULA & MICHAELS, 2013; HEREDIA et al., 2014).

Novas drogas anti-CMV estão sendo desenvolvidas e testadas, a exemplo do maribavir e do CMX-001 (BIRON, 2006; MARTY et al., 2011; HEREDIA et al., 2014). Além dessas, há relatos de utilização com sucesso de drogas não convencionais contra o CMV, a exemplo do leflunomida e o artesunato (SHAPIRA et al., 2008; AVERY et al., 2010; WOLF et al., 2011; CHACKO & JOHN, 2012; KOMATSU et al., 2014). De modo geral, cabe destacar a importância do desenvolvimento de novos fármacos anti-CMV, uma vez que os tratamentos tradicionais, apesar de eficazes, desencadeiam importantes efeitos colaterais (BIRON, 2006). Por outro lado, deve-se dar ênfase nas drogas com boa biodisponibilidade oral, pois o tratamento em casa favorece a aderência e contribui para melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

Uma importante questão que margeia os centros de tratamento diz respeito à ocorrência de infecção por CMV resistente à terapia. A resistência pode ocorrer com todas as drogas usadas para o tratamento ou profilaxia (p. ex., ganciclovir, valganciclovir, foscarnet e cidofovir). A Maioria dos casos publicados refere-se à resistência ao ganciclovir, devido a essa droga ser a mais utilizada, com estimativas de que é a primeira escolha terapêutica administrada em 90% dos pacientes (LAURAIN & CHOU, 2010; ANDREWS et al., 2011).

Na prática, deve-se suspeitar de resistência ao medicamento quando ocorrer a progressão da doença ou a carga viral se mantiver estática ou aumentar após 2 semanas de tratamento ininterrupto com dose padrão (BOECKH & LJUNGMAN, 2009). É importante destacar que a antigenemia ou DNAemia não é um bom indicador de resistência nas primeiras semanas de tratamento, uma vez que um aumento transitório nos índices de antigenemia/DNAemia pode ser observado em até um terço dos pacientes. Esse aumento é seguido por um período de declínio dos níveis, daí a importância de a equipe clínica não se precipitar no diagnóstico de CMV resistente (NICHOLS et al., 2001; PARK et al., 2011).

A ocorrência clínica de CMV resistente tem sido demonstrada principalmente após tratamento prolongado com ganciclovir para infecção primária no período pós-transplante. Cepas de CMV resistentes estão disseminadas na população. Quando um paciente está com infecção ativa e o esquema terapêutico utilizado não suprime completamente a replicação viral, um processo de seleção favorece a multiplicação das variantes resistentes (KOMATSU et al., 2014). A resistência é diagnosticada através da detecção, em espécimes clínicas, de mutações características nos genes que codificam as proteínas UL97 quinase e a UL54 DNA polimerase. A resistência ao ganciclovir ocorre principalmente devido a uma das sete mutações no gene que codifica a pUL97 (M460V/I, H520Q, C592G, A594V, L595S, C603W), entretanto, já foram identificadas mais de 40 mutações pontuais que resultam em resistência. Quando há suspeita clínica de resistência, deve-se enviar a amostra para a análise genotípica e mudar a terapia para uma droga alternativa (BOECKH & LJUNGMAN, 2009; LAURAIN & CHOU, 2010; HAKKI & CHOU, 2011; KOMATSU et al., 2014).

2.9 O CMV E O TRANSPLANTE DE ÓRGÃOS E TECIDOS

A infecção por CMV é um tema bastante presente no contexto dos transplantes de órgãos e tecidos. Muitos estudos foram e continuam sendo realizados para melhor definir as características da infecção, tais como: fatores de risco, gravidade, achados clínicos, interação com o sistema imune, estratégias terapêuticas e ferramentas para diagnóstico e monitoramento. Como resultado do empenho de tantos pesquisadores e equipes de saúde ao redor do mundo, hoje, já se sabe muito da relação entre o CMV e o sistema imune do seu hospedeiro, e, já é possível classificar os tipos de infecção e definir aspectos clínicos associados. Além disso, existem várias drogas eficazes para o tratamento e estão disponíveis ferramentas laboratoriais que permitem detectar a infecção ativa com alta sensibilidade e especificidade (MANUEL, 2013; RAMANAN & RAZONABLE, 2013; HEREDIA et al., 2014).

Acumulam-se evidências científicas, porém muitas questões ainda permanecem sem respostas, a exemplo de: qual a melhor estratégia terapêutica para prevenir ou tratar a infecção? Qual o risco de o paciente desenvolver doença grave? Quais os melhores marcadores laboratoriais da infecção e da resposta imune? Quais os sinais ou sintomas patognomônicos da infecção? Quando o paciente vai reativar a infecção? Qual ferramenta laboratorial é melhor para fazer o diagnóstico da infecção ativa? Até quando o paciente deve ser monitorado? dentre muitas outras. Para alguma dessas questões já surgem algumas evidências, porém muitos achados ainda são conflitantes.

A primeira grande questão em aberto é: qual a melhor estratégia terapêutica para prevenir a doença por CMV? Vários estudos apresentam vantagens e desvantagens da terapia preemptiva e da profilaxia universal. Para Kotton e cols. (2010), as vantagens da profilaxia estão na redução das infecções oportunistas e na melhor logística do tratamento, por outro lado, a terapia preemptiva seria melhor no que se refere à segurança do tratamento, à redução da resistência à droga e ao custo reduzido com terapia antiviral. Os autores ainda destacam que a profilaxia é mais apropriada para pacientes com alto risco de desenvolver infecção grave (p. ex., D+/R-) e para os casos nos quais a terapia preemptiva não foi bem estudada, como no transplante de pulmão, intestino e transplante pediátrico. Schroeder e cols. (2007) observaram que, mesmo com a profilaxia universal, ocorreu alta incidência de infecção ativa por CMV no primeiro ano pós-transplante de pulmão. Os autores

destacaram ainda que a terapia preemptiva é uma opção aceitável para esses pacientes, reservando a profilaxia universal apenas para os pacientes com alto risco de desenvolverem doença órgão invasiva (D+/R-). Harvala e cols. (2013) evidenciaram alto índice de mortalidade por CMV associada ao perfil (D+/R+), além de alta incidência de doença tardia em pacientes transplantados com perfil D+/R-, mesmo com a profilaxia.

Outra questão em aberto é referente aos fatores de risco para a infecção por CMV. Jaskula e cols. (2010) destacam que, no pós-TCTH, os fatores de risco incluem DECH aguda, idade avançada e transplante não aparentado. Liu e cols. (2012) destacaram a DECH aguda e uso de globulina antitimocitária como os principais fatores de risco. Para George e cols. (2010), no pós-TCTH o principal fator de risco da reativação do CMV é o perfil (D+/R-), entretanto, outros fatores significantes incluem: uso de alemtuzumabe, condicionamento de intensidade reduzida e DECH aguda. Jang e cols. (2012) observaram que os fatores de risco de a infecção ativa evoluir para doença por CMV eram: alta carga viral, leucopenia e neutropenia.

Alguns protocolos indicados por consensos ou diretrizes internacionais sugerem o monitoramento preemptivo da infecção até o D+100 em paciente transplantado com órgão sólido ou TCTH alogênico e até o D+60 para TCTH autólogo (BOECKH & LJUNGMAN, 2009; TOMBLYN et al., 2009). Por outro lado, é cada vez mais frequente a publicação de estudos ressaltando a existência da infecção tardia por CMV (infecção ativa após D+100) (GRAPIUNA et al., 2013). Ozdemir e cols. (2007) indicam que os fatores de risco para a infecção tardia pós-TCTH incluem doença de base de origem linfóide, ocorrência de DECH, episódio de reativação precoce do CMV (antes do D+100) e linfopenia. Rowe e cols. (2013) destacam que 41% dos pacientes estudados tiveram infecção tardia por CMV no pós-TCTH. O risco de mortalidade foi 4,8 vezes superior nesses pacientes do que nos que não apresentaram a infecção tardia. Esses autores encontraram como fatores de risco para a infecção tardia: TCTH de doador não aparentado, episódio de reativação precoce, doença de base de origem linfóide e uso de globulina antitimocitária. Cordero e cols. (2012) observaram que, em pacientes com transplante renal, 45% dos casos de infecção ativa por CMV ocorreram após o D+100, tendo como fatores de risco o perfil pré-transplante (D+/R-), o doador não aparentado e o tratamento recente para rejeição aguda. Nesse contexto, cabe

destacar a relevância de mais estudos apontando os fatores de risco associados à infecção tardia, bem como avaliando o monitoramento da infecção por períodos superiores aos recomendados.

Outras questões muito discutidas na literatura especializada são relativas à melhor ferramenta laboratorial para monitorar o CMV e ao ponto de corte para iniciar o tratamento. No período pós-transplante, os pacientes são monitorados semanalmente utilizando técnicas para detecção da infecção ativa (p. ex., ensaio de antigenemia ou RT-PCR) (TOMBLYN et al., 2009; KOTTON et al., 2010; PILMORE et al., 2011). Não há um ponto de corte padronizado internacionalmente para início de terapia anti-CMV quando o monitoramento é realizado pelo ensaio de antigenemia nem tampouco quando se utiliza o RT-PCR. Boeckh & Ljungman (2009) sugerem três pontos de corte para o início da terapia quando se utiliza o RT-PCR no plasma de pacientes submetidos ao TCTH, que são: > 100 cópias/mL para pacientes em uso de esteroides, com depleção de células T e em uso de anticorpos anti-célula T; > 500 cópias/mL para pacientes em uso de baixas doses de esteroides e sem depleção de células T ou uso de anti-células T e > 1000 cópias/mL para pacientes com TCTH há mais de 100 dias. Em outro estudo, Peres e cols. (2010) sugerem que seja adotado um ponto de corte de 418,4 cópias/10.000 leucócitos para o início do tratamento. Na prática, cada centro estabelece e utiliza seu próprio ponto de corte. Utilizando o ensaio de antigenemia, Saracino e cols. (2013) observaram que no pós-transplante renal, o ponto de corte de 2 células/lâmina é apropriado para iniciar a terapia preemptiva. Schroeder e cols. (2005) ressaltam que com 4 células/lâmina o paciente já apresenta infecção sintomática, porém, a terapia antiviral só deve ser iniciada quando são detectadas mais de 10 células/lâmina. Kim e cols. (2010) ao monitorar pacientes no pós-TCTH e utilizar ponto de corte de antigenemia de 5 células/lâmina, evidenciou doença por CMV em 6,3% do pacientes tratados preemptivamente com ganciclovir.

Os estudos sobre a resposta imune contra o CMV também apresentam controvérsias. Segundo Comptom e cols. (2003), os processos patológicos associados à doença por CMV são mediados pela liberação de citocinas inflamatórias. Berg e cols. (2010) observaram que, após transplante renal, a infecção primária por CMV é caracterizada por elevação dos níveis séricos de citocinas do perfil Th1, como a IL-18 e o IFN- γ , além de proteínas de fase aguda, como a Proteína C reativa (PCR), a qual tem sido proposta como fator de distinção a

infecção por CMV e por outros agentes (COSTALONGA et al., 2009). Cervera e cols. (2007) observaram que em pacientes transplantados com órgãos sólidos, durante a infecção ativa, havia um aumento sérico dos níveis de TNF- α e IL-10. Humar e cols. (1999) demonstraram que, durante a infecção sintomática, havia elevação dos níveis séricos de IL-6, TNF- α e IL-8. Por outro lado, alguns estudos têm demonstrado que a infecção ativa por CMV pode induzir a secreção de citocinas predominantemente do perfil Th2. Essa e cols. (2009) demonstraram que ao estimular células com antígenos do CMV houve elevação dos níveis de citocinas do perfil Th2 e associação com imunidade celular reduzida. Foi também observada redução na produção de citocinas Th1 após o transplante renal durante a infecção ativa por CMV (ESSA et al., 2000).

Ante o exposto, muito conhecimento já foi produzido em relação à infecção por CMV no período pós-transplante, entretanto, devido às lacunas e controvérsias que existem, são necessários mais estudos que contribuam para determinar a incidência da infecção nos diversos centros de transplante, além de elucidar algumas características da interação CMV/hospedeiro e possibilitar a utilização de estratégias que reduzam ainda mais a ocorrência de formas graves da infecção.

3 HIPÓTESES

A infecção ativa por CMV ocorre em alta incidência nos pacientes submetidos ao transplante renal ou ao transplante de células tronco hematopoiéticas no estado da Bahia.

Os níveis plasmáticos das citocinas IFN- γ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4 e TNF- α e da proteína C reativa variam em diferentes momentos da infecção por CMV.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Monitorar a infecção ativa por CMV nos pacientes submetidos ao transplante renal ou ao transplante de células tronco hematopoiéticas no estado da Bahia, descrevendo características clínicas e imunológicas relacionadas à infecção.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Monitorar a infecção ativa precoce e tardia por CMV através do ensaio de antigenemia para pp65.
- Analisar fatores de risco associados à infecção ativa por CMV.
- Descrever sinais e sintomas presentes nos pacientes com infecção ativa por CMV.
- Determinar um ponto de corte do ensaio de antigenemia para a ocorrência da infecção ativa sintomática nos pacientes submetidos ao transplante renal.
- Analisar o nível plasmático das citocinas IFN- γ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4, TNF- α e da PCR em pacientes sem infecção ativa, com infecção ativa e durante a terapia anti-CMV.
- Correlacionar os níveis das citocinas estudadas e os valores do ensaio de antigenemia durante a infecção ativa.

CAPÍTULO 1

Infecção ativa por Citomegalovírus após o Transplante Renal: incidência, achados clínicos e ponto de corte da antigenemia.

Sócrates Bezerra de Matos^{a,b*}, Roberto Meyer^c, Fernanda Washington de Mendonça Lima^a.

^a*Serviço de Imunologia de Doenças Infecciosas – SIDI. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal da Bahia (UFBA). Salvador, BA, Brasil.*

^b*Programa de Pós-graduação em Imunologia (PPGI). Instituto de Ciências da Saúde (ICS). Universidade Federal da Bahia (UFBA). Salvador, BA, Brasil.*

^c*Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Bahia (UFBA). Salvador, BA, Brasil.*

***Autor para Correspondência:** Sócrates Bezerra de Matos. Serviço de Imunologia de Doenças Infecciosas (SIDI). Faculdade de Farmácia da UFBA. Rua Barão de Jeremoabo n° 147. Ondina. CEP: 40170-115 Salvador, BA, Brasil. Tel: 55 (71) 3283 6956. E-mail: sbiomatos@yahoo.com.br

RESUMO

O Citomegalovírus (CMV) é um dos principais agentes infecciosos causadores de morbimortalidade em pacientes transplantados. Este estudo objetivou descrever a incidência, características clínicas da infecção por CMV e o ponto de corte para o ensaio de antigenemia associado à infecção sintomática. Trata-se de um estudo tipo coorte que monitorou 87 pacientes submetidos ao transplante renal. A incidência da infecção ativa foi de 63,2% (55/87). Dos 65 episódios observados, 75% ocorreram até o D+100 e 25% após o D+100 (mediana de 60 dias). A infecção ativa foi associada à idade do paciente transplantado ($p=0,001$) e à utilização de órgão de doador cadáver ($p=0,009$). Houve episódios assintomáticos (34%) e sintomáticos (66%) de infecção ativa, nos quais a diarreia foi o sintoma mais comum (22,6%), seguida pela elevação dos níveis de creatinina (14,5%), febre (12,9%) e leucopenia (10,5%). O melhor ponto de corte associado à ocorrência da infecção ativa sintomática foi 5 células positivas / 200.000 leucócitos (AUC = 0,87; VPP = 88% e VPN = 71%). A alta incidência observada ressalta a importância do monitoramento da infecção nos receptores de transplante no estado da Bahia. A idade do receptor e o transplante de órgão de doador cadáver foram fatores associados à maior ocorrência da infecção ativa por CMV.

Palavras – chave: transplante de rim, Herpesvirus humano 5, fatores de risco, diagnóstico, sinais e sintomas.

ABSTRACT

Cytomegalovirus (CMV) is the main infectious agent causative of morbidity and mortality in transplant recipients. This study aimed to describe the incidence, clinical features of CMV infection and the antigenemia assay cutoff associated to symptomatic infection. This is a cohort study that monitored 87 patients undergoing renal transplantation. The incidence of active CMV infection was 63.2% (55/87). Of the 65 episodes observed, 75% occurred until D+100 and 25% after D+100 (median 60 days). Active CMV infection was associated to age of transplant recipients ($p = 0.001$) and to use of deceased donor organ ($p = 0.009$). There were asymptomatic (34%) and symptomatic (66%) episodes of active infection, in which diarrhea was the most common symptom (22.6%), followed by elevated creatinine levels (14.5%), fever (12.9%) and leukopenia (10.5%). The best cutoff point associated to symptomatic infection was 5 positive cells / 200.000 leukocytes (AUC = 0.87, PVP = 88% and NVP = 71%). The high incidence underscores the importance of monitoring CMV infection in transplant recipients from Bahia state. The age of recipients and the deceased donor organs were factors associated to increased occurrence of CMV active infection.

Key words: Kidney transplantation, Human Herpesvirus 5, risk factors, diagnosis, signs and symptoms.

1. Introdução

O Citomegalovírus (CMV) é o agente infeccioso mais importante que acomete os pacientes após o transplante de órgão sólido, causando morbidade significativa e mortalidade ocasional (RAMANAN & RAZONABLE, 2013). A infecção ativa por CMV é detectada em 10-70% dos receptores de transplante renal, ocorrendo principalmente até o 100º dia após o procedimento cirúrgico (D+100) (BROWNE et al., 2012; CORDERO et al., 2012; GIAKOUSTIDIS et al., 2012).

A infecção por CMV pode ocorrer de forma assintomática ou apresentar-se associada a sinais e sintomas que incluem: febre, diarreia, mialgia, citopenia e elevação dos níveis séricos de creatinina ou transaminases. Essa infecção pode evoluir para doença órgão invasiva, acometendo principalmente o pulmão, trato

gastrointestinal, rim, fígado, retina e até sistema nervoso central (ANDREWS et al., 2011; KEYZER et al., 2011).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento da infecção ativa por CMV no paciente transplantado são: soropositividade do doador e soronegatividade do receptor do órgão, uso de depletors de linfócitos (p. ex., ATG e alemtuzumabe), tipo e dosagem de drogas imunossupressoras, idade avançada do doador, episódio recente de rejeição aguda e tipo de doador (vivo ou morto) (HUGHES et al., 2008; JUNG et al., 2010; KEYZER et al., 2011).

De maneira geral, a forma de prevenir a doença por CMV varia entre os diferentes centros, mas duas estratégias são reconhecidas pelos *guidelines* internacionais: a profilaxia universal e a terapia preemptiva (KOTTON et al, 2010; ANDREWS et al., 2011). A profilaxia universal envolve a administração do antiviral em todos os pacientes ou grupo considerado de alto risco de desenvolver a infecção grave. A utilização do antiviral é iniciada geralmente no pós-transplante imediato e continua até o 3º ou 6º mês. Na terapia preemptiva, os pacientes são monitorados regularmente e o tratamento é iniciado quando há evidência laboratorial da infecção ativa. Nesse caso, o tratamento dura até que se obtenha a sequência de dois testes negativos com intervalos semanais (KOWALSKY et al., 2013; SARACINO et al., 2013).

A terapia preemptiva é amparada pela realização sequencial de testes que detectam o antígeno pp65, DNA ou RNAm do CMV, principalmente por ensaios de imunofluorescência (antigenemia) ou testes de biologia molecular (reação em cadeia da polimerase) (RAMANAN & RAZONABLE, 2013). A seleção do teste mais adequado depende de vários fatores, incluindo a disponibilidade de recursos, experiência dos profissionais, tempo de processamento e custo-benefício (ATKINSON & EMERY, 2011; RAZONABLE & HAYDEN, 2013).

O presente estudo objetivou descrever a incidência, os principais sinais e sintomas presentes na infecção ativa por CMV e o melhor ponto de corte associado à ocorrência da infecção sintomática em pacientes submetidos ao transplante renal.

2. Materiais e Métodos

2.1 Pacientes

Trata-se de um estudo de coorte com pacientes submetidos ao transplante renal entre Junho de 2010 e Junho de 2012 no Hospital Ana Nery (HAN), vinculado à Universidade Federal da Bahia. O protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (CEP-HUPES), parecer nº 27/2009, e a inclusão dos participantes ocorreu mediante aceitação e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. De um total de 139 pacientes transplantados no período, 87 foram incluídos no estudo. A exclusão se deu pelo não monitoramento adequado de acordo ao protocolo proposto em 2.2.

Os pacientes incluídos residiam em várias cidades do estado da Bahia, cuja população é caracterizada pela descendência africana e pela miscigenação étnica, além de soroprevalência para CMV superior a 85%. Os pacientes excluídos não diferiram dos incluídos quanto ao sexo, idade e tipo de doador ($p > 0,05$).

2.2 Monitoramento da Infecção e Ensaio de Antigenemia

O monitoramento da infecção ativa por CMV foi realizado através do ensaio de imunofluorescência indireta, utilizando o kit comercial CMV Brite turbo Kit (IQ Products, Groningen, The Netherlands) seguindo as instruções do fabricante. Amostras de 5mL de sangue total foram coletadas por sistema à vácuo, tratadas com EDTA e processadas para isolamento de leucócitos em até 6 (seis) horas após a punção. Para cada paciente, foram preparadas duas lâminas com citocentrifugado leucocitário afim de que todos os resultados positivos fossem confirmados em duplicata. A antigenemia foi expressa em nº de células positivas / 200.000 leucócitos.

Esses pacientes foram monitorados quanto à infecção ativa por CMV em intervalos semanais até o centésimo dia pós-transplante (D+100). Após o D+100, o ensaio de antigenemia foi realizado quando houve suspeita clínica de infecção por CMV ou quando o paciente apresentava algum sinal / sintoma inexplicado, como febre, diarreia, citopenia e etc. A terapia preemptiva com ganciclovir intravenoso (5 mg/kg) foi iniciada quando o paciente apresentava antigenemia superior a 10 células positivas / 200.000 leucócitos.

2.3 Definições

Infecção ativa por CMV: termo utilizado para evidenciar que o CMV está em fase de replicação em células do hospedeiro. O ensaio de antigenemia positivo (≥ 1 célula positiva/200.000 leucócitos) indica a ocorrência da infecção ativa.

Infecção ativa sintomática: a detecção da replicação viral através do ensaio de antigenemia em paciente que apresente sinais e/ou sintomas relacionáveis à infecção por CMV.

Episódio de infecção ativa: caracteriza-se pelo período desde o diagnóstico da infecção ativa até a observância de dois resultados consecutivos de antigenemia negativa com intervalos semanais.

2.4 Análises estatísticas

Variáveis categóricas foram analisados pelo teste X^2 e as variáveis contínuas pelo teste de Mann-Whitney. A normalidade dos dados contínuos foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. O valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. A curva ROC foi utilizada para determinar o melhor ponto de corte do ensaio de antigenemia associado à ocorrência da infecção ativa sintomática.

3. Resultados

Foram incluídos no estudo 87 pacientes transplantados, 51 (59%) do sexo masculino e 36 (41%) do feminino (Tab. 1). A idade média dos pacientes foi $32,6 \pm 16,7$ anos (mediana=34). O transplante foi realizado entre doador e receptor soropositivo para CMV (D+/R+) em 72% dos casos. O órgão transplantado foi obtido de doador cadáver em 85% dos transplantes (Tab. 1). O Monitoramento com ensaio de antigenemia ocorreu durante 220 ± 117 dias (Tab. 2).

A incidência da infecção ativa por CMV foi de 63,2% (55/87; Tab. 1). Foram detectados 65 episódios de infecção ativa, 45 pacientes tiveram 1 episódio enquanto 10 pacientes tiveram 2 episódios (Tab. 2). A infecção ativa foi detectada principalmente até o D+100 (75%), com medianas de 60 dias e 23 células positivas / 200.000 leucócitos (Tab. 2).

A idade mediana dos pacientes que desenvolveram infecção ativa (39 anos) foi maior do que a dos que não desenvolveram (17 anos; $p=0,001$) (Tab. 1). Não

houve associação entre infecção ativa e sexo ($p=0,427$), perfil sorológico do doador e receptor ($p=0,554$), tratamento imunossupressivo inicial ($p=0,761$) ou uso de ATG ($p=0,975$). A chance de desenvolver infecção ativa por CMV foi 4,9 vezes maior entre receptores de órgão de doador cadáver (69%; 51/74) do que entre os receptores de órgão de doador vivo (31%; 4/13) ($p=0,009$; OR=4,9), não havendo diferença de idade entre eles ($p>0,05$) (Tab. 1).

Dos 65 episódios de infecção ativa observados, 22 (34%) foram assintomáticos e em 43 (66%) havia sinais / sintomas relacionáveis à infecção por CMV (Tab. 2). A diarreia foi o sintoma mais comum (22,6%), seguida pela elevação dos níveis de creatinina (14,5%), febre (12,9%) e leucopenia (10,5%), como observado na Tabela 3. A infecção ativa sintomática foi observada a partir de 5 células positivas / 200.000 leucócitos (AUC = 0,87; sensibilidade = 87%; especificidade = 70%; valor preditivo positivo = 88%; valor preditivo negativo = 71%), como demonstrado na Figura 1.

Tabela 1. Características dos pacientes submetidos ao transplante renal.

Características	Infecção Ativa (pp65)		P	Total (n = 87; 100%)
	Não (n=32; 36,8%)	Sim (n= 55; 63,2%)		
Idade (anos)				
Média (desvio padrão)	24,9 (17,3)	36,7 (16,1)	0,001*	32,6 (17,6)
Mínimo - Máximo	2 - 67	2 - 68		2 - 68
Mediana	17	39		34
Sexo			0,427	
Masculino	17 (53%)	34 (63%)		51 (59%)
Feminino	15 (47%)	21 (38%)	36 (41%)	
Tipo de doador			0,009**	
Vivo	9 (28%)	4 (7%)		13 (15%)
Morto	23 (72%)	51 (93%)	74 (85%)	
Perfil sorológico para CMV			0,554	
D+/R+	21 (66%)	42 (76%)		63 (72%)
D+/R-	5 (16%)	8 (15%)		13 (15%)
D-/R+	2 (6%)	1 (2%)		3 (4%)
D-/R-	4 (12%)	4 (7%)	8 (9%)	
Terapia imunossupressora			0,761	
FK/MMF/Pred	27 (84%)	45 (82%)		72 (83%)
FK/Aza/Pred	5 (16%)	10 (18%)	15 (17%)	
Uso de ATG***			0,975	
Sim	4 (12%)	7 (13%)		11 (13%)
Não	28 (88%)	48 (87%)	76 (87%)	

Abreviações: FK: tacrolimus; MMF: micofenolato mofetil; Pred: prednisona; Aza: azatioprina; ATG: globulina antitumoral; D: doador; R: receptor. Valor de P obtido pelo teste do Qui-quadrado (χ^2). *Teste de Mann – Whitney. **Não houve diferença em relação à idade dos pacientes ($p>0,05$) e OR=4,9. ***Uso de ATG durante a indução ou para o tratamento de rejeição aguda.

Tabela 2. Características dos pacientes com infecção ativa por CMV.

Nº de pacientes que tiveram infecção ativa	55
Monitoramento do CMV em dias	
Média ± desvio padrão	220 ± 117
Mediana (mínimo - máximo)	183 (120 - 810)
Nº de episódios de infecção ativa	65
Quantidade de episódios / paciente	
1 episódio	45 (82%)
2 episódios	10 (18%)
Tempo de detecção / episódio	
Até o D+100*	49 (75%)
D+100 a D+180	12 (19%)
Após D+180	4 (6%)
Sinais e Sintomas / episódio	
Assintomático	22 (34%)
Sintomático	43 (66%)
Tempo em dias do 1º episódio (mediana, mín-max)	60 (25 - 402)
Valor da 1ª antigenemia (mediana, mín-máx)**	23 (1 - 500)
Valor da maior antigenemia (mediana, mín-máx)**	32 (1 - 500)

*D+100: centésimo dia após o transplante.

**Valor da antigenemia em nº de células positivas / 200.000 leucócitos.

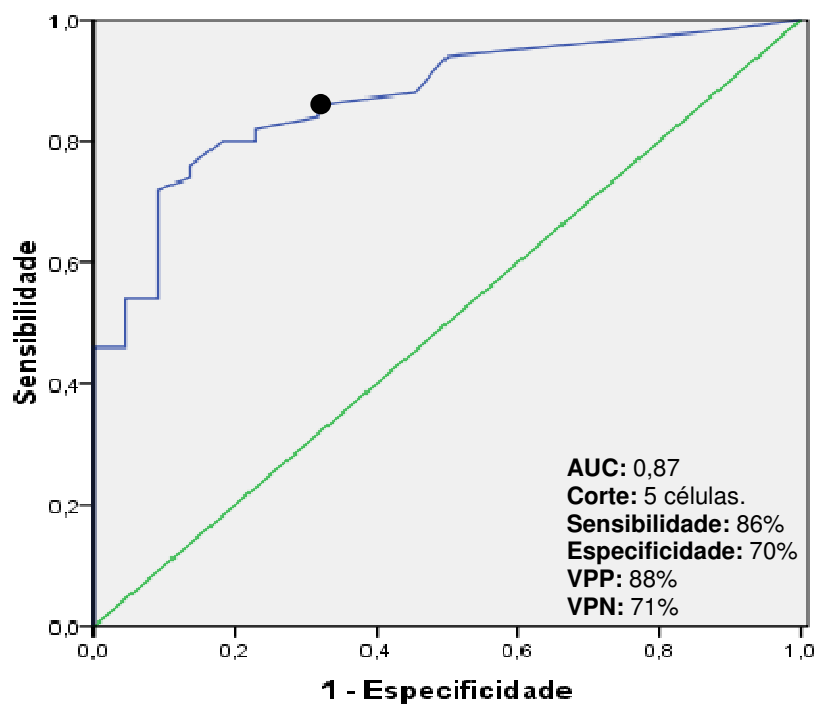


Figura 1. Curva ROC e ponto de corte para infecção ativa sintomática por CMV. AUC: área sob a curva; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo.

Tabela 3. Descrição dos sinais / sintomas apresentados pelos pacientes com infecção ativa por CMV.

Sinais e Sintomas	Frequência (n = 43*)	%
Constitucionais		
Febre	16	12,9
Mal-estar	2	1,6
Falta de apetite	3	2,4
Fraqueza	4	3,2
Pulmonares		
Tosse	1	0,8
Dispneia	2	1,6
Gastrintestinais		
Vômitos	6	4,8
Diarreia	28	22,6
Elevação de transaminases	3	2,4
Dor abdominal	9	7,3
Úlceras gástricas	2	1,6
Úlceras orais	2	1,6
Odinofagia	1	0,8
Disfagia	1	0,8
Hematológicos		
Anemia	3	2,4
Leucopenia	13	10,5
Bicitopenia	3	2,4
Pancitopenia	4	3,2
Trombocitopenia	3	2,4
Renais		
Elevação de creatinina sérica	18	14,5

Sinais / sintomas relatados no protocolo de requisição do ensaio de antígenoemia. Adaptado de Cordero e cols. (2012). *n = 43 episódios de infecção ativa por CMV com sinais / sintomas. Todas as amostras biológicas de pacientes com sinais e sintomas apresentados nessa tabela foram colhidas antes do início da terapia antiviral.

4. Discussão

A infecção ativa por CMV foi detectada em 63,2% (54/87) dos pacientes receptores de transplante renal incluídos no estudo (Tab. 1). Historicamente, a incidência da infecção ativa por CMV varia entre 10% e 70% nos diversos centros de transplante renal (KEYZER et al., 2011; BROWNE et al., 2012; GIAKOUSTIDIS et al., 2012). Essa variação ocorre devido a vários fatores, como a soroprevalência para CMV na população, o perfil sorológico do doador e do receptor do órgão, o tipo de imunossupressão utilizada e o método utilizado para diagnosticar a infecção (RAMANAN & RAZONABLE, 2013).

A infecção ativa é classificada como precoce (quando ocorre até o D+100) e tardia (após D+100). Dos 65 episódios de infecção ativa observados, 49 (75%) aconteceram até o D+100 (Tab. 2), o que está compatível com os achados de Cordero e cols. (2012), cujos pacientes transplantados apresentaram 84% de incidência da infecção precoce. Entretanto, é importante destacar que a infecção tardia ocorreu em 25% dos casos (Tab. 2), o que ressalta a importância do monitoramento após o 3º mês de transplante, como também discutido por outros autores (JAMAL et al., 2013).

A idade mediana dos pacientes que tiveram infecção ativa foi maior do que a dos que não tiveram (39 vs. 17; $p=0,001$), como demonstrado na Tabela 1. Em outros estudos, não houve associação entre idade do paciente e ocorrência da infecção ativa (CORDERO et al., 2012; SARACINO et al., 2013). Os demais fatores avaliados não influenciaram a incidência da infecção ativa, como o sexo dos pacientes, perfil sorológico do doador/receptor, uso da ATG e tipo de terapia imunossupressora (Tab. 1). Harvala e cols. (2013) também não encontraram diferença na incidência da infecção por CMV entre o transplante realizado com D+/R- e com D+R+ ($p>0,05$).

No presente estudo, foi observado que a chance de desenvolver infecção ativa por CMV foi 4,9 vezes maior entre receptores renais de doador cadáver do que entre os de doador vivo, o que aponta a utilização de órgão de doador cadáver como fator de risco para a infecção ativa (Tab. 1). Um resultado similar foi relatado por Schroeder e cols. (2005), que observaram a ocorrência da infecção sintomática por CMV em 49,5% dos receptores de doador cadáver e em 27% dos receptores de

doador vivo ($p=0,02$). Esses achados associam o transplante de órgão de doador cadáver à maior incidência da infecção ativa por CMV.

O CMV pode causar infecção assintomática ou com a presença de sinais / sintomas, podendo até evoluir para infecção órgão invasiva (KEYZER et al., 2011). No presente estudo, ocorreram 65 episódios de infecção ativa, em 43 (66%) deles houve sinais / sintomas associados ao CMV (Tab. 2). Diarreia foi o sintoma mais comumente observado (22,6%), seguido pelo aumento dos níveis séricos de creatinina (14,5%), febre (12,9%) e leucopenia (10,5%) (Tab. 3). Outros autores observaram que os sinais / sintomas mais comuns associados ao CMV são: febre e anormalidades hematológicas (JUNG et al., 2010). Cordero e cols. (2012) ratificam a observação de que febre é a principal apresentação clínica associada à infecção ativa por CMV, seguida, em ordem de frequência, por mal-estar, tosse, leucopenia e diarreia. Vale ressaltar, que os dados apresentados na Tabela 3 não são suficientes para comprovar a relação causa-efeito entre os sintomas apresentados e a infecção por CMV, uma vez que outros fatores, a exemplo da própria terapia imunossupressora, podem ter contribuído para o aparecimento dos mesmos. São necessários estudos mais específicos para avaliar a ocorrência da diarreia, ao invés de febre e/ou anormalidades hematológicas, como principal sintoma associado à infecção ativa por CMV.

A utilização do ensaio de antigenemia para monitorar a infecção ativa por CMV e amparar a terapia preemptiva há tempo já tem sido recomendada pelos *guidelines* internacionais para manejo do paciente transplantado (KOTTON et al., 2010; PILMORE et al., 2011). Entretanto, o ponto de corte associado ao risco de infecção sintomática ou sugerido para o início do tratamento ainda não foi estabelecido, fazendo com que cada centro estabeleça e utilize o seu próprio, variando desde 1 a 50 células positivas por lâmina com 200.000 leucócitos (JUNG et al., 2010).

Saracino e cols. (2013) sugeriram que o título de antigenemia ≥ 2 células positivas / 200.000 leucócitos pode ser considerado um ponto de corte apropriado para iniciar a terapia preemptiva entre os receptores de transplante renal (SARACINO et al., 2013). Em contraste, Jung e cols. (2010) concluíram que a terapia deve ser administrada apenas para pacientes com ≥ 25 células positivas por lâmina. Para Schroeder e cols. (2005), o ponto de corte mais apropriado para o diagnóstico de infecção sintomática por CMV é 4 células por lâmina, e o mais

adequado ponto de corte para iniciar a terapia antiviral é 10 células por lâmina (SCHROEDER et al., 2005).

Para avaliar essa questão, foi gerada uma curva ROC para determinar o ponto de corte do ensaio de antigenemia preditivo da infecção ativa sintomática. O melhor ponto de corte observado foi 5 células positivas / 200.000 leucócitos (AUC = 0,87, sensibilidade = 86%, especificidade = 70%, VPP = 88%, VPN = 71%), como demonstrado na Figura 1. Baseado nesse ponto de corte, 88% dos pacientes seriam tratados antes do aparecimento da infecção sintomática, o que reduziria a ocorrência da infecção sintomática não tratada dos 66% observados nesse estudo (Tab. 2) para 29%. Porém, antecipar o ponto de corte de início da terapia envolve aumentar a frequência de utilização dos antivirais, o que deve ser visto com cuidado, avaliando os riscos e benefícios para os pacientes.

Em conclusão, a alta incidência da infecção ativa por CMV observada ressalta a importância de implementar um protocolo de monitoramento e manejo da infecção nos receptores de transplante renal no estado da Bahia. Esse protocolo de monitoramento deve reconhecer a ocorrência da infecção ativa precoce e tardia, além de considerar a idade do receptor e a captação de órgão de doador cadáver como fatores associados à maior incidência da infecção. Em pacientes com infecção sintomática, diarreia e elevação dos níveis séricos de creatinina foram os sinais e sintomas mais frequentes. Os pacientes apresentam infecção sintomática por CMV a partir de 5 células positivas / 200.000 leucócitos no ensaio de antigenemia.

Agradecimentos

Agradecemos aos pacientes e à equipe clínica do transplante renal do Hospital Ana Nery, Salvador, BA. Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do estado da Bahia (FAPESB), Brasil (Outorga nº. 16/2010).

Conflito de Interesse

Todos os autores declaram que não existe conflito de interesses.

5. Referências

ANDREWS PA, EMERY VC, NEWSTEAD C. Summary of the British Transplantation Society Guidelines for the Prevention and Management of CMV Disease after Solid Organ Transplantation. *Transplant* 2011; 92:1181-1187.

ATKINSON C, EMERY VC. Cytomegalovirus quantification: Where to next in optimising patient management? *J Clin Virol* 2011; 51:219–224.

BOECKH M, LJUNGMAN P. How i treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients. *Blood* 2009; 113:5711-5719.

BROWNE BJ, YOUNG JA, DUNN TB, et al. The impact of cytomegalovirus infection \geq 1 year after primary renal transplantation. *Clin Transplant* 2010; 24:572–577.

CORDERO E, CASASOLA C, ECARMA R, et al. Cytomegalovirus Disease in Kidney Transplant Recipients: Incidence, Clinical Profile, and Risk Factors. *Transplant Proc* 2012; 44:694-700.

GIAKOUSTIDIS D, ANTONIADIS A, FOUZAS I, et al. Prevalence and Clinical Impact of Cytomegalovirus Infection and Disease in Renal Transplantation: Ten Years of Experience in a Single Center. *Transplant Proc* 2012;44:2715–2717.

GRIFFITHS P, WHITLEY R, SNYDMAN DR, et al. Contemporary management of cytomegalovirus infection in transplant recipients: guidelines from an IHMF workshop, 2007. *Herpes* 2008; 15:4-12.

HARVALA H, STEWART C, MULLER K, et al. High risk of cytomegalovirus infection following solid organ transplantation despite prophylactic therapy. *J Med Virol* 2013; 85:893-898.

HUGHES D, HAFFERTY J, FULTON L, et al. Donor and recipient CMV serostatus and antigenemia after renal transplantation: an analysis of 486 patients. *J Clin Virol* 2008; 41:92-95.

JAMAL AJ, HUSAIN S, LI Y, et al. Risk Factors for Late-Onset Cytomegalovirus Infection or Disease in Kidney Transplant Recipients. *Transplant* 2014; 97:569-575.

JUNG GO, KIM SJ, CHOI GS, et al. The effect of cytomegalovirus antigenemia titer on the efficacy of preemptive therapy for the prevention of cytomegalovirus disease after kidney transplantation. *Transplant Proc* 2010; 42:804-810.

KEYZER K, LAECKE SV, PEETERS P, et al., Human Cytomegalovirus and Kidney Transplantation: A Clinician's Update. *Am J Kidney Dis* 2011; 58(1):118-126.

KOTTON CN, KUMAR D, CALIENDO AM, et al. International Consensus Guidelines on the management of Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation. *Transplant* 2010; 89:779-795.

KOWALSKY S, ARNON R, POSADA R. Prevention of cytomegalovirus following solid organ transplantation: a literature review. *Pediatr Transplant* 2013; 17:499–509.

PILMORE H, PUSSELL B, GOODMAN D. KHA-CARI guideline: cytomegalovirus disease and kidney transplantation. *Nephrol* 2011; 16:683-687.

RAMANAN P, RAZONABLE RR. Cytomegalovirus Infections in Solid Organ Transplantation: A Review. *Infect Chemother* 2013; 45(3):260-271.

RAZONABLE RR, HAYDEN RT. Clinical Utility of Viral Load in Management of Cytomegalovirus Infection after Solid Organ Transplantation. *Clin Microbiol Rev* 2013; 26(4):703-727.

SARACINO A, COLUCCI R, LATORRACA A, et al. The effects of preemptive therapy using a very low threshold of pp65 antigenemia to prevent cytomegalovirus disease in kidney transplant recipients: a single-center experience. *Transplant Proc* 2013; 45:182-184.

SCHROEDER R, MICHELON T, FAGUNDES I, et al. Antigenemia for cytomegalovirus in renal transplantation: choosing a cutoff for the diagnosis criteria in cytomegalovirus disease. *Transplant Proc* 2005; 37:2781-2783.

CAPÍTULO 2

Níveis Plasmáticos de Citocinas e da Proteína C Reativa em Diferentes Momentos da Infecção por Citomegalovírus após o Transplante Renal.

Sócrates Bezerra de Matos^{a,b*}, Geraldo Pedral Sampaio^c, Ricardo David Couto^d
Roberto Meyer^c, Fernanda Washington de Mendonça Lima^a.

^a*Serviço de Imunologia de Doenças Infecciosas – SIDI. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal da Bahia (UFBA). Salvador, BA, Brasil.*

^b*Programa de Pós-graduação em Imunologia (PPGI). Instituto de Ciências da Saúde (ICS). Universidade Federal da Bahia (UFBA). Salvador, BA, Brasil.*

^c*Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Bahia (UFBA). Salvador, BA, Brasil.*

^d*Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário prof. Edgard Santos. Universidade Federal da Bahia (UFBA). Salvador, BA, Brasil.*

***Autor para Correspondência:** Sócrates Bezerra de Matos. Serviço de Imunologia de Doenças Infecciosas (SIDI). Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia. Rua Barão de Jeremoabo n° 147. Ondina. CEP: 40170-115 Salvador, BA, Brasil. Tel: 55 (71) 3283 6956. E-mail: sbiomatos@yahoo.com.br

RESUMO

A infecção por Citomegalovírus é de alta relevância no período pós-transplante e o entendimento da dinâmica de proteínas plasmáticas envolvidas pode contribuir para melhor caracterizar a infecção. O presente estudo objetivou descrever e avaliar os níveis plasmáticos citocinas e da proteína C reativa (PCR) em 34 pacientes submetidos ao transplante renal. A infecção ativa foi monitorada através do ensaio de antigenemia para CMV e os níveis de citocinas e de PCR foram quantificados por ensaio multiplex de citometria de fluxo e por imunoensaio turbidimétrico, respectivamente. Houve correlação entre os níveis de IL-4 e o número de células positivas no ensaio de antigenemia em pacientes com infecção ativa, além disso, a IL-4 estava em níveis maiores durante a terapia anti-CMV ($p < 0,01$). Houve aumento nos níveis da PCR em pacientes com infecção ativa (0,5 vs. 8,0; $p < 0,01$), além da correlação entre esses níveis e o número de leucócitos positivos no ensaio de antigenemia ($r = 0,38$, $p = 0,02$). Foi observada também correlação entre os níveis de IL-17A e TNF- α ($r = 0,60$, $p < 0,01$) e de IL-17A e IL-4 ($r = 0,63$, $p < 0,01$). Esses achados sugerem que mudanças nos níveis sistêmicos da PCR e da IL-4 desempenham um papel na resposta imune contra o vírus, sendo, portanto, candidatos a biomarcadores na infecção.

Palavras – chave: transplante de rim, Herpesvirus humano 5, citocinas, inflamação.

ABSTRACT

Cytomegalovirus infection is highly relevant during post-transplant period and the knowledge of the dynamic of plasma proteins involved may contribute to better characterize this infection. The present study aimed to describe and evaluate plasma levels of cytokines and of the C-reactive protein (CRP) among 34 patients who underwent renal transplantation. The active infection was monitored by CMV antigenemia assay and cytokine and CRP levels were quantified by flow cytometry multiplex assay and turbidimetric immunoassay, respectively. There was correlation between IL-4 levels and number of positive cells in antigenemia assay during active infection, moreover, IL-4 was in higher levels during anti-CMV therapy ($p < 0.01$). There was an increase in CRP levels into patients with active infection (0.5 vs. 8.0; $P < 0.01$), in addition with correlation between IL-4 levels and the number of positive leukocytes in antigenemia assay ($r = 0.38$, $p = 0.02$). Correlation between IL-17A and TNF- α ($r = 0.60$, $p < 0.01$) and IL-17A and IL-4 ($r = 0.63$, $p < 0.01$) levels was also observed. These findings suggest that changes in systemic levels of CRP and IL-4 play a role in the immune response against the virus, being therefore candidate biomarkers for infection.

Key words: kidney transplant, Human Herpesvirus 5, cytokines, inflammation.

1. Introdução

O Citomegalovírus (CMV) é um patógeno humano ubíquo, com prevalência variando geograficamente de acordo ao perfil socioeconômico da população, chegando próximo aos 100% nos países em desenvolvimento (RAMANAN & RAZONABLE, 2013). Ele é o agente infeccioso mais comumente relacionado a desfechos adversos em pacientes submetidos ao transplante de órgãos sólidos. A incidência da infecção ativa por CMV varia com o perfil sorológico do doador e do receptor do órgão, com o estado geral da imunossupressão e com o tipo de órgão transplantado (BEAM & RAZONABLE, 2012; HARVALA et al., 2013).

Durante a infecção ativa por CMV, a secreção de citocinas e de proteínas de fase aguda é importante para recrutar células inflamatórias necessárias ao controle da replicação viral (COMPTON et al., 2003; CERVERA et al., 2007). Embora a resposta imune contra a infecção viral geralmente seja amparada pela secreção de citocinas pró-inflamatórias ou de perfil Th1, alguns estudos têm demonstrado

resultados discordantes quanto ao perfil de citocinas secretadas durante a infecção ativa por CMV em pacientes submetidos ao transplante renal. Essa e cols. (2009) evidenciaram que a infecção ativa induz a secreção de citocinas de perfil Th2, enquanto Berg e cols. (2010) demonstraram que o CMV induz uma ativação imune sistêmica caracterizada por citocinas de perfil Th1 e proteína C reativa.

Citocinas inflamatórias podem mediar diretamente ou facilitar os processos patológicos associados ao CMV (COMPTON et al., 2003; NAUCLER, 2006). Algumas citocinas têm sido relacionadas ao favorecimento da reativação viral e à patogênese da lesão tecidual, a exemplo do TNF- α , que induz a síntese de produtos gênicos do CMV que desempenham papel chave na reversão do estado de latência (NAUCLER, 2006; CROUGH & KHANNA, 2009). Além disso, em modelos experimentais de transplante de pele, a IL-17 foi associada à patogenia da pneumonia intersticial por CMV (ZHAO et al., 2011).

Desse modo, o presente estudo objetivou descrever e avaliar o perfil plasmático de citocinas e da proteína C reativa em pacientes submetidos ao transplante renal em diferentes momentos da infecção por CMV.

2. Materiais e Métodos

2.1. Pacientes e controles

Foram coletadas amostras de sangue total de 34 pacientes submetidos ao transplante renal no Hospital Ana Nery, vinculado à Universidade Federal da Bahia. Como controle, foram utilizadas amostras de 30 doadores de sangue. O protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (CEP-HUPES), parecer nº 27/2009.

A inclusão dos participantes ocorreu mediante aceitação e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Os pacientes incluídos residiam em várias cidades do estado da Bahia, cuja população é caracterizada pela descendência africana e pela miscigenação étnica, além de soroprevalência para CMV superior a 85%.

De acordo com características relacionadas à infecção por CMV, as amostras biológicas foram agrupadas em:

G1: Doadores de sangue sem infecção ativa (n = 30);

G2: Receptores de transplante renal, assintomáticos e sem infecção ativa por CMV (n = 31);

G3: Receptores de transplante renal, com infecção ativa por CMV, antes de iniciar a terapia anti-CMV (n = 38);

G4: Receptores de transplante renal, durante a terapia anti-CMV (n = 56) e com antigenemia ainda positiva.

2.2. Ensaio de Antigenemia para CMV

A detecção da infecção ativa por CMV foi realizada através do ensaio de imunofluorescência indireta, utilizando o kit comercial CMV Brite turbo Kit (IQ Products, Groningen, The Netherlands) seguindo as instruções do fabricante.

As amostras de sangue periférico tratadas com EDTA foram processadas até 6 (seis) horas após a punção. Foram preparadas duas lâminas de cada amostra afim de que todos os resultados positivos fossem confirmados em duplicata. A antigenemia foi expressa em nº de células positivas / 200.000 leucócitos.

2.3. Dosagem de citocinas

O nível plasmático das citocinas IFN- γ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4 e TNF- α foi quantificado através de ensaio multiplex por citometria de fluxo. Foram utilizados kits comerciais Flowcytomix Simplex Kit (Bender MedSystems, Vienna, Austria) e o citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, MD, USA), seguindo as instruções do fabricante.

A concentração de cada citocina foi determinada por interpolação da intensidade de fluorescência utilizando a curva de diluição de 7 pontos, analisada através do software FlowCytomix™ Pro 3.0 (eBiosciences®, Bender MedSystems, Vienna, Austria). A sensibilidade para detecção de cada citocina foi: IFN- γ = 1,6 pg/mL, IL-17A = 2,5 pg/mL, IL-10 = 1,9 pg/mL, IL-6 = 1,2 pg/mL, IL-4 = 20,8 pg/mL e TNF- α = 3,2 pg/mL.

2.4 Dosagem de proteína C reativa (PCR)

O nível plasmático da PCR foi quantificado por imunoenensaio turbidimétrico através do sistema automatizado de química seca Vitros® 250/1 micro-slide system (Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Rochester, NY, USA) seguindo as instruções do

fabricante. A sensibilidade para detecção foi de 0,5 mg/L. Os resultados > 40 mg/L foram confirmados em duplicata.

2.5 Definições

Infecção ativa por CMV: termo utilizado para evidenciar que o CMV está em fase de replicação em células do hospedeiro. O ensaio de antigenemia positivo (≥ 1 célula positiva / 200.000 leucócitos) indica a ocorrência da infecção ativa.

Infecção ativa sintomática: a detecção da replicação viral através do ensaio de antigenemia em paciente que apresente sinais e/ou sintomas relacionáveis à infecção por CMV.

Episódio de infecção ativa: caracteriza-se pelo período desde o diagnóstico da infecção ativa até a observância de dois resultados consecutivos de antigenemia negativa com intervalos semanais.

2.6 Análises Estatísticas

Níveis de citocinas foram expressos em medianas e intervalo inter-quartil (IIQ, Q1 – Q3). Os quatro grupos (G1 a G4) foram analisados utilizando o teste de Kruskal-Wallis e a comparação múltipla de Dunn. Variáveis contínuas foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney quando indicado. A correlação entre variáveis foi analisada pelo coeficiente de Spearman. A normalidade dos dados contínuos foi avaliada pelo Kolmogorov-Smirnov test. O valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3. Resultados

3.1. Características dos Pacientes

Dos trinta e quatro pacientes incluídos, 18 eram do sexo masculino e 16 do sexo feminino. A terapia imunossupressora com tacrolimus, micofenolato mofetil e prednisona era utilizada por 83% deles. A idade média foi de $31,3 \pm 16,9$ anos (mediana = 30).

3.2. Níveis Plasmáticos de Citocinas

Na Tabela 1 são demonstrados os níveis plasmáticos de IFN- γ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4 e TNF- α em diferentes momentos da infecção por CMV. Os pacientes transplantados (G2, G3 e G4) apresentaram níveis plasmáticos de todas as citocinas maiores do que o grupo controle (G1; $p < 0,05$).

Não foram observadas diferenças quanto aos níveis das citocinas IFN- γ , IL-17A, IL-10, IL-6 e TNF- α entre os pacientes em relação ao momento da infecção (G2, G3, G4; $p > 0,05$). A IL-4 estava em níveis maiores em pacientes com infecção ativa durante a terapia anti-CMV do que nos pacientes sem infecção ativa (G4 vs. G2; Tab. 1, Fig. 1).

3.3. Níveis Plasmáticos da PCR

Os níveis da PCR variaram entre os diferentes momentos da infecção (Fig. 2). Houve aumento dos níveis plasmáticos da PCR na infecção ativa (0,5 vs. 8,0; $p < 0,01$), decrescendo durante a terapia anti-CMV, porém ainda permanecendo maiores do que nos pacientes sem infecção ativa (3,9 vs. 0,5; $p < 0,01$).

3.4. Correlações

Durante a infecção ativa, foi observada relação direta entre a contagem da antigenemia para CMV e os níveis plasmáticos da PCR ($r = 0,38$, $p = 0,02$) e da IL-4 ($r = 0,34$, $p = 0,04$) (Fig. 3). Houve também correlação entre os níveis de IL-17A e TNF- α ($r = 0,60$, $p < 0,01$) e IL-17A e IL-4 ($r = 0,63$, $p < 0,01$). Para as demais citocinas, não houve correlação com a contagem da antigenemia nem com os níveis de outra citocina ($p > 0,05$).

Tabela 1. Níveis plasmáticos de citocinas em diferentes momentos da infecção por CMV.

Citocina (pg/mL)	Controles (G1)	Sem Infecção Ativa (G2)	Com Infecção Ativa (G3)	Terapia anti-CMV (G4)
IFN- γ	23,7 (20,1 - 27,8)	41,2 (32,6 - 55,1)	39,9 (33,3 - 50,0)	46,6 (30,1 - 71,8)
IL - 17A	14,0 (13,4 - 19,9)	45,1 (19,1 - 68,8)	51,0 (23,2 - 103,9)	60,0 (32,1 - 105,6)
IL - 10	27,4 (26,7 - 32,1)	42,8 (35,1 - 54,1)	42,3 (32,8 - 56,0)	47,5 (40,3 - 60,2)
IL - 6	22,2 (21,6 - 26,2)	26,4 (26,1 - 26,7)	26,6 (26,1 - 27,6)	27,1 (26,4 - 28,3)
IL - 4	32,1 (27,1 - 35,0)	41,9 (35,6 - 44,7)*	42,3 (38,3 - 47,2)	46,2 (40,8 - 50,6)*
TNF- α	13,3 (12,7 - 14,7)	27,4 (23,0 - 37,5)	30,7 (21,5 - 39,0)	33,2 (26,0 - 48,8)

Valores expressos em mediana e IIQ (Q1 – Q3). Os valores medianos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e a comparação múltipla de Dunn. Os níveis de todas as citocinas do grupo (G1) foram inferiores aos dos demais grupos (G2, G3 e G4; $p < 0,05$). * $p < 0,01$.

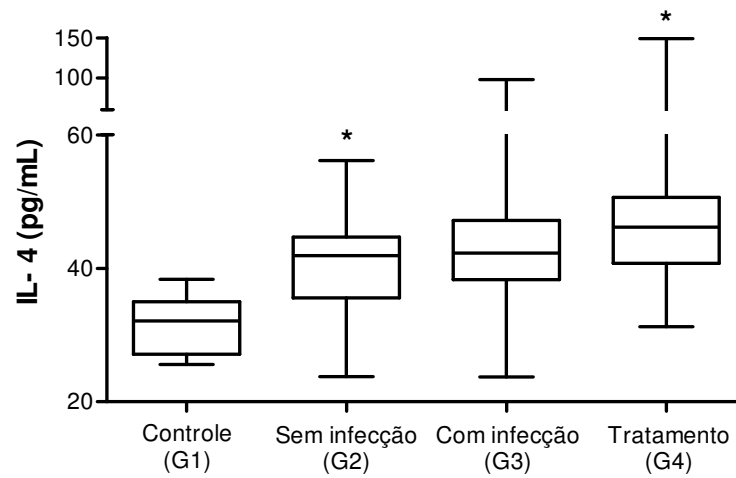


Figura 1. Níveis plasmáticos de IL-4 em diferentes momentos da infecção por CMV. O termo infecção refere-se à infecção ativa. * $p < 0,01$.

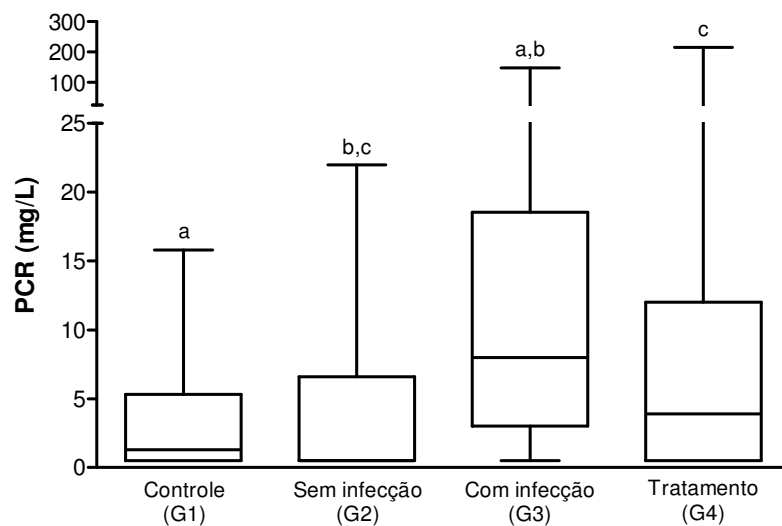


Figura 2. Níveis plasmáticos da PCR em diferentes momentos da infecção por CMV. O termo infecção refere-se à infecção ativa. ^a $p < 0,01$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,01$. Mann Whitney test. Mediana (Q1-Q3): G1=1,3 (0,5 – 5,3); G2=0,5 (0,5 – 6,6); G3=8,0 (3,0 – 18,5); G4=3,9 (0,5 – 12,0).

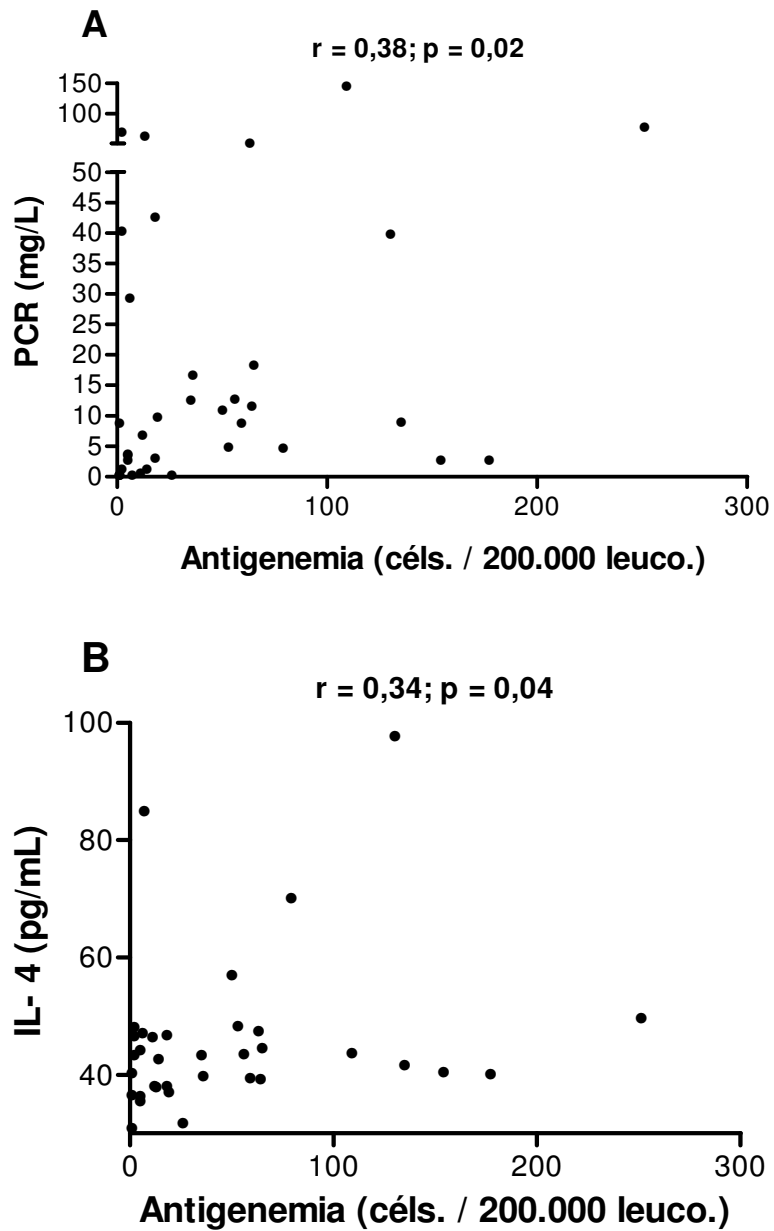


Figura 3. Correlação entre o valor da antigenemia para pp65 e níveis plasmáticos de PCR (A) e IL-4 (B). Todas as amostras incluídas foram de pacientes que não tinham iniciado a terapia anti-CMV. Coeficiente de Spearman r .

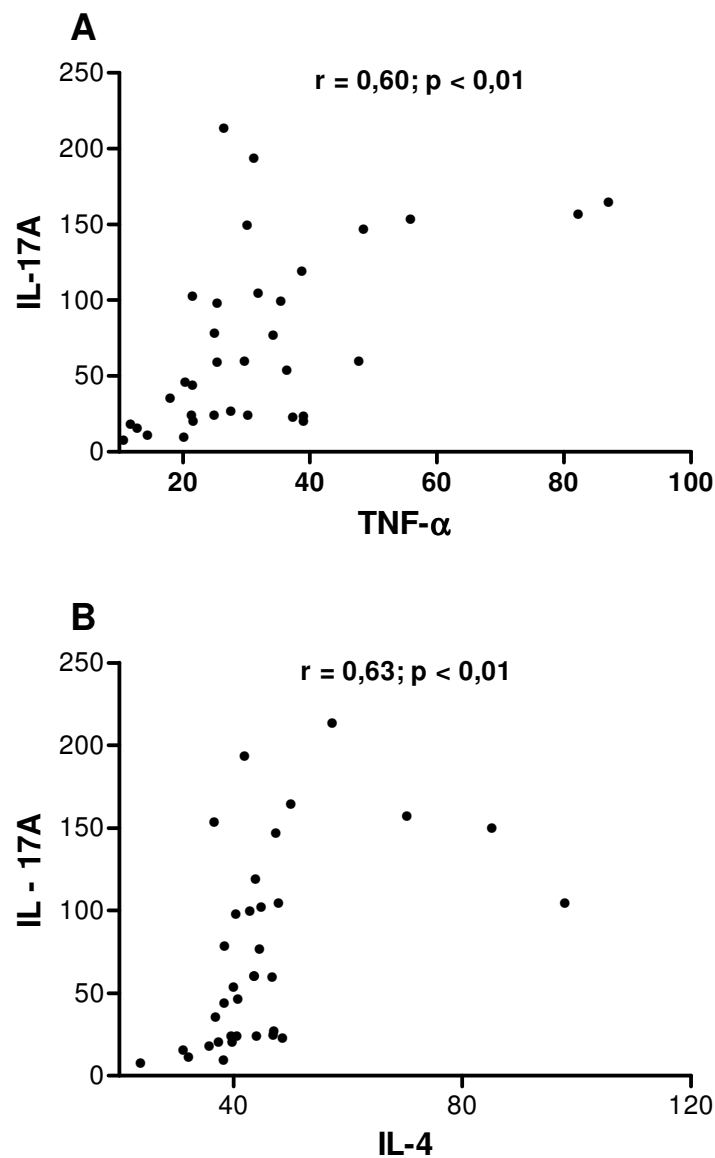


Figura 4. Correlação entre níveis plasmáticos de citocinas durante a infecção ativa por CMV. A. IL17A e TNF- α . B. IL17A e IL-4. Todas as amostras incluídas foram de pacientes que não tinham iniciado a terapia anti-CMV. Coeficiente de Spearman r.

4. Discussão

Os níveis plasmáticos de todas as citocinas estudadas (IFN- γ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4, e TNF- α) estavam maiores nos receptores de transplante renal do que no grupo controle ($P < 0,05$; Tab. 1). Considerando os pacientes transplantados em diferentes momentos da infecção, não foram observadas variações estatisticamente

significativas nos níveis das citocinas IFN- γ , IL-17A, IL-10, IL-6 e TNF- α , apenas a IL-4 apresentou níveis maiores em pacientes com infecção ativa durante a terapia anti-CMV do que na ausência da infecção ativa (Tab. 1, Fig. 1). Alguns estudos relataram a elevação dos níveis séricos ou plasmáticos de TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10 durante a infecção por CMV, entretanto, apresentam resultados discordantes entre si quanto a cada citocina isolada, além do que, as comparações utilizaram metodologias e momentos diferentes do período pós-transplante (HUMAR et al., 1999; CERVERA et al., 2007).

Humar e cols. (1999) observaram que, durante a infecção sintomática por CMV, pacientes submetidos ao transplante de medula óssea apresentavam elevação nos níveis séricos máximos das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-8 em relação a períodos sem infecção ativa. Cervera e cols. (2007) relataram que, nos pacientes transplantados com órgão sólido, havia elevação dos níveis plasmáticos de TNF- α e IL-10 durante a infecção por CMV em comparação ao primeiro mês de transplante, entretanto, não houve diferença estatística quando comparado ao pós-cirúrgico imediato. Esse mesmo estudo não observou mudança nos níveis plasmáticos de IL-6 associada à infecção por CMV.

A participação de diversas citocinas na patogênese da infecção por CMV há tempos têm sido evidenciada (COMPTON et al., 2003; NAUCLER, 2006). A secreção de citocinas pode ser diferentemente regulada de acordo com tipos celulares envolvidos e com fatores relacionados aos pacientes e ao transplante, como a realização de diálise pré-transplante, o tipo de tratamento imunossupressivo utilizado e as complicações pós-operatórias, a exemplo da função retardada do enxerto, da rejeição aguda ou crônica e das infecções (DANIEL et al., 2005; LIBETTA et al., 2007).

Apesar de muito conhecimento adquirido com relação ao papel das células T específicas nas infecções virais, ainda há resultados discordantes quanto ao perfil de citocinas secretadas por essas células em resposta à infecção ativa por CMV. Alguns estudos evidenciaram a produção de citocinas do perfil Th2, enquanto outros demonstraram a resposta predominantemente de citocinas do perfil Th1 (ESSA et al., 2000; VILLACRES et al., 2004). No presente estudo, não foi observado um padrão plasmático de citocinas relacionado à infecção por CMV (Th1 ou Th2). Os perfis mantiveram-se em equilíbrio, uma vez que não houve diferenças observadas

entre os níveis de IFN- γ , IL-17A, IL-10 e IL-4 em um mesmo momento da infecção (G2, G3, G4; $P > 0.05$) (Tab. 1).

A tolerância e a rejeição ao enxerto também têm sido associadas a diferentes perfis de citocinas. Enquanto as citocinas Th2 favorecem a tolerância imunológica ao enxerto, citocinas Th1 participam de processos de rejeição ao órgão transplantado (AMIRZARGAR et al., 2005; CHEN et al., 2008). Após os episódios de rejeição, há elevada incidência de infecção ativa por CMV (CORDERO et al., 2012). Neste estudo, não houve associação entre infecção por CMV e rejeição ao órgão transplantado (dados não mostrados).

Para analisar se o CMV também induz inflamação não específica, o nível plasmático da PCR foi quantificado nos diferentes momentos da infecção. A PCR é uma proteína de fase aguda, sintetizada pelo fígado principalmente em resposta à IL-6, que aumenta os níveis plasmáticos durante os processos inflamatórios (GABAY & KUSHNER, 1999). Há evidências de que os níveis de PCR podem ser utilizados para distinguir entre infecção por CMV e outras infecções bacterianas (COSTALONGA et al., 2009). No presente estudo, foi observado que durante a infecção ativa houve elevação dos níveis plasmáticos da PCR, sugerindo então que essa proteína desempenha um papel no processo inflamatório induzido pela infecção por CMV (Fig. 2). Berg e cols. (2010) observaram que a infecção primária por CMV em receptores de transplante renal induz uma resposta pró-inflamatória caracterizada pelo aumento sérico dos níveis de PCR e IFN- γ durante o pico da infecção ativa. Os autores ainda sugerem que, por promover uma resposta inflamatória mantida até durante a latência viral e polarizada para o perfil Th1, o CMV poderia contribuir para a patogênese da rejeição crônica ao enxerto.

Durante a infecção ativa por CMV, houve correlação entre o número de células positivas no ensaio de antigenemia e os níveis plasmáticos da PCR ($r=0,38$; $p=0,02$) e da IL-4 ($r=0,34$; $p=0,04$) (Fig. 3). Foi também observada forte correlação entre os níveis de IL-17A e TNF- α ($r=0,60$; $p<0,01$) e de IL-17A e IL-4 ($r=0,63$; $p<0,01$) (Fig. 4). Esses achados apresentam evidências de que a PCR e a IL-4 estão diretamente relacionadas à evolução da infecção ativa, uma vez que a infecção induziu a elevação proporcional da secreção da PCR e da IL-4 no plasma (Fig. 2 e Fig. 4).

A resposta sistêmica a uma infecção é pautada pela secreção de várias citocinas e o equilíbrio entre elas contribui para o desfecho da infecção em favor do

agente infeccioso ou do hospedeiro. A replicação do CMV em macrófagos diferenciados depende, aparentemente, da produção de IFN- γ e TNF- α . Ambas as citocinas possuem efeito antiviral, contudo, nenhuma das duas parece inibir a replicação do vírus em macrófagos infectados (NAUCLER, 2006). Neste estudo, não houve variação com significado estatístico nos níveis plasmáticos do IFN- γ ou da TNF- α durante a infecção ativa (Tab.1).

A IL-17 é uma citocina com papel reconhecido em doenças autoimunes e que participa do recrutamento de leucócitos nas fases iniciais da inflamação. Ela representa uma família de cinco citocinas, na qual a IL-17A e a IL-17F são os membros clinicamente mais importantes. Seu papel nas infecções virais ainda não é muito claro, mas já há evidências de que ela participa da imunopatologia da inflamação na córnea pelo vírus Herpes simplex (SURYAWANSHI et al., 2011; CHUNFANG et al., 2013). Alguns autores avaliaram a participação das células Th17 na infecção por CMV e destacam o papel importante da IL-17 no combate à infecção, porém esse achado não é consenso (O'CONNOR et al., 2012). Por outro lado, o CMV é um vírus associado à fisiopatologia de doenças inflamatórias e autoimunes, o que o coloca no mesmo contexto clínico de atuação da IL-17. No presente estudo, apesar de não haver variação nos níveis da IL-17A durante os diferentes momentos da infecção por CMV e não haver associação entre IL-17A e valor da antigenemia, a IL-17A pode estar contribuindo para a patogenia ou resposta imune contra o CMV, uma vez que durante a infecção ativa os níveis plasmáticos dessa citocina correlacionaram-se com os da citocina pró-inflamatória TNF- α e os da IL-4 (Fig. 4).

Desse modo, o presente estudo evidenciou novas observações sobre os níveis plasmáticos de citocinas e da proteína C reativa durante a infecção por CMV em pacientes submetidos ao transplante renal. Não houve variação nos níveis plasmáticos de IFN- γ , IL-17A, IL-10, IL-6 TNF- α nos diferentes momentos da infecção, apenas os da IL-4 durante a terapia anti-CMV e os da PCR durante a infecção ativa. Foi evidenciada a relação entre número de células positivas no ensaio de antigenemia e níveis plasmáticos da PCR e da IL-4, além da correlação entre os níveis de IL17A e TNF- α e de IL17A e IL-4 durante a infecção ativa. Esses achados sugerem que mudanças nos níveis sistêmicos da PCR e da IL-4 participam da resposta imune contra o vírus, sendo, portanto, candidatos a biomarcadores na infecção.

Agradecimentos

Agradecemos aos pacientes e à equipe clínica do transplante renal do Hospital Ana Nery, Salvador, BA. Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do estado da Bahia (FAPESB), Brasil (Outorga no. 16/2010).

Conflito de Interesse

Todos os autores declaram que não existe conflito de interesses.

5. Referências

- AMIRZARGAR A, LESSANPEZESHKI M, FATHI A, et al. Th1/Th2 Cytokine Analysis in Iranian Renal Transplant Recipients. *Transplant Proc* 2005; 37:2985–2987.
- BEAM E, RAZONABLE RR. Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation: Epidemiology, Prevention, and Treatment. *Curr Infect Dis Rep* 2012; 14:633–641.
- BERG PJ, HEUTINCK KM, RAABE R, et al. Human Cytomegalovirus Induces Systemic Immune Activation Characterized by a Type 1 Cytokine Signature. *J Infect Dis* 2010; 202:690–699.
- CERVERA C, FILELLA X, LINARES L, et al. Th1/Th2 Cytokine Release Pattern During In Vivo Cytomegalovirus Disease in Solid Organ Transplantation. *Transplant Proc* 2007; 39:2233–2235.
- CHEN Y, CHEN J, LIU Z, et al. Relationship between TH1/TH2 cytokines and immune tolerance in liver transplantation in rats. *Transplant Proc* 2008; 40:2691-2695.
- CHUNFANG G, LING W, XIAOXIA L. IL-17 family: Cytokines, receptors and signaling. *Cytokine* 64 (2013) 477–485.
- COMPTON T, KURT-JONES EA, BOEHME KW, et al. Human Cytomegalovirus Activates Inflammatory Cytokine Responses via CD14 and Toll-Like Receptor 2. *J Virol* 2003; 77:4588–4596.
- CORDERO E, CASASOLA C, ECARMA R, et al. Cytomegalovirus Disease in Kidney Transplant Recipients: Incidence, Clinical Profile, and Risk Factors. *Transplant Proc* 2012; 44:694-700.
- COSTALONGA EC, MELO NCV, RODRIGUES CE, et al. The potential role of C-reactive protein in distinguishing cytomegalovirus from tuberculosis and bacterial infections in renal transplant recipients. *Clin Transplant* 2009; 23:710–715.
- CROUGH T, KHANNA R. Immunobiology of Human Cytomegalovirus: from Bench to Bedside. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22:76–98.
- DANIEL V, NAUJOKAT C, SADEGHI M, et al. Association of circulating interleukin (IL)-12- and IL-10-producing dendritic cells with time posttransplant, dose of

- immunosuppression, and plasma cytokines in renal-transplant recipients. *Transplant* 2005; 79:1498–1506.
- EGLI A, SILVA MJ, O'SHEA D, et al. An Analysis of Regulatory T-Cell and Th-17 Cell Dynamics during Cytomegalovirus Replication in Solid Organ Transplant Recipients. *PLoS ONE* 2012; 7:e43937.
- ESSA S, PACSA A, RAGHUPATHY R, et al. Low Levels of Th1-Type Cytokines and Increased Levels of Th2-Type Cytokines in Kidney Transplant Recipients With Active Cytomegalovirus Infection. *Transplant Proc* 2009; 41:1643–1647.
- ESSA S, RAGHUPATHY R, PACSA AS, et al. Th1-Type Cytokines Production Is Decreased in Kidney Transplant Recipients With Active Cytomegalovirus Infection. *J. Med Virol* 2000; 60:223–229.
- GABAY C, KUSHNER L. Acute phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999; 340(6):448-454.
- HARVALA H, STEWART C, MULLER K, et al. High risk of cytomegalovirus infection following solid organ transplantation despite prophylactic therapy. *J Med Virol* 2013; 85:893-898.
- HUMAR A, LOUIS P, MAZZULLI T, et al. Elevated Serum Cytokines Are Associated with Cytomegalovirus Infection and Disease in Bone Marrow Transplant Recipients. *J Infect Dis* 1999; 179:484–488.
- LIBETTA C, SEPE V, ZUCCHI M, et al. The effect of sirolimus- or cyclosporine-based immunosuppression effects on T-cell subsets in vivo. *Kidney Int* 2007; 72:114–120.
- NAUCLÉR CS. Human Cytomegalovirus Persists in Its Host and Attacks and Avoids Elimination by the Immune System. *Crit Rev Immunol* 2006; 26:231–263.
- O'CONNOR DJH, JACOBSON MA, TAN QX, et al. Development of Cytomegalovirus (CMV) Immune Recovery Uveitis Is Associated with Th17 Cell Depletion and Poor Systemic CMV-Specific T Cell Responses. *Clin Infect Dis* 2011; 52:409–417.
- RAMANAN P, RAZONABLE RR. Cytomegalovirus Infections in Solid Organ Transplantation: A Review. *Infect Chemother* 2013; 45(3):260-271.
- SURYAWANSHI A, VEIGA-PARGA T, RAJASAGI N, et al. Role of IL-17 and Th17 Cells in HSV Induced Corneal Immunopathology. *J Immunol* 2011; 187(4):1919–1930.
- VILLACRES MC, LONGMATE J, AUGÉ C, et al. Predominant type 1 CMV-specific memory T-helper response in humans: evidence for gender differences in cytokine secretion. *Hum Immunol* 2004; 65:476–485.
- ZHAO JQ, CHEN LZ, QIU J, et al. The role of interleukin-17 in murine cytomegalovirus interstitial pneumonia in mice with skin transplants. *Transpl Int* 2011; 24: 845-855.

CAPÍTULO 3

Infecção ativa por Citomegalovírus após o Transplante Alogênico de Células Tronco Hematopoiéticas: achados clínicos e imunológicos.

Sócrates Bezerra de Matos^{a,b*}, Sâmara Grapiúna Pinheiro^a, Geraldo Pedral Sampaio^c, Mônica Borges Botura^d, Marco Aurélio Salvino^d, Roberto Meyer^c, Fernanda Washington de Mendonça Lima^a.

^a*Serviço de Imunologia de Doenças Infecciosas – SIDI. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal da Bahia (UFBA). Salvador, BA, Brasil.*

^b*Programa de Pós-graduação em Imunologia (PPGI). Instituto de Ciências da Saúde (ICS). Universidade Federal da Bahia (UFBA). Salvador, BA, Brasil.*

^c*Instituto de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Bahia (UFBA). Salvador, BA, Brasil.*

^d*Centro de Transplante de Medula Óssea – CTMO. Hospital Prof. Edgard Santos (HUPES). Universidade Federal da Bahia (UFBA). Salvador, BA, Brasil.*

***Autor para Correspondência:** Sócrates Bezerra de Matos. Serviço de Imunologia de Doenças Infecciosas (SIDI). Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia. Rua Barão de Jeremoabo n° 147. Ondina. CEP: 40170-115 Salvador, BA, Brasil. Tel: 55 (71) 3283 6956. E-mail: sbiomatos@yahoo.com.br

RESUMO

O Citomegalovírus é um dos principais agentes infecciosos causadores de morbimortalidade em pacientes transplantados, o que ressalta a importância do diagnóstico e monitoramento da infecção. O presente estudo objetivou monitorar e descrever características clínicas e imunológicas da infecção ativa por CMV em pacientes submetidos ao transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas. Nos 28 pacientes incluídos, foram realizados ensaios seriados de antigenemia para pp65, além de determinações plasmáticas da proteína C reativa (PCR) e das citocinas IFN- γ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4 e TNF- α . A infecção ativa foi observada em 67,9% dos pacientes, ocorrendo precocemente em 50% e tardiamente em 28,6%. Houve infecção sintomática em 58,4% dos episódios, tendo febre (57%) e diarreia (43%) como principais sintomas. O tratamento preemptivo com ganciclovir foi eficaz em 100% dos episódios. A infecção ativa foi associada ao aumento da IL-17A plasmática (61,0 vs. 140,0; $p < 0,01$). Durante a terapia anti-CMV, observou-se elevação dos níveis plasmáticos da PCR (7,0 vs. 19,4; $p = 0,03$) e redução dos níveis de IFN- γ (65,0 vs. 38,6; $p < 0,01$) e IL-4 (48,0 vs. 39,5; $p = 0,03$). Os achados evidenciaram a alta incidência da infecção ativa, a eficácia do tratamento preemptivo e a importância de monitorar o CMV além do 100º dia pós-transplante. Foram observadas alterações plasmáticas nos níveis de PCR, IL-17A, IFN- γ e IL-4 em diferentes momentos de infecção por CMV, sugerindo a participação dessas proteínas na resposta imune sistêmica contra o vírus e a possibilidade de utilização desses níveis como fatores preditivos na infecção.

Palavras – chave: transplante de medula óssea, Herpesvirus Humano 5, diagnóstico, citocinas.

ABSTRACT

Cytomegalovirus is a major infectious agents causing morbidity and mortality in transplant patients, which highlights the importance of diagnosis and monitoring the infection. This study aimed to monitor and describe clinical and immunological characteristics of CMV active infection in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. In the 28 patients included, were performed serial pp65 antigenemia tests and quantification of plasma levels of C-reactive protein (CRP) and cytokines IFN- γ , IL -17A, IL-10, IL-6, IL-4 and TNF- α . The active infection was observed in 67.9% of patients, occurring early in 50% and late in 28.6% of them. There was symptomatic infection in 58.4% of episodes, having fever (57%) and diarrhea (43%) as major symptoms. Preemptive treatment with ganciclovir was effective in 100% of the episodes. The active infection was associated to increase plasma levels of IL-17A (61.0 vs 140.0, $P < 0.01$). During anti-CMV therapy, we observed elevated plasma levels of CRP (7.0 vs 19.4, $P = 0.03$) and reduced levels of IFN- γ (65.0 vs 38.6, $p < 0.01$) and IL-4 (48.0 vs 39.5, $p = 0.03$). These findings indicate the high incidence of active infection, the efficacy of preemptive treatment and the importance of monitoring CMV infection beyond the 100th day after transplantation. Changes were observed in plasma levels of CRP, IL-17A, IFN- γ and IL-4 at different times of CMV infection, suggesting the involvement of these proteins in the systemic immune response against the virus and the possibility of using these levels as predictive factors in infection.

Keywords: bone marrow transplantation, Human Herpesvirus 5, diagnosis, cytokines.

1. Introdução

O transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) é um importante procedimento terapêutico para restabelecer a função medular em pacientes com doenças hematológicas malignas e algumas não malignas (COPELAN, 2006; CHEUK, 2013). Entretanto, antes e após a infusão das células, a quimioterapia utilizada promove uma imunossupressão que favorece o aparecimento de infecções (GEORGE et al., 2010; KEDIA et al., 2013).

O citomegalovírus (CMV) é um dos principais agentes infecciosos causadores de morbimortalidade no período pós-TCTH alogênico, apesar dos avanços na prevenção e no tratamento preemptivo (BOECKH & LJUNGMAN, 2009). Trata-se de um vírus ubíquo, com soroprevalência variando entre 40-100% nas

diversas populações estudadas (BEAM & RAZONABLE, 2012). Até um ano após o transplante, a infecção ativa por CMV ocorre em 30-90% dos receptores de TCTH alogênico, podendo apresentar-se de forma subclínica ou evoluir para infecção órgão invasiva no pulmão, trato gastrintestinal, fígado e até sistema nervoso central (PERES et al., 2010; LJUNGMAN et al., 2011; HEREDIA et al., 2014).

A patogênese da infecção por CMV é complexa, sendo mediada pelas interações entre o vírus e o sistema imune do hospedeiro, envolvendo a apresentação antigênica, a produção de citocinas e a resposta imune celular e humoral (BOECKH & LJUNGMAN, 2009). Existem controvérsias quanto ao perfil de citocinas envolvidas na resposta imune contra o CMV, alguns autores apontam o papel central de citocinas pro-inflamatórias ou Th1, enquanto outros evidenciaram o perfil Th2, o que ressalta a importância de estudos que avaliem essa questão (ESSA et al., 2009; BERG et al., 2010).

Técnicas imunológicas ou de biologia molecular são amplamente utilizadas para detectar a infecção ativa por CMV (HEREDIA et al., 2014). O monitoramento periódico possibilita o diagnóstico precoce e permite a introdução da terapia preemptiva, o que reduz a incidência de infecção grave e mortalidade por CMV (TOMBLYN et al., 2009; SHARMA et al., 2013).

Desse modo, o presente estudo objetivou monitorar a incidência e descrever características clínicas e imunológicas da infecção ativa por CMV em pacientes submetidos ao TCTH alogênico em uma população de alta prevalência desse vírus.

2. Materiais e Métodos

2.1 Pacientes

O estudo foi realizado em pacientes submetidos ao transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas (TCTH) no período entre Jun/2010 e Jun/2012. Foram incluídos pacientes baianos que realizaram o transplante no Hospital Universitário Prof. Edgard Santos da Universidade Federal da Bahia ou passaram a ser assistidos pela referida equipe até no máximo 20 dias pós-TCTH.

O protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Professor Edgard Santos (CEP-HUPES), parecer nº 27/2009.

A inclusão dos participantes ocorreu mediante aceitação, ratificada pela assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. De um total de 47 pacientes transplantados no período, 28 foram incluídos no estudo. A exclusão se deu pelo não monitoramento adequado de acordo ao protocolo proposto abaixo.

Os pacientes incluídos residiam em várias cidades do estado da Bahia, cuja população é caracterizada pela descendência africana e pela miscigenação étnica, além de soroprevalência para CMV superior a 85%. Os pacientes excluídos não diferiram dos incluídos quanto ao sexo, idade, fonte de células tronco e doença de base.

Esses pacientes foram monitorados prospectivamente para infecção ativa por CMV em intervalos semanais até o centésimo dia pós-TCTH (D+100). Após o D+100, o monitoramento ocorreu durante as consultas de revisão e/ou quando o paciente apresentava sinais e/ou sintomas potencialmente relacionados, a critério clínico. O estudo ainda incluiu a determinação plasmática das citocinas IFN- γ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4, TNF- α e da proteína C reativa (PCR) em diferentes momentos da infecção.

2.2 Processamento das amostras biológicas

Em cada coleta, foram obtidos 8 mL de sangue periférico tratado com EDTA. Quatro mililitros (4 mL) foram utilizados para o ensaio de antígenemia para CMV, os outros 4 mL foram utilizados para a obtenção de plasma para as dosagens de citocinas e PCR.

2.3 Ensaio de Antigenemia para CMV

O monitoramento da infecção ativa por CMV foi realizado através do ensaio de imunofluorescência indireta, utilizando o kit comercial CMV Brite turbo Kit (IQ Products, Groningen, The Netherlands) seguindo às instruções do fabricante. As amostras biológicas foram processadas até 6 (seis) horas após a punção. Para cada paciente, foram preparadas duas lâminas com citocentrifugado leucocitário afim de que todos os resultados positivos fossem confirmados em duplicata.

Os resultados foram expressos em nº de células positivas / 200.000 leucócitos. Todos os pacientes com resultado de antígenemia positiva (≥ 1 célula positiva / 200.000 leucócitos) foram tratados com ganciclovir intravenoso (5mg/kg)

por, no mínimo, 14 dias até a obtenção de duas antigenemias negativas com intervalos semanais.

2.4 Dosagem de Citocinas

O nível plasmático das citocinas IFN- γ , IL-17A, IL-10, IL-6, IL-4 e TNF- α foi quantificado através de ensaio multiplex por citometria de fluxo. Foram utilizados kits comerciais Flowcytomix Simplex Kit (Bender MedSystems, Vienna, Austria) e o citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, MD, USA), seguindo as instruções do fabricante.

A concentração de cada citocina foi determinada por interpolação da intensidade de fluorescência utilizando a curva de diluição de 7 pontos, analisada através do software FlowCytomix™ Pro 3.0 (eBiosciences®, Bender MedSystems, Vienna, Austria). A sensibilidade da detecção de cada citocina foi: IFN- γ = 1,6 pg/mL, IL-17A = 2,5 pg/mL, IL-10 = 1,9 pg/mL, IL-6 = 1,2 pg/mL, IL-4 = 20,8 pg/mL e TNF- α = 3,2 pg/mL. Amostras de 30 doadores de sangue foram utilizadas como controles.

2.5 Dosagem da proteína C reativa (PCR)

O nível plasmático da PCR foi quantificado através de imunoensaio enzimático turbidimétrico utilizando o sistema automatizado de química seca Vitros® 250/1 micro-slide system (Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Rochester, NY, USA) seguindo as instruções do fabricante. A sensibilidade da detecção foi de 0,5 mg/L. Os resultados > 40 mg/L foram confirmados em duplicata. Amostras de 30 doadores de sangue foram utilizadas como controles.

2.6 Definições

Infecção ativa por CMV: termo utilizado para evidenciar que o CMV está em fase de replicação em células do hospedeiro. O ensaio de antigenemia positivo (≥ 1 célula positiva / 200.000 leucócitos) indica a ocorrência da infecção ativa.

Episódio de infecção ativa: caracteriza-se pelo período desde o diagnóstico da infecção ativa até a observância de dois resultados consecutivos de antigenemia negativa com intervalos semanais.

2.7 Análises Estatísticas

Variáveis categóricas foram analisadas pelo teste X^2 e as variáveis contínuas pelo Mann-Whitney U teste. Níveis de citocinas foram expressos em medianas e intervalo inter-quartil (IIQ, Q1 – Q3). A normalidade dos dados contínuos foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os quatro grupos (G1 a G4) foram analisados utilizando o teste de Kruskal-Wallis e a comparação múltipla de Dunn. O valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3. Resultados

Dos 28 pacientes incluídos, 14 (50%) eram sexo masculino e 14 (50%) do sexo feminino. A idade média (\pm desvio padrão) foi de 36,4 (\pm 15,2) anos. A doença de base mais prevalente foi leucemia mielóide aguda (35,7%) e todos os transplantes foram realizados entre doadores e receptores soropositivos para CMV (D+/R+) (Tab. 1).

O sangue periférico foi a principal fonte das células tronco (75%) (Tab. 1). O regime de condicionamento mieloablativo foi o mais utilizado (46,4%), seguido pelo não mieloablativo (39,3%). Com relação à proximidade imunológica entre doador/receptor, 78,6% dos doadores eram aparentados e com HLA idêntico ao receptor. A doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) ocorreu em 92,8% dos pacientes, sendo aguda em 75% deles e crônica em 82%. A profilaxia para DECH foi realizada principalmente com a ciclosporina. Apenas 1 (um) paciente fez uso de alemtuzumabe e 1 (um) utilizou globulina antitimocitária (ATG) durante o regime de condicionamento. Onze pacientes (39,3%) foram a óbito no período de monitoramento, principalmente devido à recidiva da doença (63,6%). Não houve óbito associado à infecção por CMV (Tab. 1).

O monitoramento pela antigenemia durou em média 344 ± 244 dias (mínimo = 104, máximo = 1132, mediana = 268). Não houve associação estatística ($p > 0,05$) entre a ocorrência da infecção ativa por CMV e as variáveis qualitativas como: sexo, fonte de medula óssea, realização de TCTH prévio, tipo de doador, realização de infusão de linfócitos do doador (ILD), doença de base, intensidade do regime de

condicionamento, tipo de profilaxia para DECH, uso de metil-prednisolona, tipo de DECH e causa do óbito (dados não mostrados).

A incidência de infecção ativa por CMV foi de 67,9% (19/28) (Tab. 2). Foram observados 24 episódios de infecção ativa, dos quais 14 (58,4%) tiveram sinais / sintomas associados, principalmente febre (57%) e diarreia (43%). DECH foi observada em 50% desses episódios. A infecção ativa precoce ocorreu em 14 pacientes (50,0%; mediana de 43,5 dias), enquanto a infecção tardia foi observada em 8 pacientes (28,6%; mediana de 170 dias) (Tab. 2). Todos os pacientes com infecção ativa foram tratados preemptivamente com ganciclovir intravenoso, obtendo 100% de resolutividade da infecção.

Os receptores de TCTH apresentaram níveis de PCR maiores do que o grupo controle ($p < 0,05$; Fig. 1). Durante o tratamento anti-CMV, o nível plasmático da PCR foi superior ao apresentado por pacientes sem infecção ativa (19,4 vs. 7,0; $p = 0,03$; Fig. 1).

A Tabela 3 evidencia os níveis plasmáticos das citocinas em diferentes momentos da infecção por CMV. A IL-17A foi detectada em níveis mais altos em pacientes com infecção ativa (140,7 vs. 61,0; $p < 0,01$). Durante a terapia antiviral, houve redução nos níveis de IL-4 (48,0 vs. 39,5; $p = 0,03$) e de IFN- γ (65,0 vs. 38,6; $p < 0,01$).

A Figura 2 mostra a razão entre as citocinas IL-17A, IFN- γ e IL-4. Em pacientes com infecção ativa, a razão entre IL-17A / IL-4 e IL-17A / IFN- γ é mais alta do que nos pacientes sem infecção ativa ($p < 0,01$). Por outro lado, a razão IFN- γ / IL-4 não diferiu entre pacientes com e sem infecção ativa ($p > 0,05$). As razões entre as demais combinações de citocinas não diferiram em relação à ocorrência ou não da infecção ativa ($p > 0,05$). Não foi observada correlação entre os níveis de citocinas e o número de células positivas / 200.000 leucócitos no ensaio de antigenemia para CMV em pacientes com infecção ativa (dados não mostrados).

Tabela 1. Características dos pacientes submetidos ao transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas.

Características	Receptores do TCTH (%)
Idade (anos)	
Média, (\pm DP), Mediana (Min-Max)	36,4 (\pm 15,2), 35,5 (10 - 62)
Sexo	
Masculino / Feminino	14 / 14
TCTH prévio	6 (21,4)
Fonte de células tronco	
Sangue periférico	21 (75,0)
Medula óssea	6 (21,4)
Cordão umbilical	1 (3,6)
Doador	
HLA idêntico	22 (78,6)
Alternativo*	6 (21,4)
Mediana do tempo de pega em dias (Min-Max)	14,5 (8 - 20)
Infusão de linfócitos do doador (ILD)	8 (28,6)
Doença de base	
Leucemia mielóide aguda (LMA)	10 (35,7)
Leucemia mielóide crônica (LMC)	4 (14,3)
Leucemia linfocítica aguda (LLA)	5 (17,9)
Síndromes mielodisplásicas (SMD)	3 (10,7)
Anemia aplásica grave (AAG)	3 (10,7)
Outras**	3 (10,7)
Status sorológico para CMV	
Doador + / receptor +	28 (100)
Intensidade do regime de condicionamento***	
Mieloablativo (MA)	13 (46,4)
Condicionamento de intensidade reduzida (CIR)	4 (14,3)
Não mieloablativo (NMA)	11 (39,3)
Profilaxia para DECH	
CsP	16 (57,2)
CsP + MMF	2 (7,1)
CsP + FK	7 (25,0)
CsP + MTX	2 (7,1)
FK + MMF	1 (3,6)
Uso de metil-prednisolona	19 (67,8)
Doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH)	26 (92,8)
Aguda	21 (75,0)
Crônica	23 (82,0)
Óbito	11 (39,3)
Por CMV	0 (0,0)
Recaída da doença	7 (63,6)
Outras causas****	4 (36,4)

*Doadores alternativos (N = 6): 2 haploidênticos e 4 não aparentados.

**Outras doenças de base (N = 3): Hemoglobinúria Paroxística Noturna, Linfoma não-Hodgkin DGCB, Anemia de Fanconi.

***Intensidades de regimes de condicionamento descritas por BACIGALUPO e cols. (2009).

****Óbito por outras causas (N=4): 3 por sepse e 1 por DECH crônica grau III.

DECH: doença do enxerto contra o hospedeiro; Doador HLA idêntico: aparentado full match; Doador Alternativo: Não aparentado ou haploidêntico; CsP: Ciclosporina; MMF: Micofenolato mofetil; FK: tacrolimus; MTX: Metotrexato; DP: Desvio Padrão; Min-Max: Mínimo e Máximo.

Tabela 2. Perfil dos pacientes com infecção ativa por CMV.

Nº total da pacientes transplantados	28
Infecção ativa no pós-TCTH	
Sim	19 (67,9%)
Não	9 (32,1%)
Nº total de episódios de infecção ativa	24
Uso de metil-prednisolona durante a infecção ativa	10/24 (41,6%)
Nº de episódios de infecção ativa no pós-THCT por paciente	
1 episódio	15 (78,9%)
2 episódios	3 (15,8%)
3 episódios	1 (5,3%)
Ocorrência de infecção ativa (n = 19 pacientes)	
Precoce apenas	11 (57,9%)
Tardia apenas	5 (26,9%)
Precoce e tardia ^a	3 (15,8%)
Episódio de infecção ativa ^b	
Assintomático	10 (41,6%)
Sintomático	14 (58,4%)
Sinais e Sintomas durante a infecção ativa	
Febre	8/14 (57%)
Diarréia	6/14 (43%)
Citopenia	3/14 (22%)
Outros ^c	3/14 (22%)
DECH durante episódios de infecção ativa	
Não	12/24 (50%)
Sim ^d	12/24 (50%)
Mediana da infecção ativa em dias (Min-Max)	56,5 (25 - 325)
Mediana da infecção ativa precoce em dias (Min-Max)	43,5 (25 - 66)
Mediana da infecção ativa tardia em dias (Min-Max)	170 (101 - 325)
Mediana do valor da primeira antigenemia (Min-Max) ^e	8,5 (2 - 135)
Mediana do valor da antigenemia mais alta (Min-Max) ^e	8,5 (3 - 135)
Mediana da negatificação da antigenemia em dias (Min-Max) ^f	7,0 (7 - 35)

^aInfecção precoce: até o 100º dia pós-TCTH; Infecção tardia: após o 100º dia do TCTH.

^bTodos os pacientes com infecção ativa foram submetidos à terapia com GCV intravenoso, obtendo-se 100% de resolutividade.

^cOutros sinais / sintomas incluem: 2 casos de náuseas e 1 de hematúria.

^dDECH localizada em: pele (n=7), trato gastrointestinal (n=5) e fígado (n=2).

^eValor dado em nº células positivas / 200.000 leucócitos.

^fO tratamento antiviral com GCV iniciou até o dia seguinte da detecção à 1ª antigenemia positiva. Os testes foram realizados em intervalos semanais.

DECH: Doença do enxerto contra o hospedeiro; TCTH: Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas; GCV: ganciclovir; Min-Max: Mínimo e Máximo.

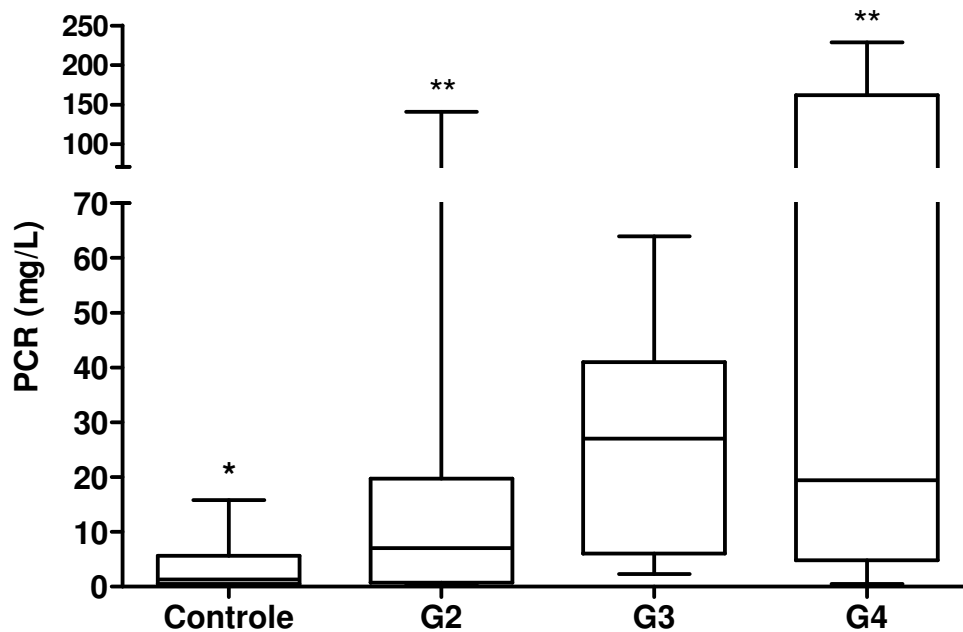


Figura 1. Níveis plasmáticos da PCR em diferentes momentos da infecção por CMV. *O grupo controle apresentou níveis medianos diferentes de todos os demais grupos ($p < 0,05$); **Nível mediano de G4 superior ao de G2 (19,4 vs. 7,0; $p = 0,03$). Mann-Whitney U test. Controle: Doadores de Sangue Saudáveis. G2: Receptores de TCTH sem infecção ativa. G3: Receptores de TCTH com infecção ativa, antes do início da terapia antiviral. G4: Receptores de TCTH no 7^o de terapia antiviral com ganciclovir intravenoso.

Tabela 3. Níveis plasmáticos de citocinas em momentos diferentes da infecção por CMV.

Citocina (pg/mL)	Controle (G1) ^a	Sem infecção ativa (G2)	Com infecção ativa (G3)	Terapia anti-CMV (G4)
IFN- γ	24,0 (20,1 - 27,0)	44,7 (34,9 - 60,8) ^c	65,0 (43,8 - 82,0) ^b	38,6 (29,5 - 46,1) ^{b,c}
IL - 17A	14,0 (12,3 - 18,5)	61,0 (39,3 - 89,5) ^d	140,7 (28,0 - 336,6) ^d	66,3 (31,2 - 185,7)
IL - 10	27,4 (25,1 - 31,9)	46,5 (41,0 - 62,6)	51,7 (41,8 - 76,6)	43,7 (37,9 - 50,9)
IL - 6	24,3 (21,6 - 26,0)	26,5 (26,0 - 27,5)	27,2 (26,2 - 27,9)	27,0 (26,2 - 30,0)
IL - 4	31,8 (27,1 - 34,6)	43,2 (38,1 - 47,8)	48,0 (41,8 - 52,3) ^e	39,5 (36,4 - 45,3) ^e
TNF- α	13,3 (12,7 - 14,7)	30,8 (22,8 - 47,5)	54,2 (22,7 - 78,8)	30,0 (16,2 - 36,9)

Valores expressos em mediana e intervalo inter-quartil - IIQ (Q1 - Q3). Teste de Kruskal-Wallis.

^aO grupo controle (G1) apresentou níveis de todas as citocinas inferiores aos demais grupos (G2, G3 e G4) ($p < 0,05$); ^b $p < 0,01$; ^c $p = 0,04$; ^d $p < 0,01$; ^e $p = 0,03$. G1: Doadores de Sangue Saudáveis; G2: Receptores de TCTH sem infecção ativa; G3: Receptores de TCTH com infecção ativa, antes do início da terapia antiviral; G4: Receptores de TCTH no 7^o dia de terapia antiviral com ganciclovir intravenoso.

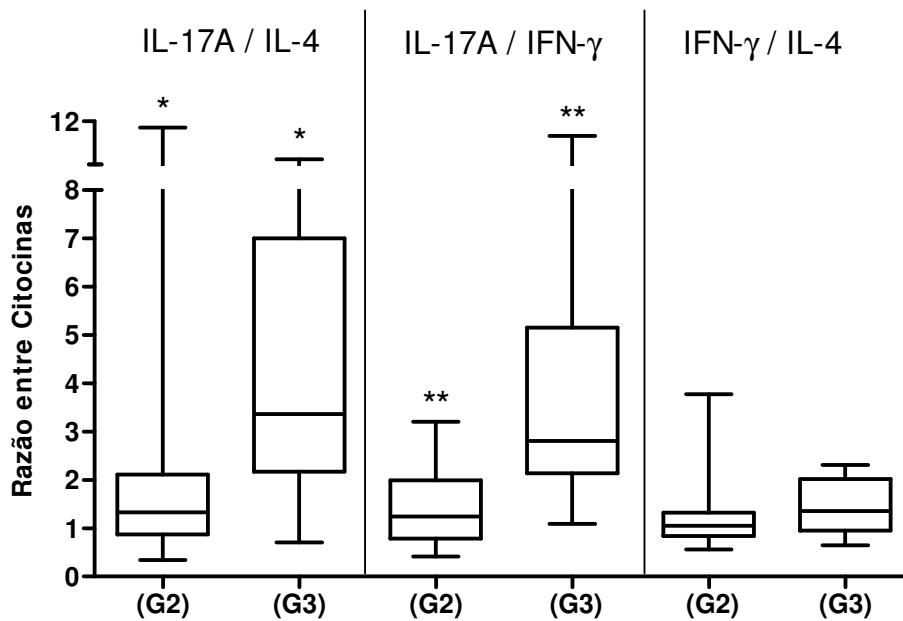


Figura 2. Razão entre as citocinas IL-17A, IFN- γ e IL-4 em pacientes com e sem infecção ativa por CMV. * $p < 0,01$. ** $p < 0,01$. Mann-Whitney U test. G2: Receptores de TCTH sem infecção ativa. G3: Receptores de TCTH com infecção ativa, antes do início da terapia antiviral.

4. Discussão

O monitoramento da infecção ativa por CMV é muito importante para o acompanhamento dos pacientes que realizam TCTH alogênico, uma vez que a incidência da infecção ativa ocorre em 30-90% desses pacientes e o CMV é o agente infeccioso mais frequentemente associado à morbimortalidade no período pós-TCTH (JASKULA et al, 2010; PERES et al., 2010). Alguns trabalhos apontam o CMV como um vírus altamente disseminado na população brasileira, com soroprevalência superior a 85% em diferentes grupos populacionais no estado da Bahia (MATOS et al., 2010; SOUZA et al., 2010; MATOS et al., 2011).

No presente estudo, realizado em pacientes submetidos ao TCTH alogênico entre doador e receptor soropositivos para CMV (D+/R+), observou-se 67,9% de incidência da infecção ativa, ocorrida até o D+100 em 16 (67%) episódios (mediana de 43,5 dias) e após o D+100 em 8 (33%) episódios (mediana de 170 dias). Quatro

pacientes apresentaram mais de um episódio de infecção ativa, sendo que três deles tiveram infecção tanto precoce quanto tardia (Tab. 1 e Tab. 2).

No estado de São Paulo, Peres e cols. (2010) observaram infecção ativa pós-TCTH alogênico em 27 de 30 pacientes (90%). Eles ainda relataram que 2 pacientes (6,7%) tiveram doença órgão invasiva e, dos 13 (43%) que foram a óbito no pós-transplante, 1 (3,3%) morreu em decorrência da doença por CMV. No presente estudo, não foi detectada doença órgão invasiva por CMV e nenhum óbito foi associado à infecção. A resolutividade da infecção ativa após a terapia preemptiva com ganciclovir foi de 100% (Tab. 1, Tab. 2).

Apesar da alta incidência da infecção ativa no período pós-TCTH, desde a introdução da terapia antiviral com ganciclovir e do tratamento preemptivo, tem-se observado uma histórica redução da ocorrência da doença órgão invasiva e consequente mortalidade por CMV (SHARMA et al., 2013; GEORGE et al., 2010).

Os fatores de risco associados à infecção ativa por CMV no período pós-TCTH incluem: doador não aparentado, uso de globulina antitimocitária (ATG), linfoma como doença de base, histórico de infecção ativa precoce por CMV (antes do D+100), idade avançada, transplante de células de cordão umbilical, irradiação corporal total, pega do enxerto demorada, regime de condicionamento mieloablativo, quimioterapia com fludarabina, uso de alemtuzumabe, ocorrência de DECH e baixas contagens de células T CD4+ (JEON et al., 2012; ROWE et al., 2013; HEREDIA et al., 2014;). Neste estudo, não houve associação estatística entre infecção ativa e os seguintes fatores: sexo, fonte de medula óssea, realização de TCTH prévio, tipo de doador, realização de infusão de linfócitos do doador (ILD), doença de base, intensidade do regime de condicionamento, profilaxia para DECH, uso de metilprednisolona, tipo de DECH e causa do óbito ($p > 0,05$; dados não mostrados). É possível que o número amostral tenha sido pequeno para caracterizar tais associações.

Os principais *guidelines* internacionais recomendam o monitoramento da infecção por CMV no pós-TCTH alogênico até o D+100, entretanto, muitos estudos têm destacado a importância de diagnosticar a infecção tardia (TOMBLYN et al., 2009; LJUNGMAN et al., 2011;). No presente estudo, dos 28 pacientes monitorados, 8 (28,5%) apresentaram infecção ativa após o D+100 (Tab. 2). Ao avaliar a significância da infecção tardia no pós-TCTH alogênico, Rowe e cols. (2013) evidenciaram incidência de 41%, sendo que esses pacientes apresentaram risco de

mortalidade 4,8 vezes maior do que pacientes que não tiveram infecção tardia. Cabe ressaltar ainda que após o D+100, os pacientes transplantados já não são acompanhados com tanta proximidade pela equipe médica como ocorre antes do D+100, desse modo, a infecção tardia subclínica não diagnosticada pode evoluir mais facilmente para doença órgão invasiva, dificultando o tratamento e aumentando o risco de mortalidade (PINHEIRO et al., 2013).

Em geral, a infecção ativa por CMV é assintomática. Entretanto, ela pode ocorrer acompanhada por sintomas / sintomas de moderada intensidade, que incluem: febre com ou sem citopenia, diarreia, tosse, dificuldade respiratória, elevação sérica de transaminases e de creatinina (MORI & KATO, 2010; SHARMA et al. 2013). A infecção ativa pode evoluir para doença invasiva acometendo virtualmente qualquer órgão, porém, é mais comum ser observada no pulmão, trato gastrointestinal e, menos frequente, no sistema nervoso central e na retina (HEREDIA et al., 2014). Jang e cols. (2012) evidenciaram que o risco de uma infecção assintomática progredir para doença por CMV estava associado à carga viral inicial, à leucopenia, à neutropenia e ao tempo de detecção da viremia. No presente estudo, em 10 (41,6%) dos 24 episódios de infecção ativa detectados, o paciente encontrava-se assintomático. Nos outros 14 (58,4%), foram observados sinais / sintomas de moderada intensidade, a exemplo de: febre (57%), diarreia (43%) e citopenia (22%) (Tab. 2).

Durante a infecção ativa no paciente transplantado, o CMV pode induzir uma resposta inflamatória sistêmica com a participação de diversas citocinas, quimiocinas e proteínas de fase aguda (HUMAR et al., 1999; COMPTON et al., 2003; CERVERA et al., 2007). Berg e cols. (2010) destacaram que no pico da infecção primária, há um evidente perfil sorológico de citocinas Th1 (IFN- γ e IL-18), como também uma elevação dos níveis de proteína C reativa em comparação a outros momentos da infecção. Maecker e Maino (2004) observaram que, durante a infecção crônica por CMV, a frequência de células T CD4+ secretando citocinas é disposta de acordo à seguinte hierarquia: TNF- α , IFN- γ e IL-2.

No presente estudo, foi observado que os receptores de TCTH apresentaram níveis de proteína C reativa (PCR) maiores do que o grupo controle, independente do momento da infecção ($p < 0,05$; Fig. 1). Durante o tratamento anti-CMV, o nível plasmático da PCR foi superior ao apresentado por pacientes sem infecção ativa (19,4 vs. 7,0; $p = 0,03$; Fig. 1), sugerindo a participação dessa proteína no processo

inflamatório sistêmico induzido pela infecção ativa por CMV e colocando-o como candidato a biomarcador da infecção. Por outro lado, os níveis de IL-6, que é uma citocina associada à produção hepática da PCR, não variaram nos diferentes momentos da infecção (Tab. 3).

Como pode ser observado na Tabela 3, a IL-17A foi detectada em níveis mais altos durante a infecção ativa (140,7 vs 61,0, $p < 0,01$). Assim, diferente de outros trabalhos que ressaltam o protagonismo das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α durante a reativação viral, neste estudo foi evidenciado que a infecção ativa por CMV induz o aumento dos níveis plasmáticos principalmente da IL-17A (HUMAR et al., 1999; REDDY et al., 2005; Tab. 3). Outros autores têm destacado o papel da IL-17 na fisiopatologia da infecção por CMV (EGLI et al., 2012; LIU et al., 2013).

A IL-4 apresentou-se em maior concentração plasmática durante a infecção ativa quando comparada ao período de tratamento (48,0 vs. 39,5, $p = 0,03$), o que indica a possibilidade de os níveis de IL-4 serem utilizados como biomarcadores na infecção (Tab. 3). Outros estudos também associaram a infecção por CMV com a secreção de citocinas de IL-4 (ESSA et al., 2000; ESSA et al., 2009).

As citocinas Th1, como o IFN- γ , são geralmente associadas à imunoproteção e à reconstituição imune, porém, há relatos de associação entre altos níveis de IFN- γ e risco de infecção ativa por CMV (PADRON et al., 2008; PATIDAR, 2010). Outros autores destacam que o CMV aumenta a expressão dos interferons (MARSHALL & GEBALLE, 2009). No presente estudo, os níveis plasmáticos do IFN- γ foram menores durante o período de tratamento anti-CMV quando comparados à ausência da infecção ativa (38,6 vs. 44,7; $p = 0,04$) e à ocorrência da infecção ativa (38,6 vs. 65,0; $p < 0,01$), indicando que a secreção plasmática do IFN- γ é um dos mecanismos sistêmicos de resposta imune ao CMV (Tab. 3).

Para melhor definir a participação das citocinas IL-17A, IFN- γ e IL-4, foram realizadas avaliações considerando a razão plasmática entre elas nos diferentes momentos da infecção. Durante a infecção ativa, a razão entre IL-17A / IL-4 e IL-17A / IFN- γ é mais alta do que no período sem infecção ativa ($p < 0,01$; Fig. 2). Por outro lado, a razão IFN- γ / IL-4 não diferiu entre os pacientes com e sem infecção ativa ($p > 0,05$), o que demonstra a impossibilidade de caracterizar a resposta sistêmica contra o CMV como sendo de perfil Th1 ou Th2.

A ocorrência de DECH nos pacientes incluídos no estudo foi de 92,8% e, durante 50% dos episódios de infecção ativa, os pacientes apresentavam sinais de

DECH (Tab. 1 e Tab. 2), o que ressalta a necessidade de destacar duas importantes considerações. A primeira diz respeito à incidência da infecção. Evidências sugerem que há uma relação bidirecional entre DECH e infecção ativa por CMV, ou seja, tanto o CMV favorece o aparecimento da DECH quanto a DECH favorece a reativação do CMV (CANTONI et al, 2010). Desse modo, a alta ocorrência da DECH nos pacientes pode ter sido um importante motivo para a alta incidência encontrada e, por outro lado, a alta soroprevalência aliada à incidência da infecção ativa pode ter impactado significativamente para a ocorrência da DECH. A segunda diz respeito ao perfil plasmático de citocinas. Vários trabalhos associam a patogênese da DECH à secreção de citocinas como TNF- α , IL-4, IFN- γ , IL-10 e IL-17 (TOPÇUOGLU et al., 2008; HOYA et al., 2012; HAYASHIDA et al., 2013). Desse modo, os níveis plasmáticos das citocinas analisadas podem ter sofrido influência da DECH, dificultando ou favorecendo as associações encontradas.

Em conclusão, pode-se destacar a alta incidência (67,9%) de infecção ativa por CMV após TCTH alogênico entre D+/R+ no estado da Bahia, ressaltando a importância do diagnóstico precoce e do monitoramento desse agente infeccioso nos pacientes transplantados. A incidência da infecção ativa tardia foi de 28,6%, o que evidencia a necessidade de monitorar o CMV após o D+100. Além disso, ficou demonstrada a eficácia do tratamento preemptivo com ganciclovir intravenoso baseado no monitoramento com o ensaio de antigenemia, uma vez que houve 100% de resolutividade dos episódios de infecção ativa diagnosticados. Com relação à concentração da PCR e das citocinas analisadas, este estudo trouxe evidências de que ocorrem alterações plasmáticas nos níveis de PCR, IL-17A, IFN- γ e IL-4 em diferentes fases de infecção ativa por CMV, sugerindo a possibilidade de utilização dos níveis plasmáticos dessas proteínas como biomarcadores e/ou fatores preditivos na infecção, entretanto, são necessários estudos mais específicos para confirmar essa possibilidade e definir os critérios de utilização.

Agradecimentos

Agradecemos aos pacientes e à equipe clínica do Centro de Transplante de Medula Óssea do Hospital Prof. Edgard Santos, Salvador, BA. Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do estado da Bahia (FAPESB), Brasil (Outorga no. 16/2010).

Conflito de Interesse

Todos os autores declaram que não existe conflito de interesses.

5. Referências

- BACIGALUPO A, BALLEEN K, RIZZO D, et al. Defining the Intensity of Conditioning Regimens: working definitions. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009; 15(12): 1628–1633.
- BEAM E, RAZONABLE RR. Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation: Epidemiology, Prevention, and Treatment. *Curr Infect Dis Rep* 2012; 14:633–641.
- BERG PJ, HEUTINCK KM, RAABE R, et al. Human Cytomegalovirus Induces Systemic Immune Activation Characterized by a Type 1 Cytokine Signature. *J Infect Dis* 2010; 202:690–699.
- BOECKH M, LJUNGMAN P. How I treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients. *Blood* 2009; 113 (23):5711-5719.
- CANTONI N, HIRSCH HH, KHANNA N, et al. Evidence for a Bidirectional Relationship between Cytomegalovirus Replication and acute Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; 16:1309-1314.
- CERVERA C, FILELLA X, LINARES L, et al. Th1/Th2 Cytokine Release Pattern During in vivo Cytomegalovirus Disease in Solid Organ Transplantation. *Transplant Proc* 2007; 39:2233–2235.
- CHEUK DKL. Optimal stem cell source for allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancies. *World J Transplant* 2013; 3(4):99-112.
- COMPTON T, KURT-JONES EA, BOEHME KW, et al. Human Cytomegalovirus Activates Inflammatory Cytokine Responses via CD14 and Toll-Like Receptor 2. *J Virol* 2003; 77:4588–4596.
- COPELAN EA. Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *N Engl J Med* 2006; 354:1813-1826.
- EGLI A, SILVA MJ, O'SHEA D, et al. An Analysis of Regulatory T-Cell and Th-17 Cell Dynamics during Cytomegalovirus Replication in Solid Organ Transplant Recipients. *PLoS ONE* 2012; 7:e43937.
- ESSA S, RAGHUPATHY R, PACSA AS, et al. Th1-type cytokines production is decreased in kidney transplant recipients with active cytomegalovirus infection. *J Med Virol* 2000; 60(2):223-229.
- ESSA S, PACSA A, RAGHUPATHY R, et al. Low levels of Th1-type cytokines and increased levels of Th2-type cytokines in kidney transplant recipients with active cytomegalovirus infection. *Transplant Proc* 2009; 41(5):1643-1647.

GEORGE B, PATI N, GILROY N, et al. Pre-transplant cytomegalovirus (CMV) serostatus remains the most important determinant of CMV reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the era of surveillance and preemptive therapy. *Transpl Infect Dis* 2010; 12:322-329.

HAYASHIDA JN, NAKAMURA S, TOYOSHIMA T, et al. Possible involvement of cytokines, chemokines and chemokine receptors in the initiation and progression of chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant* 2013; 48:115–112.

HEREDIA EJA, NESHER L, CHEMALY RF. Cytomegalovirus diseases after hematopoietic stem cell transplantation: A mini-review. *Cancer Letters* 2014; 342:1–8.

HOYA AG, SANTIAGO RL, OJEDA JV, et al. Determination of Th1/Th2/Th17 Cytokines in Patients Undergoing Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *New Advances in Stem Cell Transplantation* 2012; 5:83-102.

HUMAR A, LOUIS P, MAZZULLI T, et al. Elevated Serum Cytokines Are Associated with Cytomegalovirus Infection and Disease in Bone Marrow Transplant Recipients. *J Infect Dis* 1999; 179:484–488.

JANG JE, HYUN SY, KIM YD, et al. Risk Factors for Progression from Cytomegalovirus Viremia to Cytomegalovirus Disease after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012; 18:881-886.

JASKULA E, DLUBEK D, SEDZIMIRSKA M, et al. Reactivations of Cytomegalovirus, Human Herpes Virus 6, and Epstein-Barr Virus Differ with Respect to Risk Factors and Clinical Outcome after Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Transplant Proc* 2010; 42:3273–3276.

JEON S, LEE WK, LEE Y, et al. Risk Factors for Cytomegalovirus Retinitis in Patients with Cytomegalovirus Viremia after Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Ophthalmology* 2012; 119:1892–1898.

KEDIA S, ACHARYA PS, MOHAMMAD F, et al. Infectious Complications of Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *J Stem Cell Res Ther* 2013; S3:002.

LIU LL, LI XF, QIN WQ, et al. Is IL-17 an accomplice contributing to salivary gland damage during CMV infection? *Future Virol* 2013; 8(9):861–869.

LJUNGMAN P, HAKKI M, BOECKH M. Cytomegalovirus in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Hematol Oncol Clin North Am* 2011; 25(1): 151–169.

MAECKER HT, MAINO VC. Analyzing T-Cell Responses to Cytomegalovirus by Cytokine Flow Cytometry. *Hum Immunol* 2004; 65:493-499.

MARSHALL EE, GEBALLE AP. Multifaceted Evasion of the Interferon Response by Cytomegalovirus. *J Interf Cytok Res* 2009; 29(9):609-619.

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* 2011; 83:298–304.

MATOS SB, MEYER R, LIMA FWM. Seroprevalence of cytomegalovirus infection among healthy blood donors in Bahia State, Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2010; 32(1):45-49.

MORI T, KATO J. Cytomegalovirus infection / disease after hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol* 2010; 91:588-595.

PADRON E, SCHOLD J., DALLAS J, et al. Association of early post-transplant interferon levels and CMV infection after HSCT [Abstract]. *J Clin Oncol* 2008; 26 (15S):7095.

PATIDAR SM. Type D Personality, Th-1 cytokine levels and Cytomegalovirus Antigenemia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem Cell transplant. 2010. 40f. Dissertação (Master of Science) – University of Florida, Gainesville, USA.

PERES RMB, Costa CRC, Andrade PD, et al. 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 Infect Dis* 2010; 10:147.

PINHEIRO SG, MATOS SB, BOTURA MB. Late cytomegalovirus infection after hematopoietic stem cell transplantation: case reports. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2013;35(6):435-437.

REDDY V, MEIER-KRIESCHE HU, GREENE S, et al. Increased levels of tumor necrosis factor alpha are associated with an increased risk of cytomegalovirus infection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11(9):698-705.

ROWE J, SHELLEE AG, PEACE D, et al. The significance of cytomegalovirus viremia at day 100 or more following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Transplant* 2013; 27:510–516.

SHARMA SK, KUMAR S, AGRAWAL N, et al. Cytomegalovirus reactivation following hematopoietic stem cell transplantation. *J Infect Dev Ctries* 2013; 7(12):1003-1007.

SOUZA MA, PASSOS AM, TREITINGER A, et al. Seroprevalence of cytomegalovirus antibodies in blood donors in southern, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010; 43(4): 359-361.

TOMBLYN M, CHILLER T, EINSELE H, et al. Guidelines for Preventing Infectious Complication among Hematopoietic Cell Transplantation Recipients: A Global Perspective. *Biol blood Marrow transplant* 2009; 15:1143-1238.

TOPÇUOĞLU P, BAKANAY FM, DALVA K, et al. T-helper-1 (Th1) and Th2 cytokines after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT). *Turk J Hematol* 2008; 25:24-35.

5. CONCLUSÃO GERAL

- A infecção ativa por CMV ocorre em alta incidência nos pacientes submetidos ao transplante renal ou ao transplante de células tronco hematopoiéticas no estado da Bahia, evidenciando a importância do monitoramento seriado para o diagnóstico precoce e tratamento adequado dessa infecção.
- Os níveis plasmáticos da PCR e da IL-4 variaram em diferentes momentos da infecção por CMV nos pacientes submetidos ao transplante renal, sugerindo a possibilidade de serem utilizados como fatores preditivos na infecção.
- Os níveis plasmáticos da PCR, IL-17A, IFN- γ e IL-4 variaram em diferentes momentos da infecção por CMV nos pacientes submetidos ao transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas, sugerindo a possibilidade de serem utilizados como fatores preditivos na infecção.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED SA, AL-JOUDI FS, ZAIDAH AW, et al. The Prevalence of Human Cytomegalovirus Seropositivity among Blood Donor at the Unit of Blood Transfusion Medicine, Hospital Universiti Sains Malaysia. 2006; 37(2):294-296.
- ALMEIDA LNB, AZEVEDO RS, AMAKU M, et al. Cytomegalovirus seroepidemiology in an urban community of São Paulo, Brazil. *Rev Saúde Pública* 2001; 35(2):124-129.
- AMIRZARGAR A, LESSANPEZESHKI M, FATHI A, et al. Th1/Th2 Cytokine Analysis in Iranian Renal Transplant Recipients. *Transplant Proc* 2005; 37:2985–2987.
- ANDREWS PA, EMERY VC, NEWSTEAD C. Summary of the British Transplantation Society Guidelines for the Prevention and Management of CMV Disease after Solid Organ Transplantation. *Transplant* 2011; 92: 1181-1187.
- ATKINSON C, EMERY VC. Cytomegalovirus quantification: Where to next in optimising patient management? *J Clin Virol* 2011; 51:219–224.
- AVERY RK, MOSSAD SB, POGGIO E, et al. Utility of leflunomide in the treatment of complex cytomegalovirus syndromes. *Transplant* 2010; 90: 419–426.
- BACIGALUPO A, BALLEEN K, RIZZO D, et al. Defining the Intensity of Conditioning Regimens: working definitions. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009; 15(12): 1628–1633.
- BALE JF. Cytomegalovirus Infections. *Semin Pediatr Neurol* 2012; 19:101-106.
- BARZILAI O, RAM M, SHOENFELD Y. Viral infection can induce the production of autoantibodies. *Curr Opin Rheumatol* 2007; 19(6):636-43.
- BATE SL, DOLLARD SC, CANNON MJ. Cytomegalovirus seroprevalence in the United States: the national health and nutrition examination surveys, 1988-2004. *Clin Infect Dis* 2010; 50:1439-47.
- BEAM E, RAZONABLE RR. Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation: Epidemiology, Prevention, and Treatment. *Curr Infect Dis Rep* 2012; 14:633–641.
- BERG PJ, HEUTINCK KM, RAABE R, et al. Human Cytomegalovirus Induces Systemic Immune Activation Characterized by a Type 1 Cytokine Signature. *J Infect Dis* 2010; 202:690–699.
- BIRON KK. Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases: Mini-review. *Antiviral Research* 2006; 71:154–163.
- BOECKH M, LJUNGMAN P. How I treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients. *Blood* 2009; 113 (23):5711-5719.
- BOEHME KW, COMPTON T. Innate Sensing of Viruses by Toll-Like Receptors. *J Virol* 2004; 78(15):7867–7873.

BOEHME KW, GUERRERO M, COMPTON T. Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells. *J Immunol.* 2006; 177(10):7094–7102.

BONON SHA, ROSSI CL, DE SOUZA CA, et al. Comparison of Serology, Antigenemia assay and the Polymerase Chain Reaction for Monitoring Active Cytomegalovirus Infections in Hematopoietic Stem Cell Transplantation Patients. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2006; 48(5):275-78.

BRASIL. Resolução - RDC Nº 57, de 16 de dezembro de 2010. ANVISA. Brasília, 2010.

BRAVO D, CLARI MA, AGUILAR G, et al. Looking for Biological Factors to Predict the Risk of Active Cytomegalovirus Infection in Non-Immunosuppressed Critically Ill Patients. *J Med Virol* 2013. DOI: 10.1002/jmv.23838.

BRISTOW BN, O'KEEFE KA, SHAFIR SC, et al. Congenital Cytomegalovirus Mortality in the United States, 1990–2006. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5 (4): e1140.

BRITT WJ, BOPANA S. Human Cytomegalovirus Virion Proteins. *Hum Immunol* 2004; 65:395-402.

BROWNE BJ, YOUNG JA, DUNN TB, et al. The impact of cytomegalovirus infection ≥ 1 year after primary renal transplantation. *Clin Transplant* 2010; 24:572–577.

BUONSENSO D, SERRANTI D, GARGIULLO L, et al. Congenital cytomegalovirus infection: current strategies and future perspectives. *Eun Rev Med and Pharmacol Sci* 2012; 16:919-935.

CANNON MJ, DAVIS KF. Washing our hands of the congenital cytomegalovirus disease epidemic. *BMC Pub Health.* 2005; 5(70):1-8.

CANNON MJ, SCHMID DS, HYDE TB. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev Med Virol* 2010; 20:202–213.

CANTONI N, HIRSCH HH, KHANNA N, et al. Evidence for a Bidirectional Relationship between Cytomegalovirus Replication and acute Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010; 16:1309-1314.

CASAVANT NC, LUO MH, ROSENKE K, et al. Potential Role for p53 in the Permissive Life Cycle of Human Cytomegalovirus. *J Virol* 2006; 80(17):8390-8401.

CAVLEK TV, STERNAK SL, GALINOVIC GM. Value of IgG avidity in cytomegalovirus infection diagnosis in pregnant women and newborn infants. *Medica Jadertina* 2008; 38(1-2):23-28.

CDC. Cytomegalovirus (CMV) and Congenital CMV Infection. Center of Disease Control and Prevention. National Center for Immunization and Respiratory Diseases, Division of Viral Diseases. Reviewed: June 5, 2013. Access: 10/01/2014. Available at: <http://www.cdc.gov/cmvtrends-stats.html>.

- CERVERA C, FILELLA X, LINARES L, et al. Th1/Th2 Cytokine Release Pattern During in vivo Cytomegalovirus Disease in Solid Organ Transplantation. *Transplant Proc* 2007; 39:2233–5.
- CHACKO B, JOHN GT. Leflunomide for cytomegalovirus: bench to bedside. *Transpl Infect Dis* 2012; 14:111–120.
- CHEERAN MCJ, LOKENSGARD JR, SCHLEISS MR. Neuropathogenesis of Congenital Cytomegalovirus Infection: Disease Mechanisms and Prospects for Intervention. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22(1):99–126.
- CHEN SF, TU WW, SHARP MA, et al. Antiviral CD8 T cells in the control of primary human cytomegalovirus infection in early childhood. *J Infect Dis* 2004; 189:1619–1627.
- CHEN Y, CHEN J, LIU Z, et al. Relationship between TH1/TH2 cytokines and immune tolerance in liver transplantation in rats. *Transplant Proc* 2008; 40:2691–2695.
- CHEUK DKL. Optimal stem cell source for allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancies. *World J Transplant* 2013; 3(4):99–112.
- CHEVILLOTTE M, LANDWEHR S, LINTA L, et al. 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* 2009; 83:2480–2490.
- CHOU SW, DENNISON KM. Analysis of interstrain variation in cytomegalovirus glycoprotein B sequences encoding neutralization-related epitopes. *J Infect Dis* 1991; 163(6):1229–1234.
- CHUNFANG G, LING W, XIAOXIA L. IL-17 family: Cytokines, receptors and signaling. *Cytokine* 64 (2013) 477–485.
- COMPTON T, KURT-JONES EA, BOEHME KW, et al. Human Cytomegalovirus Activates Inflammatory Cytokine Responses via CD14 and Toll-Like Receptor 2. *J Virol* 2003; 77:4588–4596.
- COOK CH. Cytomegalovirus Reactivation in “Immunocompetent” Patients: A Call for Scientific Prophylaxis. *J Infect Dis* 2007; 196:1273–5.
- COPELAN EA. Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *N Engl J Med* 2006; 354:1813–1826.
- COSTALONGA EC, MELO NCV, RODRIGUES CE, et al. The potential role of C-reactive protein in distinguishing cytomegalovirus from tuberculosis and bacterial infections in renal transplant recipients. *Clin Transplant* 2009; 23:710–715.
- CORDERO E, CASASOLA C, ECARMA R, et al. Cytomegalovirus Disease in Kidney Transplant Recipients: Incidence, Clinical Profile, and Risk Factors. *Transplant Proc* 2012; 44:694–700.
- COUZI L, HELOU S, BACHELET T, et al. Preemptive Therapy versus Valgancyclovir Prophylaxis in Cytomegalovirus-positive Kidney Transplant Recipients Receiving Antithymocyte Globulin Induction. *Transplant Proc* 2012; 44:2809–2813.

CROUGH T, KHANNA R. Immunobiology of Human Cytomegalovirus: from Bench to Bedside. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22:76–98.

DANGEL V, BÄDER U, ENDERS G. Improvement of cytomegalovirus avidity testing by adjusting the concentration of CMV-specific IgG in test samples. *J Clin Virol* 2006; 35:303-9.

DANIEL V, NAUJOKAT C, SADEGHI M, et al. Association of circulating interleukin (IL)-12- and IL-10-producing dendritic cells with time posttransplant, dose of immunosuppression, and plasma cytokines in renal-transplant recipients. *Transplant* 2005; 79:1498–1506.

DIEAMANT D, BONON SHA, PERES RMB, et al. Cytomegalovirus (CMV) genotype in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *BMC Infec Dis* 2013; 13:310.

DOLLARD SC, STARAS SAS, AMIN MM, et al. National Prevalence Estimates for Cytomegalovirus IgM and IgG Avidity and Association between High IgM Antibody Titer and Low IgG Avidity. *Clin Vacc Immunol* 2011; 18(11):1895–1899.

EGLI A, SILVA MJ, O'SHEA D, et al. An Analysis of Regulatory T-Cell and Th-17 Cell Dynamics during Cytomegalovirus Replication in Solid Organ Transplant Recipients. *PLoS ONE* 2012; 7:e43937.

ERICE A, MARLENE AH, GILL PC, et al. Cytomegalovirus (CMV) Antigenemia Assay Is More Sensitive Than Shell Vial Cultures for Rapid Detection of CMV in Polymorphonuclear Blood Leukocytes. *J Clin Microbiol* 1992; 30(11):2822-2825.

ESSA S, PACSA A, RAGHUPATHY R, et al. Low levels of Th1-type cytokines and increased levels of Th2-type cytokines in kidney transplant recipients with active cytomegalovirus infection. *Transplant Proc* 2009; 41(5):1643-7.

ESSA S, RAGHUPATHY R, PACSA AS, et al. Th1-type cytokines production is decreased in kidney transplant recipients with active cytomegalovirus infection. *J Med Virol* 2000; 60(2):223-9.

FOWLER KB, PASS RF. Risk factors for congenital cytomegalovirus infection in the offspring of young women: exposure to young children and recent onset of sexual activity. *Pediatrics* 2006; 118(2):e286–e292.

FREEMAN RB. The 'Indirect' Effects of Cytomegalovirus Infection. *Am J Transplant* 2009; 9:2453–2458.

GABAY C, KUSHNER L. Acute phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999; 340(6):448-454.

GAULT E, MICHEL Y, DEHÉE A, et al. Quantification of Human Cytomegalovirus DNA by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39(2): 772–775.

GEORGE B, PATI N, GILROY N, et al. Pre-transplant cytomegalovirus (CMV) serostatus remains the most important determinant of CMV reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in the era of surveillance and preemptive therapy. *Transpl Infect Dis* 2010; 12:322-329.

GIAKOUSTIDIS D, ANTONIADIS A, FOUZAS I, et al. Prevalence and Clinical Impact of Cytomegalovirus Infection and Disease in Renal Transplantation: Ten Years of Experience in a Single Center. *Transplant Proc* 2012;44:2715–2717.

GILLESPIE GM, WILLS MR, APPAY V, et al. Functional heterogeneity and high frequencies of cytomegalovirus-specific CD8⁺ T lymphocytes in healthy seropositive donors. *J Virol* 2000; 74:8140–8150.

GIMENO C, SOLANO C, LATORRE JC, et al. 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* 2008; 46(10):3311-18.

GLEAVES CA, SMITH TF, SHUSTER EA, et al. Rapid detection of cytomegalovirus in MRC-5 cells inoculated with urine specimens by using low-speed centrifugation and monoclonal antibody to an early antigen. *J Clin Microbiol* 1984; 19(6):917–9.

GREINER M, CUSINI A, RUESCH M, et al. A stringent preemptive protocol reduces cytomegalovirus disease in the first 6 months after kidney transplantation. *Infection* 2012; 40:669–675.

GRIFFITHS P, WHITLEY R, SNYDMAN DR, et al. Contemporary management of cytomegalovirus infection in transplant recipients: guidelines from an IHMF workshop, 2007. *Herpes* 2008; 15:4-12.

HAKKI M, CHOU S. The biology of cytomegalovirus drug resistance. *Curr Opin Infect Dis* 2011; 24:605–611.

HAMPRECHT K, MASCHMANN J, VOCHER M, et al. Epidemiology of transmission of cytomegalovirus from mother to preterm infant by breastfeeding. *Lancet* 2001; 357:513-518.

HARMENING DM. *Técnicas Modernas em Banco de sangue e Transfusões*. 4 ed. Rio de Janeiro: Editora Revinter, 2006. 632 p.

HARVALA H, STEWART C, MULLER K, et al. High risk of cytomegalovirus infection following solid organ transplantation despite prophylactic therapy. *J Med Virol* 2013; 85:893-898.

HARVEY J, DENNIS CL. Hygiene interventions for prevention of cytomegalovirus infection among childbearing women: systematic review. *J Adv Nurs* 2008; 63(5):440-450.

HAYASHIDA JN, NAKAMURA S, TOYOSHIMA T, et al. Possible involvement of cytokines, chemokines and chemokine receptors in the initiation and progression of chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant* 2013; 48:115–112.

HEREDIA EJA, NESHER L, CHEMALY RF. Cytomegalovirus diseases after hematopoietic stem cell transplantation: A mini-review. *Cancer Letters* 2014; 342:1–8.

- HOYA AG, SANTIAGO RL, OJEDA JV, et al. Determination of Th1/Th2/Th17 Cytokines in Patients Undergoing Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *New Advances in Stem Cell Transplantation* 2012; 5:83-102.
- HUANG ES, JOHNSON RA. Human Cytomegalovirus – no longer just a DNA virus. *Nat Med* 2000; 6(8):863-864.
- HUGHES D, HAFFERTY J, FULTON L, et al. Donor and recipient CMV serostatus and antigenemia after renal transplantation: an analysis of 486 patients. *J Clin Virol* 2008; 41:92-95.
- HUMAR A, LOUIS P, MAZZULLI T, et al. Elevated Serum Cytokines Are Associated with Cytomegalovirus Infection and Disease in Bone Marrow Transplant Recipients. *J Infect Dis* 1999; 179:484–488.
- JAMAL AJ, HUSAIN S, LI Y, et al. Risk Factors for Late-Onset Cytomegalovirus Infection or Disease in Kidney Transplant Recipients. *Transplant* 2014; 97:569-575.
- JANG JE, HYUN SY, KIM YD, et al. Risk Factors for Progression from Cytomegalovirus Viremia to Cytomegalovirus Disease after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012; 18:881-886.
- JASKULA E, DLUBEK D, SEDZIMIRSKA M, et al. Reactivations of Cytomegalovirus, Human Herpes Virus 6, and Epstein-Barr Virus Differ with Respect to Risk Factors and Clinical Outcome after Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Transplant Proc* 2010; 42:3273–3276.
- JEON S, LEE WK, LEE Y, et al. Risk Factors for Cytomegalovirus Retinitis in Patients with Cytomegalovirus Viremia after Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Ophthalmology* 2012; 119:1892–1898.
- JIN X, DEMOITIE MA, DONAHOE SM, et al. High Frequency of Cytomegalovirus-Specific Cytotoxic T-Effector Cells in HLA-A*0201–Positive Subjects during Multiple Viral Coinfections. *J Infect Dis* 2000; 181:165–75.
- JUNG GO, KIM SJ, CHOI GS, et al. The effect of cytomegalovirus antigenemia titer on the efficacy of preemptive therapy for the prevention of cytomegalovirus disease after kidney transplantation. *Transplant Proc* 2010; 42:804-810.
- JUNQUEIRA JJM, SANCHO TM, SANTOS VA. Citomegalovirus: Revisão dos Aspectos Epidemiológicos, Clínicos, Diagnósticos e de Tratamento. *NewsLab* 2008; 86:89-103.
- KALEJTA RF. Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiol Mol Biol Rev* 2008; 72:249-265.
- KANENGISSER PB, HAZAN Y, PINES G, et al. High cytomegalovirus IgG avidity is a reliable indicator of past infection in patients with positive IgM detected during the first trimester of pregnancy. *J Perin Med* 2009; 37:15–18.
- KEDIA S, ACHARYA PS, MOHAMMAD F, et al. Infectious Complications of Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *J Stem Cell Res Ther* 2013; S3:002.

- KEYZER K, LAECKE SV, PEETERS P, et al., Human Cytomegalovirus and Kidney Transplantation: A Clinician's Update. *Am J Kidney Dis* 2011; 58(1):118-126.
- KIM CS. Congenital and Perinatal Cytomegalovirus infection. *Korean J Pediatric* 2010; 53:14-20.
- KIM ST, LEE MH, KIM SY, et al. A randomized trial of preemptive therapy for prevention of cytomegalovirus disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol* 2010; 91:886–891.
- KOMATSU TE, PIKIS A, NAEGER LK, et al. Resistance of human cytomegalovirus to ganciclovir / valganciclovir: A comprehensive review of putative resistance pathways. *Antivir Res* 2014; 101:12–25.
- KOTTON CN, KUMAR D, CALIENDO AM, et al. International Consensus Guidelines on the Management of Cytomegalovirus in Solid Organ Transplantation. *Transplantation* 2010; 89:779-795.
- KOWALSKY S, ARNON R, POSADA R. Prevention of cytomegalovirus following solid organ transplantation: a literature review. *Pediatr Transplant* 2013; 17:499–509.
- LANDOLFO S, GARIGLIO M, GRIBAUDO G, et al. The human cytomegalovirus. *Pharmacol Therapeut* 2003; 98:269–297.
- LANDRY ML, FERGUSON A. 2-Hour Cytomegalovirus pp65 Antigenemia Assay for Rapid Quantitation of Cytomegalovirus in Blood Samples. *J Clin Microbiol* 2000; 38(1):427–428.
- LEVITSKY J, FREIFELD AG, PUUMALA S, et al. Cytomegalovirus viremia in solid organ transplantation: does the initial viral load correlate with risk factors and outcomes?. *Clin Transplant* 2008; 22(2):222-8.
- LIBETTA C, SEPE V, ZUCCHI M, et al. The effect of sirolimus- or cyclosporine-based immunosuppression effects on T-cell subsets in vivo. *Kidney Int* 2007; 72:114–120.
- LIU LL, LI XF, QIN WQ, et al. Is IL-17 an accomplice contributing to salivary gland damage during CMV infection? *Future Virol* 2013; 8(9):861–869.
- LIU YC, LU PL, HSIAO HH, et al. 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* 2012; 91:587–595.
- LJUNGMAN P, BRAND R, EINSELE H, et al. Donor CMV serologic status and outcome of CMV-seropositive recipients after unrelated donor stem cell transplantation: an EBMT megafile analysis. *Blood* 2003; 102:4255–4260.
- LJUNGMAN P, GRIFFITHS P, PAYA C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 1094–1097.
- LJUNGMAN P, HAKKI M, BOECKH M. Cytomegalovirus in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Hematol Oncol Clin North Am* 2011; 25(1): 151–169.

- LOETH N, ASSING K, MADSEN HO, et al. Humoral and Cellular CMV Responses in Healthy Donors; Identification of a Frequent Population of CMV-Specific, CD4+ T Cells in Seronegative Donors. *PLoS ONE* 2012; 7(2):e31420.
- LOH HS, MOHD-LILA MA, ABDUL-RAHMAN SO, et al. Pathogenesis and vertical transmission of a transplacental rat cytomegalovirus. *Virology* 2006; 3:42.
- LUNARDI C, DOLCINO M, PETERLANA D, et al. Endothelial Cells' Activation and Apoptosis Induced by a Subset of Antibodies against Human Cytomegalovirus: Relevance to the Pathogenesis of Atherosclerosis. *PLoS ONE* 2007; 2(5): e473.
- LURAIN NS, CHOU S. Antiviral Drug Resistance of Human Cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23(4):689–712.
- MAECKER HT, MAINO VC. Analyzing T-Cell Responses to Cytomegalovirus by Cytokine Flow Cytometry. *Hum Immunol* 2004; 65:493-499.
- MANUEL O. Clinical Experience with Immune Monitoring for Cytomegalovirus in Solid-Organ Transplant Recipients. *Curr Infect Dis Rep* 2013; 15:491–496.
- MARSHALL EE, GEBALLE AP. Multifaceted Evasion of the Interferon Response by Cytomegalovirus. *J Interf Cytok Res* 2009; 29(9):609-619.
- MARTY FM, DREW J, WINSTON MD, et al. CMX001 to Prevent Cytomegalovirus Disease in Hematopoietic-Cell Transplantation. *N Engl J Med* 2013; 369:1227-36.
- MARTY FM, LJUNGMAN P, PAPANICOLAOU GA, et al. Maribavir prophylaxis for prevention of cytomegalovirus disease in recipients of allogeneic stem-cell transplants: a phase 3, double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *Lancet Infect Dis* 2011; 11:284–92.
- MATOS SB, MEYER R, LIMA FWM. Citomegalovírus: uma revisão da patogenia, epidemiologia e diagnóstico da infecção. *Rev Saúde.com* 2011; 7(1): 44-57a.
- 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* 2011; 83:298–304b.
- MATOS SB, MEYER R, LIMA FWM. Seroprevalence of cytomegalovirus infection among healthy blood donors in Bahia State, Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2010; 32(1):45-49.
- MICHAELIS M, DOERR HW, CINATL J. The Story of Human Cytomegalovirus and Cancer: Increasing Evidence and Open Questions. *Neoplasia* 2009;11:1–9.
- MINTON K. Viral immunity: How CMV bypasses immune memory. *Nat Rev Immunol* 2010; 10:288-289.
- MIURA CS, MIURA E, MOMBACH AB, et al. The prevalence of congenital cytomegalovirus infection in newborn infants at an intensive care unit in a public hospital. *J Pediatr (Rio J)* 2006; 82(1):46-50.
- MORI T, KATO J. Cytomegalovirus infection / disease after hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol* 2010; 91:588-595.

- NAUCLER CS. Human Cytomegalovirus Persists in its Host and Attacks and Avoids Elimination by the Immune System. *Cr Rev Immunol* 2006; 26(3):231-63.
- NICHOLS WG, COREY L, GOOLEY T, et al. High risk of death due to bacterial and fungal infection among cytomegalovirus (CMV) - seronegative recipients of stem cell transplants from seropositive donors: evidence for indirect effects of primary CMV infection. *J Infect Dis* 2002; 185:273–282.
- NORIEGA V, REDMANN V, GARDNER T, et al. Diverse immune evasion strategies by human cytomegalovirus. *Immunol Res.* 2012; 54(1-3):140-51.
- NOVAK Z, ROSS AS, PATRO RK, et al. Cytomegalovirus Strain Diversity in Seropositive Women. *J Clin Microbiol* 2008; 46(3):882-886.
- O'CONNOR DJH, JACOBSON MA, TAN QX, et al. Development of Cytomegalovirus (CMV) Immune Recovery Uveitis Is Associated with Th17 Cell Depletion and Poor Systemic CMV-Specific T Cell Responses. *Clin Infect Dis* 2011; 52:409–417.
- ODEBERG J, PLACHTER B, BRANDEN L, et al. Human cytomegalovirus protein pp65 mediates accumulation of HLA-DR in lysosomes and destruction of the HLA-DR alpha-chain. *Blood* 2003; 101:4870-4877.
- OLSON DM, SCHMIDT RE, BOLLMANN BA. Treatment and prevention of cytomegalovirus-associated diseases in HIV-1 infection in the era of HAART. *HIV Therapy* 2010; 4(4):413-436.
- OZDEMIR E, SALIBA RM, CHAMPLIN RE, et al. Risk factors associated with late cytomegalovirus reactivation after allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant* 2007; 40:125–136.
- PADRON E, SCHOLD J., DALLAS J, et al. Association of early post-transplant interferon levels and CMV infection after HSCT [Abstract]. *J Clin Oncol* 2008; 26 (15S):7095.
- PAIXÃO P, ALMEIDA S, GOUVEIA P, et al. Prevalence of human cytomegalovirus congenital infection in Portuguese newborns. *Eurosurveillance* 2009; 14(9):1-3.
- PANG XL, FOX JD, FENTON JM, et al. Inter-laboratory comparison of cytomegalovirus viral load assays. *Am J Transplant* 2009; 9(2):258–68.
- PATIDAR SM. Type D Personality, Th-1 cytokine levels and Cytomegalovirus Antigenemia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem Cell transplant. 2010. 40f. Dissertação (Master of Science) – University of Florida, Gainesville, USA.
- PEREIRA WA, FERNANDES RC, SOLER WV, et al. Diretrizes Básicas para Captação e Retirada de Múltiplos Órgão e Tecidos da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. São Paulo: ABTO - Associação Brasileira de Transplante de Órgãos, 2009.
- PERES RMB, Costa CRC, Andrade PD, et al. 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 Infect Dis* 2010; 10:147.

PILMORE H, PUSSELL B, GOODMAN D. KHA-CARI guideline: cytomegalovirus disease and kidney transplantation. *Nephrol* 2011; 16:683-687.

PINHATA MMM, YAMAMOTO AY, BRITTO RMM, et al. Birth Prevalence and Natural History of Congenital Cytomegalovirus (CMV) Infection in a Highly Seroimmune Population. *Clin Infect Dis* 2009; 49(4):522–528.

PINHEIRO SG, MATOS SB, BOTURA MB, et al. Late cytomegalovirus infection after hematopoietic stem cell transplantation: case reports. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2013; 35(6):435-7.

RABELLA N, DREW L. Comparison of Conventional and Shell Vial Cultures for Detecting Cytomegalovirus Infection. *J Clin Microbiol* 1990: 806-807.

RAFAILIDIS PI, MOURTZOUKOU EG, VARBOBITIS IC, et al. Severe cytomegalovirus infection in apparently immunocompetent patients: a systematic review. *Viol J* 2008; 5(47):1-7.

RAMANAN P, RAZONABLE RR. Cytomegalovirus Infections in Solid Organ Transplantation: A Review. *Infect Chemother* 2013; 45(3):260-271.

RAZONABLE RR, HAYDEN RT. Clinical Utility of Viral Load in Management of Cytomegalovirus Infection after Solid Organ Transplantation. *Clin Microbiol Rev* 2013; 26(4):703-727.

REDDY V, MEIER-KRIESCHE HU, GREENE S, et al. Increased levels of tumor necrosis factor alpha are associated with an increased risk of cytomegalovirus infection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2005; 11(9):698-705.

RITTER JT, FELDMAN YJT, LOCHHEAD GR, et al. In vivo characterization of cytokine profiles and viral load during murine cytomegalovirus-induced acute myocarditis. *Cardiovasc Pathol* 2010; 19:83–93.

ROWE J, SHELLER AG, PEACE D, et al. The significance of cytomegalovirus viremia at day 100 or more following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Transplant* 2013; 27:510–516.

SANTOS DV, SOUZA MMR, GONÇALVES SHL, et al. Congenital cytomegalovirus infection in a neonatal intensive care unit in Brazil evaluated by PCR and association with perinatal aspects. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2000; 42(3):129-132.

SARACINO A, COLUCCI R, LATORRACA A, et al. The effects of preemptive therapy using a very low threshold of pp65 antigenemia to prevent cytomegalovirus disease in kidney transplant recipients: a single-center experience. *Transplant Proc* 2013; 45:182-184.

SCHAADE KL, KOCKELKORN P, RITTER K, et al. Detection of Cytomegalovirus DNA in Human Specimens by LightCycler PCR. *J Clin Microbiol* 2000; 38(11): 4006–4009.

SCHROEDER R, MICHELON T, FAGUNDES I, et al. Antigenemia for cytomegalovirus in renal transplantation: choosing a cutoff for the diagnosis criteria in cytomegalovirus disease. *Transplant Proc* 2005; 37:2781-2783.

- SCHROEDER R, MICHELON T, WURDIG J, et al. The Incidence of Cytomegalovirus Infection in Lung Transplant Recipients under Universal Prophylaxis with Intravenous Ganciclovir. *Braz J Infect Dis* 2007; 11(2):212-14.
- SCRIVANO L, SINZGER C, NITSCHKO H, et al. HCMV Spread and Cell Tropism are Determined by Distinct Virus Populations. *PLoS Pathog* 2011; 7(1):e1001256.
- SESTER M, SESTER U, GARTNER B, et al. Levels of virus – specific CD4 T cells correlate with cytomegalovirus control and predict virus-induced disease after renal transplantation. *Transplant* 2001; 71:1287-1294.
- SESTER U, GARTNER BC, WILKENS H, et al. Differences in CMV-specific T-cell levels and long-term susceptibility to CMV infection after kidney, heart and lung transplantation. *Am J Transplant* 2005; 5:1483–1489.
- SHAPIRA MY, RESNICK IB, CHOU S, et al. Artesunate as a potent antiviral agent in a patient with late drug-resistant cytomegalovirus infection after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 2008; 46(9):1455–1457.
- SHARMA SK, KUMAR S, AGRAWAL N, et al. Cytomegalovirus reactivation following hematopoietic stem cell transplantation. *J Infect Dev Ctries* 2013; 7(12):1003-1007.
- SINCLAIR J. Human cytomegalovirus: Latency and reactivation in the myeloid lineage. *J Clin Virol* 2008; 41:180-185.
- SINZGER C, DIGEL M, JAHN G. Cytomegalovirus cell tropism. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; 325:63–83.
- SMITH MG. Propagation in tissue cultures of a cytopatho-genic virus from human salivary gland virus (SVG) disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956; 92:424–430.
- SOUZA MA, PASSOS AM, TREITINGER A, et al. Seroprevalence of cytomegalovirus antibodies in blood donors in southern, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010; 43(4): 359-361.
- STADLER LP, DAVID I, BERNSTEIN S, et al. Seroprevalence of Cytomegalovirus (CMV) and Risk Factors for Infection in Adolescent Males. *Clin Infec Dis* 2010; 51(10):e76–e81.
- STARAS SAS, FLANDERS WD, DOLLARD SC, et al. Influence of Sexual Activity on Cytomegalovirus Seroprevalence in the United States, 1988-1994. *Sex Transm Dis* 2008; 35(5):472-479.
- STERN-GINOSSAR N, WEISBURD B, MICHALSKI A, et al. Decoding human cytomegalovirus. *Science* 2012; 338:1088–1093.
- SUASSUNA JHR, LEITE LL, VILLELA, LHC. Prevalence of cytomegalovirus infection in different patient groups of a urban university in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 1995; 28(2):105-108.
- SURYAWANSHI A, VEIGA-PARGA T, RAJASAGI N, et al. Role of IL-17 and Th17 Cells in HSV Induced Corneal Immunopathology. *J Immunol* 2011; 187(4):1919–1930.

SWANSON EC, SCHLEISS MR. Congenital Cytomegalovirus Infection: New Prospects for Prevention and Therapy. *Pediatr Clin N Am* 2013; 60:335–349.

SYLWESTER AW, MITCHELL BL, EDGAR JB, et al. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med* 2005; 202:673–685.

TABETA K, GEORGEL P, JANSSEN E, et al. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *PNAS* 2004; 101(10):3516–3521.

TAYLOR GH. Cytomegalovirus. *Am Fam Physician* 2003; 67(3):519-24.

TOMBLYN M, CHILLER T, EINSELE H, et al. Guidelines for Preventing Infectious Complication among Hematopoietic Cell Transplantation Recipients: A Global Perspective. *Biol blood Marrow transplant* 2009; 15:1143-1238.

TOPÇUOĞLU P, BAKANAY FM, DALVA K, et al. T-helper-1 (Th1) and Th2 cytokines after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT). *Turk J Hematol* 2008; 25:24-35.

TU W, CHEN S, SHARP M, et al. Persistent and selective deficiency of CD4⁺ T cell immunity to cytomegalovirus in immunocompetent young children. *J Immunol* 2004; 172, 3260–3267.

UPADHYAYULA S, MICHAELS MG. Ganciclovir, Foscarnet, and Cidofovir: Antiviral Drugs Not Just for Cytomegalovirus. *J Pediatric Infect Dis Soc* 2013; 2(3):286–90.

VARNUM SM, STREBLOW DN, MONROE ME, et al. Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J Virol* 2004; 78:10960-10966.

VASTO S, ROMANO GC, LARBI A, et al. Role of persistent CMV infection in configuring T cell immunity in the elderly. *Immunity & Ageing* 2007; 4(2):1-6.

VILLACRES MC, LONGMATE J, AUGÉ C, et al. Predominant type 1 CMV-specific memory T-helper response in humans: evidence for gender differences in cytokine secretion. *Hum Immunol* 2004; 65:476–485.

WELLER TH, MACAULEY JC, CRAIG JM, et al. Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 1957; 94:4–12.

WIDMANN T, SESTER U, GARTNER BC, et al. Levels of CMV Specific CD4 T Cells Are Dynamic and Correlate with CMV Viremia after Allogeneic Stem Cell Transplantation. *PLoS ONE* 2008; 3(11):e3634.

WILLS MR, CARMICHAEL A, MYNARD K, et al. The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J Virol* 1996; 70:7569-7579.

WOLF DG, SHIMONI A, RESNICK IB, et al. Human cytomegalovirus kinetics following institution of artesunate after hematopoietic stem cell transplantation. *Antivir Res* 2011; 90:183–186.

YAMAMOTO AY, PINHATA MMM, DE DEUS VM, et al. Human Cytomegalovirus Glycoprotein B Genotypes in Brazilian Mothers and their Congenitally Infected Infants. *J Med Virol* 2007; 79:1164–1168.

YAMAMOTO K. Possible mechanisms of autoantibody production and the connection of viral infections in human autoimmune diseases. *Tohoku J Exp Med* 1994; 173:75–82.

ZHANG JP, LI F, YU XM, et al. Trace Elements and Cytokine Profile in Cytomegalovirus-Infected Pregnancies: A Controlled Study. *Gynecol Obstet Invest* 2008; 65:128–132.

ZHAO JQ, CHEN LZ, QIU J, et al. The role of interleukin-17 in murine cytomegalovirus interstitial pneumonia in mice with skin transplants. *Transpl Int* 2011; 24: 845-855.

ZHOU W, LONGMATE J, LACEY SF, et al. Impact of donor CMV status on viral infection and reconstitution of multifunction CMV-specific T cells in CMV-positive transplant recipients. *Blood* 2009; 113:6465–6476.

ZHU J, QUYYUMI AA, NORMAN JE. Cytomegalovirus in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34(6): 1738 – 1743.

ANEXO

Universidade Federal da Bahia

Complexo Hospitalar Universitário Prof. Edgard Santos
Diretoria Adjunta de Ensino e Pesquisa (DAEPE)

Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

Rua Augusto Viana, s/n – Canela, Salvador – Bahia. Cep – 40.110-060
Tel.: (71) 3283-8140 FAX: (71) 3283-8141
E-mail: cep.hupes@gmail.com

FORMULÁRIO DE APROVAÇÃO PROTOCOLO CEP – 027/2009

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos (HUPES) avaliou o projeto descrito abaixo:

Projeto de Pesquisa: Imunodiagnóstico Precoce da Infecção por Citomegalovírus e por *Aspergillus spp.* em Pacientes Hematológicos Imunossuprimidos.

Pesquisador Responsável: Fernanda Washington de Mendonça Lima.

Data do Parecer: 27.08.2009

Parecer: Projeto Aprovado

Atenciosamente,


ROBERTO BADARÓ, MD PHD
Coordenador CEP
CHUPES

Resolução CNS 196/96 item IX.2 letra c
Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar os relatórios parciais e final de seu projeto de pesquisa ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).