



RENATA MARIA BORGES PERES

O CITOMEGALOVÍRUS HUMANO (HCMV) NO TRANSPLANTE DE
CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTIAS (TCTH): O uso da PCR em
tempo real no monitoramento da infecção e doença causada pelo HCMV

CAMPINAS
2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

RENATA MARIA BORGES PERES

O CITOMEGALOVÍRUS HUMANO (HCMV) NO TRANSPLANTE DE CÉLULAS-
TRONCO HEMATOPOÉTIAS (TCTH): O uso da PCR em tempo real no monitoramento
da infecção e doença causada pelo HCMV

ORIENTAÇÃO: Prof^ª. Dr^ª. SANDRA CECÍLIA BOTELHO COSTA
CO-ORIENTAÇÃO: Prof^ª. Dr^ª. SANDRA HELENA ALVES BONON

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção de título de Doutora em
Clínica Médica na área de concentração Ciências Básicas.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA POR RENATA
MARIA BORGES PERES, E ORIENTADA PELA
PROF^ª. DR^ª. SANDRA CECÍLIA BOTELHO
COSTA

Assinatura da Orientadora

CAMPINAS
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

P415c Peres, Renata Maria Borges, 1983--
O citomegalovírus humano (HCMV) no transplante de células-tronco hematopoéticas : o uso da PCR em tempo real no monitoramento da infecção e doença causada pelo HCMV / Renata Maria Borges Peres. -- Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador : Sandra Cecília Botelho Costa.
Coorientador : Sandra Helena Alves Bonon.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Citomegalovírus. 2. Transplante de células-tronco hematopoéticas. 3. Reação em cadeia da polimerase em tempo real. I. Costa, Sandra Cecília Botelho, 1951-. II. Bonon, Sandra Helena Alves. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Human cytomegalovirus (HCMV) in hematopoietic stem cell transplantation : the use of real-time PCR in monitoring the infection and disease caused by HCMV

Palavras-chave em inglês:

Cytomegalovirus
Hematopoietic stem cell transplantation
Real-time polymerase chain reaction

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Clínica Médica

Banca examinadora:

Sandra Helena Alves Bonon [Coorientador]
Marcelo de Carvalho Ramos
Kleber Yotsumoto Fertrin
Victor Hugo Aquino Quintana
Maurício Lacerda Nogueira

Data de defesa: 22-08-2014

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

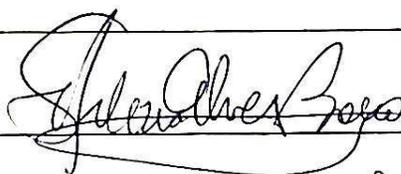
RENATA MARIA BORGES PERES

ORIENTADORA: PROF. DR. SANDRA CECILIA BOTELHO COSTA

COORIENTADORA: PROF. DR. SANDRA HELENA ALVES BONON

MEMBROS:

1. PROF. DR. SANDRA HELENA ALVES BONON



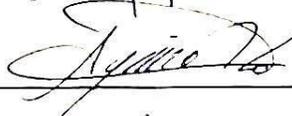
2. PROF. DR. MARCELO DE CARVALHO RAMOS



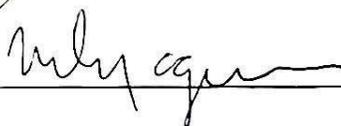
3. PROF. DR. KLEBER YOTSUMOTO FERTRIN



4. PROF. DR. VICTOR HUGO AQUINO QUINTANA



5. PROF. DR. MAURÍCIO LACERDA NOGUEIRA



Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 22 de agosto de 2014

"Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha, porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra. Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha, e não nos deixa só, porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso."

(Charlie Chaplin)

Dedico este trabalho às pessoas que não estão por acaso em minha vida, e que dão um sentido especial a ela...

*Ao meu marido Gilberto por ser meu grande incentivador, companheiro e amigo.
Palavras são insuficientes para expressar a importância que você tem na minha vida...*

*Aos meus pais Fernando e Lúcia por serem exemplos de vida,
por abrirem mão dos próprios sonhos para que os meus se tornassem realidade
e por serem os grandes idealizadores e maiores responsáveis por tudo o que sou.
Sei o quanto esta “NOSSA” conquista custou e significa pra vocês...*

*Às minhas queridas irmãs Mariana e Rafaela
pelas lembranças da infância e momentos inesquecíveis compartilhados ao longo da vida...*

*Aos meus amados sobrinhos João Pedro e Maria Eduarda
por me proporcionarem a oportunidade de sentir e viver a mais pura forma de amor,
por não apenas ocuparem um lugar especial no meu coração, mas serem uma grande parte
dele e por me fazerem resgatar a criança existente dentro de mim...*

*Agradeço a Deus, diariamente, por colocar vocês no meu caminho e por serem meus
maiores tesouros... Amarei vocês, eternamente!*

*“A falta de amor é a maior de todas as pobrezaas”
(Madre Teresa de Calcutá)*

*“... Devia ter complicado menos, trabalhado menos, ter visto o sol se pôr...
Devia ter se importado menos com problemas pequenos
ter morrido de amor...”
(Sérgio Britto)*

*Ao querido tio Luiz Gonzaga Cavaroli Ribeiro,
sinônimo de amor, dedicação, doação e
merecedor de todas as homenagens...*

Saudades eternas...

Aos longos destes últimos anos muitas pessoas tiveram especial importância em minha vida. Muitas delas estiveram diretamente relacionadas ao desenvolvimento deste projeto. Outras sempre estiveram a postos nos bastidores, me incentivando e acreditando na minha capacidade profissional, combustíveis que me guiaram à conclusão de mais esta etapa.

Agradeço, em especial, a Prof^a Dr^a Sandra Cecília Botelho Costa pelos nove anos de convivência, parceria, aprendizado e confiança. Grande parte da profissional que sou devo a você. Serei eternamente grata por tudo.

À querida amiga e colega Dr^a Sandra Helena Alves Bonon. Muito obrigada por se fazer tão presente ao longo desses anos, compartilhando desde problemas a momentos felizes e inesquecíveis... Você sempre terá um lugar especial em meu coração.

À querida amiga Dr^a Cláudia Raquel Cantarelli Costa pela amizade e confiança.

À querida amiga Ms. Paula Durante Andrade. Agradeço pelo convívio, ensinamentos, amizade e companheirismo.

À querida amiga Ms. Tycha Bianca Sabaini Pavan por toda a ajuda e, principalmente, por tudo o que a nossa amizade significa.

À Josiele Cristina Franco pela amizade e competência ao longo deste estudo.

Aos amigos do “Laboratório de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular” pelo convívio, amizade e trocas de experiências.

À equipe da Unidade de Transplante de Medula Óssea/UNICAMP pela confiança e colaboração.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP por financiar este estudo, transformando um sonho em realidade.

Ao meu marido Gilberto, meus pais Fernando e Lúcia, e demais familiares que sempre estiveram ao meu lado. Amo vocês...

A todos que direta, ou indiretamente, tiveram participação na realização deste trabalho. Meu muito obrigada...

*Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes,
mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo e
que posso evitar que ela vá à falência;
Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver apesar de todos os desafios,
incompreensões e períodos de crise;
Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas
e se tornar um autor da própria história;
É atravessar desertos fora de si, e ser capaz de encontrar um oásis no
recôndito da sua alma;
É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida;
Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos;
É saber falar de si mesmo e ter coragem para ouvir um “Não”;
É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta. . .*

*Pedras no caminho?
Guardo todas, um dia vou construir um castelo. . .*

(Fernando Pessoa)

Introdução: Considerando-se que o transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) está associado à significativa morbidade e mortalidade devido à toxicidade do regime de condicionamento, sepse, doença do enxerto-contra-hospedeiro (DECH), entre outras complicações, sua indicação requer uma avaliação cuidadosa de risco. As infecções estão associadas a elevados índices de óbitos no pós-transplante, e seu aparecimento pode estar associado a fatores como o regime de condicionamento, imunodepressão para a prevenção da DECH, a própria DECH e a terapia adicional para a doença de base. Dentre as infecções virais, o citomegalovírus humano (HCMV) é o patógeno mais importante no pós-TCTH pela morbidade e mortalidade associadas a ele. Por este motivo os pacientes submetidos ao TCTH são monitorados por testes laboratoriais sensíveis e específicos para o diagnóstico precoce da infecção ativa causada pelo HCMV, permitindo assim, a administração imediata da terapia antiviral. A antigenemia tem sido indicada como “padrão ouro” para guiar o tratamento precoce desta infecção. Embora a PCR em tempo real seja outra técnica muito utilizada para este fim, esta pode ser demasiadamente sensível para uso clínico, podendo haver diagnósticos positivos em pacientes que não apresentam risco de desenvolvimento da doença causada pelo HCMV. **Objetivos:** Determinar um valor de *cutoff* para diferenciar infecção latente de infecção ativa, além do risco do desenvolvimento da doença causada pelo HCMV. **Métodos:** Neste trabalho, 49 pacientes submetidos ao TCTH do tipo alogênico foram monitorados desde o dia do transplante até o dia +150 pelas técnicas de antigenemia e pela PCR em tempo real. **Resultados:** Após a construção da curva ROC o *cutoff* encontrado para indicar a infecção ativa causada pelo HCMV foi 116 cópias. Baseado nesta determinação, os resultados positivos da PCR em tempo real (≥ 116 cópias) foram comparados com resultados positivos da antigenemia (≥ 3 células *pp65* positivas), observando associação estatisticamente significativa entre eles. Sendo assim, a PCR em tempo real com 116 cópias como *cutoff* foi adotada como o único critério para definir a infecção ativa causada pelo HCMV nos pacientes incluídos no estudo. Vinte (40,8%) dos 49 pacientes tiveram infecção ativa causada pelo HCMV durante o monitoramento,

ocorrendo com maior frequência entre os dias +41 e +50 pós-TCTH. Dezoito (90%) desses 20 pacientes foram tratados com ganciclovir e 16 deles atingiram a negatificação da PCR em tempo real numa mediana de 6 dias após o início do tratamento. Quatro (8,2%) pacientes tiveram doença causada pelo HCMV comprovada por biópsia do trato gastrointestinal, 1 deles sem diagnóstico da viremia. Dois (50%) dos 4 pacientes que tiveram doença causada pelo HCMV não responderam bem ao tratamento antiviral, evoluindo para o óbito por esta causa numa mediana de 6,5 dias após o início do tratamento com ganciclovir. Outros 15 pacientes morreram por infecções fúngicas e bacterianas, DECH, recidiva da doença de base ou doença veno-oclusiva hepática. Conclusões: Pacientes submetidos ao TCTH não aparentado apresentam maior risco de infecção ativa causada pelo HCMV, o aumento repentino da carga viral parece ter relação com o aparecimento da doença causada pelo HCMV, a gravidade desta doença pode estar associada com o tempo de resposta ao tratamento antiviral e a manifestação de doença causada pelo HCMV e provável doença causada pelo HCMV aumentam o risco de óbito no pós-TCTH.

Introduction: Considering that allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is associated with significant morbidity and mortality due to toxicity of the conditioning regimen, sepsis onset, graft versus host disease (GVHD) manifestation, among other complications, its indication requires careful risk assessment. Infections are associated with high rates of deaths after transplantation, and their appearance can be associated with factors such as conditioning regimen, immunosuppression to prevent GVHD, GVHD itself and additional therapy for the underlying disease after transplantation. Among the viral infections, human cytomegalovirus (HCMV) is the most significant pathogen after HSCT, considering morbidity and mortality associated with it. For this reason, patients submitted to HSCT are monitored by sensitive and specific laboratory tests for early diagnosis of HCMV reactivation, thus allowing immediate administration of antiviral therapy. The antigenemia method has been indicated as the gold standard for guiding the early treatment of this infection. Although real-time PCR is another technique widely used for this purpose, this may be too sensitive for clinical use, there may be positive diagnoses in patients without risk of developing HCMV disease. **Objectives:** Determining a cutoff value to distinguish latent infection from active infection and the risk of developing HCMV disease. **Methods:** In this study, 49 patients undergoing allogeneic HSCT were monitored from the day of transplantation until day +150 by antigenemia and real-time PCR. **Results:** After constructing the ROC curve, the cutoff found for HCMV infection was 116 copies. Based on this determination, the positive results of real-time PCR (≥ 116 copies) were compared with results of positive antigenemia (pp65 positive cells ≥ 3), observing statistically significant association between them. Thus, the real-time PCR with 116 copies as cutoff was adopted as the sole criterion to define the active infection in the patients included in the study. Twenty (40.8%) of the 49 patients had HCMV reactivation during monitoring, occurring most frequently between days +41 and +50 after HSCT. Eighteen (90%) of these 20 patients were treated with ganciclovir and 16 have reached their negative real-time PCR in a median of six days after the beginning of treatment. Four (8.2%) patients had positive

gastrointestinal tract biopsy for HCMV disease, one of them with no diagnosis of viremia. Two (50%) of four patients who had HCMV disease have not responded well to antiviral therapy, progressing to death by HCMV disease at a median of 6.5 days after starting treatment with ganciclovir. Another 15 patients died from fungal bacterial infection, GVHD, underlying disease relapse or veno-occlusive hepatic disease. Conclusions: Patients undergoing unrelated HSCT had higher risk of HCMV reactivation; the sudden increase in viral load seems to be related to the onset of HCMV disease; the severity of HCMV disease may be associated with the response time to antiviral therapy; and HCMV disease manifestation and probable HCMV disease increase the risk of death after HSCT.

Lista de Abreviaturas

- AAS – Anemia aplástica severa
ADV – Adenovírus
AF – Anemia falciforme
AGM – Antigenemia
ATG – Globulina antitimócito
Bx – Biópsia
CAAE – Certificado de apresentação para apreciação ética
CDV – Cidofovir (Vistide®, Gilead)
CEP – Comitê de ética em pesquisa
CPP - Células progenitoras periféricas
Ct - *Cycle Threshold* (ciclo de amplificação)
CTH – Células-tronco hematopoéticas
CV – Coeficiente de variação
D – Doador das células-tronco hematopoéticas
D+ – Dia pós-transplante de células-tronco hematopoéticas
DECH – Doença do enxerto-contrá-hospedeiro
DH – Doença de Hodgkin
DNA – *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)
E – *Early* (precoce)
E – Eficiência
EBV – Epstein-Barr vírus (ou Herpesvírus humano tipo 4)
ECL - Efeito enxerto-contrá-leucemia
EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic* (ácido etilenodiaminotetracético)
EUA – Estados Unidos da América
FAL – Fosfatase alcalina
Fc – Porção constante das imunoglobulinas
FOS – Foscarnet (Foscavir®, Astra-Zeneca)

gB – Glicoproteínas B
GCV – Ganciclovir (Cymevene®, Roche)
GGT – Gama glutamil transpeptidase
gH – Glicoproteínas H
gM – Glicoproteínas M
gN – Glicoproteínas N
HCMV – Citomegalovírus humano (ou Herpesvírus humano tipo 5)
HHV-1 - Herpesvírus humano tipo 1
HHV-5 - Herpesvírus humano tipo 5
HHV-6 - Herpesvírus humano tipo 6
HHV-7 – Herpesvírus humano tipo 7
HHV-8 – Herpesvírus humano tipo 8
HIV – *Human immunodeficiency virus* (vírus da imunodeficiência humana)
HLA – *Human leukocyte antigen* (antígeno leucocitário humano)
HSV – Herpesvírus simplex (ou Herpesvírus humano tipo 1)
IE – *Immediate-early* (imediatamente precoce)
IgG – Imunoglobulina da classe G
IgM – Imunoglobulina da classe M
ILD – Infusão de linfócitos do doador
IVIG – Imunoglobulina intravenosa
kg - Kilograma
L – *Late* (tardio)
LBA – Lavado broncoalveolar
LDH – Lactato desidrogenase
LLA – Leucemia linfoide aguda
LLC – Leucemia linfoide crônica
LMA – Leucemia mieloide aguda
LMC – Leucemia mieloide crônica
LNH – Linfoma não-Hodgkin
Log – Logaritmo
M – Concentração molar

M – *Slope* ou inclinação da reta
mg – Miligrama
MHC – *Major histocompatibility complex* (complexo principal de histocompatibilidade)
MiHA – antígenos de histocompatibilidade *minor*
mL – Microlitro
MM – Mieloma múltiplo
mm³ – Milímetro cúbico
MMF – Micofenolato mofetil
MO – Medula óssea
NF-κB – *Factor nuclear kappa B* (fator nuclear kappa B)
ng – Nanograma
NK – Células *natural killer*
nM – Nanomolar
pb – Pares de base
PBS – *Phosphate buffered saline* (tampão fosfato-salino)
PCR – *Polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)
PMN – *Polymorphonuclear leukocytes* (leucócitos polimorfonucleares)
pp65 – *65-kD phosphoprotein* (fosfoproteína de 65 kD)
qsp – Quantidade suficiente para
r – Coeficiente de correlação
R – Receptor do transplante de células-tronco hematopoéticas
r² – Coeficiente de determinação
RNA – *Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)
RNAm – RNA mensageiro
ROC – *Receiver operating characteristic*
rpm – Rotações por minuto
RT-PCR – reação da transcriptase reversa, seguida por PCR
RX – Raio X
SD – *Standard deviation* (desvio padrão)
SIDA – Síndrome da imunodeficiência adquirida
SMD – Síndrome mielodisplásica

SNC – Sistema nervoso central
TC – Tomografia computadorizada
TCTH – Transplante de células-tronco hematopoéticas
TGI – Trato gastrointestinal
TGO – Transaminase glutâmica oxalacética
TGP – Transaminase glutâmica pirúvica
TGU – Trato geniturinário
TNF – *Tumor necrosis factor* (fator de necrose tumoral)
UFC – Unidades formadoras de colônias
UI – Unidades internacionais
UL – *Unique long* (sequência única longa do genoma do HCMV)
US – *Unique short* (sequência única curta do genoma do HCMV)
VGCV – Valganciclovir (Valcyte®, Roche)
VZV – Varicela-zoster vírus
°C – Grau *Celsius*
μL – Microlitro
μM – Micromolar

Lista de Tabelas

Página

Tabela 1. Condições que causam imunodeficiência no TCTH	50
Tabela 2. Identificação das sequências dos <i>primers</i> e sonda utilizados na PCR em tempo real	91
Tabela 3. Valores dos Cts de amplificação de uma amostra HCMV-positiva nas diferentes matrizes de concentração	106
Tabela 4. Análise de repetibilidade e precisão intermediária da PCR em tempo real realizada em 5 amostras HCMV-positivas	110
Tabela 5. Características dos pacientes incluídos no estudo	113
Tabela 6. Relação entre os resultados de antigenemia e PCR em tempo real no diagnóstico da infecção ativa do HCMV em amostras obtidas ao longo do monitoramento.....	118
Tabela 7. Relação entre os resultados de antigenemia e PCR em tempo real no diagnóstico da infecção ativa do HCMV em amostras não expostas ao GCV durante o monitoramento.....	118
Tabela 8. Relação entre a carga viral do HCMV em amostras positivas e as alterações clínicas apresentadas pelos pacientes	119
Tabela 9. Relação entre os fatores considerados de risco e a infecção ativa causada pelo HCMV no pós-TCTH.....	121
Tabela 10. Relação entre os fatores de risco e o aparecimento da doença causada pelo HCMV	122
Tabela 11. Relação entre a cinética da carga viral do HCMV, a manifestação da HCMV-doença e a evolução clínica dos pacientes.....	125
Tabela 12. Casos confirmados de doença causada pelo HCMV e complicações clínicas apresentadas pelos pacientes	128
Tabela 13. Casos de “provável doença causada pelo HCMV” e complicações clínicas apresentadas pelos pacientes	133

Tabela 14. Causas de óbito.....	138
Tabela 15. Relação entre o HCMV e óbito no pós-TCTH.....	139

Lista de Figuras

	<i>Página</i>
Figura 1. Fases do TCTH e infecções oportunistas associadas	55
Figura 2. Genoma do HCMV	57
Figura 3. Estrutura do HCMV	58
Figura 4. Mecanismo de replicação do HCMV nas células do hospedeiro	61
Figura 5. Efeito citopático característico do HCMV	63
Figura 6. Tomografia computadorizada demonstrando a HCMV-pneumonia no pós-TCTH.....	69
Figura 7. Características histopatológicas da HCMV-pneumonia	70
Figura 8. Achados endoscópicos da doença causada pelo HCMV no trato gastrointestinal.....	71
Figura 9. Antigenemia <i>pp65</i> -positiva.....	78
Figura 10. Gráfico de amplificação da curva padrão absoluta para a quantificação do HCMV pela PCR em tempo real	80
Figura 11. Estruturas químicas dos medicamentos utilizados para o tratamento do HCMV	83
Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 2%	94
Figura 16. Esquema utilizado para a seleção dos pacientes incluídos no estudo	112

Lista de Gráficos

Página

Gráfico 1. Gráfico de amplificação do Controle Exógeno Positivo (IPC) presente em todas as amostras analisadas.....	93
Gráfico 2. Gráfico de amplificação de uma amostra HCMV-positiva com diferentes concentrações dos <i>primers</i>	105
Gráfico 3. Gráfico de amplificação de uma amostra HCMV-positiva com diferentes concentrações da sonda TaqMan ®.....	106
Gráfico 4. Gráfico de amplificação das 7 amostras da curva padrão absoluta pela PCR em tempo real	107
Gráfico 5. Curva padrão absoluta da PCR em tempo real para a quantificação do HCMV.....	108
Gráfico 6. Curva ROC de sensibilidade <i>versus</i> (1-especificidade) com eixo X regressivo para determinar o <i>cutoff</i> da carga viral indicativa da infecção ativa causada pelo HCMV com necessidade de tratamento antiviral	116
Gráfico 7. Frequência de ocorrência do primeiro diagnóstico da infecção ativa causada pelo HCMV realizado pela PCR em tempo real ao longo dos 5 primeiros meses pós-TCTH.....	120
Gráfico 8. Curva ROC de sensibilidade <i>versus</i> (1-especificidade) com eixo X regressivo para determinar o <i>cutoff</i> da carga viral sugestivo para a doença causada pelo HCMV	123
Gráfico 9. Correlação entre as altas cargas virais do HCMV e o diagnóstico da HCMV-doença.....	124
Gráfico 10. Cinética da carga viral do HCMV ao longo do monitoramento do paciente 13	130
Gráfico 11. Cinética da carga viral do HCMV ao longo do monitoramento do paciente 28	131
Gráfico 12. Cinética da carga viral do HCMV ao longo do monitoramento do paciente 32	132
Gráfico 13. Cinética da carga viral do HCMV ao longo do monitoramento do paciente 16	134
Gráfico 14. Cinética da carga viral do HCMV ao longo do monitoramento do paciente 43.	135
Gráfico 15. Cinética da carga viral do HCMV ao longo do monitoramento do paciente 19	136

Gráfico 16. Cinética da carga viral do HCMV ao longo do monitoramento do paciente 34137

1. INTRODUÇÃO	35
2. OBJETIVOS.....	41
2.1 OBJETIVOS GERAIS	43
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
3. REVISÃO DA LITERATURA	45
3.1 INTRODUÇÃO AO TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS	47
3.2. FATORES DE RISCO PARA O APARECIMENTO DE INFECÇÕES NO PÓS- TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS	50
3.3 O TEMPO PÓS-TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS E O APARECIMENTO DE INFECÇÕES	54
3.4. O CITOMEGALOVÍRUS HUMANO	56
3.4.1 CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DO HCMV	56
3.4.1.1 <i>A estrutura viral</i>	56
3.4.1.2 <i>A replicação viral</i>	58
3.4.1.3 <i>Interação entre a replicação do HCMV e o sistema imunológico do hospedeiro</i>	61
3.4.1.4 <i>A infecção causada pelo HCMV</i>	63
3.4.1.5 <i>Epidemiologia e manifestação da infecção causada pelo HCMV</i>	64
3.4.2 O CITOMEGALOVÍRUS HUMANO NO PÓS-TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS	66
3.4.2.1 <i>Manifestações clínicas comumente associadas ao HCMV no pós-transplante alôgênico de células-tronco hematopoéticas</i>	67
3.4.2.1.1 <i>Pneumonia causada pelo HCMV</i>	68
3.4.2.1.2 <i>Doença gastrointestinal causada pelo HCMV</i>	70
3.4.2.1.3 <i>Doença do enxerto-contra-hospedeiro (DECH)</i>	72

3.4.2.2 Fatores de risco para a infecção ativa e doença causada pelo HCMV no pós-transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas	72
3.4.2.3 Prevenção da doença causada pelo HCMV	74
3.4.2.4 Monitoramento da viremia causada pelo HCMV para guiar o início da terapia preemptiva	76
3.4.2.4.1 Antigenemia	77
3.4.2.4.2 PCR em tempo real.....	79
3.4.3 AGENTES ANTIVIRAIS.....	81
4. METODOLOGIA.....	85
4.1 DESENHO DO ESTUDO.....	87
4.2 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	87
4.3 SELEÇÃO DO PACIENTES INCLUÍDOS NO ESTUDO.....	87
4.3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	87
4.3.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	88
4.4 COLETA DAS AMOSTRAS.....	88
4.5 ANTIGENEMIA	88
4.6 EXTRAÇÃO DO DNA DE LEUCÓCITOS TOTAIS	90
4.6.1 OBTENÇÃO DOS LEUCÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO	90
4.6.2 EXTRAÇÃO DO DNA PELO KIT QIAAMP DNA BLOOD MINI® (QIAGEN)	90
4.7 PROCEDIMENTOS PARA A REALIZAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL	91
4.7.1 DESENHO DOS <i>PRIMERS</i> E SONDA	91
4.7.2 OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS <i>PRIMERS</i>	91
4.7.3 OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO DNA.....	92
4.7.4 PCR EM TEMPO REAL UTILIZANDO CONTROLE INTERNO EXÓGENO POSITIVO (TAQMAN® EXOGENOUS INTERNAL POSITIVE CONTROL REAGENTS - IPC) E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO IDEAL DA SONDA TAQMAN®	92
4.7.5 CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO ABSOLUTA A PARTIR DE CLONAGEM MOLECULAR	93
4.7.5.1 <i>Nested-PCR</i> para obtenção do inserto a ser ligado ao vetor.....	93
4.7.5.2 <i>Ligação do inserto ao vetor e transformação</i>	94
4.7.5.3 <i>Incubação, multiplicação das células competentes e isolamento das colônias recombinantes</i>	95

4.7.5.4 Amplificação do DNA recombinante	95
4.7.5.5 Sequenciamento automatizado	96
4.7.5.6 Extração do DNA do fragmento clonado e linearização do vetor recombinante	96
4.7.5.7 Construção da curva padrão absoluta	97
4.7.6 VALIDAÇÃO DO PROTOCOLO DA PCR EM TEMPO REAL	98
4.7.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	99
4.7.8 ANÁLISE DA TAXA DE REPLICAÇÃO DO HCMV	100
4.7.9 ANÁLISE DA RESPOSTA AO TRATAMENTO ANTIVIRAL	100
4.7.10 CRITÉRIOS UTILIZADOS PARA DEFINIR A DOENÇA CAUSADA PELO HCMV	101
5. RESULTADOS	103
5.1 DESENVOLVIMENTO DA PCR EM TEMPO REAL	105
5.2 CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO ABSOLUTA	107
5.3 VALIDAÇÃO DO PROTOCOLO DA PCR EM TEMPO REAL PARA O HCMV	108
5.4 SELEÇÃO DO PACIENTES E COLETA DAS AMOSTRAS	112
5.5 ANTIGENEMIA	116
5.6 DETERMINAÇÃO DO <i>CUTOFF</i> DA CARGA VIRAL DO HCMV INDICATIVA PARA A INFECÇÃO CAUSADA PELO HCMV COM NECESSIDADE DE TRATAMENTO ANTIVIRAL	116
5.7 COMPARAÇÃO ENTRE O DESEMPENHO DA ANTIGENEMIA E DA PCR EM TEMPO REAL NO DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO ATIVA CAUSADA PELO HCMV	117
5.8 INFECÇÃO ATIVA CAUSADA PELO HCMV	118
5.9 CONFIRMAÇÃO DA DOENÇA CAUSADA PELO HCMV	122
5.10 DETERMINAÇÃO DO <i>CUTOFF</i> DA CARGA VIRAL DO HCMV SUGESTIVA PARA A DOENÇA CAUSADA PELO HCMV	123
5.11 COMPARAÇÃO ENTRE AS CARGAS DO HCMV, CONFIRMAÇÃO DA DOENÇA CAUSADA PELO HCMV E RESPOSTA AO TRATAMENTO ANTIVIRAL	124
5.12 QUANTIFICAÇÃO E CINÉTICA DA CARGA VIRAL DURANTE A MANIFESTAÇÃO DA DOENÇA CAUSADA PELO HCMV	128
5.13 ANÁLISES ADICIONAIS	132
5.13.1 <i>Quantificação e cinética da carga viral durante a “Provável doença causada pelo HCMV”</i>	132

5.13.2 <i>Quantificação e cinética da carga viral durante o monitoramento dos pacientes com elevado risco de complicações associadas ao HCMV</i>	136
5.14 CAUSAS DE ÓBITO	138
6. DISCUSSÃO	141
7. CONCLUSÕES	153
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	157
ANEXOS	179
ANEXO 1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa FCM/ UNICAMP.....	181
ANEXO 2. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa FCM/ UNICAMP quanto à Dispensa da Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	185
ANEXO 3. Resultados obtidos ao longo do monitoramento	187

Introdução



1. *Introdução*

Devido ao intenso regime de imunossupressão ao qual os receptores de células-tronco hematopoéticas (CTH) são submetidos, as infecções são as maiores causadoras de morbidade e mortalidade nessa população. A perda de granulócitos circulantes durante um período de quebra das barreiras anatômicas, tanto da mucosa oral quanto gastrointestinal, coloca o paciente em risco para infecções precoces causadas por bactérias e fungos e, mesmo após a recuperação do número de neutrófilos, ainda existe prejuízo na imunidade celular e humoral, contribuindo, assim, para um risco aumentado de infecções virais (1).

O citomegalovírus humano (HCMV), isoladamente, é o patógeno mais importante no período precoce pós-transplante. Este vírus ocorre em praticamente todas as regiões do mundo (2), desde sociedades globalizadas até mesmo em sociedades isoladas (3). De modo geral, as taxas de soroprevalência variam de 60% a 80% nos países do hemisfério norte e de 80% a 100% na África e América Latina (4).

Por ser um vírus oportunista, o impacto desta infecção em receptores de transplante de células-tronco hematopoéticas (TCTH) varia desde a soroconversão assintomática até pneumonia intersticial, doença no trato gastrointestinal, hepatite, mielossupressão, retinite, nefrite, manifestação no sistema nervoso central (SNC) e alterações hematológicas, como leucopenia e trombocitopenia (5,6). Além disso, a infecção ativa causada pelo HCMV pode estar associada a manifestações graves como pancitopenia e hipoplasia da medula óssea, atraso da pega do enxerto, aparecimento da doença do enxerto-contrá-hospedeiro (DECH), infecções oportunistas, aceleração da perda do enxerto e óbito (7).

Devido ao grande impacto que o HCMV pode causar em pacientes submetidos ao TCTH é de suma importância o diagnóstico precoce desta infecção com o uso de técnicas laboratoriais, suficientemente sensíveis e específicas, capazes de guiar estratégias precoces, evitar o aparecimento da doença causada pelo HCMV (HCMV-doença) e diminuir o seu impacto nos pacientes imunodeprimidos (8,9).

O método da antigenemia é considerado um grande avanço no diagnóstico da infecção ativa causada pelo HCMV em transplantados de CTH e muitos estudos têm indicado a antigenemia como “padrão ouro” para guiar o tratamento precoce desta infecção (10). A presença do antígeno viral *pp65* (fosfoproteína de 65 kD) em leucócitos do sangue periférico proporciona um marcador precoce desta infecção e indica pré-disposição em desenvolver a doença causada pelo HCMV (11), onde altos níveis deste antígeno são frequentemente encontrados em pacientes com HCMV-doença e baixos níveis correlacionam-se com infecções assintomáticas (12). Entretanto, este método apresenta algumas desvantagens como a necessidade do processamento imediato das amostras, ser observador dependente, além de poder apresentar resultados falso-negativos em pacientes com grave neutropenia, situação clínica frequente durante o tratamento imunossupressor e na fase de aplasia medular após o TCTH (13).

Outra técnica muito utilizada para o monitoramento da infecção ativa pelo HCMV em pacientes imunodeprimidos é a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Este método facilita, significativamente, as tarefas de quantificação da carga viral e expressão gênica do HCMV em um determinado tecido ou amostra biológica (14). Esta quantificação permite a detecção precoce da infecção ativa causada pelo HCMV, o monitoramento rigoroso da resposta ao medicamento antiviral, a previsão do risco de viremia e recaída ao tratamento, além do surgimento de cepas resistentes e eventual HCMV-doença (15), guiando, com segurança, o tratamento antiviral (16). A PCR em tempo real é uma técnica altamente precisa e menos trabalhosa que outras técnicas baseadas na PCR, não necessitando de manuseio pós-reação, o que evita potenciais contaminações com produtos amplificados e a torna mais rápida e com melhor rendimento (17).

No entanto, a implantação da PCR em tempo real não é uma questão simples. Primeiramente é necessário escolher o protocolo mais adequado para este diagnóstico, já que a sensibilidade e especificidade da PCR em tempo real estão diretamente relacionadas à escolha da região alvo para amplificação e respectivos *primers* e sonda (18,19). Além disso, os métodos de extração do DNA e a origem do material biológico utilizado ainda não são bem definidos, o que resulta em diferentes desempenhos analíticos, tornando difícil a comparação entre os resultados encontrados nos diferentes estudos (19,20). Ainda, a PCR em tempo real pode ser demasiadamente sensível para uso clínico, podendo haver

diagnósticos positivos em pacientes que não apresentam risco de desenvolvimento da HCMV-doença. Sendo assim, é necessária a determinação de um valor de *cutoff* para diferenciar o risco de desenvolvimento da HCMV-doença com necessidade de tratamento antiviral de infecção assintomática ou com baixo risco de desenvolvimento desta doença (13). Entretanto, não há, por enquanto, consenso sobre o *cutoff* e o tipo de amostra biológica adequada para ser utilizada para este propósito em receptores de TCTH (18).

Sendo assim, o desenvolvimento e a validação de um protocolo de PCR em tempo real, bem como a determinação de um valor de *cutoff* para indicar a necessidade do tratamento antiviral se fazem necessários, refletindo em diagnósticos mais precoces e precisos, reduzindo o número de pacientes que desenvolvem a doença causada pelo HCMV e complicações associada à mesma, duração do tratamento antiviral e número de pacientes submetidos a tratamentos desnecessários ou tardios.



2.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo tem por objetivos analisar o histórico da carga viral do HCMV e complicações clínicas associadas a este vírus durante os primeiros 150 dias pós-TCTH do tipo alogênico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Desenvolver e validar um protocolo de PCR em tempo real para o diagnóstico da infecção e doença causada pelo HCMV;
- ✓ Monitorar a carga viral do HCMV durante os primeiros 150 dias pós-TCTH alogênico, correlacionando os resultados laboratoriais com as manifestações clínicas apresentadas neste período;
- ✓ Determinar um valor de *cutoff* da carga viral do HCMV para indicar a necessidade do tratamento antiviral em receptores de CTH do tipo alogênico;
- ✓ Determinar um valor de *cutoff* da carga viral do HCMV sugestivo para a doença causada pelo HCMV em receptores de CTH do tipo alogênico;
- ✓ Verificar o grau de correlação estatística entre a infecção e doença causada pelo HCMV com os fatores considerados de risco para estes eventos como: *status* sorológico para o HCMV no pré-transplante, intensidade do regime de condicionamento, fonte de CTH infundidas, tipo de TCTH e DECH.

Revisão da Literatura



3. *Revisão da Literatura*

3.1 INTRODUÇÃO AO TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS

O uso da medula óssea (MO) e das células progenitoras periféricas (CPP) no tratamento de doenças humanas tem uma longa e fascinante história, tendo início com uma série de importantes estudos animais no início da década de 1920 (21). Esses estudos, combinados com os avanços na compreensão dos antígenos de histocompatibilidade e com o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos e terapias radioativas permitiram o uso do transplante de MO e de CPP como último recurso para tratamento de doenças até então consideradas incuráveis (22).

Sessenta anos se passaram desde os primeiros experimentos animais que conduziram à aplicação disseminada do TCTH em seres humanos. As soluções para os problemas apresentados pelos receptores dos transplantes surgiram a partir de pesquisas em camundongos, cães e primatas. No início, esses transplantes celulares eram feitos somente em pacientes terminais. Atualmente, o TCTH é realizado na fase precoce de muitas doenças, e devido ao desenvolvimento de drogas efetivas para o tratamento de quadros infecciosos e à ênfase no cuidado ambulatorial, além da redução drástica do custo do transplante, resultados muito superiores aos iniciais foram atingidos. Com o intuito de elevar o sucesso do TCTH e aumentar seu uso durante os anos iniciais do terceiro milênio, investigações científicas, nas mais diversas áreas do TCTH, continuam sendo realizadas, como obtenção da enxertia sem o uso de regimes preparativos letais para a MO e a aplicação do TCTH no tratamento de doenças autoimunes (22).

O TCTH pode ser definido como a transferência de CTH, que contem elevado número de precursores e células maduras que irão substituir os compartimentos hematopoético e imunológico do receptor (23), de um indivíduo para outro (TCTH alogênico) ou o retorno das células previamente coletadas e tratadas para o mesmo indivíduo (TCTH autólogo) (24).

O regime de condicionamento realizado antes do transplante é capaz de eliminar a maioria das células precursoras e maduras do sistema imune do receptor. Durante o TCTH alogênico, as células provenientes do doador e do receptor convivem no mesmo ambiente, na MO e em outros tecidos. Normalmente ocorrem agressões recíprocas entre as células, de intensidade controlada, permitindo a instalação lenta e progressiva de uma quimera completa de células do doador (23).

Entretanto, algumas células persistem após o regime de condicionamento, provocando um desequilíbrio imunológico que pode mediar reações importantes. Em um extremo, o sistema imunológico do receptor, se exageradamente estimulado ou pouco suprimido, reage contra as CTH do doador, desencadeando a rejeição do enxerto. A manifestação clínica desta rejeição pode ocorrer de duas formas distintas, sendo através da recuperação da medula autóloga ou da pancitopenia, que, em casos mais profundos, pode atingir a aplasia da MO. Embora esta rejeição esteja associada na maioria das vezes a mecanismos imunológicos, pode ser causada por infecções virais, principalmente pelo HCMV, herpesvírus humano tipo 6 (HHV-6) e parvovírus, e, mais raramente, por sepse e medicamentos mielotóxicos (23).

No outro extremo, as células alorreativas do doador reagindo contra as células do receptor podem gerar a DECH (23). A DECH está associada a uma importante desregulação do sistema imunológico e é a causa mais importante de morte não relacionada à recidiva da doença de base, frequentemente acompanhada pela reativação do HCMV (25). A patogenia da DECH é bastante complexa e não é totalmente compreendida, implicando desde danos teciduais causados pelo regime de condicionamento, citocinas e efetores celulares envolvidos na resposta imune, como os linfócitos T do doador, células apresentadoras de antígeno e mecanismos de apoptose (26).

Cronologicamente a DECH pode ser classificada como aguda ou crônica, de acordo com o tempo pós-TCTH em que a manifestação ocorre (25). A DECH aguda causa grande morbidade e mortalidade no campo dos transplantes alogênicos de CTH (27), ocorrendo de forma progressiva e sistêmica, e caracterizada pela imunossupressão, resposta imunológica citotóxica e inflamatória, o que pode causar dano tecidual à pele, intestino e fígado (23). Clinicamente, a DECH crônica é bastante distinta da DECH aguda (28). Durante a manifestação da DECH crônica diversos defeitos imunológicos ocorrem,

envolvendo desde a imunidade humoral e celular, função hiperesplênica, atraso na reconstituição imune e pobre resposta à imunização (25). Frequentemente ocorre o envolvimento da pele, boca, fígado e olhos e, mais raramente do trato intestinal, pulmões, esôfago, trato genital feminino e articulações, sendo, por este motivo, considerada uma síndrome multiorgânica (29).

Os critérios utilizados para os diagnósticos clínico e histológico, bem como para a classificação e estadiamento da DECH sofreram modificações, contidas no consenso do *National Institutes of Health (NIH)* de 2005 e 2006, o que minimizou bastante as dificuldades previamente encontradas (28).

Na fase precoce e demais fases pós-TCTH alogênico, além da prevenção da rejeição do enxerto e do aparecimento da DECH são necessários outros cuidados para se atingir o sucesso do transplante. Deve-se dar atenção especial a problemas como a toxicidade aguda em múltiplos órgãos, eliminação das células patogênicas residuais do receptor que resistiram ao condicionamento, reconstituição imunológica adequada para o reconhecimento e controle de agentes infecciosos e prevenção de infecções primárias e de reativações de infecções latentes (23,30).

A toxicidade aguda em múltiplos órgãos está diretamente associada ao regime de condicionamento empregado no pré-TCTH, o qual visa vencer a resistência que as células tumorais têm aos tratamentos convencionais, reduzir as células neoplásicas e imunodeprimir o receptor do transplante alogênico. Embora este condicionamento seja utilizado para evitar a rejeição, favorecendo a enxertia das células do doador, o mesmo pode causar toxicidade em diversos órgãos como coração, bexiga, rins, pulmões, fígado, SNC, trato gastrointestinal, pele e mucosas. Assim sendo, o sucesso do TCTH como terapia curativa encontra-se em um equilíbrio, em que a dose da quimio/radioterapia não deve ser tóxica demais, mas também não pode ser menor que o necessário, arriscando a recidiva tumoral (31).

Por fim, as infecções causam grande preocupação em receptores de TCTH, sendo responsáveis por aproximadamente 20% das mortes no pós-transplante (25). Ocorrem como resultado direto de um balanço negativo na interação do agente etiológico envolvido – seus mecanismos de virulência e capacidade de causar doença – e a defesa do paciente. Os fatores de risco para o desenvolvimento de infecção são múltiplos, podendo

ser endógenos e exógenos. A utilização de doadores alternativos, novos imunossupressores e outras medidas relacionadas ao procedimento influenciam diretamente no tipo e na intensidade da imunossupressão, modificando, assim, o risco do desenvolvimento de uma infecção (1,32).

3.2. FATORES DE RISCO PARA O APARECIMENTO DE INFECÇÕES NO PÓS-TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS

As infecções, dentre outras causas, são as principais complicações do TCTH, e a principal causa de óbito. Elas ocorrem como resultado da profunda depressão na imunidade, causada por múltiplos fatores como doença de base, tratamentos anteriores ao TCTH, regime de condicionamento, esquemas de imunossupressão para a prevenção da DECH, a própria DECH e a terapia adicional para a doença de base após o transplante. Esses fatores podem comprometer todos os elementos da defesa do organismo como a pele, mucosas, imunidade celular específica (linfócitos B e T) e inespecífica (fagócitos) e os componentes da imunidade humoral, representados pelas imunoglobulinas e complemento (Tabela 1) (5).

Tabela 1. Condições que causam imunodeficiência no TCTH

TIPO DE IMUNODEFICIÊNCIA	
DOENÇA DE BASE	
Anemia Aplástica	Neutropenia
Doença de Hodgkin	Defeito na imunidade T
Leucemias agudas	Neutropenia
Leucemia linfóide crônica	Déficit de imunoglobulinas
Linfomas não-Hodgkin	Defeito na imunidade T
Mieloma múltiplo	Déficit de imunoglobulinas
TRATAMENTOS ANTERIORES	
Corticoides	Defeito na imunidade T
Poliquimioterapia	Defeito na imunidade T
Alentuzumabe	Defeito na imunidade T, B e NK

Rituximab	Defeito na imunidade T e B
REGIME DE CONDICIONAMENTO	Defeito na imunidade T, neutropenia e mucosite
PROFILAXIA E TRATAMENTO DA DECH	Defeito na imunidade T
DECH	Defeito na imunidade T, neutropenia, quebra na barreira mucosa, déficit de imunoglobulinas
TRATAMENTO ADICIONAL PARA A DOENÇA DE BASE	Neutropenia, quebra na barreira mucosa, defeito na imunidade T, déficit de imunoglobulinas

A imunodepressão intensa predispõe os pacientes transplantados a graves complicações infecciosas, podendo ocorrer em qualquer tipo de TCTH. Devido a importantes diferenças entre os transplantes alogênico e autólogo em termos de imunodepressão, diferentes complicações podem ser vistas no pós-transplante. Sendo assim, no transplante alogênico as células progenitoras infundidas de um doador são imunologicamente competentes, ao passo que as células do paciente infundidas no transplante autólogo carregam a imunodepressão da doença de base. Além disso, a transferência passiva de anticorpos é mais adequada no transplante alogênico. Já a pega do enxerto costuma ser mais rápida no transplante autólogo, especialmente se a fonte de células-tronco for do sangue periférico, o que reduz a duração da neutropenia (33).

O aparecimento de infecções também pode estar ligado a outros fatores relacionados aos receptores de CTH (34) como características individuais (ex: doença de base, infecções prévias, sorostatus para o HCMV e características genéticas individuais), tempo de transplante e tipo de transplante (baseado no regime de condicionamento, fonte das CTH, grau de compatibilidade do antígeno leucocitário humano [HLA] e imunossupressão) (25).

Considerando-se a fonte das CTH, o TCTH pode ser realizado com material obtido a partir de aspiração direta da MO ou coleta das CPP através da leucoferese. A fonte das CTH pode estar relacionada a quadros infecciosos no pós-TCTH, já que o tempo de neutropenia está diretamente associado à incidência de reativação de infecção latente. Embora os pacientes que receberam infusão de CPP geralmente apresentem menor tempo

de neutropenia quando comparados com os que receberam MO, seu risco de DECH crônica é mais elevado, refletindo na necessidade do uso de medicamentos com maior efeito imunossupressor (25).

A doação de CTH quer seja através de aspiração direta da MO, ou da coleta do sangue periférico através da leucoaférese, envolve mínimos riscos à saúde do doador. Entretanto, o doador deve passar por uma avaliação rigorosa para determinação de eventuais situações patológicas que possam colocar sua saúde em risco e, acima de tudo, assegurar a ausência de doenças que possam ser transmitidas ao receptor (35). Deste modo, infecções progressas, persistentes ou em estado de latência com risco de reativação, característico dos herpesvírus, devem ser investigadas no período pré-transplante através da detecção laboratorial e pela história clínica do paciente e de seu doador. A avaliação do estado imunológico do receptor e do doador ajuda a definir o risco da reativação destas infecções no pós-transplante, assim como o risco de infecção primária e a necessidade de estratégias preventivas (32).

O regime de condicionamento pré-TCTH é considerado outro fator de risco para o aparecimento de infecções (36). Genericamente, pode ser classificado em mieloablativo e de intensidade reduzida, baseado nas doses dos fármacos quimioterápicos utilizados antes da infusão das CTH e consequente efeito imunossupressor. Por este motivo, o regime mieloablativo associado ou não a radioterapia, além de causar destruição das células neoplásicas malignas e imunodepressão do paciente (31,36), está associado à hospitalização prolongada e índices de mortalidade entre 10 e 30% (36). Estas constatações despertaram o interesse por regimes de condicionamento menos mieloablativos, conhecidos como não-mieloablativo, de intensidade reduzida ou mini transplante, que deprimem, sem suprimir definitivamente a MO do paciente (36). Deste modo, pacientes submetidos ao tratamento mieloablativo apresentam índices mais elevados de mucosite grave e quadros de neutropenia prolongada após o TCTH, resultando em maior risco de infecções (25) quando comparados aos pacientes expostos a condicionamentos com menor toxicidade e mielossupressão (24).

A manifestação da DECH, sua gravidade e estadiamento estão diretamente relacionadas ao aparecimento de complicações infecciosas. Esta correlação é causada por uma variedade de fatores, incluindo danos ao microambiente linfático, efeitos adversos da

DECH na homeostase periférica, bem como o impacto que a imunossupressão crônica tem sobre a reconstituição imunológica. Durante a manifestação da DECH aguda a combinação do rompimento da mucosa gastrointestinal e o uso de imunossupressores em altas doses estão associados ao alto risco de infecções, o que também ocorre durante o tratamento extensivo da DECH crônica. Assim sendo, a administração precoce de estratégias profiláticas para a prevenção da DECH em pacientes submetidos ao TCTH alogênico se faz necessária, o que eleva o risco de infecções, que muitas vezes são de difícil tratamento e em alguns casos são fatais (25). As estratégias utilizadas para essa profilaxia são a depleção das células T, realizada com diminuição da contagem das células T do doador, e o uso de drogas imunossupressoras que apenas reduzem a função dessas células. Embora a depleção das células T possa contribuir para a prevenção da DECH, seu uso resulta em uma prolongada imunodeficiência e maior incidência de infecções quando comparada com o uso de medicamentos imunossupressores (25,37).

Por fim, a compatibilidade do HLA e o grau de parentesco entre o doador e receptor do transplante também estão associados ao risco de infecções sendo: doador HLA compatível aparentado < doador HLA compatível não aparentado < doador incompatível. A falta de doador HLA compatível aparentado para a maioria dos pacientes que necessitam de TCTH resultou em um progressivo aumento no uso de doador HLA compatível não aparentado. O problema visto no transplante não aparentado é um risco aumentado de manifestação da DECH devido à presença dos antígenos de histocompatibilidade *minor* (MiHA) com consequente aumento da imunossupressão profilática para a DECH e retardo na reconstituição imunológica. Estes fatores elevam o risco de infecções associadas à imunodeficiência das células T, como causadas pelo HCMV, Epstein-Barr vírus (EBV) e *Pneumocystis carinii* (25).

Portanto, o regime de condicionamento mieloablativo, a neutropenia prolongada, a depleção das células T, a DECH grave, sua profilaxia e tratamento, além de outros fatores estão associados à progressão das infecções no pós-TCTH (25).

Infelizmente, ainda não existe nenhum marcador laboratorial definitivo de reconstituição imunológica para prever o risco infeccioso e que possa ser utilizado para guiar a profilaxia de infecções. É provável que o grau da recuperação imune medido por vários testes esteja associado a resultados clínicos. Além disso, a maioria dos estudos

publicados tem focado na associação dos resultados de testes imunológicos com os resultados que podem ser claramente definidos como sobrevida ou mortalidade não relacionada à recidiva, não avaliando a correlação desses resultados com o aparecimento de infecções (34).

3.3 O TEMPO PÓS-TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS E O APARECIMENTO DE INFECÇÕES

O tempo do transplante está diretamente associado ao aparecimento de infecções. De modo geral é possível considerar três períodos distintos no pós-TCTH: fase I ou pré-enxertia, fase II, pós-enxertia ou precoce e fase III ou tardia. Alguns modelos têm sido formulados para demonstrar as complicações infecciosas que ocorrem durante estas diferentes fases (Figura 1) (34):

✓ Fase I ou pré-enxertia: entre o dia 0 e o dia da enxertia, devido à neutropenia prolongada e a quebra da barreira mucocutânea resultantes do regime de condicionamento, os pacientes apresentam elevado risco de infecções, tendo como principais fontes a microbiota oral, gastrointestinal e da pele. Infecções causadas por *Candida* sp e *Aspergillus* sp são muito frequentes nesse período, podendo se manifestar como neutropenia febril. Durante a fase pré-enxertia infecções oportunistas comumente ocorrem, tal como pelo herpesvírus simplex (HSV), também conhecido herpesvírus humano tipo 1 (HHV-1) (34). Embora a reativação do HCMV ocorra em uma minoria de pacientes, sua manifestação é extremamente grave nessa fase, estando associada a altas taxas de mortalidade (38).

✓ Fase II, pós-enxertia ou precoce: entre o dia da enxertia e o dia +100 o risco de infecções está diretamente associado à lenta recuperação da imunidade humoral e celular. Nesta fase está a principal diferença entre os transplantes autólogo e alogênico. Pacientes submetidos ao TCTH autólogo apresentam reconstituição imune mais rápida, enquanto receptores de TCTH alogênico têm recuperação mais lenta, especialmente em pacientes com manifestação de DECH (32), o que eleva ainda mais risco de infecções. Após a

enxertia, os patógenos críticos que podem causar infecção são os herpesvírus, principalmente o HCMV. Entre os dias +30 e +100 pós-TCTH o risco do HCMV causar pneumonia, hepatite e colite é mais elevado, além de poder favorecer o aparecimento de infecções oportunistas, principalmente em pacientes com DECH aguda (34).

✓ Fase III ou tardia: após o dia +100, devido aos defeitos da imunidade celular e humoral e função prejudicada do sistema retículoendotelial, pacientes receptores alogênicos de CTH com DECH crônica ou com doadores alternativos (transplante não aparentado, doador incompatível ou de cordão umbilical) estão em risco nesta fase para algumas infecções, como pelo HCMV, varicela-zoster vírus (VZV), doença linfoproliferativa relacionada ao EBV e por bactérias capsuladas como *Streptococcus pneumoniae* (34). Atualmente, o HCMV está emergindo como um grande problema nesta fase, já que os pacientes não estão mais sob vigilância viral, sendo observado um aumento nos índices de aparecimento da HCMV-doença tardia (39).

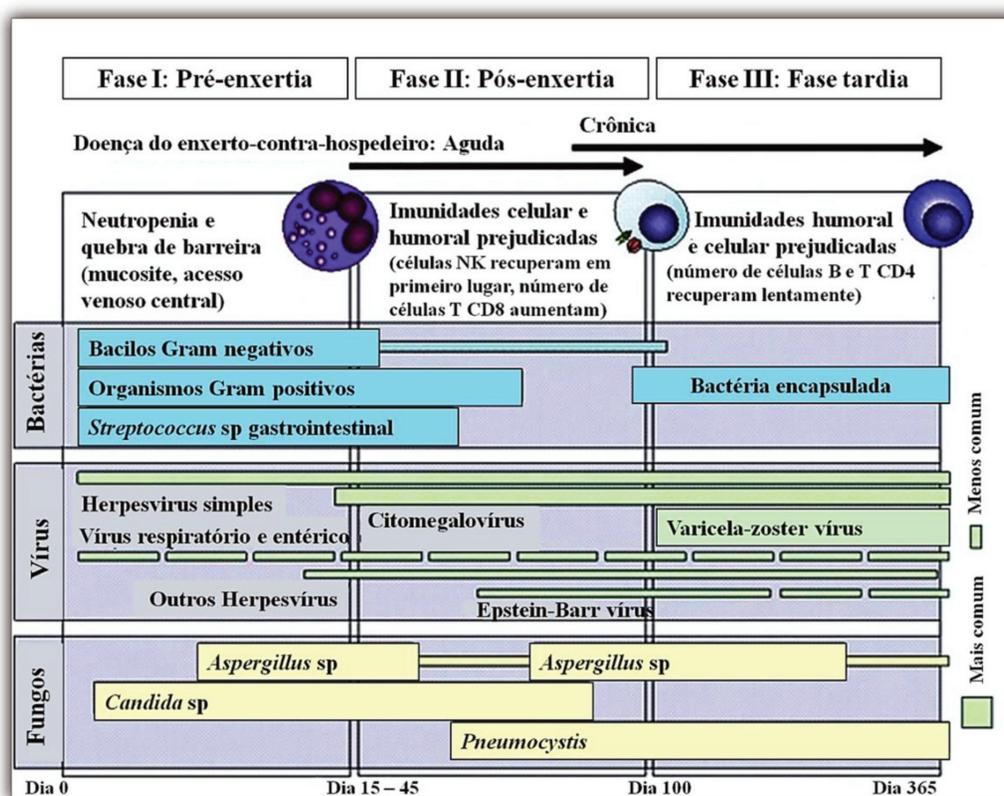


Figura 1. Fases do TCTH e infecções oportunistas associadas (34).

3.4. O CITOMEGALOVÍRUS HUMANO

A maioria das infecções virais que afetam o ser humano pode causar grave doença nos receptores de TCTH. O aspecto fundamental para a prevenção de infecções virais envolve a avaliação de risco baseada nas condições do paciente, tempo de transplante e características específicas do vírus (40).

Dentre as infecções de etiologia viral, os agentes que assumem maior relevância como causadores de doença em pacientes submetidos ao TCTH são os vírus da família *Herpesviridae*, principalmente o HCMV (5), sendo caracterizados pela reativação da latência principalmente no período de maior supressão das células T (40).

Isoladamente, o HCMV é o patógeno viral mais importante no pós-TCTH pela morbidade e mortalidade associadas a ele (1). Este vírus, também conhecido como herpesvírus humano tipo 5 (HHV-5), é um membro da família *Herpesviridae*, subfamília *Betaherpesvirinae*, cuja estrutura do vírion, cinética da expressão dos genes virais e capacidade de permanecer em latência por toda a vida do hospedeiro é característico de todos os herpesvírus. No entanto, outras características como ser um vírus espécie-específico, ter tropismo por glândula salivar e apresentar crescimento lento em cultura celular, classificam-no como um beta herpesvírus, assim como o HHV-6 e herpesvírus humano tipo 7 (HHV-7) (41).

3.4.1 CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DO HCMV

3.4.1.1 A estrutura viral

O genoma do HCMV contém aproximadamente 235 mil pares de base de DNA, sendo o maior dentre todos os herpesvírus humanos. Este grande genoma codifica mais de 200 proteínas e é composto por duas regiões únicas definidas como longa (UL) e curta (US), flanqueadas por sequências repetidas invertidas localizadas nas extremidades. Os genes do HCMV são nomeados de acordo com suas posições em cada região do genoma, como observado no gene UL97, que é o 97º gene na sequência longa do DNA do HCMV (42). Apesar de existir esta convenção, alguns genes recebem nomes adicionais, como o

gene UL54 (54º gene na região UL), também conhecido como gene da DNA polimerase (43).

Sabe-se que a porção central da região UL contém genes que tem homologia com outros herpesvírus, como a DNA polimerase, glicoproteína B (gB), glicoproteína H (gH), enquanto o restante do genoma contém genes encontrados somente nos beta herpesvírus e alguns exclusivamente no HCMV (43).

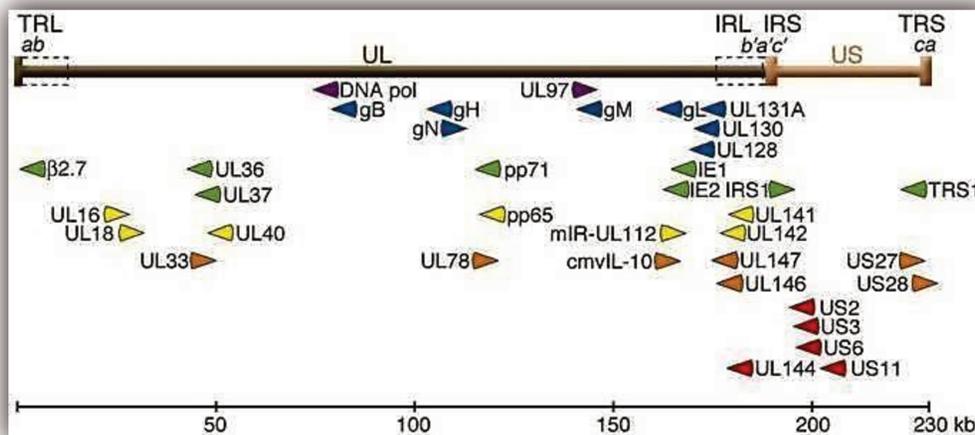


Figura 2. Genoma do HCMV. O genoma do HCMV é constituído por duas regiões únicas (UL e US), flanqueadas por sequências repetidas invertidas localizadas nas extremidades (43).

O vírion do HCMV é composto por DNA de dupla fita, o qual é revestido por um capsídeo icosaédrico. Envolvendo este capsídeo está a região conhecida como tegumento (ou matriz) e o envelope, de origem lipídica, contendo as glicoproteínas virais, mediadoras na ligação e entrada do vírus na célula hospedeira (42) (Figura 3).

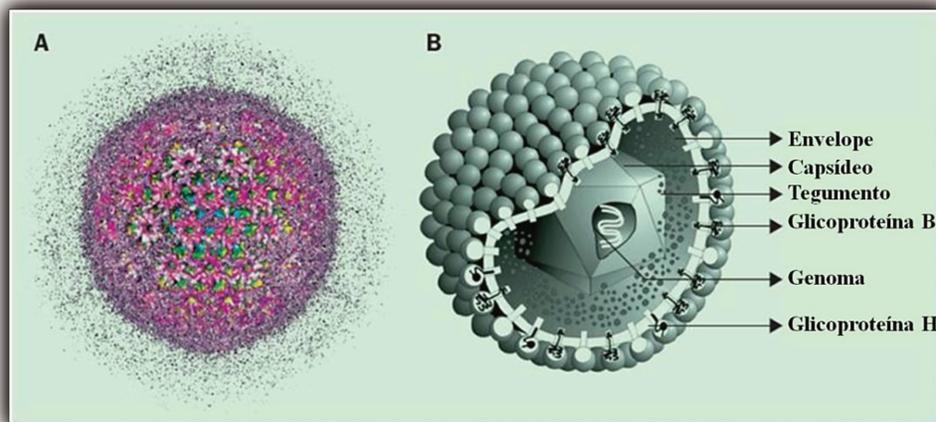


Figura 3. Estrutura do HCMV. (A) representação tridimensional da superfície do citomegalovírus humano em resolução de $18 \times 10^{-8} \text{m}$ e (B) modelo tridimensional virtual mostrando vários componentes do citomegalovírus humano (44).

O capsídeo viral é uma estrutura composta principalmente por cinco proteínas: UL86, UL48-49, UL85, UL46 e UL80. Destas, a UL86 é a principal proteína componente do capsídeo. O tegumento viral é uma camada de revestimento amorfo que mantém associação entre o envelope e o capsídeo. Algumas proteínas do tegumento são expressas somente no núcleo da célula (ex: *ppUL69*) ou somente no citoplasma (ex: *pp150*, *pp28*), enquanto outras, como a *pp65*, são encontradas no núcleo da célula pouco tempo após a infecção e, mais tarde, localizam-se predominantemente no citoplasma. O envelope viral é formado por complexos glicoprotéicos de ligação dissulfídica com o vírion. As glicoproteínas M (gM) e N (gN) são as mais abundantes do envelope e, junto com as glicoproteínas H (gH) e B (gB), são essenciais para a infectividade viral (45).

3.4.1.2 A replicação viral

A replicação do HCMV em cultura celular, assim como no hospedeiro é lenta, e o período de possível doença é prolongado, tendo a capacidade de permanecer em estado latente. Para iniciar a infecção é necessário que o vírus seja adsorvido aos receptores da superfície celular, resultado de uma cascata de interações entre proteínas virais e celulares,

seguido pela fusão do envelope viral com a lamela externa da membrana citoplasmática (Figura 4 – A). Esta fusão é sucedida pela perda do envelope (Figura 4 – B) e entrada do nucleocapsídeo, juntamente com as proteínas do tegumento, no citoplasma da célula hospedeira, translocação para o poro nuclear e lançamento do DNA viral no núcleo celular (12,46-48) (Figura 4 – C).

A interação das glicoproteínas do HCMV com os seus receptores é suficiente para gerar um sinal de transdução intracelular, que conduz à alterações da expressão dos genes celulares. O DNA forma um círculo e é transcrito pelo maquinário de transcrição celular. Outras proteínas do tegumento permanecem no citoplasma ou são transportadas independentemente ao núcleo. O RNAm viral, juntamente com o capsídeo, é transportado para o citoplasma da célula hospedeira, e lá é traduzido. Esse processo é rápido e eficiente tanto nos tipos celulares permissivos quanto nos não permissivos (12,46-48).

Durante a infecção produtiva, o genoma do HCMV é expresso em uma cascata, temporariamente coordenada e regulada por eventos de transcrição, que conduzem à síntese de três categorias de proteínas virais, descritas como imediatamente precoces (*IE* [*immediate-early*] ou α), precoces (*E* [*early*] ou β) e tardias (*L* [*late*] ou γ) (41) (Figura 4 – D).

A expressão gênica do HCMV se inicia a partir de algumas proteínas α ou *IE* na 1^a hora após a infecção. Os genes *IE* incluem o gene *major IE* (*MIE*) UL122/123 genes (*IE1* e *IE2*) e os genes auxiliares, tais como UL36, UL38, UL115-UL119, IRS1/TRS1, e US3. As proteínas do gene *MIE*, isoladamente ou em sinergismo, são necessárias para a subsequente expressão, atuando como transativadoras e autoestimuladoras de genes virais. Além disso, estas proteínas têm um profundo impacto sobre a fisiologia da célula hospedeira, uma vez que regulam a expressão de um grande número de genes desta célula (12,49).

A expressão de genes β ou *E* depende da presença de proteínas *IE* funcionais e não é afetada por inibidores da replicação do DNA viral. Elas são divididas em duas subclasses: $\beta 1$ e $\beta 2$ de acordo com o seu tempo de expressão. Os genes $\beta 1$ e $\beta 2$ são transcritos dentro de 4 - 8 horas e de 8 - 24 horas após a infecção, respectivamente. Dados indicam que os genes *E* codificam principalmente proteínas não estruturais, incluindo

fatores de replicação do DNA viral, enzimas de reparo e proteínas envolvidas na evasão imune (12,41,49).

A síntese do DNA viral ocorre no núcleo das células infectadas, sendo iniciada após 16 horas de infecção. Para tanto é necessário a atividade de proteínas virais essenciais e específicas e a contribuição ativa de várias proteínas celulares (41).

As proteínas γ ou *L* são a última classe de produtos de genes expressos durante a replicação do HCMV. A transcrição começa após 24 horas de infecção e necessita que a replicação do DNA viral já tenha sido realizada. A expressão dos genes tardios levam à síntese de duas subclasses de proteínas γ ($\gamma 1$ e $\gamma 2$), de acordo com o seu tempo de expressão e de sensibilidade a inibidores de replicação de DNA viral. A transcrição dos genes $\gamma 1$ e $\gamma 2$ ocorre entre 24 - 36 horas e 24 - 48 horas pós-infecção, respectivamente, sendo esta última estritamente dependente de replicação do DNA. As proteínas *L* têm funções estruturais e contribuem para a montagem e morfogênese viral (12,41,49).

A formação do capsídeo do HCMV e o empacotamento do DNA ocorrem no núcleo da célula (Figura 4 – E). Posteriormente o nucleocapsídeo adquire, por brotamento da membrana nuclear, um envoltório primário o qual, ao passar pelo lúmen, é perdido. No citoplasma o capsídeo adquire o tegumento (Figura 4 – F) e seu envelope. Estas partículas maduras são retidas dentro de vesículas e transportadas para a superfície da célula através do complexo de Golgi, o qual, devido ao acúmulo de nucleocapsídeos e corpos densos, tem seu volume aumentado. As alterações do complexo de Golgi durante a fase tardia da replicação criam inclusões em torno do núcleo. Os novos vírus se acumulam no citoplasma e são liberados para o compartimento extracelular a partir das 72 horas após a infecção (3,12,50).

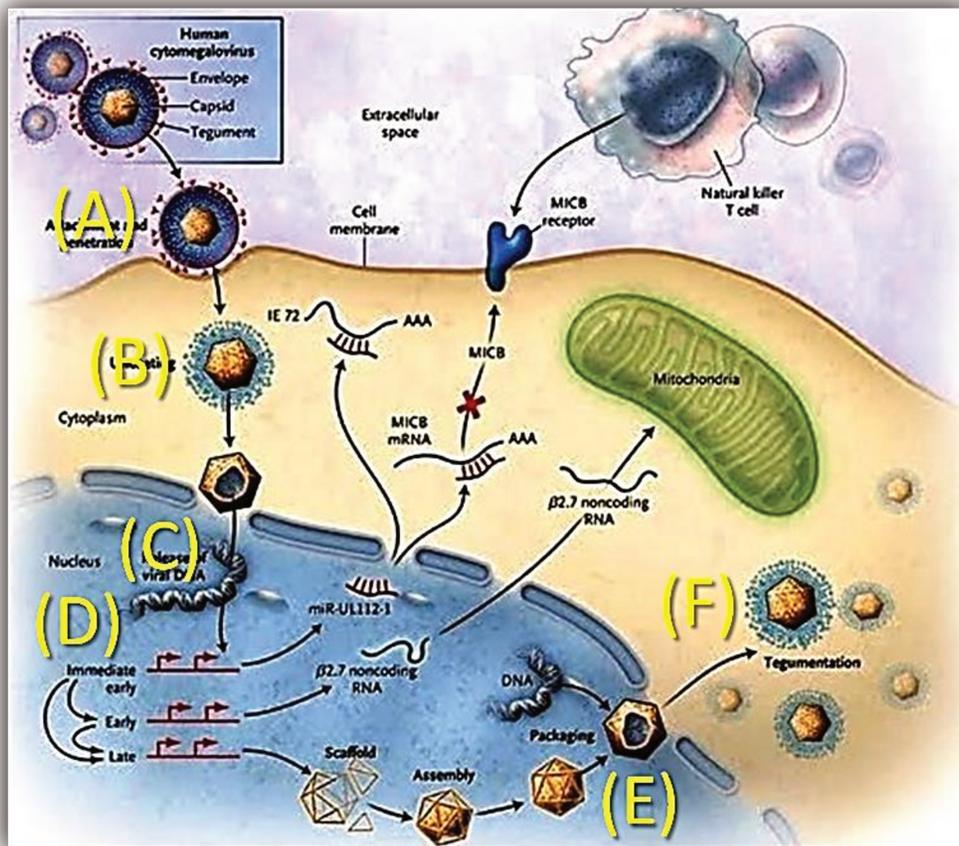


Figura 4. Mecanismo de replicação do HCMV nas células do hospedeiro (51).

3.4.1.3 Interação entre a replicação do HCMV e o sistema imunológico do hospedeiro

Embora a infecção causada pelo HCMV seja controlada pelo sistema imunológico, sua eliminação total raramente é atingida, permanecem em estado latente. A latência viral pode ser funcionalmente definida como circunstância em que ocorre a manutenção do genoma viral na célula hospedeira sem produção de vírus infecciosos. Este estado de latência pode ser revertido em condições que afetam o sistema imune, recuperando, assim, sua capacidade de replicação (52).

Ainda que a reativação do HCMV esteja diretamente associada a situações de imunodepressão, esta também pode ser desencadeada por outros vírus, como o vírus da imunodeficiência humana (HIV), e pela ativação do sistema imunológico. O HCMV pode

ser reativado pelo fator de necrose tumoral (TNF)- α , o qual é libertado durante a inflamação. O TNF- α liga-se ao receptor de TNF das células infectadas com o HCMV latente, gerando sinais de ativação do fator nuclear- κ B (NF- κ B). Por conseguinte, as subunidades p65/p50 ativadas do NF- κ B translocam-se para o núcleo, ligando-se aos genes *IE*, e iniciando a replicação viral do HCMV (53).

A interação entre o HCMV e o sistema imunológico de seu hospedeiro apresenta características muito interessantes. A coexistência do HCMV com o hospedeiro é facilitada por estratégias desenvolvidas pelo vírus para limitar a ação do sistema imunológico, tais como: (A) estabelecimento de um estado de latência da infecção e restrição do número de genes virais expressos a fim de minimizar sua exposição ao sistema imunológico, (B) replicação em tecidos específicos, que apresentam uma vigilância imunológica menos intensa (ex: glândulas salivares, onde as células não expressam MHC-I suficientes para mediar a eliminação do vírus através das células T CD8+), (C) comprometimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro através da expressão de fatores que silenciam a resposta imune (ex: receptores de Fc de imunoglobulinas), ampliando o período disponível para a replicação (40) e (D) codificação de muitos produtos gênicos que interagem nas vias de processamento do antígeno viral, restringindo sua apresentação via MHC I/II (41,45,54,55).

O papel da imunidade humoral em controlar a replicação do HCMV ainda não é claro. Embora os anticorpos específicos para as gB e gH possam neutralizar o vírus em cultura celular, eles parecem não prevenir a infecção primária em adultos, podendo funcionar somente para limitar a gravidade da HCMV-doença (56). Como a infecção grave geralmente é limitada a indivíduos com diminuição da imunidade celular, muitas vezes previsível durante o tratamento da DECH e mais precoce em receptores de transplantes com depleção das células T, é evidente que a resposta imunológica seja a melhor proteção contra o vírus (12,40,43), estando a resposta citotóxica T HCMV-específica associada ao bloqueio da replicação viral e a resposta T CD8+, juntamente com as células *natural killer* (NK), ligadas à prevenção da recorrência desta infecção (12,56,57).

3.4.1.4 A infecção causada pelo HCMV

A infecção causada pelo HCMV pode ser transmitida através da saliva, urina, contato sexual, infecção congênita por transferência placentária, aleitamento materno, transfusão de sangue, transplante de órgão sólido ou de CTH (44).

Em laboratório, o HCMV cresce em um número limitado de linhagens celulares, como fibroblastos humanos, células endoteliais e macrófagos (43,58), observando-se inclusões nucleares e edema nas células do hospedeiro, efeito citopático característico conhecido como “olhos de coruja” (59). A inclusão nuclear aparece de cor vermelho-púrpura (acidófila na coloração por hematoxilina-eosina) cercada por um halo claro. A inclusão citoplasmática é mais granulosa, sendo basófila. Nas proximidades das células infectadas, observam-se reações inflamatórias (geralmente linfomonocitária) e necrose, com ou sem calcificação (60) (Figura 5).

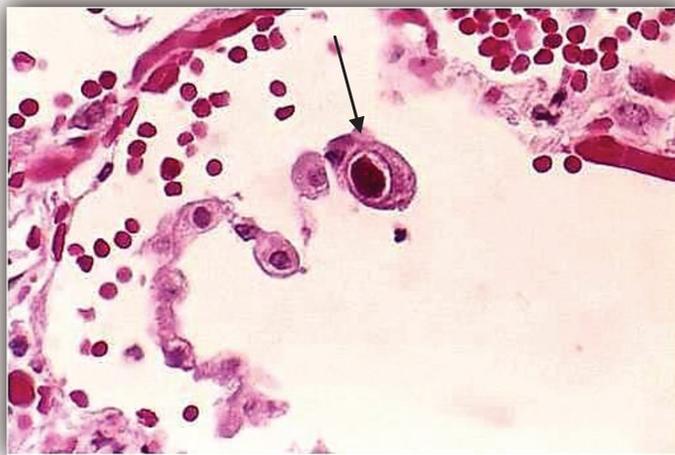


Figura 5. Efeito citopático característico do HCMV. Inclusão intranuclear citomegálica em tecido pulmonar (61).

Somente as cepas de laboratório, como a AD169 e Towne, produzem um efeito citopático generalizado, com a lise da totalidade da monocamada da células e liberação de títulos elevados de partículas virais a partir de 3 a 4 dias pós-infecção (12).

In vitro, as únicas células totalmente permissivas para a replicação de cepas de laboratório são fibroblastos de prepúcio humano e de pulmão. Algumas linhas celulares transformadas derivadas de glioblastomas, bem como as células musculares lisas arteriais primárias suportam a infecção produtiva, embora em níveis mais baixos do que nos fibroblastos (12).

Culturas celulares infectadas pelo HCMV podem produzir, além das partículas virais infecciosas (vírions), outros dois tipos de partículas, as envelopadas não infecciosas e os corpos densos. As partículas envelopadas não infecciosas são partículas virais defeituosas compostas por capsídeo envelopado imaturo sem DNA, e por proteínas virais que não são encontradas em nucleocapsídeos maduros. Já os corpos densos são partículas envelopadas sem nucleocapsídeo e DNA viral, mas com presença de várias proteínas do tegumento, das quais a ppUL83 (*pp65*) é a mais abundante (42,62).

Durante a infecção humana o HCMV pode ser encontrado em uma ampla diversidade de células (43), podendo se replicar nas células epiteliais, endoteliais, musculares lisas, mesenquimais, hepatócitos, granulócitos e macrófagos derivados de monócitos (12,43,58). Após a infecção primária, o vírus não é eliminado do organismo, e permanece ali em sua forma latente, mantendo-se em níveis reduzidos (63). O DNA viral latente pode ser detectado nas células progenitoras de macrófagos-granulócitos da MO e em monócitos periféricos (12).

3.4.1.5 Epidemiologia e manifestação da infecção causada pelo HCMV

O HCMV é um dos patógenos mais bem sucedidos. É encontrado tanto nas sociedades industrializadas desenvolvidas, quanto em grupos indígenas isolados (3), sendo, por este motivo, uma infecção extremamente comum. A prevalência desta infecção é mais alta em indivíduos que vivem em aglomerados, condições insalubres e em países socialmente desfavorecidos. A maioria das crianças de populações com baixos níveis socioeconômicos é infectada no início da puberdade, ao passo que menos de 40% dos adolescentes de países desenvolvidos apresentam sorologia HCMV-positiva, acompanhado por aumento de 1% ao ano (3,12,64).

Em análise recente da população adulta dos EUA observou-se uma soroprevalência de 50%. Esta taxa é ainda maior em algumas populações. Mais de 90% da população brasileira adulta apresenta anticorpos específicos para o HCMV (5), atingindo 96% dos indivíduos do sul do Brasil. Esta alta prevalência igualmente é vista em mexicanos residentes nos EUA com idades próximas aos 50 anos, em que a soroprevalência atinge índices de 90%, bem como 88% nos pacientes submetidos ao transplante de CTH na Itália (42,65,66-68). Apesar de sua elevada prevalência em todo o mundo, a infecção causada pelo HCMV ocorre, geralmente, de forma assintomática (42).

As manifestações da infecção causada pelo HCMV variam de acordo com a idade e a imunocompetência do hospedeiro. Tanto em adultos quanto em crianças imunocompetentes a infecção normalmente é subclínica. Em raras ocasiões (~8%) os indivíduos desenvolvem uma síndrome semelhante à mononucleose infecciosa (59). As manifestações clínicas da mononucleose causada tanto pelo HCMV quanto pelo EBV são semelhantes, verificando febre persistente, mialgia, cefaleia, linfadenopatia cervical, esplenomegalia e sintomas inespecíficos comuns a outras infecções, podendo persistir por semanas. *Rash* pode ser visto em 30% dos pacientes. Complicações raras incluem pneumonia, miocardite, anemia hemolítica, retinite, ulceração gastrointestinal, hepatite, envolvimento do SNC e neuropatia periférica (12).

Contudo, esta infecção pode causar grave morbidade e mortalidade na ausência de uma resposta imunológica eficaz, como em indivíduos imunologicamente comprometidos (12). A síndrome sistêmica causada pelo HCMV tem como sintomas febre superior a 38°C com duração de pelo menos 2 dias, mal-estar, leucopenia, trombocitopenia, aumento de transaminases hepáticas (valor superior ao dobro do limite normal - com exceção dos receptores de transplante de fígado) e presença viral no sangue (viremia). Já a doença causada pelo HCMV é a manifestação mais grave sendo caracterizada por sintomas e sinais de envolvimento de órgãos e sistemas, tais como trato gastrointestinal (TGI), pulmões, fígado, SNC, retina, rins, bexiga, pâncreas, entre outros, podendo ser fatal (67,69). Outros efeitos associados ao HCMV em pacientes transplantados é a perda do enxerto não associada à rejeição imunológica, aterosclerose e superinfecção por fungos e bactérias (12,67). O seu impacto, entretanto, tem aumentado nas últimas décadas, devido ao

aumento de aloenxertos, tratamentos imunossupressores e de pacientes infectados pelo HIV (12).

3.4.2 O CITOMEGALOVÍRUS HUMANO NO PÓS-TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS

O HCMV é considerado um dos mais importantes patógenos oportunistas em pacientes imunodeprimidos. Admite-se que praticamente todos os receptores de TCTH HCMV-soropositivos, desde que convenientemente acompanhados, apresentarão evidências laboratoriais dessa replicação viral. É importante salientar, contudo, que somente uma parte dos pacientes com infecção ativa desenvolverá a doença causada pelo HCMV (4).

Os termos “infecção ativa” e “doença causada pelo HCMV” (HCMV-doença) se diferenciam na sua forma de diagnóstico e gravidade associada. A infecção ativa causada pelo HCMV simplesmente indica a replicação viral, detectada com o uso de técnicas laboratoriais, geralmente pela antigenemia, PCR ou reação da transcriptase reversa, seguida por PCR (RT-PCR) em amostras de plasma ou sangue (43,67). Já a doença causada pelo HCMV indica o acometimento de órgãos pelo vírus, diagnosticada através de biópsia, acompanhada por sintomas e comprometimento das funções do órgão afetado (70).

Nos últimos 15 anos, devido às mudanças ocorridas nos protocolos dos centros que realizam o TCTH, como a prevenção da transfusão de produtos sanguíneos HCMV-positivos em receptores HCMV-soronegativos, utilização de regimes de condicionamento de menor toxicidade e estratégias preventivas para a infecção ativa e manifestação da HCMV-doença, observou-se redução na incidência de complicações associadas a esse vírus no pós-TCTH. Apesar disso, esta infecção continua sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade após a TCTH, uma vez que entre 50 e 90% dos pacientes receptores de TCTH alogênico apresentam sua reativação (71).

A maior incidência da reativação do HCMV ocorre durante os três primeiros meses pós-transplante devido à lenta recuperação da imunidade celular (71-73). Após o TCTH a reconstituição da resposta citotóxica mediada pelas células T CD8+ está associada à proteção contra a infecção e as células T CD4+ estão associadas à proteção contra a

doença causada pelo HCMV (56). Porém, após a enxertia, os receptores de TCTH alogênico apresentam uma grave e persistente deficiência quantitativa e funcional no compartimento de linfócitos T e B. Estas deficiências se manifestam como uma desordem na função da célula T helper, na síntese de imunoglobulina e na resposta das células T citotóxicas, facilitando, assim, a reativação do HCMV (38).

Antes da implantação da terapia antiviral com o uso de ganciclovir (GCV) a incidência da HCMV-doença durante o primeiro ano pós-TCTH atingia índices de 30 a 35%. Após a introdução dessa terapia houve uma redução significativa nesta manifestação, acometendo entre 8 e 10% dos pacientes submetidos ao TCTH (39,74).

3.4.2.1 Manifestações clínicas comumente associadas ao HCMV no pós-transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas

A febre é uma manifestação comum da infecção ativa causada pelo HCMV, mas pode estar ausente em pacientes que receberam altas doses de drogas imunossupressoras. Outras complicações clínicas estão associadas a esse vírus, como a falha da pega do enxerto manifestada como pancitopenia grave ou hipoplasia da MO, atraso da recuperação funcional de MO, DECH grave e morte por mielossupressão (7). Além disso, o HCMV pode causar doença em quase todos os órgãos como pulmão, TGI, fígado, retina, encéfalo, entre outros (43).

Por muitos anos a pneumonia causada pelo HCMV (HCMV-pneumonia) foi considerada a complicação mais comum no pós-transplante de CTH, com elevadas taxas de mortalidade (44). Progressivamente, publicações científicas começaram a descrever uma redução nessa incidência e aumento na manifestação de HCMV-doença no TGI nos receptores do TCTH monitorados pela antigenemia e PCR (74-76). Embora atualmente a HCMV-pneumonia não seja a manifestação mais comum, ela continua sendo a complicação mais grave, já que sua baixa sensibilidade ao tratamento antiviral resulta em elevados índices de mortalidade. Em contrapartida, embora os casos HCMV-doença no TGI tenham aumentado, uma menor gravidade tem sido observada, estando associada a uma melhor resposta tratamento antiviral (77).

Nos dias atuais, a HCMV-doença no TGI, sem dúvida, é a manifestação mais comum da doença causada por este vírus em receptores de TCTH. Outra forma em que o HCMV pode se manifestar é através da HCMV-retinite. Ainda que raramente vista nesse grupo de pacientes, a HCMV-retinite deve ser suspeitada em pacientes com alterações visuais (74-76).

Acredita-se, baseado em estudos realizados em modelos animais, que a presença do HCMV aumente o risco da DECH. Vários estudos têm demonstrado associações entre a sorologia HCMV-positiva no pré-transplante, tanto do doador quanto do receptor, com o risco aumentado da DECH aguda ou crônica no pós-TCTH (56).

3.4.2.1.1 *Pneumonia causada pelo HCMV*

A HCMV-pneumonia, também conhecida como pneumonia intersticial causada pelo HCMV, é a manifestação mais grave do HCMV em receptores de CTH. A mortalidade associada à HCMV-pneumonia no pós-transplante era superior a 90% até a introdução da combinação da terapia com GCV e imunoglobulina intravenosa (IVIG). Embora tenha havido redução nesta taxa, esta mortalidade ainda continua alta, sendo superior a 50% (70).

A HCMV-pneumonia é responsável por até 20% de todas as pneumonias que ocorrem após o TCTH, acontecendo geralmente dentro dos primeiros 100 dias pós-transplante, com pico de incidência entre os dias +21 e +80 (71,78). Pode ocorrer entre a 1ª e a 20ª semana pós-transplante (79), muitas vezes com rápida progressão para insuficiência respiratória com necessidade de ventilação mecânica (71,78).

A HCMV-pneumonia pode se manifestar com febre, tosse não produtiva, hipóxia (71,78) e dispneia, muito semelhante a outras pneumonias. A radiografia geralmente revela infiltrado bilateral que, em uma fase mais tardia, pode evoluir para consolidações difusas (79). Raramente nódulos são observados (71,78). A tomografia computadorizada (TC) de tórax confirma o padrão intersticial (79), além de revelar outros achados associados à HCMV-pneumonia, como uma combinação de pequenos nódulos, opacidade em vidro fosco, opacidades nodulares e consolidação, bem como espessamento dos septos interlobulares e derrame pleural (80) (Figura 6).



Figura 6. Tomografia computadorizada demonstrando a HCMV-pneumonia no pós-TCTH. A imagem revela com nitidez as regiões com opacidade em vidro fosco, demarcada com zonas de consolidação e nódulos centrolobulares (80).

O diagnóstico da HCMV-pneumonia é estabelecido pela combinação de sinais e/ou sintomas da doença pulmonar combinado com a detecção do HCMV em lavado broncoalveolar (LBA) ou biópsia de pulmão (Figura 7). A detecção do HCMV deve ser realizada por cultura *shell-vial*, testes histopatológicos, análise imuno-histoquímica ou hibridização *in situ* (67). Sendo assim, a presença do HCMV em amostras de LBA na ausência de evidências clínicas da doença deve ser interpretada com cautela. Não é recomendado o uso da PCR para este diagnóstico, já que existem poucos dados que correlacionam a detecção do DNA do HCMV no LBA com a HCMV-pneumonia. Entretanto, devido ao alto valor preditivo negativo associado à alta sensibilidade da PCR, um resultado negativo pode ser utilizado para descartar este diagnóstico (43,81). É possível que futuramente a PCR quantitativa do LBA seja utilizada para diagnosticar a HCMV-pneumonia (70).

No que diz respeito à terapêutica, a HCMV-pneumonia é tratada com o uso de GCV, de importante ação antiviral, auxiliado por altas doses de IVIG (79).

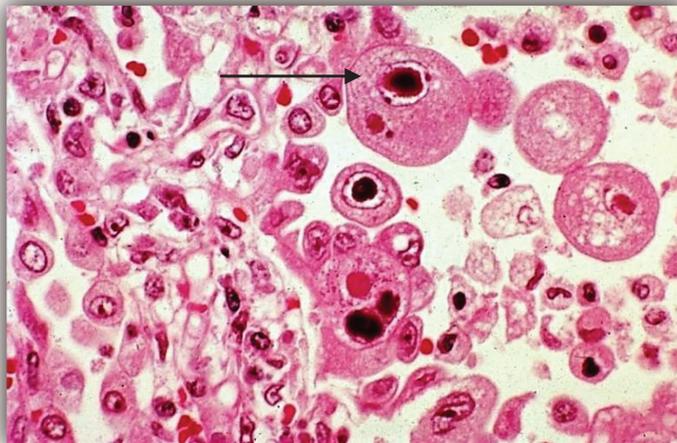


Figura 7. Características histopatológicas da HCMV-pneumonia. Células infectadas pelo HCMV apresentando volume aumentado com inclusões intranucleares escuras e rodeadas por um halo claro (82).

3.4.2.1.2 Doença gastrointestinal causada pelo HCMV

Embora a incidência da doença gastrointestinal causada pelo HCMV (HCMV-TGI) tenha declinado devido à profilaxia antiviral, esta manifestação é um problema cada vez mais importante para receptores alogênicos de TCTH. A HCMV-TGI pode causar diarreia com ou sem sangramento e seu risco de ocorrência está diretamente relacionado com o aparecimento e gravidade da DECH aguda (83-84).

Em pacientes imunocomprometidos a HCMV-TGI, na ausência de terapia antiviral, é a principal causa de morbidade e mortalidade devido a acontecimentos como hemorragia e perfuração. Deste modo, o diagnóstico precoce da HCMV-TGI é essencial para o bom prognóstico do paciente (85).

O HCMV pode afetar qualquer parte do TGI. Ulcerações associadas ao HCMV podem ser identificadas desde o esôfago até o cólon. A esofagite normalmente resulta em odinofagia, ao passo que dor abdominal e hematoquezia ocorrem com a colite (43,84). Além disso, diarreias agudas ou crônicas podem ser vistas em pacientes imunodeprimidos (86).

Existem três tipos de diarreia associadas à doença causada pelo HCMV sendo: (A) diarreia aquosa profusa com perda de proteína, (B) colite inflamatória com sangramento, dor e diarreia menos volumosa e (C) isolamento do HCMV em paciente cuja diarreia tenha outra causa associada, como DECH ou uso de antibióticos (87).

A HCMV-enterite nem sempre resulta em diarreia, podendo se apresentar como anorexia, náusea, vômito, hemorragia e perfuração. Pacientes com HCMV-TGI podem apresentar pseudo-obstrução intestinal e desconforto abdominal devido ao envolvimento de neurônios intestinais (87).

Através do exame endoscópico, úlceras que se estendem profundamente nas camadas da submucosa podem ser vistas (Figura 8). Macroscopicamente, a identificação visual destas lesões pode ser confundida com outras doenças, incluindo a DECH e doença causada pelos adenovírus (ADV) (43).

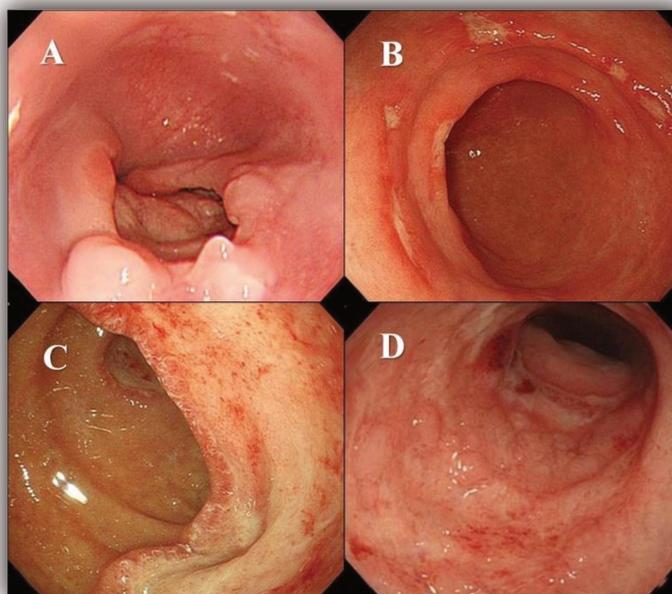


Figura 8. Achados endoscópicos da doença causada pelo HCMV no trato gastrointestinal. (A) esôfago - úlcera perfurada, (B) estômago - úlceras rasas no antro gástrico, (C) duodeno - úlcera profunda no duodeno e (D) cólon - múltiplas erosões e mucosa edematosa com úlceras no cólon sigmoide (85).

O diagnóstico da doença gastrointestinal causada pelo HCMV é feito pela combinação de sintomas clínicos do trato gastrointestinal superior e/ou inferior, demonstração de lesões na mucosa por endoscopia e/ou colonoscopia e visualização do HCMV em biópsia do TGI por teste histopatológico, análise imuno-histoquímica ou hibridação *in situ*. A detecção pela PCR é insuficiente para diagnosticar a doença HCMV-TGI (67), já que o diagnóstico do HCMV-TGI pode ocorrer na ausência da detecção de HCMV no sangue (70,88,89).

O tratamento da HCMV-TGI é realizado com o uso do antiviral GCV. Embora o vírus consiga se eliminado do tecido, a cicatrização das ulcerações causadas pelo HCMV é demorada (83).

3.4.2.1.3 Doença do enxerto-contra-hospedeiro (DECH)

Apesar do progresso na terapia imunossupressora e antiviral, a DECH aguda e a infecção causada pelo HCMV continuam sendo importantes complicações no pós-transplante alogênico. A DECH e a replicação do HCMV estão patogenicamente associadas. Vários estudos demonstram que a DECH e seu tratamento imunossupressor colocam os pacientes em risco para a reativação do HCMV. Em contraste, o papel da replicação do HCMV como uma causa da DECH é controverso. Com frequência, publicações sobre o tema sugerem que a replicação do HCMV pode induzir o aparecimento da DECH (90). Recentemente Cantoni et al (2010), estudando evidências da relação bidirecional entre a replicação do HCMV e a DECH aguda, concluíram que receptores alogênicos de CTH tem o risco e a gravidade da DECH aguda aumentada durante a replicação de HCMV (90).

3.4.2.2 Fatores de risco para a infecção ativa e doença causada pelo HCMV no pós-transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas

Receptores de TCTH do tipo alogênico apresentam como fator de risco mais importante para o aparecimento da doença causada pelo HCMV o *status* sorológico do doador (D) e do receptor (R) no pré-TCTH (43). Os candidatos ao transplante e respectivos

doadores devem ser submetidos à dosagem sérica de IgG específico para o HCMV para determinar o risco de infecção primária ou reativação do vírus latente no pós-transplante (91).

Estudos sugerem que a memória HCMV-específica das células T administradas com o enxerto pode desempenhar um papel importante na prevenção da reativação e doença causada pelo HCMV (25), e o risco da reativação deste vírus no pós-TCTH muitas vezes acompanha as seguintes combinações sorológicas: D-/R+ > D+/R+ >> D+/R- > D-/R- (25,92).

Pacientes HCMV-soronegativos que receberam CTH de doadores HCMV-soronegativos (D-/R-) têm um risco muito baixo de apresentar infecção primária. A infecção primária pode ocorrer por transfusão de produtos sanguíneos, contato sexual ou contato com outro indivíduo HCMV-soropositivo (43).

Aproximadamente 30% dos receptores submetidos ao transplante com combinação sorológica D+/R- desenvolvem infecção primária causada pelo HCMV, provavelmente pela transmissão do vírus latente através do enxerto. Embora o risco de HCMV-doença seja baixo nos pacientes submetidos ao tratamento preemptivo (precoce), a mortalidade causada por infecções bacterianas e fúngicas neste grupo de pacientes é maior do na combinação D-/R- (18.3% vs. 9.7%, respectivamente) (40,70).

Além disso, pacientes que tiveram doença causada pelo HCMV documentada antes do transplante tem risco elevado no pós-TCTH. O transplante deve ser adiado até que a doença seja tratada de forma adequada e o uso de profilaxia anti-HCMV deve ser considerada. A viremia do HCMV deve ser cuidadosamente monitoriada neste grupo de pacientes, incluindo a fase pré-enxertia, utilizando um baixo valor de *cutoff* (valor de referência para o teste de diagnóstico) para iniciar o tratamento preventivo (24).

Outros fatores de risco para a reativação do HCMV no pós-TCTH alogênico incluem a DECH aguda e crônica, o uso de doadores incompatíveis ou não aparentados, o uso de altas doses de corticosteroides e a depleção de células T (93,94); este último associado a elevados índices de mortalidade durante os primeiros 30 dias pós-TCTH (38,95).

Ainda não está claro se a fonte de CTH (CPP vs. MO) tem impacto significativo no aparecimento da infecção ativa e doença causada pelo HCMV. Curiosamente, o uso de

Sirolimus para profilaxia da DECH parece ter um efeito protetor contra a infecção causada pelo HCMV (43,70). Já o uso de Alemtuzumab, anticorpo monoclonal anti-CD52, resulta em prolongada linfopenia CD4+ e CD8+, podendo ser responsável por altas taxas de reativação do HCMV (93,94).

Com relação ao regime de condicionamento, a utilização de regimes de intensidade reduzida tem resultado numa menor taxa de infecção e HCMV-doença precoce após o transplante quando comparado com regimes mieloablativos. Entretanto, após um ano de transplante estas taxas se igualam (43). Já o adoecimento tardio pelo HCMV apresenta como fatores de risco a ausência de resposta T HCMV-específica, antigenemia positiva nos primeiros 100 dias pós-TCTH e a DECH crônica (5).

3.4.2.3 Prevenção da doença causada pelo HCMV

Receptores de TCTH alogênico com risco de reativação e doença causada pelo HCMV no pós-transplante devem ser inseridos em um programa de prevenção logo após a enxertia até pelo menos 100 dias pós-transplante. A equipe médica pode optar pela profilaxia universal ou pelo tratamento preemptivo para o HCMV. Ambas as estratégias têm suas vantagens e desvantagens (43). A escolha da estratégia preventiva deve levar em consideração os riscos e benefícios de cada estratégia, as necessidades e condições de cada paciente e a existência de um laboratório de virologia que execute os testes de monitoramento da viremia do HCMV, dando assim suporte ao centro que realiza o transplante (24).

A estratégia profilática contra a replicação do HCMV envolve a administração de medicamento antiviral a todos os receptores de TCTH alogênico com risco da reativação viral, ocorrendo entre o período da enxertia e o dia +100. GCV, aciclovir em altas doses, e valganciclovir (VGCV) são eficazes na redução da infecção causada pelo HCMV no pós-TCTH. Se o GCV for a droga de escolha, o curso de indução geralmente é iniciado na enxertia. Se o aciclovir ou VGCV são usados, o paciente deve ser monitorado e, na presença de evidência de replicação viral, a terapia precoce deve ser iniciada (24).

Vários estudos avaliaram a efetividade do uso profilático com GCV em pacientes receptores de TCTH, em esquema de doses diárias ou de 2 a 3 vezes por semana

até o dia 100 pós-transplante. Em estudo realizado no início da década de 1990, na Divisão de Transplante de Medula Óssea da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, o uso profilático com GCV em baixas doses não mostrou redução significativa na morbidade em receptores de TCTH alogênico. Embora a profilaxia tenha se mostrado bastante efetiva na redução das taxas de reativação e adoecimento pelo HCMV, eventos adversos como toxicidade medular e aumento da incidência de adoecimento tardio pelo HCMV fizeram com que tal prática fosse progressivamente abandonada (5).

Atualmente, a maioria dos centros de TCTH com infraestrutura para a realização da vigilância viral opta pela estratégia preemptiva (5). A terapia preemptiva tem como alvo preferencial o tratamento de pacientes assintomáticos com evidência de replicação do HCMV após o transplante. É necessária a utilização de testes laboratoriais sensíveis e específicos para o diagnóstico precoce desta replicação, permitindo assim, a administração imediata da terapia antiviral (24).

Como a detecção do HCMV em amostras sanguíneas de indivíduos submetidos ao TCTH alogênico tem forte impacto prognóstico no desenvolvimento da HCMV-doença (96), atualmente os testes de diagnóstico mais usados para monitorar a viremia e determinar a necessidade do início do tratamento preemptivo são a antigenemia *pp65* em leucócitos e a PCR em tempo real para a detecção do DNA viral, os quais foram prospectivamente avaliados e tiveram desempenhos semelhantes (97).

Os pacientes submetidos ao TCTH alogênico inseridos no protocolo da estratégia preemptiva devem ser monitorados quanto à presença da replicação do HCMV pela antigenemia e/ou PCR em amostras sanguíneas 1 vez por semana a partir do 10º dia até pelo menos 100 dias pós-transplante (24). Sendo assim, os centros que realizam TCTH do tipo alogênico devem ter estrutura para realizar ao menos um dos testes indicados para o monitoramento desta viremia. A determinação sorológica de IgG e IgM não é utilizada para diagnosticar a infecção e doença por HCMV, mas é eficaz para determinar o risco de reativação do HCMV no pós-transplante (97). Cultura viral de urina, saliva, sangue ou LBA raramente são usados por apresentar menor sensibilidade que a antigenemia *pp65* e a PCR do DNA viral (24).

Uma das vantagens atribuídas à estratégia preemptiva é o direcionamento da terapia a pacientes que apresentam maior risco de manifestação futura da doença causada

pelo HCMV, reduzindo o número de indivíduos expostos à toxicidade durante o tratamento antiviral e de resistência à droga utilizada, além de maximizar a relação custo- benefício (12,43,97). Por este motivo, nos dias de hoje, a terapia preemptiva é a alternativa de primeira-linha na maioria dos centros da Europa e dos EUA (98).

Apesar da eficácia das estratégias antivirais atualmente disponíveis, os pacientes submetidos ao TCTH permanecem em risco para a infecção ativa causada pelo HCMV não somente durante o período precoce pós-transplante (< 100 dias pós-TCTH), mas também durante o período tardio (> 100 dias pós-TCTH). Antes da introdução do GCV, a vasta maioria das reativações do HCMV ocorria entre a enxertia e o 100º dia pós-TCTH, com ocorrências esporádicas antes da pega do enxerto. Nos últimos anos, com o uso intenso de drogas antivirais, houve uma diminuição na prevalência do aparecimento da doença precoce causada pelo HCMV para 3 – 6%, e um aumento no risco de doença tardia, atingindo uma taxa de 18% em pacientes sem o uso de medidas preventivas (39). Portanto, a maior preocupação com relação ao HCMV é o adoecimento tardio, uma vez que, nesse período, o paciente não está mais sob a vigilância viral, o que limita a intervenção precoce com antiviral (5).

Deste modo, as seguintes recomendações são preconizadas para a vigilância do HCMV no pós-TCTH: (A) utilização da antigenemia ou da PCR até 100 dias após o transplante alogênico, (B) vigilância prolongada por pelo menos 6 meses em casos de DECH aguda ou crônica, positividade de antigenemia antes do dia 30 pós-TCTH, transplante não aparentado ou com disparidade HLA e (C) a vigilância intensificada (2 vezes por semana) em situações de depleção *in vivo* de células T, como uso de micofenolato mofetil (MMF), globulina antitimócito (ATG) ou corticoides em dose superior a 1 mg/kg/dia (5).

3.4.2.4 Monitoramento da viremia causada pelo HCMV para guiar o início da terapia preemptiva

A reativação do HCMV ocorre com maior frequência entre os dias +30 e +120 pós-TCTH. Com a introdução, no final dos anos de 1980, de técnicas rápidas e sensíveis para o diagnóstico do HCMV (antigenemia e PCR), a morbidade e mortalidade

relacionadas à HCMV-pneumonia reduziram significativamente. Estudos controlados mostraram redução nas taxas de HCMV-pneumonia de 30% para menos de 5% e na mortalidade relacionada a esse evento de mais de 85% para menos de 3%. Assim, a vigilância utilizando técnicas clássicas, como o isolamento viral e *shell-vial*, foi substituída pela antigenemia e pela PCR, que se revelaram armas poderosas para guiar a estratégia preemptiva (5).

3.4.2.4.1 Antigenemia

A antigenemia é um método que identifica e quantifica os leucócitos do sangue periférico que transportam a *pp65* do HCMV, fosfoproteína estrutural produzida em abundância no tegumento viral (99) que entra na célula como parte do vírion infectante e apresenta tropismo pelo núcleo celular. A detecção deste antígeno no núcleo de granulócitos, descrita primeiramente por van der Bij et al (100), é usada para documentar precocemente a disseminação do HCMV em pacientes imunocomprometidos.

Nos anos da década de 1990, experimentos clínicos usando a antigenemia demonstraram que este teste tinha correlação com o HCMV presente na infecção sanguínea (101). Além disso, a quantificação feita pela antigenemia pode ser usada para prever o aparecimento da doença causada pelo HCMV, uma vez que altos níveis do antígeno *pp65* são frequentemente encontrados em pacientes com HCMV-doença e baixos níveis correlacionam-se com infecções assintomáticas (10,12). Por este motivo, o método da antigenemia é considerado um grande avanço no diagnóstico da infecção ativa pelo HCMV em transplantados de CTH e muitos estudos a têm indicado como “padrão ouro” para guiar o tratamento preemptivo desta infecção (10).

Desde que a antigenemia foi descrita pela primeira vez vários estudos tentaram correlacionar o número de células *pp65*-positivas com o aparecimento dos sinais clínicos, a fim de estabelecer um limite em que o tratamento deve ser iniciado, independentemente dos sintomas (102). Apesar das exceções individuais, centenas de artigos publicados indicam que valores entre 50 e 100 células *pp65*-positivas/200.000 leucócitos são preditivos para o desenvolvimento da HCMV-doença em pacientes transplantados de órgãos sólidos, ao

passo que um número menor de células *pp65*-positivas é indicativo de risco para o desenvolvimento da doença causada pelo HCMV em receptores de CTH (99).

Este teste se baseia em quatro passos básicos: (A) separação das células polimorfonucleares (PMN) do sangue periférico e preparação da lâmina microscópicas, (B) fixação e permeabilização das células PMN, (C) detecção, a partir do uso de anticorpos monoclonais anti-*pp65*, por imunofluorescência e (D) leitura da lâmina e contagem semiquantificação das células *pp65*-positivas (99).



Figura 9. Antigenemia *pp65*-positiva. Leucócitos polimorfonucleares HCMV-positivos com coloração amarelo esverdeado positivos (99).

Para a realização da antigenemia é imprescindível o processamento da amostra de sangue periférico dentro de 6 a 8 horas após a coleta. Isto se faz necessário devido à falta de estabilidade dos neutrófilos em períodos maiores que 8 horas, podendo haver uma grande redução no número de células na amostra e, conseqüentemente, de células *pp65*-positivas (99).

Outras desvantagens são atribuídas a antigenemia. Hakki et al (2010) relataram que como a antigenemia é baseada na relação entre o número de células *pp65*-positivas pelo número de leucócitos presentes na lâmina, proporcionando desse modo uma avaliação semiquantitativa da carga viral circulante, este resultado não é confiável em pacientes com profunda leucopenia, situação clínica muito comum no pós-TCTH (42). Sendo assim, a

realização do teste pode se tornar inviável quando a contagem absoluta de neutrófilos for menor que 1000 neutrófilos/ μL (99). Mori et al (2000) asseguraram que, apesar da alta sensibilidade que a antigenemia apresenta na detecção prévia da reativação viral em quadros de HCMV-pneumonia, a antigenemia não necessariamente antecede o aparecimento de outras doenças causadas pelo vírus (88). Desta forma, a doença no TGI ou a retinite causada pelo HCMV podem ocorrer em pacientes monitorados pela antigenemia sem nunca apresentarem resultados *pp65*-positivos. Além disso, há problemas com a falta de padronização do teste e com a interpretação dos resultados (103).

3.4.2.4.2 PCR em tempo real

A técnica da PCR quantitativa foi criada na década de 1990 tanto para a detecção quanto para a quantificação do DNA viral. A PCR quantitativa foi desenvolvida no formato de PCR em tempo real (99,104), método que utiliza um sistema fluorescente capaz de captar a luz emitida pelos fluoróforos, oriunda da reação de amplificação, com elevada sensibilidade e especificidade no diagnóstico viral. A precisão deste método é determinada pelo ciclo de amplificação (*threshold cycle* - Ct), que é calculado durante a fase exponencial da reação (14). O DNA viral presente na amostra clínica pode ser quantificado pela interpolação de sua concentração em uma curva padrão absoluta, em que suas amostras possuem concentrações pré-estabelecidas (105) (Figuras 10).

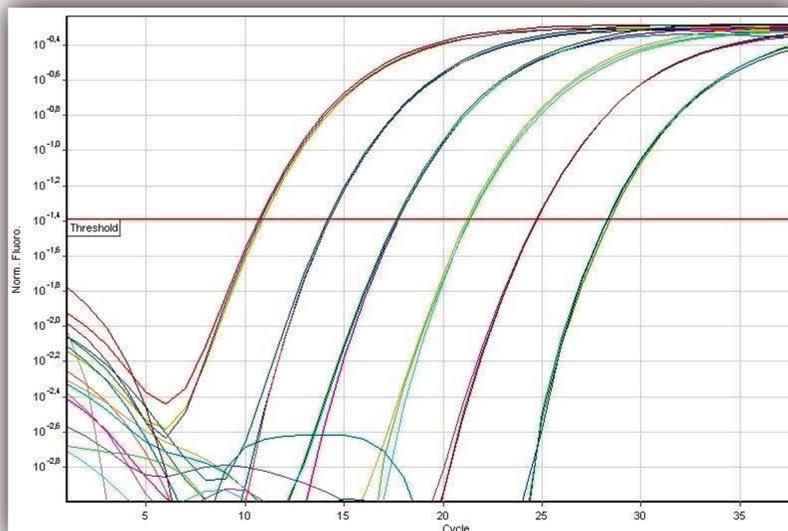


Figura 10. Gráfico de amplificação da curva padrão absoluta para a quantificação do HCMV pela PCR em tempo real (Fonte: próprio autor).

A PCR em tempo real representa um grande avanço nos métodos moleculares de auxílio diagnóstico, e a maioria dos laboratórios estão se atualizando nesta nova tecnologia por facilitar significativamente a quantificação da expressão gênica, por possuir a capacidade de medir quantidades diminutas de ácidos nucleicos em uma grande variedade de amostras (106), apresentar melhor precisão, maior intervalo linear, menor tempo de processamento e risco reduzido de contaminação em comparação à PCR convencional (99,104).

Como a PCR em tempo real possui a capacidade de quantificar o HCMV com precisão, seu uso levou ao reconhecimento de que a replicação viral *in vivo* é altamente dinâmica, podendo ter a carga viral dobrada em cerca de 1 - 2 dias (107). Sendo assim, estudos indicam que informações adicionais relacionadas ao fator de risco de desenvolvimento da HCMV-doença podem ser obtidas pela determinação da carga viral em receptores de TCTH (70,98,108). Por este motivo, a PCR em tempo real se tornou o método de diagnóstico mais rotineiramente utilizado e o “padrão ouro” para o diagnóstico do HCMV em amostras de sangue (43, 99,104).

Outra vantagem atribuída ao uso da PCR quantitativa é a possibilidade da avaliação do tratamento antiviral (97). Se as cargas virais do HCMV persistirem em níveis elevados por mais de uma semana durante o tratamento, a resistência aos medicamentos utilizados deve ser suspeitada, verificando-se a hipótese de mutações nos genes UL97 e UL54 da DNA polimerase, associadas à resistência ao efeito do medicamento GCV (105). Caso esta resistência seja comprovada, outros agentes antivirais devem ser administrados.

3.4.3 AGENTES ANTIVIRAIS

Até o momento um número limitado de drogas foi licenciado para o tratamento da infecção e doença causadas pelo HCMV (109). O tratamento do HCMV em pacientes imunodeprimidos ainda se baseia em alguns compostos disponíveis há cerca de 10 anos: ganciclovir (GCV, Cymevene®, Cytovene®), valganciclovir (VGCV, Valcyte®), foscarnet (FOS, Foscavir®) e cidofovir (CDV, Vistide®) (Figura 11). Exceto o valganciclovir, que é administrado via oral, todos os demais compostos são administrados por via intravenosa (110).

Atualmente a terapêutica de escolha para a HCMV-doença em pacientes transplantados é o VGCV, um pró-fármaco oral do GCV, o qual foi desenvolvido para superar a baixa biodisponibilidade e substituir o GCV endovenoso na prática clínica (109). O VGCV é um L-valil éster do GCV o qual, após administração oral, é rapidamente convertido para GCV pelas esterases intestinais e hepáticas. O GCV é um análogo sintético da 2'-desoxiguanosina, o qual inibe a replicação do HCMV *in vitro* e *in vivo* (111).

O principal efeito adverso atribuído ao tratamento com GCV é a neutropenia, que ocorre em aproximadamente 30% dos pacientes. Além disso, mielossupressão e plaquetopenia também podem estar associados ao uso do medicamento (48). Alguns efeitos adversos associados ao uso de GCV podem ocorrer com o uso de VGCV (111).

O FOS (ácido fosfonofórmico), outro medicamento indicado para o tratamento do HCMV é um análogo do pirofosfato e tem ação antiviral de amplo espectro por inibir todas as viroses humanas causadas pelos vírus da família *Herpesviridae* (112). O FOS não necessita de qualquer modificação química para a atividade antiviral intracelular. O efeito adverso mais importante associado à terapia com o FOS é o comprometimento renal,

causando aumento duas a três vezes dos níveis de creatinina sérica em 20% a 30% dos pacientes submetidos ao tratamento com esta droga (109). Outros efeitos colaterais observados com menor frequência são hipofosfatemia, convulsões e úlceras penianas ou vulvares (48). Devido a este perfil de toxicidade desfavorável e ao fato de que o medicamento deve ser administrado intravenosamente de duas a três vezes ao dia, o FOS é reservado para a terapia de segunda linha. No entanto, o FOS é o medicamento preferido para pacientes que não apresentaram resposta ao tratamento com GCV (109).

O CDV, nucleosídeo análogo da citosina, cujo químico é (S)-1[3-hidroxido-2(phosphorylmethoxy)propyl] cytokine) é um medicamento de atividade de largo espectro contra vírus de DNA de cadeia dupla, incluindo os herpesvírus e altamente ativo contra o HCMV (109,113). No entanto a sua utilidade clínica é limitada uma vez que a droga é absorvida lentamente, além de causar nefrotoxicidade grave. Além disso, o CDV apresentou efeitos cancerígeno e teratogênico em estudos animais (109,114), devendo ser usado apenas quando outros agentes terapêuticos forem considerados inadequados (48).

Muita esperança foi colocada no maribavir, um composto que tem como alvo a UL97 kinase (110,115). Entretanto, o maribavir foi abandonado para o desenvolvimento clínico (110,116), já que esta droga não foi capaz de reduzir os índices de doença causada pelo HCMV na fase III do estudo (117).

Entre as várias tentativas de desenvolver novos fármacos para o tratamento da infecção causada pelo HCMV está o AIC246 (110,118,119). Este composto inibe a formação e liberação de partículas virais infecciosas por meio da ação no complexo terminase viral. Com base neste novo modo de ação, a resistência cruzada entre AIC246 e os agentes atualmente disponível não deve ocorrer. Além disso, durante a fase I e II da pesquisa, nenhum efeito tóxico foi observado (120). O futuro parece promissor com o uso do AIC246 no tratamento da HCMV-doença multirresistente (110,120).

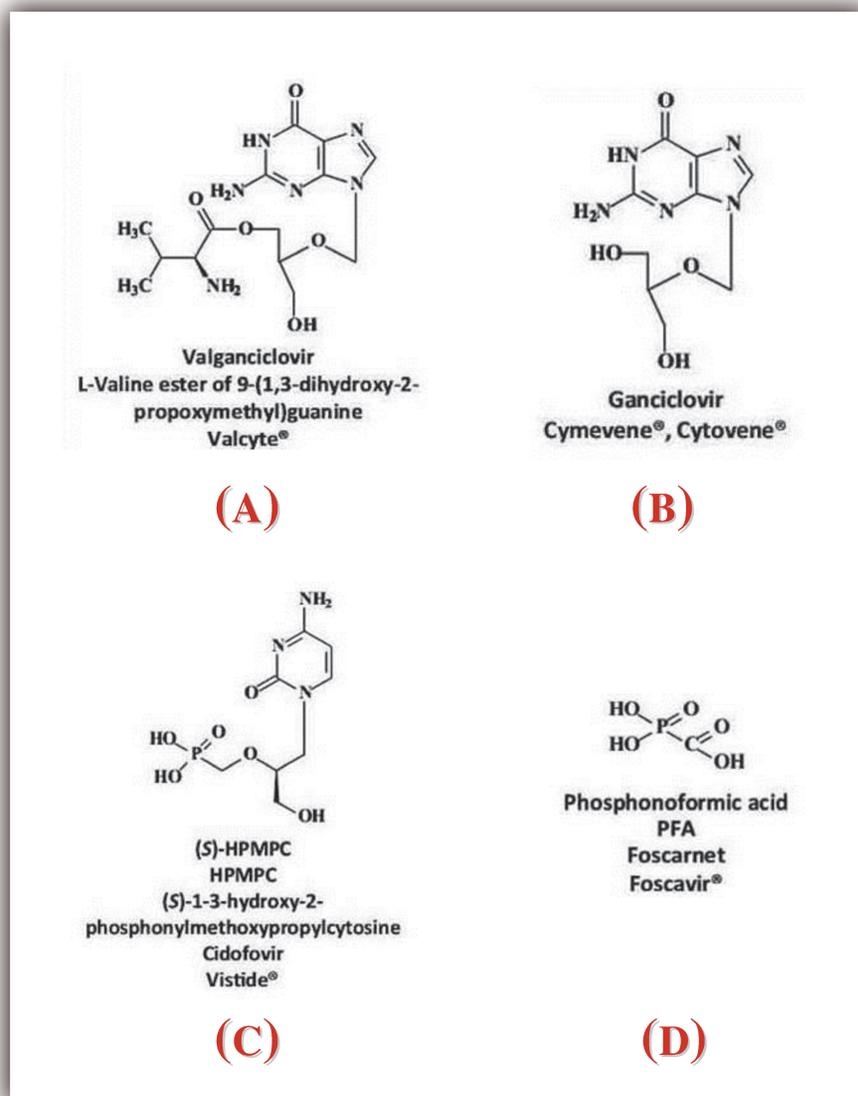


Figura 11. Estruturas químicas dos medicamentos utilizados para o tratamento do HCMV. (A) Valganciclovir (Valcyte®), (B) Ganciclovir (Cytovene®), (C) Cidofovir (Vistide®) e (D) Foscarnet (Foscavir®) (110).

Metadologia



4.1 DESENHO DO ESTUDO

O trabalho foi desenhado com a proposta de um estudo descritivo observacional. Os pacientes submetidos ao transplante alogênico de CTH na Unidade de Transplante de Medula Óssea/Hemocentro/Unicamp tiveram suas amostras analisadas pela antigenemia e PCR em tempo real semanalmente desde o transplante (dia 0) até o dia +150, período considerado de maior risco para a reativação do HCMV.

4.2 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O projeto em questão foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas/ UNICAMP em 2010, CAAE 0892.0.146.000-09, CEP num. 1157/2009 (Anexo 1). Houve dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por se tratar de testes realizados na rotina clínica dos pacientes durante o período precoce pós-TCTH (Anexo 2).

4.3 SELEÇÃO DOS PACIENTES INCLUÍDOS NO ESTUDO

No presente estudo, 49 pacientes foram selecionados de acordo com alguns critérios de inclusão e exclusão definidos previamente, não se levando em consideração critérios de vulnerabilidade como sexo, idade, doença de base, entre outros.

4.3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Os critérios adotados para a inclusão dos pacientes no estudo foram:

- ✓ Pacientes que realizaram TCTH do tipo alogênico aparentado ou não aparentado;
- ✓ Pacientes incluídos no protocolo da estratégia preemptiva para a prevenção da doença causada pelo HCMV;
- ✓ Sobrevida maior ou igual ao dia +30 pós-TCTH.

4.3.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Os critérios adotados para a exclusão dos pacientes no estudo foram:

- ✓ Transplante de CTH do tipo autólogo e singênico;
- ✓ Sobrevida menor ou igual ao dia +30 pós-TCTH.

4.4 COLETA DAS AMOSTRAS

As coletas das amostras ocorreram entre novembro de 2010 e outubro de 2013, em intervalos semanais durante os 5 primeiros meses pós-TCTH. As equipes de enfermagem, tanto da enfermagem quanto do ambulatório do Serviço de Transplante de Medula Óssea/Hemocentro/Unicamp foram responsáveis por coletar 6 mL de sangue periférico de cada paciente em tubo contendo anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), as quais foram enviadas para a realização da antígenemia e da PCR em tempo real para o diagnóstico do HCMV pelo “Laboratório de Vírus” e “Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular”, ambos vinculados ao departamento de Clínica Médica/ Faculdade de Ciências Médicas/ UNICAMP.

4.5 ANTIGENEMIA

A antígenemia é o método utilizado pelo Serviço de Transplante de Medula Óssea/Hemocentro/Unicamp como o “padrão ouro” para indicar a necessidade do tratamento com GCV e monitorar a resposta a este tratamento. Sendo assim, a mesma foi

realizada com o uso do Kit Comercial CMV Brite™ Turbo Kit (IQ Products, Groningen, The Netherlands), conforme recomendações do fabricante. À amostra de 2 mL de sangue periférico foi adicionado 30 mL da solução de lise de hemácias (cloreto de amônio [NH₄Cl], azida de sódio [NaN₃] < 0,1% e água desmineralizada) incubada a 4°C por 5 minutos e centrifugada por 2 minutos a 2500 rpm. O sobrenadante formado foi descartado. O pellet foi suspenso em 30 mL de PBS (fosfato de sódio dibásico [Na₂HPO₄], fosfato de sódio monobásico [NaH₂PO₄] e cloreto de sódio [NaCl]) e centrifugado por 2 minutos a 2500 rpm. O sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento formado foi suspenso em 1 mL de PBS. A concentração das células foi ajustada para 2,0 x 10⁶ células/mL e 100 µL desta solução foi utilizada para a preparação das lâminas (confeccionadas em duplicata). As células foram fixadas às lâminas com o reagente fixador (formaldeído [H₂CO] em PBS e azida de sódio [NaN₃] < 0,1%) por 5 minutos, lavadas em PBS por 3 minutos, seguida por permeabilização (Igepal Ca-630, soro de vitelo recém-nascido em PBS e azida de sódio [NaN₃] < 0,1%) por 1 minuto e lavagem, novamente com PBS, por 5 minutos. Após a confecção das lâminas 35 µL de solução MoAb C10/C11 (anticorpo monoclonal [rato] – mistura de C10 e C11 e azida de sódio [NaN₃] < 0,1%) foi adicionado às mesmas, sendo mantidas em incubação à 37°C por 20 minutos em câmara úmida, seguida por lavagem com PBS por 3 minutos. À lâmina seca aplicou-se 35 µL de conjugado (imunoglobulinas de ovelha anti-rato conjugadas com FITC e Azul de Evans e azida de sódio [NaN₃] < 0,1%), a qual ficou incubada por 20 minutos a 37°C, seguida por lavagem com PBS e água corrente. A avaliação microscópica foi realizada em microscópio de imunofluorescência, em que as células positivas apresentaram coloração nuclear polilobada amarelo-esverdeada homogênea. O resultado foi expresso como número de células *pp65*-positivas/200.000 leucócitos.

4.6 EXTRAÇÃO DO DNA DE LEUCÓCITOS TOTAIS

4.6.1 OBTENÇÃO DOS LEUCÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO

Em um tubo tipo Falcon (15 mL) foram adicionados 4 mL de sangue periférico e 8 mL de tampão de lise de hemácias (cloreto de amônio 0,0114M [NH₄Cl] e bicarbonato de amônio 0,01M [NH₄HCO₃]), o qual foi agitado vigorosamente e centrifugado a 2200 rpm por 12 minutos. Desprezou-se o sobrenadante e ao pellet formado adicionou-se 12 mL de tampão de lise de hemácias, sendo novamente agitado, centrifugado a 2200 rpm por 15 minutos e desprezado o sobrenadante. Ao pellet adicionou-se PBS 0,15M na quantidade necessária para totalizar 200µL, material posteriormente submetido à extração de DNA pelo kit QIAamp DNA Blood Mini® (Qiagen).

4.6.2 EXTRAÇÃO DO DNA PELO KIT QIAAMP DNA BLOOD MINI® (QIAGEN)

A extração do DNA foi realizada com o uso do kit QIAamp DNA Blood Mini® (Qiagen) conforme instruções do fabricante. Em um microtubo (1,5 mL) contendo 200µL de leucócitos periféricos foram adicionados 20 µL de protease e 200 µL de Buffer AL, agitado vigorosamente e incubado a 56°C por 10 minutos. Em seguida, após spin, adicionou-se 200 µL de álcool absoluto. Essa mistura foi transferida para uma coluna de extração a qual foi centrifugada por 3 minutos a 13000 rpm. O filtrado foi descartado e à coluna foi adicionado 500 µL de Buffer AW1, sendo centrifugada por 1 minuto a 8000 rpm. Novamente descartou-se o filtrado, adicionou-se 500 µL do Buffer AW2, seguido por centrifugação a 8000 rpm por 3 minutos. Após descartar o filtrado, adicionou-se 60 µL do Buffer AE à coluna de extração, a qual permaneceu em repouso em temperatura ambiente por 10 minutos. Após esta etapa, o tubo contendo a coluna foi centrifugado a 8000 rpm por 1 minuto e o DNA obtido foi armazenado a -20°C para posterior amplificação pela PCR em tempo real.

4.7 PROCEDIMENTOS PARA A REALIZAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL

4.7.1 DESENHO DOS *PRIMERS* E SONDA

Os *primers* e sonda utilizados para a realização da PCR em tempo real (Tabela 2) foram desenhados com o auxílio do software Primer Express® (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) para a região genômica US17 do HCMV, apontada por Ikewari et al (2005) como sendo a mais adequada para este diagnóstico (19). Em seguida, com o auxílio do programa BLAST foi realizada a análise de similaridade entre a sequência escolhida e genomas de outros patógenos, a qual não foi encontrada.

Tabela 2. Identificação das sequências dos *primers* e sonda utilizados na PCR em tempo real

Nome	Sequência	Sentido
<i>Primer</i> US17 F	5' GAAGGTGCAGGTGCCCTG 3'	<i>sense</i>
<i>Primer</i> US17 R	5' GTGTCGACGAACGACGTACG 3'	<i>antisense</i>
<i>Primer</i> US17F ex	5'AGCAGGGCCAAACAGATG3'	<i>sense</i>
Sonda HCMV	5' FAM ACGGTGCTGTAGACCCGCATACAAA TAMRA3'	

4.7.2 OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS *PRIMERS*

A otimização da concentração dos *primers* utilizados se baseou na amplificação de uma única amostra HCMV-positiva com diferentes concentrações dos *primers*, variando entre 150 a 600 nM, nas seguintes condições: 6 µL de SYBR® Green, 3 µL do mix de *primers* US17 F e US17 R (Tabela 2) e 3 µL da amostra nas seguintes ciclagens: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos a 95°C por 15 segundos sucedido por 60°C por 1 minuto. Todas as amostras foram amplificadas em triplicata. Após o término da PCR e análise da curva de dissociação observou-se apenas um pico mostrando a especificidade do

par de *primers*. Na *amplification plot* verificou-se a menor concentração dos *primers* que gerou máxima amplificação, esta sendo adotada para a realização da PCR em tempo real.

4.7.3 OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO DNA

Após a determinação da concentração ideal dos *primers* foram realizadas reações de amplificação pela PCR em tempo real variando as concentrações de uma amostra HCMV-positiva nas seguintes condições: 6 μL de SYBR® Green, 300nM de cada *primer* (US17 F e US17 R – Tabela 2) e 3 μL de uma única amostra em diferentes concentrações (1,25; 2,5; 5; 6,25; 10; 12,5 e 25 ng/ μL final) amplificadas em triplicata nas seguintes ciclagens: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos a 95°C por 15 segundos sucedido por 60°C por 1 minuto. Adotou-se a concentração que apresentou o menor valor do Ct de amplificação.

4.7.4 PCR EM TEMPO REAL UTILIZANDO CONTROLE INTERNO EXÓGENO POSITIVO (TAQMAN® EXOGENOUS INTERNAL POSITIVE CONTROL REAGENTS - IPC) E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO IDEAL DA SONDA TAQMAN®

Para a padronização da reação de amplificação foram seguidas as recomendações do kit TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents - IPC (VIC™ Probe – Applied Biosystems) adotando as concentrações ideais dos *primers* e amostra e alterando as concentrações da sonda TaqMan® (50 nM, 100 nM e 200 nM). A reação de amplificação foi realizada em triplicata nas seguintes condições: 25 μL de TaqMan® Universal Mastermix, 5 μL do reagente 10X Exo IPC Mix, 1 μL do reagente 50X Exo IPC DNA, 300 nM de cada *primer* (US17 F e US17 R – Tabela 2), 12,5 ng/ μL (concentração final) de uma amostra HCMV-positiva, sonda TaqMan® (Tabela 2) nas concentrações testadas e água deionizada para completar um volume final de 50 μL . Foram realizadas as seguintes condições de ciclagens: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos a 95°C por 15 segundos sucedido por 60°C por 1 minuto. Após o término da reação de PCR e análise da curva de amplificação do IPC, todas as amostras que apresentaram curva de amplificação foram consideradas apropriadas para a análise de quantificação da carga viral

(Gráfico 1). A análise da melhor concentração da sonda TaqMan® levou em consideração a concentração que apresentou o menor valor de Ct de amplificação.

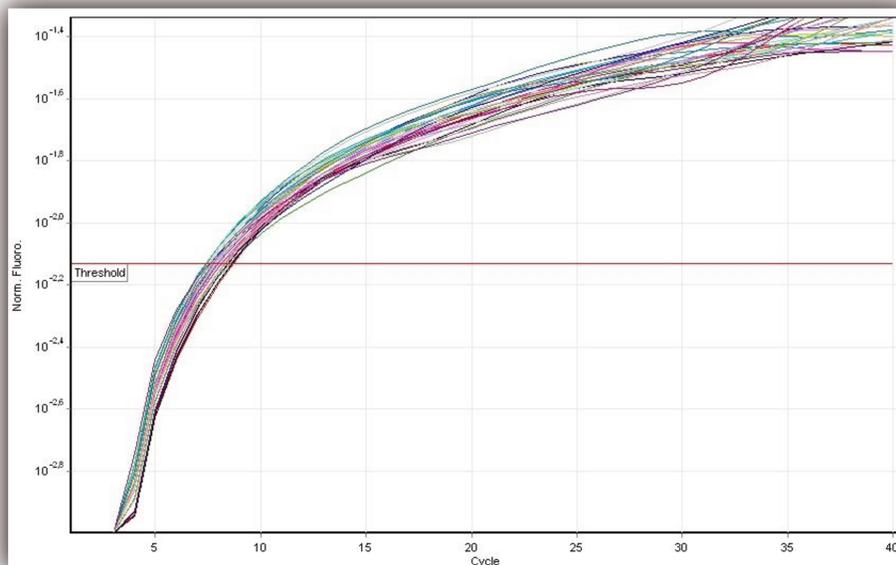


Gráfico 1. Gráfico de amplificação do Controle Exógeno Positivo (IPC) presente em todas as amostras analisadas.

4.7.5 CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO ABSOLUTA A PARTIR DE CLONAGEM MOLECULAR

4.7.5.1 *Nested-PCR para obtenção do inserto a ser ligado ao vetor*

O inserto de interesse foi obtido a partir da amplificação da cepa AD169 do HCMV nas seguintes condições: 10 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 2,5 mM de cloreto de magnésio, 1,25mM dos *primers* US17F ext e US17R (Tabela 2), 1,5 mM de cada desoxirribonucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,5 unidade de Taq DNA polimerase e água estéril para completar um volume final de 20 μ L. A reação da PCR foi compreendida por 30 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 40 segundos, precedidos por um período de denaturação inicial a 95°C durante 2 minutos e de

extensão final por 5 minutos a 72°C, resultando em um produto amplificado de 200 pares de base (pb) (121).

A Nested-PCR foi realizada nas mesmas condições da PCR anterior, utilizando-se 1 µL do produto da mesma como amostra e os *primers* US17F e US17R (Tabela 2) em volume final de 50µL. Os 50 ciclos de amplificação foram compostos por 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, precedidos por um período de denaturação inicial a 95°C durante 3 minutos (121). O produto amplificado foi analisado em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio sendo de 81pb (Figura 12).

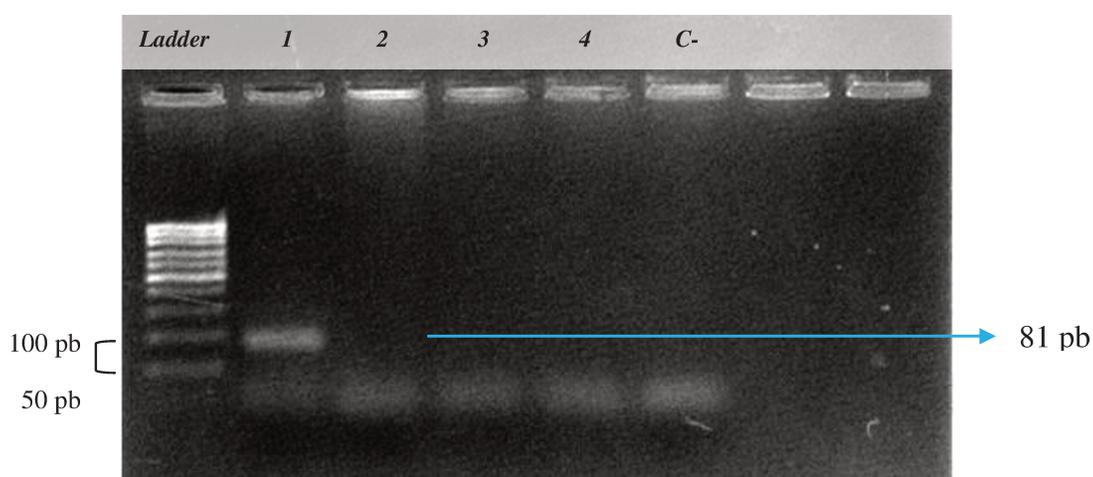


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 2%. (Ladder) marcador de peso molecular, (1) inserto – 81 pb, (2 – 4) amostras HCMV negativas e (C-) controle negativo.

4.7.5.2 Ligação do inserto ao vetor e transformação

Após a confirmação do inserto, o mesmo foi ligado a um vetor de clonagem, utilizando-se o Kit pGEM®-T Vector System I (Promega). Para tanto adicionou-se 1 µL (50ng) do pGEM®-T Vector, de 3015 pb, 3 µL do produto da Nested-PCR supracitada, 5 µL da solução 2X tampão de ligação rápida, 1 µL (3U/µL) da T4 DNA ligase e água estéril qsp para completar 10 µL. A solução foi homogeneizada e incubada *overnight* a 4°C. Após a reação de ligação, adicionou-se 5 µL dessa solução a 200 µL de cultura de células competentes (*Escherichia coli*), a qual foi misturada suavemente e mantida em

banho de gelo por 20 minutos, seguido por incubação a 42°C por 1 hora e 30 minutos e posterior banho de gelo por 2 minutos (121).

4.7.5.3 Incubação, multiplicação das células competentes e isolamento das colônias recombinantes

Após a etapa de transformação, as células competentes foram inseridas em 800 µL de meio SOC e incubada a 37°C por 1 hora em agitação (Thermomixer Comfort – Eppendorf). A seguir, a cultura foi centrifugada por 1 minuto a 8000 rpm, e mais da metade da solução foi descartada. O pellet foi homogeneizado e, com alça de vidro, cerca de 200 µL foi aplicado em meio de cultura e mantido *overnight* a 37°C. Após o crescimento das colônias, as colônias brancas, que deveriam conter o vetor recombinante (inserto + vetor) e que não expressaram o gene lacZ, foram selecionadas e removidas com palitos descartáveis (121).

4.7.5.4 Amplificação do DNA recombinante

Cada colônia branca removida com palito descartável foi inserida em um poço da microplaca *Deep – Well* de 96 poços contendo meio *Circle Grow* e deixado crescer a 37°C de um dia para outro. Em seguida foi realizada, a partir da cultura turva, a PCR para amplificação do DNA recombinante para posterior purificação e sequenciamento. A PCR, de volume final de 15 µL, seguiu as seguintes condições: 2 µL da cultura do vetor recombinante, 1,5 µL de solução tampão, 1,5 µL de dNTP (1,25 mM), 0,5 µL de MgCl₂ (50mM), 0,35 µL do *primer sense* e 0,35 µL do *primer antisense*, ambos do vetor, 0,35 µL de Taq DNA polimerase e 8,6 µL de água estéril, submetidos as seguinte condições de amplificação: denaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida por 30 ciclos de 94°C por 20 segundos, 58°C por 15 segundos e 72°C por 1 minuto. O produto da PCR foi submetido à eletroforese e visualizado em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio para a confirmação do vetor recombinante de 3096 pb (121).

4.7.5.5 Sequenciamento automatizado

O produto da reação de amplificação do vetor recombinante foi submetido à purificação e sequenciamento automatizado (ABI PRISM 377). Para tanto foram utilizados 1,2 µL do produto da PCR anteriormente realizada, 1 µL de primer *antisense* do vetor, 4 µL do pré mix, regente pronto contendo o corante para o sequenciamento e 9 µL de água estéril. A reação foi submetida às seguintes condições de amplificação: denaturação inicial por 96°C a 1 minuto, seguidos por 30 ciclos compreendidos por 96 °C por 10 segundos, 57°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. O produto da PCR foi submetido a uma reação de precipitação utilizando o seguinte protocolo: 2 µL de acetato de amônio 7,5M e 50 µL de etanol 100%. Após 15 minutos no escuro, a reação foi centrifugada por 30 minutos a 4000 rpm e o sobrenadante foi descartado. Acrescentou-se 100 µL de etanol 70% , seguido por centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos. A amostra foi aquecida a 65°C por 5 minutos e sequenciada no ABI PRISM 377. A sequência obtida foi comparada à literatura e à base de dados do *GenBank* para confirmação do inserto (121).

4.7.5.6 Extração do DNA do fragmento clonado e linearização do vetor recombinante

Após a confirmação do DNA recombinante pelo sequenciamento, realizou-se cultura da amostra em meio SOC a 37°C por cerca de 12 horas, seguida por extração do DNA do vetor recombinante com o uso do kit Wizard® SV Plasmid DNA Purification System (Promega), conforme instruções do fabricante. A partir da leitura em espectrofotômetro do DNA referente ao vetor recombinante ($2,8 \times 10^{-7}$ g/µL) foi realizada a digestão com enzima de restrição (*EcoRI*) para linearização do DNA circular. A digestão foi realizada com 1 µg do DNA referente ao vetor recombinante, 1 µL de Tampão 10x, 1 µL da enzima *EcoRI* e água em volume final de 10 µL. Esta reação ficou incubada por 12 horas a 37°C (121). A partir do produto desta reação foi obtida a amostra padrão, utilizada para a construção da curva padrão absoluta.

4.7.5.7 Construção da curva padrão absoluta

A conversão da concentração da amostra padrão obtida em g/ μ L para genoma equivalente/ μ L, também conhecido como cópias/ μ L, foi realizada utilizando-se os parâmetros de peso molecular do DNA recombinante, conforme descrito por Whelan et al (2003) (122):

CÁLCULO DO PESO EM DALTONS DO DNA RECOMBINANTE:

Tamanho da dupla fita do DNA recombinante (pb) x Peso de cada nucleotídeo (g/mol)

Sendo:

Tamanho da dupla fita do DNA recombinante: 6192 pb

Peso em daltons (g/mol) de cada nucleotídeo: ~330

Logo, o peso molecular do DNA recombinante é 2×10^6 g/mol

CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DO DNA RECOMBINANTE:

Leitura em espectrofotômetro do DNA referente ao vetor recombinante: $2,8 \times 10^{-7}$ g/ μ L

Peso molecular do DNA referente ao vetor recombinante: 2×10^6 g/mol

Como: 1 mol de DNA recombinante = 2×10^6 g

X moles de DNA recombinante = $2,8 \times 10^{-7}$ g/ μ L

X = $1,4 \times 10^{-13}$ moles/ μ L

Sabendo-se que: 1 mol = $6,023 \times 10^{23}$ moléculas

X = $1,4 \times 10^{-13}$ x $6,023 \times 10^{23}$

X = $8,4 \times 10^{10}$ moléculas de genoma equivalente/ μ L

Após esta conversão, a amostra padrão, de $8,4 \times 10^{10}$ moléculas de genoma equivalente/ μL foi utilizada como estoque. Como a protocolo da PCR em tempo real para a amplificação dos pontos da curva padrão absoluta foi configurado de modo que $3\mu\text{L}$ da amostra padrão fossem pipetados para cada reação, os cálculos da massa e da concentração final da amostra padrão necessárias para ajustar a concentração em 70^9 moléculas de genoma equivalente foram realizados. A partir deste ajuste de concentração, realizou-se diluições seriadas (1:10) até obter a concentração de 0,7 moléculas de genoma equivalente, totalizando 11 amostras diluídas, as quais foram amplificadas pela PCR em tempo real, conforme protocolo supracitado.

4.7.6 VALIDAÇÃO DO PROTOCOLO DA PCR EM TEMPO REAL

A validação do protocolo da PCR em tempo real se baseou nas análises de especificidade, intervalo de trabalho e linearidade, limite de detecção (sensibilidade analítica), limite de quantificação, repetibilidade e precisão intermediária.

A análise de especificidade foi realizada com o intuito de comprovar que a PCR em tempo real diagnostica e quantifica apenas o HCMV. Para tanto, cepas e controles positivos de todos os vírus humanos pertencentes a família *Herpesviridae* (HHV1 – HHV8) foram submetidos à amplificação pela PCR em tempo real, conforme protocolo supracitado.

O intervalo de trabalho, referente à faixa de concentração em que a sensibilidade é constante (123), foi avaliado para definir as concentrações da amostra padrão que seriam adotadas para a construção da curva padrão absoluta.

A linearidade, definida como a capacidade do método em produzir resultados linearmente proporcionais na faixa de trabalho previamente determinada (123) foi avaliada de acordo com o coeficiente de correlação linear (r) da curva padrão absoluta, em que, segundo Brito et al (2003), valores entre 0,91 e 0,99 apresentam fortíssima correlação (124).

A determinação do limite de detecção levou em consideração a concentração do alvo que produz um sinal de 5 vezes a razão do sinal/ruído do equipamento utilizado para a

amplificação do HCMV pela PCR em tempo real, calculada de acordo com a fórmula apresentada por Forti et al (2011) (123).

O limite de quantificação, definido como a menor concentração do alvo que pode ser detectada e quantificada com um nível aceitável de exatidão e precisão, foi baseado na menor concentração da curva padrão absoluta (123).

Por fim, a precisão do método se baseou na análise de repetibilidade e precisão intermediária, também conhecida por variabilidade intralaboratorial. A repetibilidade pode ser definida como grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de uma mesma amostra, efetuadas sob as mesmas condições (analista, instrumento, local e tempo) (123). Já a precisão intermediária refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas em tempos diferentes (123). Para tanto, 5 amostras HCMV-positivas, de diferentes concentrações, foram submetidas à amplificação pela PCR em tempo real, sempre em quintuplicatas, com resultados expressos em logaritmo (\log_{10}). A análise de repetibilidade se baseou na similaridade dos resultados apresentados pelas quintuplicatas. Já a precisão intermediária foi avaliada a partir de amplificações destas mesmas amostras em diferentes reações. Em ambas as análises considerou-se o cálculo do desvio-padrão (SD) e do coeficiente de variação (CV).

4.7.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A determinação dos valores dos *cutoffs* indicativos para a infecção causada pelo HCMV com necessidade de tratamento antiviral e sugestivo para o acometimento de órgãos por este vírus foi baseada na construção da curva ROC (*Receiver operating characteristic*), conforme R Core Team (2013) (125). Para tanto, utilizou-se como “padrão ouro” resultados de antigenemia ≥ 3 células *pp65*-positivas/200000 leucócitos e resultados HCMV-positivos em biópsia, respectivamente.

A avaliação da correlação estatística existente entre os resultados apresentados pela antigenemia e pela PCR em tempo real baseou-se no coeficiente de correlação de Pearson, em que: (A) Correlação perfeita: $r=1$, (B) Correlação fortíssima: $0,91 < r < 0,99$, (C) Correlação forte: $0,61 < r < 0,91$, (D) Correlação média $0,31 < r < 0,60$, (E) Correlação fraca: $0,01 < r < 0,30$ e (F) Correlação nula: $r=$ zero (124). Já a probabilidade de associação

entre os resultados da antigenemia e da PCR em tempo real, assim como as variáveis apontadas como fatores de risco para a reativação viral e HCMV-doença se basearam no teste exato de Fisher, com intervalo de confiança de 95%, em que valores de $p \leq 0,05$ indicaram associação estatisticamente significativa entre as variáveis avaliadas.

4.7.8 ANÁLISE DA TAXA DE REPLICAÇÃO DO HCMV

A análise da taxa de replicação do HCMV se baseou no cálculo do tempo de duplicação do HCMV, conforme estimado por Muñoz-Cobo et al (2011) (126). Para tanto, foram consideradas 2 quantificações, sendo q1 a carga viral quantificada no primeiro diagnóstico da infecção ativa causada pelo HCMV e q2 a carga viral da amostra subsequente a este diagnóstico, conforme a seguinte fórmula:

$$\text{Tempo de duplicação do HCMV} = (t2 - t1) * \log(2) / \log(q2/q1)$$

Em que:

t2 = dia pós-TCTH da amostra subsequente ao primeiro diagnóstico da infecção ativa causada pelo HCMV

t1 = dia pós-TCTH do primeiro diagnóstico da infecção ativa causada pelo HCMV

q2 = quantificação do HCMV (cópias) em t2

q1 = quantificação do HCMV (cópias) em t1

4.7.9 ANÁLISE DA RESPOSTA AO TRATAMENTO ANTIVIRAL

A resposta ao tratamento com GCV foi avaliada de acordo com o histórico da cinética da carga viral do HCMV. Baseado na análise da regressão linear dos resultados das amostras coletadas durante o tratamento com GCV (expressos em \log_{10}) é possível avaliar a eficácia do tratamento antiviral em bloquear a replicação do HCMV. Como o declínio da carga viral e o tempo de tratamento antiviral apresentam relação inversamente proporcional, uma boa resposta ao tratamento com GCV está associada a valores negativos

da inclinação da reta de tendência em que o valor de M indica a taxa de redução em \log_{10} cópias do HCMV/dia. Os coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2) estão associados à progressiva redução do HCMV, em que valores próximos de 1 indicam diminuição gradual da carga viral ao longo do tratamento e valores próximos de 0 podem estar associados à intermitência de baixos valores de carga viral.

4.7.10 CRITÉRIOS UTILIZADOS PARA DEFINIR A DOENÇA CAUSADA PELO HCMV

Conforme descrito por Ljungman et al (67) o diagnóstico da doença causada pelo HCMV se baseou na presença de manifestações clínicas compatíveis com o HCMV associadas a resultados HCMV-positivos em biópsia do tecido acometido.

- ✓ Sintomas da infecção ativa causada pelo HCMV: febre, encefalite, mielite, pneumonia intersticial, colite, gastrite, hepatite, esofagite e retinite;

- ✓ Pneumonia causada pelo HCMV (HCMV-pneumonia): presença de sinais e/ou sintomas de doença pulmonar combinado com a detecção do HCMV em LBA ou biópsia de pulmão. A detecção deve ser realizada por cultura celular, testes histopatológicos, análise imunohistoquímica ou hibridização *in situ*;

- ✓ Doença gastrointestinal causada pelo HCMV (HCMV-TGI): sintomas gastrointestinais (colite, gastrite ou esofagite) associados a resultados HCMV-positivos em biópsia das lesões do TGI;

- ✓ Hepatite: associação da demonstração do HCMV em biópsias hepáticas por cultura, imunohistoquímica, hibridização *in situ* ou PCR, achados histopatológicos consistentes com hepatite ou colangite e aumento de pelo menos 2 vezes o valor máximo normal de alanina aminotransferase;

- ✓ Doenças Neurológicas: sintomas como encefalite, mielite transversa ou outros sinais de doença difusa do SNC juntamente com a detecção de HCMV em fluido cerebrospinal por PCR, cultura ou detecção do antígeno;

✓ Retinite: lesões oftalmológicas típicas, com ou sem provas virológicas, diagnosticadas pelo exame de fundo de olho, com presença de retinite necrotizante e infiltrado branco algodinoso, áreas de hemorragia e irite e vitrite mínima.

Resultados



5.1 DESENVOLVIMENTO DA PCR EM TEMPO REAL

A otimização das concentrações dos *primers*, DNA e sonda TaqMan[®] se baseou nos valores de Ct de amplificação das replicatas. Deste modo, verificou-se a menor concentração que gerou máxima amplificação, sendo: *primers* de 300 nM (Gráfico 2), DNA de 12,5 ng/μL (Tabela 3) e sonda TaqMan[®] de 100 nM (Gráfico 3).

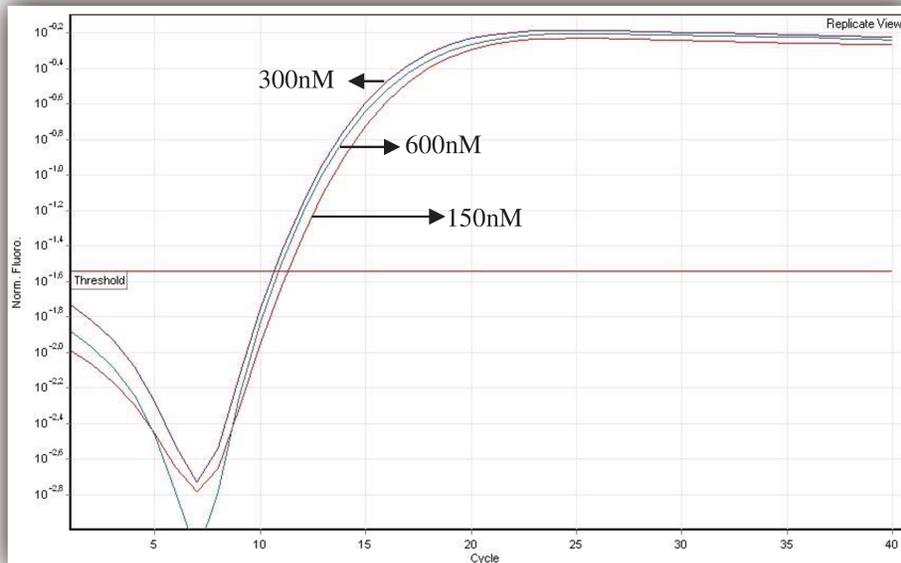


Gráfico 2. Gráfico de amplificação de uma amostra HCMV-positiva com diferentes concentrações dos *primers*. As réplicas foram agrupadas para melhor visualização das curvas de amplificação (150nM – Ct: 11,28 ; 300nM – Ct: 10,63 ; 600nM – Ct: 10,84).

Tabela 3. Valores dos Cts de amplificação de uma amostra HCMV-positiva nas diferentes matrizes de concentração

Concentração final da amostra	Ct de amplificação
1,25 ng/uL final	24,11
2,5 ng/uL final	23,15
5 ng/uL final	22,75
6,25 ng/uL final	23,21
10 ng/uL final	22,59
12,5 ng/uL final	22,54
25 ng/uL final	23,22

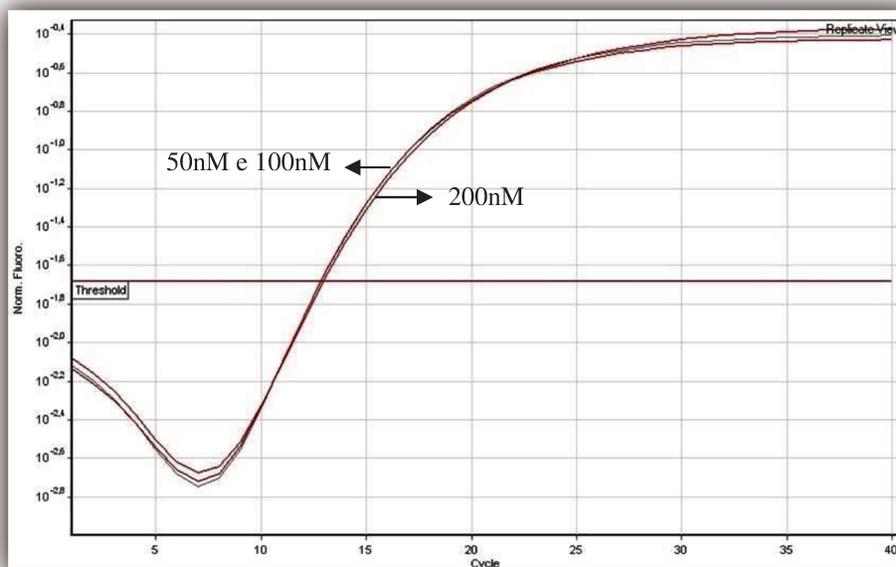


Gráfico 3. Gráfico de amplificação de uma amostra HCMV-positiva com diferentes concentrações da sonda TaqMan[®]. As réplicas foram agrupadas para melhor visualização das curvas de amplificação (50nM – Ct: 12,68; 100nM – Ct: 12,55; 200nM – CT: 12,57).

5.2 CONSTRUÇÃO DA CURVA PADRÃO ABSOLUTA

A construção da curva padrão absoluta para a quantificação do HCMV pela PCR em tempo real foi realizada com êxito. Após a amplificação das 11 amostras obtidas através da diluição seriada, os pontos escolhidos para serem utilizados como curva padrão absoluta foram 70^7 , 70^6 , 70^5 , 70^4 , 70^3 , 70^2 e 70 moléculas de genoma equivalente (cópias). Após a amplificação em triplicata destes 7 pontos da curva padrão os seguintes parâmetros foram obtidos: eficiência de 100% ($E=1$), inclinação da reta (*slope* ou M) igual a -3,325, coeficiente de correlação linear (r) de 0,9988 e valor do coeficiente de determinação (r^2) de 0,9977 (Gráficos 4 e 5).

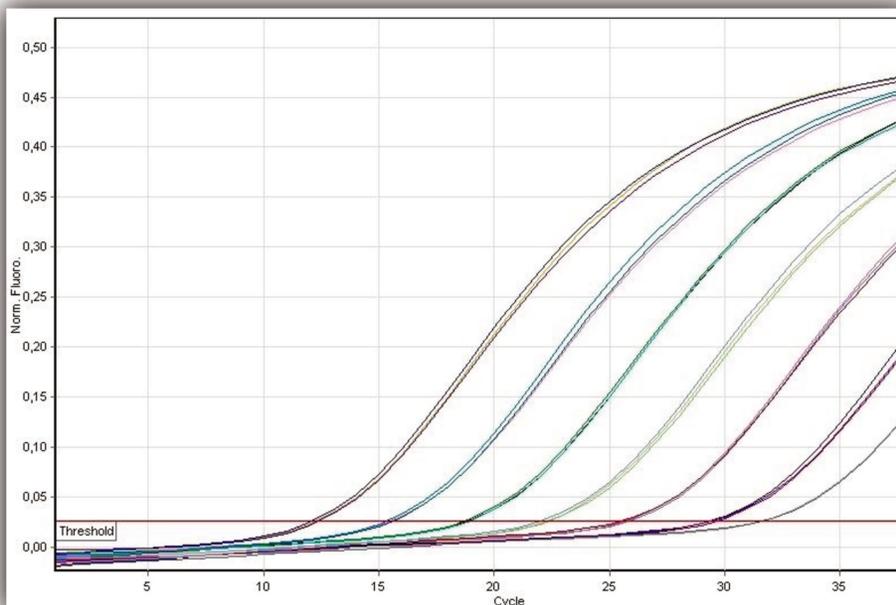


Gráfico 4. Gráfico de amplificação das 7 amostras da curva padrão absoluta pela PCR em tempo real.

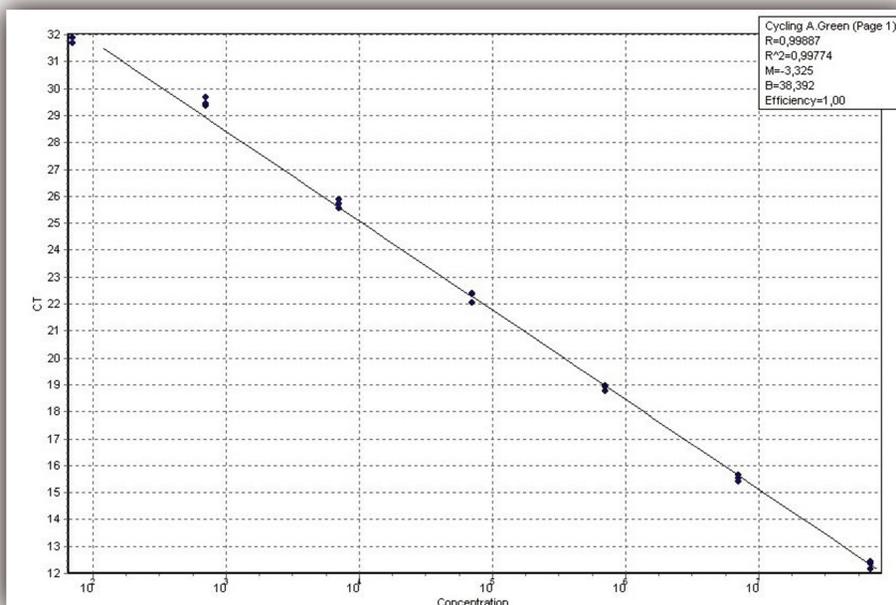


Gráfico 5. Curva padrão absoluta da PCR em tempo real para a quantificação do HCMV. Diluição de 10^7 a 10^1 realizadas em triplicata (E=1; M= -3,325; $r^2=0,9977$).

5.3 VALIDAÇÃO DO PROTOCOLO DA PCR EM TEMPO REAL PARA O HCMV

O primeiro passo da validação do protocolo da PCR em tempo real se baseou na análise da faixa de trabalho e linearidade do método. Baseado nos parâmetros estatísticos obtidos após a amplificação em triplicata dos pontos da curva padrão absoluta (E=1; M= -3,325; $r=0,9988$ e $r^2=0,9977$), comprovou-se a excelente linearidade do método no intervalo de trabalho entre 10^7 e 10^1 moléculas de genoma equivalente ou cópias do HCMV.

Após a certificação da linearidade da técnica, a especificidade do protocolo foi comprovada após a realização da PCR em tempo real utilizando como amostras cepas ou controles positivos dos oito herpesvírus humanos, observando-se a curva de amplificação somente da cepa AD169 do HCMV. Em seguida, baseado em Brito et al (2003) (124), conforme demonstrado abaixo, calculou-se o limite de detecção atribuído a PCR em tempo real, sendo de 5,6 cópias de HCMV.

$$\text{Limite de detecção} = \bar{X} + 5*s$$

Em que:

\bar{X} = média das intensidades de sinal obtidas para 30 leituras do branco

s = coeficiente linear da equação da curva de calibração

O limite de quantificação atribuído ao protocolo da PCR em tempo real utilizado foi de 70 cópias, correspondente a menor concentração da curva padrão absoluta (124). Já a precisão da PCR em tempo real foi comprovada a partir das análises de repetibilidade e precisão intermediária em 5 amostras HCMV-positivas de diferentes concentrações, em que os valores de desvio padrão (SD) foram próximos de 0 e do coeficiente de variação (CV%) menores que 5% (Tabela 4).

Tabela 4. Análise de repetibilidade e precisão intermediária da PCR em tempo real realizada em 5 amostras HCMV-positivas

Amostras	REPETIBILIDADE												PRECISÃO INTERMEDIÁRIA	
	EXPERIMENTO 1				EXPERIMENTO 2				EXPERIMENTO 3				SD Log ₁₀ cópias	CV(%) Log ₁₀ cópias
	Log ₁₀ cópias	Média Log ₁₀ cópias	SD Log ₁₀ cópias	CV(%) Log ₁₀ cópias	Log ₁₀ cópias	Média Log ₁₀ cópias	SD Log ₁₀ cópias	CV(%) Log ₁₀ cópias	Log ₁₀ cópias	Média Log ₁₀ cópias	SD Log ₁₀ cópias	CV(%) Log ₁₀ cópias		
#1		6,93	0,04	0,54		6,95	0,06	0,92		6,95	0,04	0,55		
Replicata 1	6,98				7,04				7,00				0,03	0,48
Replicata 2	6,94				6,97				6,98				0,02	0,28
Replicata 3	6,93				6,96				6,96				0,02	0,22
Replicata 4	6,91				6,92				6,92				0,01	0,12
Replicata 5	6,88				6,87				6,91				0,02	0,33
#2		4,85	0,03	0,64		4,85	0,07	1,49		4,94	0,05	0,95		
Replicata 1	4,88				4,93				4,99				0,05	1,07
Replicata 2	4,88				4,88				4,99				0,06	1,29
Replicata 3	4,86				4,87				4,92				0,03	0,62
Replicata 4	4,82				4,83				4,90				0,04	0,82
Replicata 5	4,81				4,74				4,89				0,08	1,63
#3		2,82	0,11	3,81		2,86	0,04	1,43		2,77	0,07	2,48		
Replicata 1	2,99				2,91				2,84				0,08	2,71
Replicata 2	2,81				2,89				2,83				0,04	1,36
Replicata 3	2,80				2,85				2,75				0,05	1,75
Replicata 4	2,79				2,82				2,74				0,04	1,45
Replicata 5	2,70				2,81				2,67				0,08	2,80

#4	2,36	0,04	1,52		2,51	0,07	2,80		2,43	0,06	2,47		
<i>Replicata 1</i>	2,40			2,56				2,50				0,08	3,12
<i>Replicata 2</i>	2,38			2,55				2,49				0,09	3,47
<i>Replicata 3</i>	2,34			2,54				2,43				0,10	4,27
<i>Replicata 4</i>	2,33			2,52				2,38				0,10	4,03
<i>Replicata 5</i>	2,32			2,39				2,37				0,04	1,49
#5	1,53	0,01	0,58		1,52	0,02	1,36		1,53	0,01	0,38		
<i>Replicata 1</i>	1,54			1,54				1,53				0,00	0,24
<i>Replicata 2</i>	1,54			1,53				1,53				0,00	0,23
<i>Replicata 3</i>	1,54			1,52				1,53				0,01	0,40
<i>Replicata 4</i>	1,53			1,51				1,52				0,01	0,41
<i>Replicata 5</i>	1,52			1,49				1,52				0,02	1,28

SD: desvio padrão; CV (%): coeficiente de variação

5.4 SELEÇÃO DO PACIENTES E COLETA DAS AMOSTRAS

Entre o período de novembro de 2010 e maio de 2013 125 TCTH foram realizados na Unidade de Transplante de Medula Óssea/Hemocentro/Unicamp. Sessenta e um pacientes foram excluídos por terem sido submetidos ao TCTH do tipo autólogo ou singênico. Dos 64 TCTH alogênico realizados neste período, 6 pacientes apresentaram sobrevida < 30 dias pós-transplante. Sendo assim, 58 TCTH alogênicos apresentaram os pré-requisitos para a inclusão no estudo. Entretanto, em 5 casos, o TCTH foi realizado em pacientes já anteriormente monitorados, restando 53 pacientes. Quatro desses pacientes foram excluídos por não apresentarem coletas regulares, totalizando 49 pacientes incluídos no estudo (Figura 16 e Tabela 5).

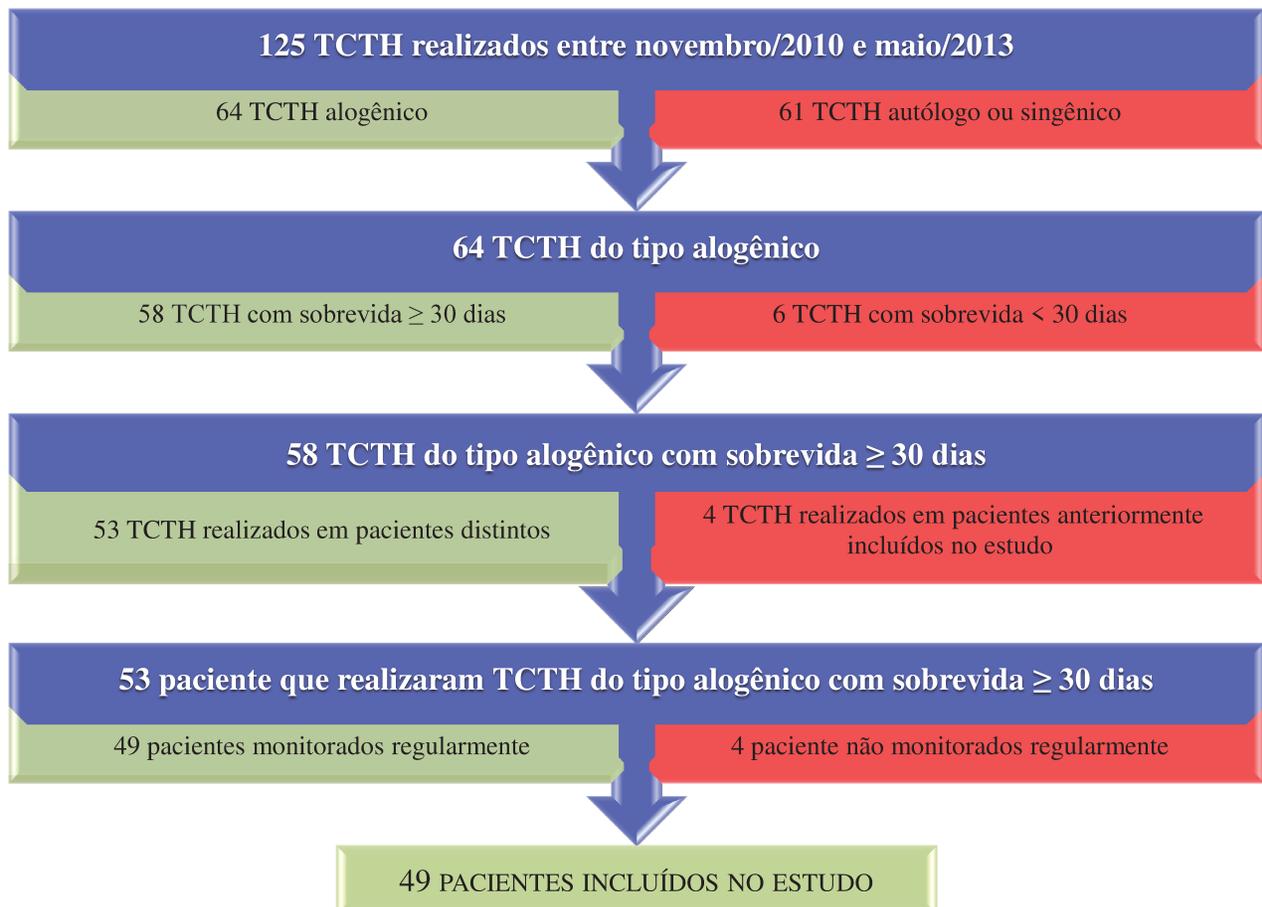


Figura 16. Esquema utilizado para a seleção dos pacientes incluídos no estudo.

Tabela 5. Características dos pacientes incluídos no estudo

ID PACIENTE	IDADE (ANOS)	SEXO	DOENÇA DE BASE	DATA TCTH	HCMV IgG Pré-TCTH (R/D)	ENXERTO	INTENSIDADE DO REGIME DE CONDICIONAMENTO (TRATAMENTO)	Nº DE AMOSTRAS COLETADAS
PACIENTE 1	43	M	LNH (Linfoma não-Hodgkin de grandes células B)	25/11/10	+/+	CPP	RIC (Bu/Flu)	14
PACIENTE 2	31	F	AAS (Anemia Aplástica Severa)	20/01/11	+/+	MO	MIELOABL (Bu/Cy)	20
PACIENTE 3	27	M	AF (Anemia Falciforme)	10/02/11	+/+	MO	MIELOABL (Bu/Flu/ATG/TBI)	21
PACIENTE 4	23	F	AAS (Anemia Aplástica Severa – Origem idiopática)	03/03/11	+/+	MO	MIELOABL (Bu/Cy)	21
PACIENTE 5	59	F	Mielodisplasia (Mielofibrose 1 ^{ária} de alto risco)	29/03/11	+/+	CPP	RIC (Bu/Flu)	41
PACIENTE 6	57	M	DH (Doença de Hodgkin)	31/03/11	+/+	CPP	RIC (Flu/TBI)	21
PACIENTE 7	14	M	SMD (Síndrome Mielodisplásica 2 ^{ária} a LMA)	13/05/11	+/+	CPP	MIELOABL (Bu/Cy/ATG)	18
PACIENTE 8	30	M	LLA (Leucemia Linfóide Aguda – linhagem B comum)	11/05/11	+/+	CPP	MIELOABL (Bu/Cy/VP16)	20
PACIENTE 9	68	M	LMA (Leucemia Mielóide Aguda – 1 ^a RC)	04/07/11	+/+	CPP	RIC (Bu/Flu)	15
PACIENTE 10	61	F	LNH (Linfoma não-Hodgkin de grandes células B– 3 ^a RC)	02/08/11	+/+	CPP	RIC (Bu/Flu)	19
PACIENTE 11	56	M	LNH (Linfoma não-Hodgkin folicular de células do manto)	10/08/11	+/+	CPP	RIC (Flu/TBI)	20
PACIENTE 12	42	M	LMA (Leucemia Mielóide Aguda com aparecimento de Sarcoma granulocítico)	11/08/11	+/+	CPP	MIELOABL (Bu/Cy)	14
PACIENTE 13	47	M	LNH (Linfoma não- Hodgkin)	18/08/11	+/+	CPP	RIC (Flu/TBI)	18
PACIENTE 14	52	F	LNH (Subtipo: Linfoma Linfoplasmocítico/Macroglobulinemia de Waldenström com aplasia medular 2 ^{ária} a quimioterapia)	15/08/11	+/+	CPP	RIC (Bu/Flu)	21
PACIENTE 15	63	F	AAS (Anemia Aplástica com clone HPN e falência medular)	15/09/11	+/+	MO	MIELOABL (Bu/Cy)	20
PACIENTE 16	34	M	LMC (Leucemia Mielóide Crônica – portador da mutação	23/09/11	+/+	MO	MIELOABL (Bu/Cy/ATG)	18

T315i e Ph+)

PACIENTE 17	21	M	AAS (Anemia Aplástica Severa)	13/10/11	+/+	MO	MIELOABL (Bu/Cy)	4
PACIENTE 18	60	F	LMA (Leucemia Mielóide Aguda - 1ª RC e Sarcoma granulocítico T4 a L1)	11/10/11	+/+	CPP	RIC (Bu/Flu)	20
PACIENTE 19	32	F	LLA (Leucemia Linfóide Aguda com cromossomo Ph+ e DRM+)	27/10/11	+/-	CPP	MIELOABL (Bu/Cy/VP)	20
PACIENTE 20	45	F	LMA (Leucemia Mielóide Aguda)	17/11/11	+/+	MO	MIELOABL (Bu/Cy)	4
PACIENTE 21	36	F	DH (Doença de Hodgkin)	17/11/11	+/+	CPP	RIC (Flu/TBI)	17
PACIENTE 22	40	F	LMC (Leucemia Mielóide Crônica)	30/11/11	+/+	CPP	MIELOABL (Bu/Cy/ ATG)	16
PACIENTE 23	24	F	LMA (Leucemia Mielóide Aguda – 1ª RC)	01/12/11	+/+	MO	MIELOABL (Bu/Cy)	20
PACIENTE 24	21	F	LLA (Leucemia Linfóide Aguda – 1ª RC)	16/02/12	+/+	MO	MIELOABL (Bu/Cy/VP)	22
PACIENTE 25	49	M	LMA (Leucemia Mielóide Aguda – 1ª RC)	08/03/12	+/+	MO	MIELOABL (Bu/Cy)	23
PACIENTE 26	40	F	LMA (Leucemia Mielóide Aguda com maturação M2 - 1ª RC)	28/03/12	+/+	MO	MIELOABL (Bu/Cy)	21
PACIENTE 27	52	F	SMD (Síndrome Mielodisplásica - AREB II)	12/04/12	+/+	CPP	MIELOABL (Bu/Cy)	22
PACIENTE 28	53	M	SMD (Síndrome Mielodisplásica)	17/05/12	+/+	MO	MIELOABL (Bu/Cy)	7
PACIENTE 29	23	M	LMA (Leucemia Mielóide Aguda - M5 - 1ª RC)	24/05/12	+/+	MO	MIELOABL (Bu/Cy)	19
PACIENTE 30	34	M	LMA (Leucemia Mielóide Aguda - 1ª RC)	30/05/12	+/+	CPP	MIELOABL (Bu/Cy)	22
PACIENTE 31	33	M	LMA (Leucemia Mielóide Aguda M5b - 1ª RC)	11/06/12	+/+	CPP	MIELOABL (Bu/Cy)	22
PACIENTE 32	50	M	SMD (Síndrome Mielodisplásica)	21/06/12	+/+	MO	MIELOABL (Bu/Cy)	9
PACIENTE 33	54	M	LMC (Leucemia Mielóide Crônica – fase crônica)	28/06/12	+/+	CPP	MIELOABL (Bu/Cy/ATG)	21
PACIENTE 34	23	F	AAS (Anemia Aplástica Severa)	18/07/12	+/-	MO	MIELOABL (Flu/Cy/ ATG/TBI)	8
PACIENTE 35	16	F	AAS (Anemia Aplástica Severa)	26/07/12	+/+	MO	MIELOABL (Flu/Cy/ATG/TBI)	8

PACIENTE 36	29	M	LMA (Leucemia Mieloide Aguda – 1ª RC)	22/08/12	+/+	MO	MIELOABL (Bu/Cy/ATG)	22
PACIENTE 37	65	M	LMA (Leucemia Mieloide Aguda)	21/08/12	+/+	CPP	RIC (Bu/Flu)	21
PACIENTE 38	34	M	AAS (Anemia Aplástica Severa)	13/08/12	+/+	MO	MIELOABL (Bu/Cy)	19
PACIENTE 39	39	F	LMA (Leucemia Mieloide Aguda – 1ª RC)	30/08/12	+/+	MO	MIELOABL (Bu/Cy)	14
PACIENTE 40	58	M	LLC (Leucemia Linfoide Crônica B – 2ª Recidiva)	02/10/12	+/+	CPP	RIC (Bu/Flu)	18
PACIENTE 41	52	F	LMA (Leucemia Mieloide Aguda – 2ª RC)	08/11/12	+/+	CPP	MIELOABL (Bu/Cy)	14
PACIENTE 42	35	M	LNH (Linfoma não-Hodgkin)	11/12/12	+/+	CPP	RIC (Bu/Flu)	17
PACIENTE 43	17	M	LMC (Leucemia Mieloide Crônica – fase acelerada)	13/12/12	+/+	CPP	MIELOABL (Bu/Cy)	14
PACIENTE 44	63	F	MM (Mieloma Múltiplo)	17/01/13	+/+	CPP	RIC (Flu/TBI)	20
PACIENTE 45	67	M	LLC (Leucemia Linfoide Crônica)	15/01/13	+/+	CPP	RIC (Flu/TBI)	21
PACIENTE 46	45	F	LMC (Leucemia Mieloide Crônica – fase acelerada)	22/03/13	+/+	CPP	MIELOABL (Bu/Cy)	17
PACIENTE 47	48	F	LNH (Linfoma não-Hodgkin – folicular)	16/04/13	+/+	CPP	RIC (Bu/Flu)	23
PACIENTE 48	29	M	LMC (Leucemia Mieloide Crônica)	25/04/13	+/+	CPP	MIELOABL (Bu/Cy)	19
PACIENTE 49	44	M	LLA (Leucemia Linfoide Aguda – cutâneo 1º RC)	01/05/13	+/+	CPP	MIELOABL (Bu/Cy/VP)	21

ID (identificação); IgG (imunoglobulina da classe G); R (receptor); D (doador); M (masculino); F (feminino); CPP (células progenitoras periféricas); MO (medula óssea); MIELOABL (mieloablativo); RIC (regime de condicionamento de intensidade reduzida); Bu (bussulfano); Flu (fludaradina); Cy (ciclofosfamida); TBI (irradiação de corpo total); ATG (globulina antitumócito); VP16 (etoposide); VP (vepeside); MTX (metotrexato); CsA (ciclosporina); MMF (micofenolato mofetil)

As coletas das amostras foram realizadas semanalmente entre novembro de 2010 e outubro de 2013, totalizando 886 amostras de sangue periférico.

5.5 ANTIGENEMIA

A antigenemia ≥ 3 células *pp65*-positivas foi utilizada como “padrão ouro” para diagnosticar a infecção ativa causada pelo HCMV. Cento e vinte e nove amostras foram consideradas inviáveis para a realização deste teste por terem sido coletadas de pacientes com neutropenia. Sendo assim, dos 757 resultados de antigenemia, 41 (5,4%) foram considerados positivos para a infecção ativa causada pelo HCMV, com valores variando entre 3 e > 400 células *pp65*-positivas (Anexo 3).

5.6 DETERMINAÇÃO DO *CUTOFF* DA CARGA VIRAL DO HCMV INDICATIVA PARA A INFECÇÃO CAUSADA PELO HCMV COM NECESSIDADE DE TRATAMENTO ANTIVIRAL

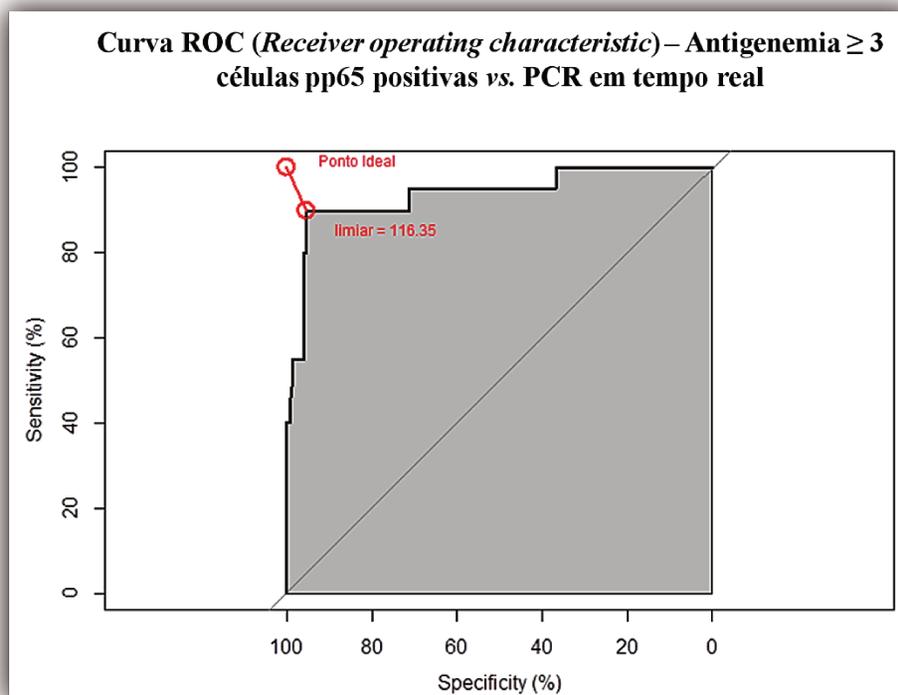


Gráfico 6. Curva ROC de sensibilidade *versus* (1-especificidade) com eixo X regressivo para determinar o *cutoff* da carga viral indicativa da infecção ativa causada pelo HCMV com necessidade de tratamento antiviral.

A construção da curva ROC para indicar um valor de *cutoff* associado à infecção ativa causada pelo HCMV com necessidade de tratamento antiviral se baseou nos resultados de 603 amostras, as quais não foram expostas ao GCV. Considerando-se os resultados de antigenemia ≥ 3 células *pp65*-positivas como “padrão ouro”, o valor considerado ótimo para indicar a necessidade de tratamento antiviral foi ≥ 116 cópias (2,06 \log_{10} cópias), com sensibilidade=90%, especificidade=95,2%, valor preditivo positivo=98,35%, valor preditivo negativo=70%, acurácia=94,5% e área sob a curva=93,74% (Gráfico 6).

Considerando-se este *cutoff*, 40 das 886 amostras coletadas (4,5%) foram positivas pela PCR em tempo real, com cargas virais variando entre 124,32 e 7814,27 cópias.

5.7 COMPARAÇÃO ENTRE O DESEMPENHO DA ANTIGENEMIA E DA PCR EM TEMPO REAL NO DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO ATIVA CAUSADA PELO HCMV

Conforme descrito anteriormente, a detecção da infecção ativa causada pelo HCMV foi considerada positiva quando a antigenemia apresentou resultados ≥ 3 células *pp65*-positivas e/ou a PCR em tempo real ≥ 116 cópias. Como 129 amostras foram consideradas inviáveis para a realização da antigenemia, 757 amostras tiveram resultados conclusivos por ambas as técnicas utilizadas.

Considerando-se estas 757 amostras, a análise dos resultados quantitativos da antigenemia e da PCR em tempo real apresentou média correlação segundo o valor do coeficiente de correlação de Pearson ($r=0,37$), o qual apresentou valor mais elevado quando somente as 603 amostras não expostas ao GCV foram avaliadas ($r=0,52$).

Já a comparação qualitativa dos resultados apresentados pelas 2 técnicas apresentou alta correlação ($r=0,64$) (Tabela 5). Considerando-se somente as amostras que não foram expostas ao GCV o valor de r foi igual a 0,71 (Tabela 7).

Tabela 6. Relação entre os resultados de antigenemia e PCR em tempo real no diagnóstico da infecção ativa do HCMV em amostras obtidas ao longo do monitoramento

		PCR EM TEMPO REAL	
		<i>Positivo</i>	<i>Negativo</i>
ANTIGENEMIA	<i>Positivo</i>	25	16
	<i>Negativo</i>	10	706

$p \leq 0,001$ e $r = 0,64$ n=757

Tabela 7. Relação entre os resultados de antigenemia e PCR em tempo real no diagnóstico da infecção ativa do HCMV em amostras não expostas ao GCV durante o monitoramento

		PCR EM TEMPO REAL	
		<i>Positivo</i>	<i>Negativo</i>
ANTIGENEMIA	<i>Positivo</i>	11	3
	<i>Negativo</i>	6	583

$p \leq 0,001$ e $r = 0,71$ n=603

Vinte dos 49 pacientes monitorados (40,8%) apresentaram antigenemia ≥ 3 células *pp65*-positivas, com mediana de tempo de diagnóstico de 48 dias pós-TCTH (variação: 35–147). Embora o mesmo número de pacientes tenha apresentado resultados positivos pela PCR em tempo real (≥ 116 cópias), esta se mostrou mais precoce, com mediana de tempo de diagnóstico de 43 dias pós-TCTH (variação: 27–140).

5.8 INFECÇÃO ATIVA CAUSADA PELO HCMV

Após a verificação da correlação entre o desempenho da PCR em tempo real e o da antigenemia, a quantificação da carga viral foi adotada como o único critério para distinguir a infecção latente da infecção ativa causada pelo HCMV. Sendo assim, os resultados das 40 amostras com carga viral ≥ 116 cópias foram interpretadas como infecção ativa causada pelo

HCMV, na maioria das vezes acompanhadas por alterações das enzimas hepáticas e sintomas associados ao vírus como vômito e diarreia (Tabela 8).

Tabela 8. Relação entre a carga viral do HCMV em amostras positivas e as alterações clínicas apresentadas pelos pacientes

CARGA VIRAL DO HCMV		ALTERAÇÕES CLÍNICAS
Cópias	Log ₁₀ cópias	
124,32	2,09	Assintomático
125,87	2,10	Valor elevado de LDH
127,23	2,10	Assintomático e em tratamento com GCV
137,48	2,14	Valor elevado de LDH e em tratamento com GCV
139,19	2,14	Assintomático e em tratamento com GCV
145,52	2,16	Assintomático e em tratamento com GCV
150,65	2,18	Valores elevados de FAL e GGT
154,93	2,19	Valor elevado de LDH
177,2	2,25	Diarreia profunda e valor elevado da proteína C reativa
186,34	2,27	Valores elevados de LDH e bilirrubina total
189,75	2,28	Valores elevados de TGP e TGO
236,26	2,37	Valores elevados de TGP, TGO e bilirrubina total
255,51	2,41	Valores elevados TGP, FAL e GGT
305,8	2,49	Valores elevados de TGO, FAL, GGT, LDH e bilirrubina total
345,76	2,54	Assintomático
454,21	2,66	Assintomático
473,7	2,68	Piora do quadro respiratório com Rx de tórax com infiltrado intersticial bilateral, valores elevados de TGO, GGT e bilirrubina total e em tratamento com GCV
483,97	2,68	Valores elevados de TGP, TGO, GGT e bilirrubina total evoluindo com náusea, vômito, diarreia e febre
483,97	2,68	HCMV-doença + DECH (estômago), plaquetopenia, vômito, diarreia e Bx cavidade oral com 2 células sugestivas de HCMV
552,19	2,74	Assintomático e em tratamento com GCV
630,02	2,80	Febre, fezes líquidas e valores elevados de TGP, TGO, FAL, GGT e bilirrubina total
641,55	2,81	Provável doença por HCMV - cistite hemorrágica (ráfia de bexiga) e valores elevados de TGP, TGO, FAL, GGT e bilirrubina total
645,8	2,81	Valores elevados de bilirrubina total e GGT
685,28	2,84	Provável doença por HCMV, valor elevado da proteína C reativa e em tratamento com GCV
696,67	2,84	Valor elevado de GGT
708,25	2,85	Provável doença por HCMV, valor elevado da proteína C reativa e em tratamento com GCV
716,47	2,86	Diarreia e valores elevados de TGP, FAL e GGT
735,62	2,87	Provável doença por HCMV, diarreia profunda e em tratamento com GCV
757,15	2,88	Valores elevados de LDH e bilirrubina total
772,72	2,89	Valor elevado de LDH
952,11	2,98	Provável doença por HCMV, hematúria maciça e valores elevados de TGP, TGO, FAL, GGT e bilirrubina total
1066,81	3,03	Provável doença por HCMV, Bx de pele + para <i>Fusarium</i> e <i>Acinetobacter</i> , hemocultura + para <i>Staphylococcus</i> e em tratamento com GCV
1305,52	3,12	Vômito, enterorragia e valor elevado de GGT. Após 2 dias houve diagnóstico de HCMV-doença + DECH (côlon)
1451,97	3,16	Hipotermia após 3 dias consecutivos de febre e valores elevados de TGO, FAL, GGT e bilirrubina total
2615,37	3,42	Provável doença por HCMV, fezes líquidas, hematúria e em tratamento com GCV

3043,66	3,48	Valores elevados de bilirrubina total e GGT
3112,15	3,49	Provável doença por HCMV, náusea, vômito e valor elevado de bilirrubina total
3275,32	3,52	Provável doença por HCMV, fusariose em pele e em tratamento com GCV
4071,47	3,61	HCMV-doença + DECH (estômago), em tratamento com GCV, plaquetopenia, insuficiência respiratória aguda, elevação das transaminases hepáticas, distensão abdominal e febre
7814,27	3,89	Diarreia e após 7 dias diagnosticou-se HCMV-doença (cólon)

LDH (lactato desidrogenase); GCV (ganciclovir); FAL (fosfatase alcalina); GGT (gama glutamil transpeptidase); TGP (transaminase glutâmica pirúvica); TGO (transaminase glutâmica oxalacética); RX (raio x); DECH (doença do enxerto-contra-hospedeiro); Bx (biópsia)

As demais amostras que apresentaram resultados < 116 cópias foram consideradas infecção latente.

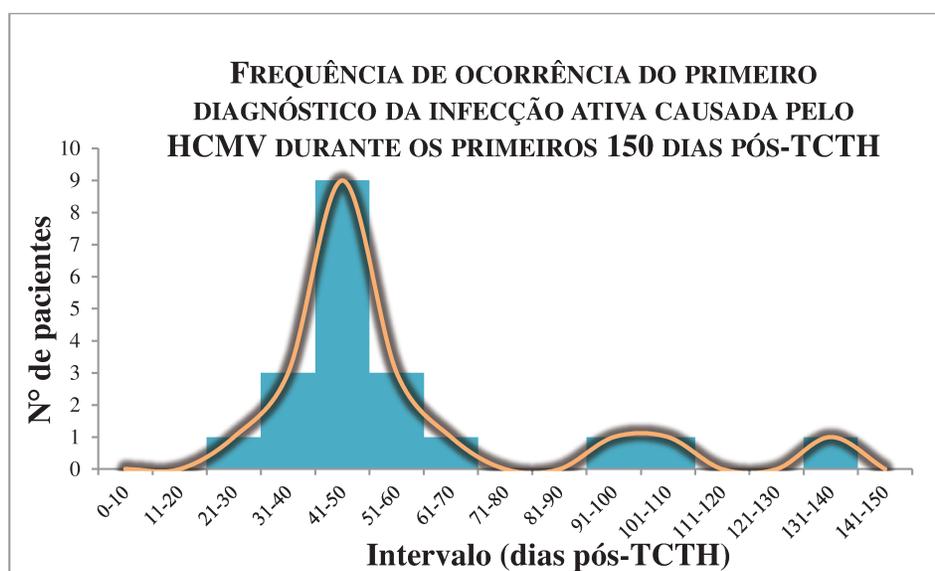


Gráfico 7. Frequência de ocorrência do primeiro diagnóstico da infecção ativa causada pelo HCMV realizado pela PCR em tempo real ao longo dos 5 primeiros meses pós-TCTH (n=20).

Vinte dos 49 pacientes monitorados (40,8%) apresentaram pelo menos 1 episódio de infecção ativa causada pelo HCMV no pós-TCTH, ocorrendo principalmente durante os 100 primeiros dias (18/20 – 90%), com mediana de tempo de diagnóstico de 43 dias pós-TCTH (variação: 27 – 140), e maior frequência de ocorrência (45%) entre os dias +41 e +50 (Gráfico 7).

Dezoito dos 20 pacientes que tiveram infecção ativa causada pelo HCMV (90%) foram tratados com GCV e 16 deles (88,9%) atingiram o bloqueio da replicação viral (carga viral

< 116 cópias) numa mediana de 6 dias após o início do tratamento (variação: 1–34). Os 2 pacientes que não tiveram resposta ao tratamento antiviral evoluíram para o óbito pelo HCMV em um curto período de tempo.

A probabilidade de associação entre a infecção ativa causada pelo HCMV com os fatores considerados de risco para este evento foi baseada no teste exato de Fisher, sendo o parentesco entre o doador e o receptor a única variável que apresentou significativa associação estatística com a infecção ativa causada pelo HCMV ($p=0,023$) (Tabela 9).

Tabela 9. Relação entre os fatores considerados de risco e a infecção ativa causada pelo HCMV no pós-TCTH

		INFEÇÃO ATIVA CAUSADA PELO HCMV		
		<i>Sim</i>	<i>Não</i>	<i>p</i>
SEXO	<i>Feminino</i>	7	15	0,381
	<i>Masculino</i>	13	14	
SOROSTATUS PRÉ-TCTH (R/D)	<i>Positivo/Negativo</i>	2	0	0,162
	<i>Positivo/Positivo</i>	18	29	
REGIME DE CONDICIONAMENTO	<i>Mieloablativo</i>	14	19	1
	<i>Intens. reduzida</i>	6	10	
TIPO DO ENXERTO	<i>CPP</i>	12	18	1
	<i>MO</i>	8	11	
TIPO DE TCTH	<i>Não aparentado</i>	4	0	0,023*
	<i>Aparentado</i>	16	29	
DECH	<i>Sim</i>	6	11	0,761
	<i>Não</i>	14	18	

R(receptor); D (doador); CPP (células progenitoras periféricas); MO (medula óssea); DECH (doença do enxerto-contra-hospedeiro); * estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$)

As características predominantes dos pacientes que tiveram infecção ativa causada pelo HCMV foram: sexo masculino (65%), sorologia HCMV-IgG no pré-TCTH R+/D+ (90%), regime de condicionamento mieloablativo (70%), enxerto composto por CPP (60%), TCTH HLA idêntico do tipo aparentado (80%) e ausência de diagnóstico prévio da DECH (70%).

5.9 CONFIRMAÇÃO DA DOENÇA CAUSADA PELO HCMV

O diagnóstico da doença causada pelo HCMV se baseou na identificação da combinação de sintomas associados ao vírus com a visualização do mesmo em exame histopatológico do tecido acometido, conforme descrito por Ljungman et al (67). Quatro dos 49 pacientes (8,2%) tiveram a doença causada pelo HCMV. Em todos os casos houve confirmação da HCMV-doença por endoscopia e/ou colonoscopia associado a resultados positivos de biópsia do TGI (Tabela 11) numa mediana de 55,5 dias pós-TCTH (variação: 40 – 147).

O teste exato de Fisher foi realizado a fim de avaliar a associação entre o aparecimento da doença causada do HCMV com os fatores considerados de risco para este evento, não sendo verificada associação estatisticamente significante com nenhum deles (Tabela 10).

Tabela 10. Relação entre os fatores de risco e o aparecimento da doença causada pelo HCMV

		DOENÇA CAUSADA PELO HCMV		<i>p</i>
		<i>Sim</i>	<i>Não</i>	
SEXO	<i>Feminino</i>	1	21	0,617
	<i>Masculino</i>	3	24	
SOROSTATUS PRÉ-TCTH (R/D)	<i>Positivo/Negativo</i>	0	2	1
	<i>Positivo/Positivo</i>	4	43	
REGIME DE CONDICIONAMENTO	<i>Mieloablativo</i>	2	31	0,588
	<i>Intens. reduzida</i>	2	14	
TIPO DO ENXERTO	<i>CPP</i>	2	28	0,636
	<i>MO</i>	2	17	
TIPO DE TCTH	<i>Não aparentado</i>	0	4	1
	<i>Aparentado</i>	4	41	

R (receptor); D (doador); CPP (células progenitoras periféricas); MO (medula óssea)

5.10 DETERMINAÇÃO DO *CUTOFF* DA CARGA VIRAL DO HCMV SUGESTIVA PARA A DOENÇA CAUSADA PELO HCMV

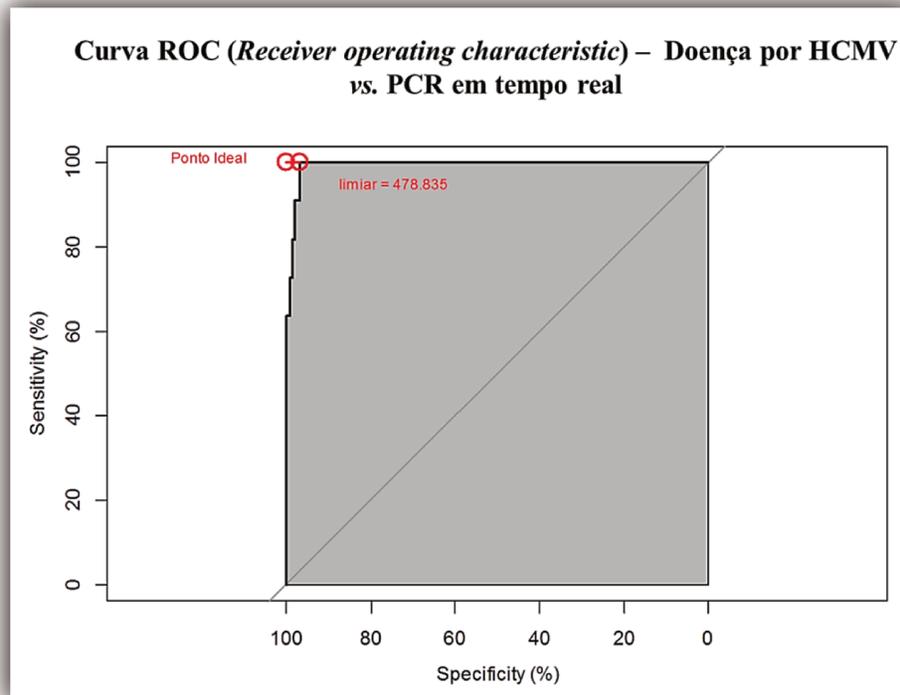


Gráfico 8. Curva ROC de sensibilidade *versus* (1–especificidade) com eixo X regressivo para determinar o *cutoff* da carga viral sugestivo para a doença causada pelo HCMV.

A determinação do valor de *cutoff* sugestivo para a HCMV-doença se baseou na construção da curva ROC (125) com as 886 quantificações feitas pela PCR em tempo real e com os resultados de biópsias dos tecidos acometidos pelo HCMV, esta última sendo utilizada como o “padrão ouro”. Após a realização desta análise, o valor considerado ótimo para sugerir a doença causada pelo HCMV foi ≥ 479 cópias (2,68 \log_{10} cópias) com sensibilidade=100%, especificidade=96,7%, valor preditivo positivo=61,1%, valor preditivo negativo=100%, acurácia=96,8% e área sob a curva=99,3% (Gráfico 8).

5.11 COMPARAÇÃO ENTRE AS CARGAS DO HCMV, CONFIRMAÇÃO DA DOENÇA CAUSADA PELO HCMV E RESPOSTA AO TRATAMENTO ANTIVIRAL

Após a construção da curva ROC para e determinação do *cutoff* indicativo da HCMV-doença, os resultados da PCR em tempo real foram analisados e somente 23 amostras (2,6%), pertencentes a 12 pacientes, foram consideradas sugestivas para tal evento por apresentar resultados ≥ 479 cópias ($2,68 \log_{10}$ cópias).

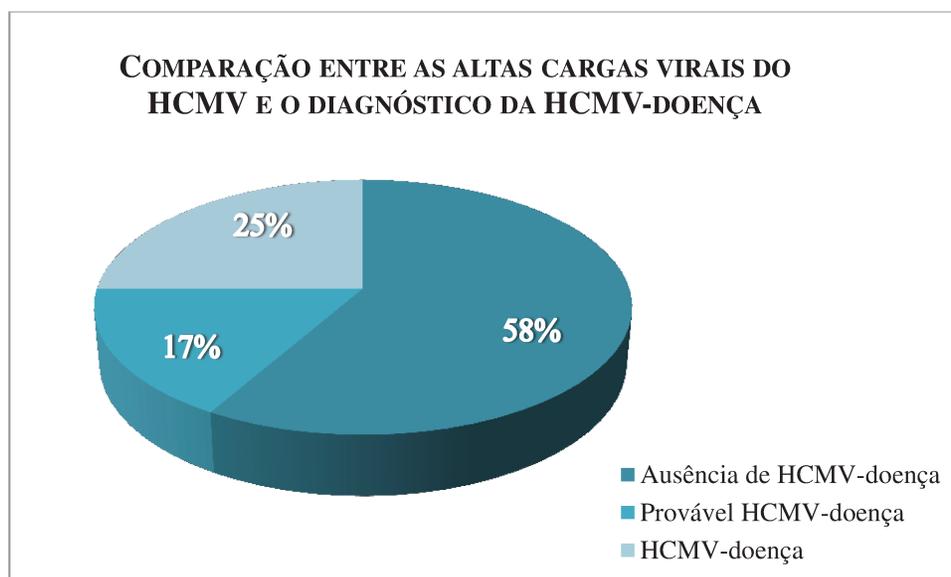


Gráfico 9. Correlação entre as altas cargas virais do HCMV e o diagnóstico da HCMV-doença.

Sete pacientes, embora tenham apresentado elevadas cargas do HCMV, não tiveram evidências da doença causada pelo HCMV antes, durante ou após o tratamento antiviral. Dois pacientes foram considerados como “prováveis casos de HCMV-doença” e 3 pacientes apresentaram confirmação da HCMV-doença em biópsia do TGI associadas às elevadas taxas de carga viral pela PCR em tempo real (Gráfico 9).

A análise da relação existente entre a cinética da carga viral do HCMV, a manifestação da HCMV-doença e a evolução clínica dos pacientes se baseou no histórico do HCMV, na velocidade da sua replicação e na regressão linear dos resultados das amostras coletadas durante o tratamento com GCV (Tabela 11).

Tabela 11. Relação entre a cinética da carga viral do HCMV, a manifestação da HCMV-doença e a evolução clínica dos pacientes

PACIENTE	HISTÓRICO DA CINÉTICA DA CARGA DO HCMV	EVOLUÇÃO CLÍNICA
9	Aumento de 1,20 para 2,81 \log_{10} cópias do HCMV em 5 dias com tempo de duplicação de 0,94 dias. A negatificação do HCMV ocorreu 1 dia após o início do tratamento com GCV com a análise da regressão linear associada a ótima resposta ao tratamento com GCV ($M=-2,81$, $r=1$ e $r^2=1$)	Rápida resposta ao tratamento antiviral com progressiva redução do HCMV associada à ausência de HCMV-doença
11	Aumento de 1,93 para 2,84 \log_{10} cópias do HCMV em 9 dias com tempo de duplicação de 2,95 dias, sucedido por aumento de 2,84 para 3,48 \log_{10} cópias do HCMV em 5 dias com tempo de duplicação de 2,35 dias. O bloqueio da replicação viral foi atingido 7 dias após o início do tratamento com GCV com a análise da regressão linear associada a boa resposta ao tratamento com GCV ($M=-0,15$, $r=0,94$ e $r^2=0,89$). Baixos valores de carga viral associados a latência puderam ser observados até o 14º dia do tratamento antiviral	Rápida resposta ao tratamento antiviral com progressiva redução do HCMV associada à ausência de HCMV-doença
13	Aumento de 3,89 \log_{10} cópias do HCMV em 23 dias* com diagnóstico da HCMV-doença no cólon 7 dias após esta quantificação. A redução da carga viral foi atingida após 14 dias de tratamento com GCV com a análise da regressão linear associada a boa resposta ao tratamento com GCV ($M=-0,11$, $r=1$ e $r^2=1$)	HCMV-doença com baixa gravidade associada à progressiva redução do HCMV e boa resposta ao tratamento antiviral
16	Aumento de 1,91 para 3,49 \log_{10} cópias do HCMV em 9 dias com tempo de duplicação de 1,70 dias, hipótese diagnóstica de cistite hemorrágica causada pelo HCMV e ausência de tratamento com GCV por apresentar falha de pega do enxerto com necessidade de um novo TCTH	Provável HCMV-doença associada ao curto tempo de duplicação do HCMV pode ter favorecido a falha da pega do enxerto
19	Aumento de 1,85 para 2,80 \log_{10} cópias do HCMV em 9 dias com tempo de duplicação de 2,85 dias. A negatificação do HCMV ocorreu 4 dias após o início do tratamento com GCV com a análise da regressão linear associada a ótima resposta ao tratamento com GCV ($M=-0,48$, $r=1$ e $r^2=1$). Considerando as amostras subsequentes, após 2 resultados negativos apresentou infecção recorrente, com carga viral de 2,49 \log_{10} cópias do HCMV e lenta resposta ao tratamento antiviral ($M=-0,03$, $r=0,86$ e $r^2=0,75$), atingindo o bloqueio da replicação somente após 34 dias	Rápida resposta ao tratamento antiviral com progressiva redução do HCMV associada à ausência de HCMV-doença, sucedida por infecção recorrente com lenta resposta ao tratamento antiviral
22	Aumento de 1,72 para 2,68 \log_{10} cópias do HCMV em 9 dias com tempo de duplicação de 2,81 dias. O bloqueio da replicação viral foi atingido 4 dias após o início do tratamento com GCV com a análise da regressão linear associada a ótima resposta ao tratamento com GCV ($M=-0,12$, $r=0,95$ e $r^2=0,90$)	Rápida resposta ao tratamento antiviral com progressiva redução do HCMV associada à ausência de HCMV-doença
28	Aumento de 1,37 para 3,12 \log_{10} cópias do HCMV em 7 dias com tempo de duplicação de 1,20 dias, e diagnóstico da HCMV-doença e DECH em biópsia de cólon após 2 dias. Houve falha ao tratamento com GCV, evoluindo para o óbito 9 dias após o início do tratamento antiviral**	HCMV-doença associada ao curto tempo de duplicação do HCMV e óbito resultante da falha ao tratamento antiviral

32	Aumento de 1,83 para 2,68 log ₁₀ cópias do HCMV em 14 dias com tempo de duplicação de 4,95 dias e diagnóstico da HCMV-doença e DECH em biópsia de estômago durante este período. Mesmo após o início do tratamento com GCV a carga viral continuou aumentando, atingindo o valor de 3,61 log ₁₀ cópias do HCMV em 2 dias com tempo de duplicação de 0,65 dias, evoluindo para o óbito 4 dias após o início do tratamento antiviral. A análise de regressão linear comprovou a falha ao tratamento com GCV (M=0,93, r=1 e r ² =1)	HCMV-doença associada à falha de resposta ao tratamento antiviral favoreceu a replicação viral, com redução do tempo de duplicação do HCMV e óbito
34	Aumento de 2,03 para 3,16 log ₁₀ cópias do HCMV em 7 dias com tempo de duplicação de 1,86 dias. Embora o bloqueio da replicação viral tenha sido atingido 6 dias após o início do tratamento com GCV e a análise da regressão linear esteja associada a boa resposta ao tratamento com GCV (M=-0,24, r=1 e r ² =1), houve diagnóstico de carga viral associada a infecção latente até o término do monitoramento, evoluindo ao óbito por infecção bacteriana 8 dias após o início do tratamento antiviral com GCV	Rápida resposta ao tratamento antiviral associada à ausência de HCMV-doença e diagnóstico de infecção latente do HCMV durante o tratamento, o que pode ter favorecido o óbito por infecção bacteriana
37	Aumento de 1,11 para 2,86 log ₁₀ cópias do HCMV em 7 dias com tempo de duplicação de 1,20 dias. Embora o bloqueio da replicação viral tenha sido atingido 6 dias após o início do tratamento com GCV e a análise da regressão linear esteja associada a ótima resposta ao tratamento com GCV (M=-0,03, r=0,82 e r ² =0,67) a intermitência de baixos valores de carga viral foi observada até o término do monitoramento. 62 dias após o início do tratamento antiviral evoluiu para o óbito por recidiva da doença de base e aspergilose pulmonar	Rápida resposta ao tratamento antiviral associada à ausência da HCMV-doença e intermitência de baixos valores de carga viral (infecção latente), o que pode ter favorecido o óbito por aspergilose pulmonar
42	Aumento de 1,96 para 2,54 log ₁₀ cópias do HCMV em 7 dias com tempo de duplicação de 3,65 dias, sucedido por aumento de 2,54 para 2,89 log ₁₀ cópias do HCMV em 7 dias com tempo de duplicação de 6,03 dias. Após o início do tratamento com GCV, mesmo atingindo negatificação em 2 dias, o HCMV voltou a ser replicar atingindo 2,74 log ₁₀ cópias do HCMV após 9 dias do início do tratamento antiviral. O bloqueio da replicação viral foi atingido 14 dias após o início do tratamento com GCV com a análise da regressão linear associada à moderada resposta ao tratamento com GCV (M=-0,11, r=0,79 e r ² =0,63) Obs: doador HCMV-IgM +	Rápida resposta ao tratamento antiviral associada à ausência de HCMV-doença
43	Aumento de 2,25 para 2,87 log ₁₀ cópias do HCMV em 7 dias com tempo de duplicação de 3,40 dias, associado à provável HCMV-doença. Mesmo após o início do tratamento com GCV a carga viral continuou aumentando, atingindo 3,42 log ₁₀ cópias do HCMV após 7 dias de tratamento, com tempo de duplicação de 3,82 dias. Houve redução para 2,84 log ₁₀ cópias do HCMV após 12 dias de tratamento seguido por um novo pico viral, atingindo 3,52 log ₁₀ cópias do HCMV após 21 dias de tratamento, com tempo de duplicação de 3,99 dias. O bloqueio da replicação viral foi atingido somente após 34 dias de tratamento com GCV com a análise da regressão linear associada à moderada resposta ao tratamento com GCV (M=-0,04, r=0,62 e r ² =0,38). Após o bloqueio da replicação do HCMV a intermitência de baixos valores de carga viral foi observada até o término do monitoramento, evoluindo para o óbito 62 dias após o início do tratamento antiviral evoluiu ao óbito por fusariose disseminada e DECH	Provável HCMV-doença associada à lenta resposta ao tratamento antiviral e intermitência de baixos valores de carga viral (infecção latente), o que pode ter favorecido a disseminação da fusariose e gravidade da DECH, fatores que ocasionaram a morte do paciente

GCV (ganciclovir); M (*slope* ou inclinação da reta); r (coeficiente de correlação); r² (coeficiente de determinação); *Sem dados suficientes para análise do tempo de duplicação; **Sem dados suficientes para análise da inclinação da reta de regressão; D+ (dias pós-TCTH); GCV (ganciclovir)

Comparando as manifestações clínicas com as quantificações do HCMV, os dados sugerem que o aumento repentino da carga viral, juntamente com a resposta ao tratamento com GCV estejam associados ao risco e gravidade da HCMV-doença, uma vez que:

- ✓ os 5 pacientes que não manifestaram a HCMV-doença e complicações associadas a este evento apresentaram rápida resposta ao tratamento com GCV atingindo a negatificação total do HCMV;
- ✓ os 3 pacientes que atingiram o bloqueio da replicação do HCMV seguido por óbito por infecções oportunistas apresentaram diagnósticos de infecção latente (<116 cópias do HCMV) até o término do monitoramento;
- ✓ os 2 pacientes que evoluíram para óbito por HCMV-doença apresentaram não responderam ao tratamento com GCV;
- ✓ o único paciente que manifestou a HCMV-doença em menor gravidade apresentou boa resposta ao tratamento com GCV, observando-se progressiva redução da carga viral do HCMV.

Sendo assim, os dados sugerem a seguinte classificação de risco para o óbito:

Baixo risco	Altas cargas virais com rápida resposta ao tratamento atingindo a negatificação total do HCMV
Médio risco	HCMV-doença com rápida resposta ao tratamento antiviral e progressiva redução da carga viral do HCMV
Alto risco	Altas cargas virais com resposta ao tratamento e diagnóstico persistente da infecção latente
Altíssimo risco	HCMV-doença com falha ao tratamento antiviral

5.12 QUANTIFICAÇÃO E CINÉTICA DA CARGA VIRAL DURANTE A MANIFESTAÇÃO DA DOENÇA CAUSADA PELO HCMV

Considerando-se os 4 pacientes que tiveram a confirmação da HCMV-doença, observou-se que a viremia, baseada no *cutoff* ≥ 479 cópias (2,68 \log_{10} cópias), foi detectada pela PCR em tempo real em 3/4 pacientes (75%), variando entre 483,97 e 7814,27 (2,68 e 3,89 \log_{10}) cópias. Curiosamente, os 4 pacientes foram expostos ao tratamento profilático com aciclovir, e 3 deles, por não terem histórico de varicela, tiveram esta profilaxia interrompida. O único paciente que manteve o tratamento com aciclovir ao longo do monitoramento foi o que desenvolveu HCMV-duodenite sem ocorrência de viremia.

Tabela 12. Casos confirmados de doença causada pelo HCMV e complicações clínicas apresentadas pelos pacientes

	DIA PÓS-TCTH (cópias do HCMV)	DIA PÓS- TCTH(Bx HCMV+)	SINTOMAS E COMPLICAÇÕES ASSOCIADAS
PACIENTE 13	D+140(7814,27) e D+154(209,82) *sem coleta entre D+117 e D+140*	D+147 (cólon)	D+140: ↑ bilirrubina total (3,70mg/dL), TGP (76U/L), GGT (115U/L) e início do tratamento com GCV D+147: <u>diarreia a esclarecer. Colonoscopia e Bx de colón e reto (colite crônica erosiva com alterações celulares compatíveis com infecção por HCMV)</u> – em uso de GCV D+147: Bx esôfago e duodeno (ausência de sinais de infecção viral ou DECH) – em uso de GCV D+148: ↑ bilirrubina total (6,01mg/dL), TGP (114U/L), TGO (38U/L) e GGT (342U/L) – em uso de GCV D+158: DECH aguda acometendo tórax frente e dorso (pele + TGI + fígado) – em uso de GCV

PACIENTE 28	D+40(1305,52) *sem coleta após o D+40*	D+42 (côlon)	<p>D+36: enterorragia com suspeita de encefalopatia hepática grau 2 - falência hepática aguda</p> <p>D+39: ↑ proteína C reativa (2,02mg/dL), 1 episódio de vômito, 4 episódios de diarreia sanguinolenta e 1 episódio de dor abdominal intensa</p> <p>D+40: ↑ GGT (659 U/L), vômito e enterorragia</p> <p>D+41: início do tratamento com GCV</p> <p><u>D+42: enterorragia com aumento do volume das evacuações e Bx de colon/reto (colite ulcerativa com tecido de granulação e alterações citopáticas compatíveis com infecção por HCMV. Presença focalizada e de corpos apoptóticos em base de criptas favorecendo DECH associado)- em uso de GCV</u></p> <p>D+43: enterorragia, boca seca, fraqueza, abdome globoso, flácido e doloroso à palpação do hipocôndrio direito, fígado palpável a 4 cm do rebordo costal direito e cultura de escarro + para <i>Aspergillus</i> sp – em uso de GCV</p> <p>D+45: diminuição do volume de diarreia (3 episódios com sangue) e afebril – em uso de GCV</p> <p>D+46: ↑ proteína C reativa (8,79mg/dL) – em uso de GCV</p> <p>D+47: melhora das evacuações, em menor volume e sem sangue vivo, porém bastante icterício e em tratamento com GCV</p> <p>D+49: importante piora de traquidispnéia e rebaixamento do nível de consciência. DECH aguda IV (TGI e fígado) e sem resposta ao tratamento – em uso de GCV</p> <p>D+50: instável hemodinamicamente, choque séptico e <u>óbito por DECH associada a doença por HCMV no TGI</u></p>
PACIENTE 32	D+47(483,97) e D+49(4071,47) *sem coleta entre o D+33 e D+47*	D+40 (estômago) e D+47 (cavidade oral)	<p><u>D+40: erosões gástricas e enantema corpo/fundo – endoscopia e Bx de estômago (gastrite ativa moderada com alterações compatíveis com efeito citopático viral por HCMV. Presença de alterações sugestivas para DECH associado. Negativo para H. pylori)</u></p> <p>D+41: febre</p> <p>D+43: febre de origem indeterminada, ↑ TGO (48U/L), FAL (141U/L) e GGT (254U/L)</p> <p>D+44: febre, sinusite e derrame pleural não puncionável</p> <p>D+45: episódio de fezes pastosas</p> <p>D+46: febre, vômito, diarreia, úlceras na cavidade oral e ↑ proteína C reativa (20,70mg/dL), TGP (82U/L), TGO (186U/L), bilirrubina total (1,46mg/dL), FAL (261U/L), GGT (421U/L) e LDH (803U/L)</p> <p><u>D+47: plaquetopenia, vômito e diarreia. Bx cavidade oral (crosta fibrino-necrótica espessa, com grão bacteriano, mucosa com clivagem subepitelial, acentuado edema subepitelial e infiltrado inflamatório misto no tecido conjuntivo subepitelial. Notam-se 2 células endoteliais com alterações citopáticas sugestivas de HCMV, epiteliais para HSV e sem alterações para DECH) e esfregaço da lesão oral (sem critérios sugestivos de infecção herpética e por HCMV)</u></p> <p>D+48: febre, ↑ TGP (346U/L), TGO (951U/L), bilirrubina total (2,61mg/dL), FAL (316U/L), GGT (463U/L), piora da função renal, 2 episódios de fezes pastosas e início do tratamento com GCV</p> <p>D+49: insuficiência respiratória aguda, aumento das transaminases, distensão abdominal e <u>elevação da carga viral do HCMV mesmo em tratamento com GCV</u></p> <p>D+50: estado grave com piora do padrão respiratório, instabilidade hemodinâmica, plaquetopenia, distensão abdominal e piora da função renal – em uso de GCV</p> <p>D+51: estado gravíssimo com abdome distendido, choque séptico com falência multiorgânica (renal, respiratória, cardíaca e hepática) com necessidade de hemodiálise – em uso de GCV</p> <p>D+52: hipotensão com assistolia não responsiva às medidas de ressuscitação e <u>óbito decorrente da doença disseminada por HCMV</u></p>

PACIENTE 44

Sem viremia

D+69
(duodeno)

D+68: fezes líquidas com muco
D+69: endoscopia e Bx duodeno (duodenite ulcerativa com total desnudamento da mucosa, intensa atrofia de vilos, depleção de criptas e corpos apoptóticos focais, compatível com DECH grau IV. Alterações citológicas focais sugestivas de infecção por HCMV associada)
D+78: Colonoscopia e Bx cólon e reto (compatível com a hipótese clínica de DECH e negativo para HCMV)
D+79: início do tratamento com GCV
D+83: úlceras duodenais ativas - endoscopia e Bx de duodeno (sugestivo para DECH e negativo para HCMV) e valores elevados de bilirrubina total (1,60mg/dL), GGT (230U/L) e proteína C reativa (3,31mg/dL)
D+161: óbito por pneumonia, insuficiência renal e hepática

D+(dias pós-TCTH); TGP (transaminase glutâmica pirúvica);GGT (gama glutamil transpeptidase); GCV (ganciclovir); Bx (biópsia); DECH (doença do enxerto-contra-hospedeiro); TGO (transaminase glutâmica oxalacética); TGI (trato gastrointestinal); FAL (fosfatase alcalina); LDH (lactato desidrogenase)

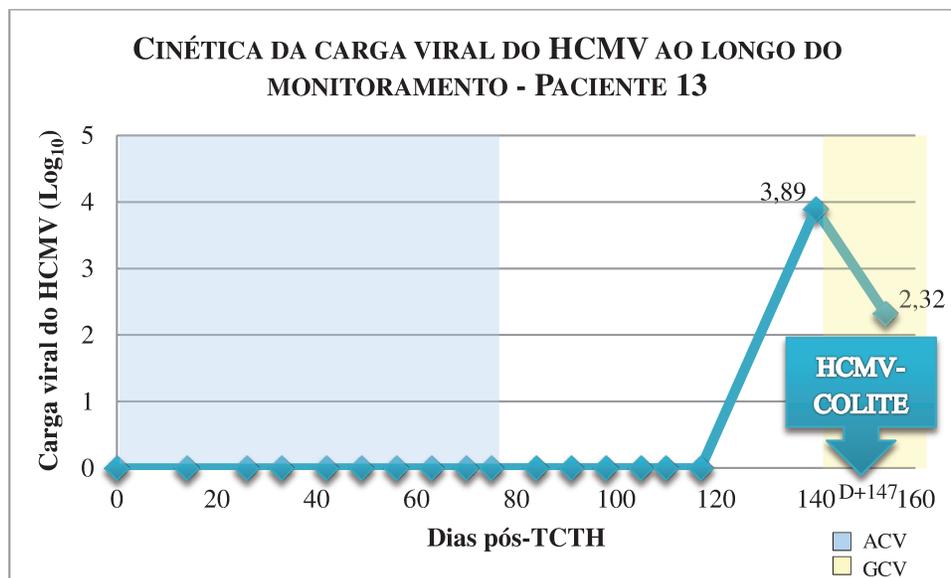


Gráfico 10. Cinética da carga viral do HCMV ao longo do monitoramento do paciente 13.

O paciente 13 mesmo apresentando diarreia associada à elevada carga viral do HCMV (3,89 log₁₀ cópias), respondeu bem ao tratamento com GCV, atingindo o bloqueio da replicação viral (Gráfico 10). Os outros 2 pacientes que tiveram diagnóstico da HCMV-doença acompanhado por viremia não responderam bem ao tratamento com GCV, apresentando um rápido e progressivo aumento da carga viral, ultrapassando 3 log₁₀ cópias, associado a sintomas como vômito, diarreia, enterorragia e distensão abdominal, mesmo durante o tratamento antiviral,

evoluindo para o óbito numa mediana de 6,5 dias (variação: 4 – 9) após o início do tratamento antiviral. Vale ressaltar que estes 2 pacientes que evoluíram para o óbito por HCMV-doença apresentavam em comum o mesmo tipo de doença de base, sendo a síndrome mielodisplásica, e o regime de condicionamento mieloablativo.

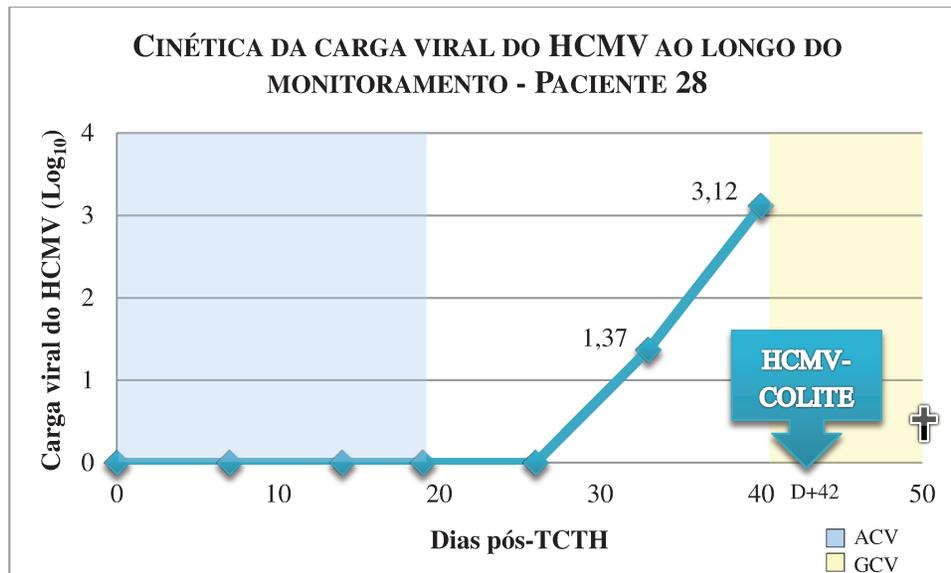


Gráfico 11. Cinética da carga viral do HCMV ao longo do monitoramento do paciente 28.

O paciente 28 atingiu a carga viral de 3,12 log₁₀ cópias do HCMV no dia +40 com quadro de colite ulcerativa e diagnóstico de HCMV-doença associada à DECH em biópsia de cólon (dia +42), eventos acompanhados por vômito, dor abdominal intensa e enterorragia, este último permanecendo durante o tratamento com GCV. Evoluiu com importante piora da traquidispnéia, rebaixamento do nível de consciência, choque séptico e óbito por HCMV-colite associado à DECH no fígado e TGI (dia +50) (Gráfico 11).

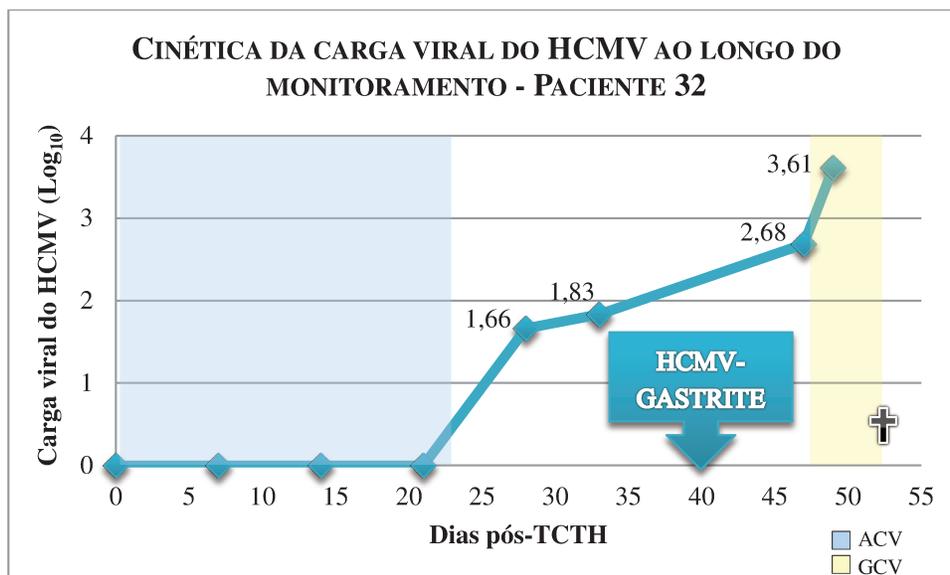


Gráfico 12. Cinética da carga viral do HCMV ao longo do monitoramento do paciente 32.

O paciente 32 apresentou quadro de erosões gástricas, biópsia de estômago positiva para a HCMV-doença e DECH (dia +40) e febre. No dia +47 manteve-se febril, plaquetopênico e com episódios de vômito e diarreia, além de biópsia de úlceras da cavidade oral sugestiva para infecção por HCMV. Evoluiu com aumento da carga viral do HCMV, mesmo durante tratamento com GCV, piora da função renal, insuficiência respiratória aguda, distensão abdominal, falência multiorgânica e óbito por HCMV-gastrite no dia +52 (Gráfico 12).

5.13 ANÁLISES ADICIONAIS

5.13.1 Quantificação e cinética da carga viral durante a “Provável doença causada pelo HCMV”

No presente estudo, 2 pacientes tiveram quadros sugestivos da doença causada pelo HCMV, tanto pelos sintomas apresentados, quanto pelas altas cargas virais detectadas pela PCR em tempo real. Sendo assim, mesmo sem a realização de biópsia para a confirmação das inclusões virais, o termo “provável doença causada pelo HCMV” foi utilizado.

Algumas das características apresentadas pelos pacientes que tiveram “provável doença causada pelo HCMV” foram: sexo masculino (100%), leucemia mieloide crônica (100%), sorologia HCMV-IgG no pré-TCTH R+/D+ (100%), regime de condicionamento mieloablativo (100%), uso contínuo de aciclovir (100%), resultados de PCR em tempo real atingindo 3112,15 e 2615,37 (3,49 e 3,42 log₁₀) cópias e sintomas como hematúria e diarreia (Tabela 13).

Tabela 13. Casos de “provável doença causada pelo HCMV” e complicações clínicas apresentadas pelos pacientes

DIA PÓS-TCTH (cópias do HCMV)	LOCAL DA PROVÁVEL DOENÇA POR HCMV	SINTOMAS E COMPLICAÇÕES ASSOCIADAS
PACIENTE 16	D+41 (3112,15), D+48 (952,11) e D+55 (641,55)	TGU - Cistite hemorrágica por HCMV
	D+38 e D+42: ↑ bilirrubina total (1,51mg/dL e 2,11mg/dL, respectivamente) D+40: náusea e vômito (100mL) D+42: urocultura + para <i>Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia</i> superior a 100000 UFC D+44: febre D+45: hematúria prolongada e abdome globoso, flácido e indolor. ↑ TGP (74U/L), TGO (56U/L), bilirrubina total (1,53mg/dL), FAL (215U/L) e GGT (195U/L) D+49: piora importante da hematúria (maciça). ↑ TGP (99U/L), TGO (57U/L), bilirrubina total (1,37mg/dL), FAL (197U/L) e GGT (227U/L) D+50: dor abdominal difusa. Melhora da hematúria após aumento da irrigação vesical com soro gelado e transfusão de plaquetas 12/12h. Ainda febril D+51: TC abdominal - 3 úlceras + perfuração D+52: ↑ TGP (119U/L), TGO (79U/L) e bilirrubina total (3,58mg/dL) D+54: ↑ TGP (285U/L), TGO (386U/L) e bilirrubina total (7,60mg/dL) D+55: soro/urina: poliomavírus (-), HHV-6 e HHV-7 (-), HCMV (+). ↑ TGP (122U/L), TGO (76U/L), bilirrubina total (7,97mg/dL), FAL (404U/L) e GGT (487U/L) D+56: paciente inapetente tentando reintroduzir líquidos e PO4 rãfia de bexiga (cistite hemorrágica) D+59: febre, hematúria (urina com presença de hemácias superior a 100,00/campo) e valores aumentados de TGP (103U/L), TGO (50U/L), bilirrubina total (8,83mg/dL), FAL (416U/L) e GGT (579U/L) D+60: falha 1 ^{ária} da pega do enxerto e nova infusão de CPP D+94 – 2° TCTH: óbito por insuficiência respiratória aguda e septicemia por <i>Candida</i> sp	

PACIENTE 43

D+63(177,2),
D+70(735,62),
D+77(2615,37),
D+82(685,28),
D+84(708,25),
D+89(1066,81) e
D+91
(3275,32)

TGU + TGI

D+58 a D+66: diarreia profunda
D+63: ↑ proteína C reativa (2,78mg/dL)
D+64: início do tratamento com GCV
D+66: diarreia profunda (2650mL) em vigência de metilprednisona e micofenolato sódico – em uso de GCV
D+70: elevação da carga do HCMV mesmo com o uso do GCV
D+70 a D+73: diarreia profunda– em uso de GCV
D+74: desnutrição grave e valor elevado de proteína C reativa (2,02mg/dL) – em uso de GCV
D+75: hematúria (urina com presença de hemácias superior a 100,00/campo) – em uso de GCV
D+76: fezes líquidas com pesquisa de sangue oculto +, exame parasitológico negativo e pesquisa de *Microsporidium*, coccídios e germes enteropatogênicos negativa – em uso de GCV
D+77: elevação da carga viral do HCMV mesmo com o uso do GCV
D+78: hematúria (urina com presença de hemácias superior a 100,00/campo) – suspeita de HCMV – e melhora da diarreia– em uso de GCV
D+79: hipótese diagnóstica - HCMV (TGU + TGI) – em uso de GCV
D+82: redução da carga do HCMV – em uso de GCV
D+84: elevação da carga viral do HCMV mesmo com o uso do GCV
D+89: elevação da carga viral do HCMV mesmo com o uso do GCV
D+90: úlceras profundas acometendo epiderme/derme/subcutâneo em pé direito com Bx + para *Fusarium* sp e *Acinetobacter lwoffii*. Hemocultura + para *Staphylococcus*– em uso de GCV
D+91: elevação da carga viral do HCMV mesmo com o uso do GCV
D+94: fezes semipastosas (1000mL) – em uso de GCV
D+98: negatização do HCMV
D+132: óbito por fusariose disseminada e DECH (TGI)

D+(dias pós-TCTH); TGU (trato geniturinário); UFC (unidades formadoras de colônias);TGP (transaminase glutâmica pirúvica); TGO (transaminase glutâmica oxalacética); FAL (fosfatase alcalina); GGT (gama glutamil transpeptidase); TC (tomografia computadorizada); CPP (células progenitoras periféricas); TGI (trato gastrointestinal); GCV (ganciclovir); Bx (biópsia); DECH (doença do enxerto-contra-hospedeiro)

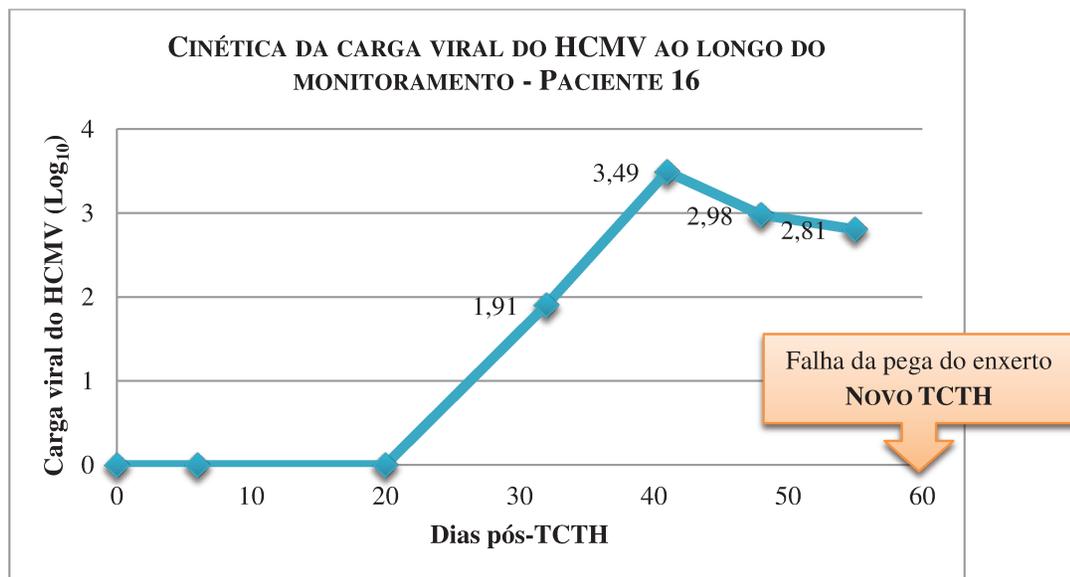


Gráfico 13. Cinética da carga viral do HCMV ao longo do monitoramento do paciente 16.

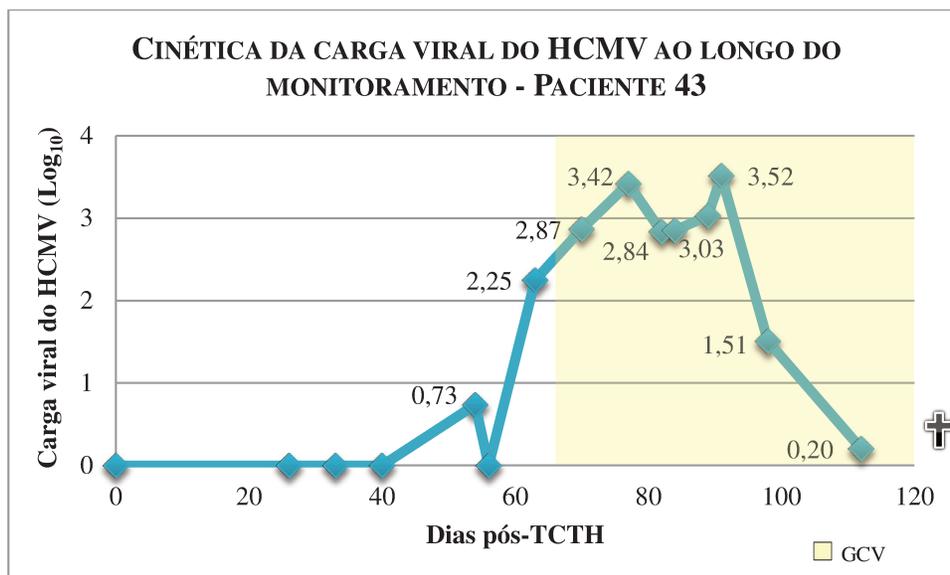


Gráfico 14. Cinética da carga viral do HCMV ao longo do monitoramento do paciente 43.

Ambos os pacientes fizeram profilaxia com aciclovir ao longo de todo o monitoramento e, mesmo sem a realização de biópsia, a hipótese diagnóstica de HCMV-doença foi aceita. Somente 1 (paciente 43) dos 2 paciente que tiveram quadros sugestivos de HCMV-doença foi tratado com GCV, o qual apresentou lenta resposta ao tratamento antiviral. Este paciente, inicialmente, apresentou um grande aumento da carga viral do HCMV associado a sintomas como diarreia profunda e hematúria, sendo tratada como HCMV-doença no TGU e TGI, e atingindo o bloqueio da replicação do HCMV somente após 34 dias de tratamento com GCV (Gráfico 14). Este longo período de replicação do HCMV e tratamento antiviral pode ter favorecido a disseminação da fusariose e agravamento da DECH, fatores que causaram a morte deste paciente. O outro paciente (paciente 16), embora estivesse apresentando náuseas, vômitos e sintomas de cistite hemorrágica causada pelo HCMV, não foi tratado com GCV por apresentar falha 1^{ária} da pega do enxerto, com necessidade de um novo TCTH (Gráfico 13).

5.13.2 Quantificação e cinética da carga viral durante o monitoramento dos pacientes com elevado risco de complicações associadas ao HCMV

O *status* sorológico IgG específico para o HCMV tem sido apontado como o fator de risco mais importante para o aparecimento de complicações clínicas associadas a este vírus no pós-TCTH. Embora não se tenha encontrado associação estatística entre esta variável e a infecção ativa causada pelo HCMV, bem como com a HCMV-doença, a combinação sorológica D-/R é considerada a de maior risco para as complicações associadas ao HCMV no pós-TCTH. Esta ausência de associação estatisticamente significativa pode estar relacionada ao pequeno tamanho amostral, já que 47 pacientes apresentaram a combinação sorológica D+/R+ e apenas 2 pacientes apresentaram a combinação D-/R+.

Os 2 pacientes que exibiram a combinação sorológica D-/R+ apresentaram elevadas cargas do HCMV detectados pela PCR em tempo real e sintomas como febre, diarreia e infecções oportunistas.

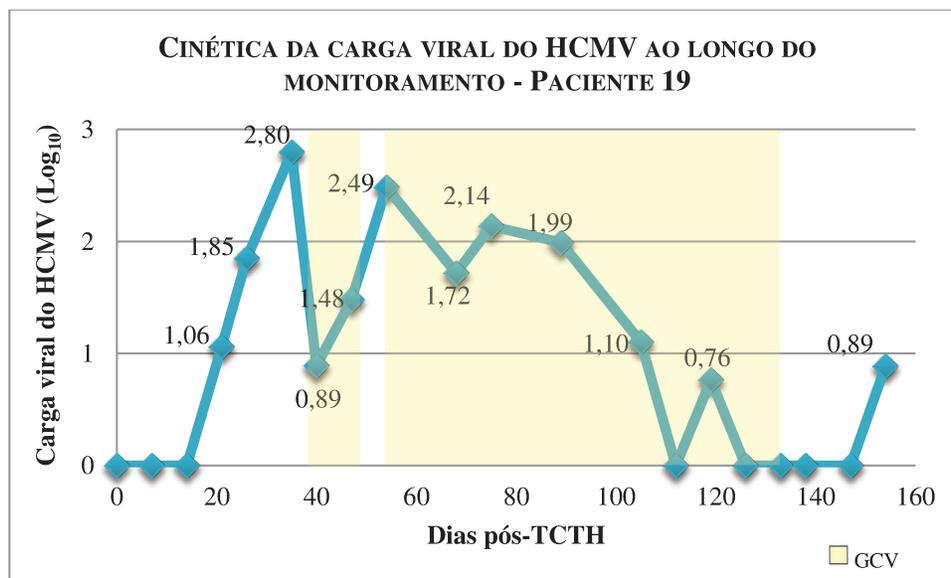


Gráfico 15. Cinética da carga viral do HCMV ao longo do monitoramento do paciente 19.

O paciente 19, além da combinação sorológica de alto risco, também apresentava manifestação de SIDA - classificação C3 (contagem T CD4+ < 200/mm³ associada a sinais e/ou

sintomas graves) e estava em tratamento antirretroviral. Este paciente apresentou o primeiro pico de carga viral do HCMV ($2,80 \log_{10}$ cópias) no dia +35 pós-TCTH, acompanhado por febre e fezes líquidas. No dia +36 apresentou urocultura positiva para *Enterococcus faecium*, sucedida por hemoculturas positivas para *Acinetobacter lwoffii* (dia +42) e *Staphylococcus* sp (dia +45) e quadro de diarreia febril (dia +51), com rápida resposta ao tratamento com GCV. No dia +54 apresentou novo pico da carga viral ($2,49 \log_{10}$ cópias) associado à elevação das enzimas hepáticas, sendo reiniciado o tratamento com GCV (dia +55) (Gráfico 15).

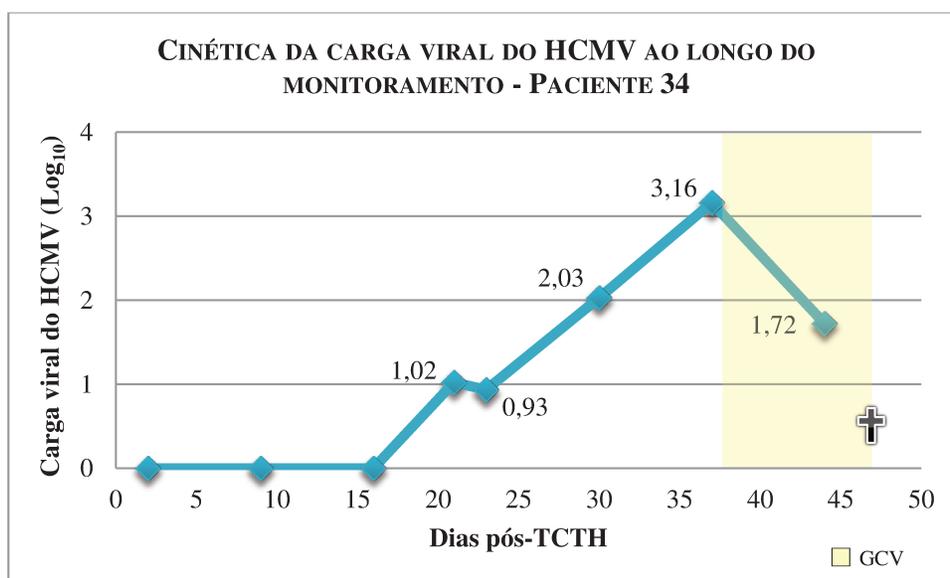


Gráfico 16. Cinética da carga viral do HCMV ao longo do monitoramento do paciente 34.

O paciente 34, além da combinação sorológica de alto risco, também apresentava risco mais elevado de manifestar a HCMV-doença por ter sido submetido ao TCTH HLA idêntico não aparentado. Este paciente apresentou aumento de $1,13 \log_{10}$ cópias do HCMV entre o dia +30 e dia +37, com aparecimento de febre, atingindo o índice de $3,16 \log_{10}$ cópias no dia +37. Embora tenha respondido bem ao tratamento com GCV, evoluiu com cultura positiva da secreção traqueal para *Serratia marcescens* (dia +39), hematúria, hemocultura positiva para *Candida tropicalis* (dia +44) e óbito por insuficiência respiratória aguda e disfunção de múltiplos órgãos (Gráfico 16).

5.14 CAUSAS DE ÓBITO

Dezessete pacientes (34,7%) evoluíram para o óbito após o TCTH numa mediana de 118 dias pós-TCTH (variação: 31 – 204). Três óbitos (17,6%) ocorreram devido à recidiva da doença de base numa mediana de 144 dias pós-TCTH (variação: 123 – 163). Os 14 óbitos (82,3%) que tiveram causas não relacionadas à recidiva da doença de base ocorreram numa mediana de 97 dias pós-TCTH (variação: 31 – 204). Oito destes 14 óbitos (57,1%) ocorreram durante o período precoce pós-TCTH, tendo como principal causa o aparecimento de infecções (75%), seguido por DECH (12,5%) e doença veno-oclusiva hepática (12,5%). Os outros 6 óbitos ocorreram no período tardio pós-TCTH (> dia +100) e foram ocasionados por infecções (83,3%) e DECH (16,7%) (Tabela 12).

A doença causada pelo HCMV foi responsável por 2 óbitos no pós-TCTH (11,8%). Ambos os óbitos ocorreram durante os 100 primeiros dias, com mediana de ocorrência de 51 dias pós-TCTH (variação: 50 – 52) (Tabela 14).

Tabela 14. Causas de óbito

CAUSA DE ÓBITO	IDADE (ANOS)	DOENÇA DE BASE	DIA PÓS- TCTH	PERÍODO PÓS-TCTH
Doença veno-oclusiva hepática (VOD)	45	LMA	31	Precoce
Fusariose disseminada	21	AAS	32	Precoce
Infecção não especificada	23	AAS	46	Precoce
Septicemia por <i>Enterococcus faecium</i>	16	AAS	49	Precoce
Doença por HCMV (cólon) associado à DECH	53	SMD	50	Precoce
Doença por HCMV (estômago)	50	SMD	52	Precoce
Septicemia por <i>Candida</i>	34	LMC	94	Precoce
DECH	39	LMA	100	Precoce
Septicemia não especificada	45	LMC	118	Tardio
Recidiva da doença de base (LMA) e aspergilose pulmonar	52	LMA	123	Tardio
Fusariose disseminada associada a DECH	17	LMC	132	Tardio
Recidiva da doença de base (LNH)	43	LNH	144	Tardio
Pneumonia, insuficiência renal e hepática	63	MM	161	Tardio
Recidiva da doença de base (LMA) e aspergilose pulmonar	65	LMA	163	Tardio
DECH grave	52	LNH	170	Tardio
Infecção intestinal não especificada	60	LMA	170	Tardio

DECH (doença do enxerto-contrá-hospedeiro); LMA (leucemia mieloide aguda); AAS (anemia aplástica severa); SMD (síndrome mielodisplásica); LMC (leucemia mieloide crônica); LNH (linfoma não-Hodgkin); MM (Mieloma múltiplo); LLC (leucemia linfóide crônica)

A análise estatística realizada pelo teste exato de Fisher não encontrou associação entre a infecção ativa causada pelo HCMV e o óbito. Já a manifestação da HCMV-doença e “provável HCMV-doença” parecem favorecer o óbito no pós-TCTH, em que, segundo valor de $p \leq 0,015$, apresentaram associação estatisticamente significativa (Tabela 15).

Tabela 15. Relação entre o HCMV e óbito no pós-TCTH

		ÓBITO		<i>p</i>
		<i>Sim</i>	<i>Não</i>	
INFECÇÃO ATIVA CAUSADA PELO HCMV	<i>Sim</i>	7	13	1
	<i>Não</i>	10	19	
HCMV-DOENÇA + “PROVÁVEL HCMV-DOENÇA”	<i>Sim</i>	5	1	0,015*
	<i>Não</i>	12	31	

* estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$)



As infecções causam grande preocupação no pós-TCTH do tipo alogênico. Estudos relataram que a incidência de infecções atingem 77% dos pacientes e a mortalidade relacionada às infecções pode chegar a 20% no pós-TCTH. Recentemente, devido ao uso de antibióticos e antifúngicos na profilaxia e tratamento dessas infecções, a incidência da mortalidade associada às infecções bacterianas e fúngica no pós-transplante diminuiu significativamente. No entanto, devido à ausência de medicamentos eficazes para a prevenção e tratamento da maioria dos vírus, a incidência e mortalidade associada às infecções virais aumentaram relativamente, especialmente no período precoce pós-TCTH (127).

Embora o uso das drogas antivirais GCV, FOS e VGCV tenha reduzido a morbidade e mortalidade associadas à doença causada pelo HCMV, seu uso deve ser realizado com cautela devido aos efeitos colaterais associados a estes medicamentos, como neutropenia, mielossupressão, plaquetopenia, comprometimento renal entre outros (48,109,128). Sendo assim, a estratégia de vigilância viral e tratamento preemptivo tornaram-se padrão ouro para a prevenção da doença causada pelo HCMV no pós-TCTH (129). Suas vantagens incluem o direcionamento da terapia antiviral para os pacientes que apresentam risco de manifestação da HCMV-doença, redução do número de pacientes expostos à toxicidade antiviral, diminuição do risco de resistência aos medicamentos e maximização da relação custo-benefício (130).

O sucesso da terapia preemptiva depende, em grande parte, do uso de técnicas adequadas para o diagnóstico precoce da infecção causada pelo HCMV (128). Problemas de diagnóstico ocorrem em receptores de transplante, principalmente quando a reativação do HCMV aparece de forma assintomática. Por esta razão é essencial o uso de técnicas de diagnóstico que ofereçam informações sobre os fatores preditivos para o início da HCMV-doença, controle da progressão da doença, monitoramento da eficácia da terapia antiviral e constatação da falha deste tratamento (99). Durante o ano de 2003, quase metade dos centros de transplante utilizavam o monitoramento viral baseado no antígeno *pp65* em

leucócitos do sangue periférico, enquanto o restante já havia adotado a quantificação do HCMV em plasma ou sangue total pela técnica da PCR (129).

Atualmente a PCR em tempo real se tornou um teste amplamente utilizado para o diagnóstico e quantificação do HCMV em amostras clínicas, tanto com o uso de testes comerciais, quanto com testes padronizados *in house*. Por ser uma técnica muito sensível para uso clínico, pode haver diagnósticos positivos em pacientes que não apresentam risco de desenvolvimento da HCMV-doença, havendo a necessidade de padronizar um *cutoff* (valor de referência) para indicar o início do tratamento antiviral (70). Não é recomendado que um valor de *cutoff* universal seja adotado (131). Sendo assim, é necessário a determinação de um *cutoff* indicativo para o início do tratamento antiviral, específico para cada protocolo de PCR e para cada instituição, devendo levar em consideração os fatores de risco apresentado por cada grupo de pacientes (70).

O método da antigenemia ainda tem sido indicado como “padrão ouro” para guiar o tratamento precoce da infecção ativa causada pelo HCMV. Além das desvantagens atribuídas a esta técnica como curto período para processar a amostra, incapacidade de realização em amostras de pacientes neutropênicos e não ser um marcador confiável da extensão e gravidade da HCMV-doença (132), outro problema tem sido relatado. Várias publicações apontam a existência de um fenômeno paradoxal associado aos resultados de antigenemia durante o tratamento com GCV, sendo frequentemente visto um aumento ou níveis persistentemente elevados de células *pp65*-positivas durante o tratamento, associado à diminuição ou persistência de baixos níveis de viremia, demonstrando assim uma divergência inexplicável, que comumente induz a equipe médica a alterar o tratamento antiviral. No entanto, esta mudança de tratamento é desnecessária, particularmente nos casos em que a viremia é negativa, documentando assim a eficácia do tratamento com GCV em bloquear a replicação viral (133). Sendo assim, no presente estudo e conforme publicado por Choi et al (2009), somente amostras não expostas ao GCV foram incluídas na construção da curva ROC da infecção ativa causada pelo HCMV, a fim de minimizar o risco de resultados não confiáveis ou discrepantes (18).

Após a construção da curva ROC e determinação do *cutoff* de 116 cópias do HCMV para indicar a necessidade do tratamento antiviral, o desempenho da antigenemia e da PCR em tempo real foram comparados. Primeiramente a análise da correlação existente

entre os resultados quantitativos e qualitativos foi realizada em 2 grupos distintos: (A) todos os resultados obtidos ao longo do estudo e (B) somente resultados de amostras não expostas ao GCV. Em ambas as análises a correlação foi observada, sendo melhor entre a PCR em tempo real e a antigenemia de amostras não expostas ao GCV, concluindo que a quantificação feita pela antigenemia durante o tratamento com GCV pode não se correlacionar diretamente com a replicação viral, conforme já mencionado por Gerna et al (2003) (133). Breda et al (2013) observaram baixa concordância entre os resultados qualitativos obtidos pela antigenemia e PCR em tempo real, atribuindo este fato à positividade mais precoce da PCR em tempo real (134). No presente estudo a PCR em tempo real também se mostrou mais precoce para diagnosticar a infecção ativa causada pelo HCMV.

Após a validação do protocolo da PCR em tempo real, determinação do *cutoff* da infecção ativa causada pelo HCMV e confirmação de sua associação e correlação com a antigenemia, a PCR foi adotada como único critério para o monitoramento da infecção ativa causada pelo HCMV. Durante a vigilância viral, 40,8% dos pacientes incluídos no estudo apresentaram infecção ativa causada pelo HCMV com mediana do tempo de diagnóstico de 43 dias pós-TCTH. Valores similares foram observados por Xuan et al (2012) e Lilleri et al (2007), em que 41,6% e 34% dos pacientes apresentaram infecção ativa causada pelo HCMV com mediana do tempo de diagnóstico de 41 e 43 dias pós-TCTH, respectivamente (127, 135).

Como o diagnóstico da doença causada pelo HCMV é feita por teste histológico, a carga viral média correspondente à invasão tecidual tem sido pesquisada. No presente estudo a maioria dos pacientes que tiveram evidências de infecção ativa causada pelo HCMV não apresentou doença causada por este vírus. Sendo assim, houve a necessidade da construção de uma curva ROC para a determinação do *cutoff* sugestivo para o aparecimento da HCMV-doença, obtendo o valor de 479 cópias do HCMV.

Dados científicos demonstram que o diagnóstico de cargas virais abaixo do *cutoff* indicativo para a HCMV-doença rotineiramente estão associadas ao mau funcionamento de órgãos (108). Dezesete amostras apresentaram resultados entre 116 e 478 cópias do HCMV, estando frequentemente associados a alterações das enzimas hepáticas. Já as 23 amostras com carga viral acima do *cutoff* sugestivo de HCMV-doença

foram comumente acompanhadas por alterações das enzimas hepáticas e sintomas como vômito, diarreia ou febre.

Acompanhando os vários centros que preferem reportar a carga viral como \log_{10} cópias/mL no intuito de que a equipe médica fique menos propensa a interpretar pequenas alterações nas cargas virais (136) os valores de *cutoff* obtidos foram convertidos, adotando os valores de 2,06 \log_{10} cópias do HCMV como sendo indicativo da infecção ativa e 2,68 \log_{10} cópias como sugestivo para o aparecimento da HCMV-doença.

Valores muito discrepantes de *cutoff* para indicar a necessidade do tratamento antiviral têm sido publicados. Martín-Gandul et al (2013) estabeleceram o *cutoff* de 2600 cópias/mL para iniciar este tratamento (137). Diferentemente, Halfon et al (2011) adotaram o *cutoff* de 1130 cópias/mL para distinguir os pacientes com necessidade do tratamento antiviral (138), Baldanti et al (2008) iniciaram o tratamento a partir do diagnóstico da carga viral ≥ 10000 cópias/mL (139) e Choi et al (2009) indicaram o *cutoff* de 20000 cópias de DNA/mL para os pacientes de alto risco (18).

A significativa variabilidade observada entre os resultados de quantificação do HCMV apresentada pelos diversos métodos moleculares disponíveis limita a comparação interlaboratorial desses resultados (134). Sendo assim, na intenção de superar a limitação da comparação interlaboratorial o *World Health Organization Expert Committee on Biological Standardization* recentemente estabeleceu o primeiro padrão internacional para testes de DNA do HCMV. Os resultados serão apresentados em unidades internacionais (UI)/mL podendo ser comparados entre os diversos centros de transplantes. A disponibilidade desse controle permitirá aos centros de transplantes a possibilidade de avaliar o desempenho das diversas metodologias utilizadas, e seu resultado permitirá definir *Guidelines* para a terapia preemptiva para a infecção e doença causada pelo HCMV (134).

Diversos estudos relatam que a carga viral inicial e a cinética da carga viral são importantes fatores de risco para o aparecimento da HCMV-doença (70). Mesmo não sendo possível definir o momento exato do aparecimento da doença é evidente que o risco é significativamente aumentado a cada aumento de \log_{10} da carga viral do HCMV (98,108). Kraft et al (2012) afirmaram que o aumento $> 0,5 \log_{10}$ cópias do HCMV/mL representa uma importante mudança biológica na replicação viral (136) e, segundo Hardie et al (2013), este aumento está fortemente associado a uma significativa probabilidade de manifestação

da doença causada pelo HCMV (132). Embora os resultados apresentados no presente estudo tenham sido expressos em \log_{10} cópias, o risco de manifestação da HCMV-doença parece acompanhar estes dados, já que a diferença entre os *cutoffs* sugestivos para a reativação viral e para o aparecimento da HCMV-doença foi de 0,62 \log_{10} cópias.

Buyck et al (2010) apontam a quantidade acumulada do HCMV como um fator fundamental para a patogênese do HCMV em receptores de TCTH (140). Baseado nos resultados obtidos, em que 58,3% dos pacientes que apresentaram cargas virais $\geq 2,68 \log_{10}$ cópias não apresentaram evidências da doença causada pelo HCMV antes, durante ou após o tratamento antiviral, observou-se que a quantidade absoluta acumulada do HCMV, isoladamente, não pode ser utilizada para indicar a manifestação da HCMV-doença.

A velocidade da replicação viral e o aumento da carga viral em amostras subsequentes também se mostraram fatores prognósticos para desenvolvimento da doença por HCMV, e sua gravidade parece estar associada à resposta ao tratamento antiviral. A análise da cinética da carga viral e evolução clínica dos pacientes sugeriram a seguinte classificação de risco para o óbito: (A) Baixo risco: altas cargas virais com rápida resposta ao tratamento atingindo a negatificação total do HCMV, (B) Médio risco: HCMV-doença com rápida resposta ao tratamento antiviral e progressiva redução da carga do HCMV, (C) Alto risco: altas cargas virais com resposta ao tratamento e diagnóstico persistente de cargas virais abaixo do *cutoff* de 116 cópias do HCMV (infecção latente) e, (D) Altíssimo risco: HCMV-doença com falha ao tratamento antiviral. Observações semelhantes a esta classificação de risco já foram constatadas e explicadas em publicações científicas. Lazzarotto (2010) afirmou que como a fase virêmica precede ou coincide com a disseminação generalizada da infecção, os resultados obtidos durante o monitoramento por testes quantitativos específicos para o HCMV são diretamente proporcionais à extensão da infecção ou doença (99). Deste modo, é evidente que os pacientes que atingem a negatificação do HCMV ou a progressiva redução da carga do HCMV durante o tratamento antiviral apresentem menor risco de complicações associadas a este vírus. O mal prognóstico associado ao diagnóstico persistente da infecção latente foi discutido por Varani et al (2011), os quais asseguraram que o HCMV tem um efeito imunossupressor em receptores de TCTH alogênico, o que favorece o óbito causado por infecções fúngicas e bacterianas (141). Já a alta mortalidade associada à falha de resposta ao tratamento antiviral

pode estar relacionada ao tempo de replicação do HCMV, o qual, segundo Emery et al (2000), ocorre rapidamente *in vivo*, podendo ter a carga viral duplicada em apenas 24 horas (108).

Apesar do grande sucesso da abordagem preemptiva no controle do HCMV, casos de pneumonia ou doença digestiva eventualmente ocorrem por falha da técnica de monitoramento ou por adoecimento sem ocorrência de viremia. Esta última eventualidade é mais frequente nos casos de doença digestiva, quando pode ocorrer replicação local do HCMV sem viremia prévia ou concomitante. Outra possibilidade é a ocorrência de viremia com baixa carga viral, fora dos limites de detecção da técnica utilizada (5).

Em estudo realizados por Ruel et al (2007) 50% dos pacientes que tiveram HCMV-doença não apresentaram viremia no início desta manifestação. Metade destes pacientes permaneceu com diagnósticos negativos pela PCR até o óbito ou resolução da doença e 25% apresentaram positividade somente 35 dias após o diagnóstico da HCMV-doença, observando pobre correlação entre a PCR e a HCMV-doença (142).

Cho et al (2013) observaram que o diagnóstico do HCMV feito pela PCR precedeu a manifestação da HCMV-doença no TGI em 42% dos casos. O diagnóstico concomitante da viremia e da HCMV-doença foi visto em 46% dos pacientes e a manifestação da HCMV-doença no TGI sem ocorrência de viremia ocorreu em 12% do pacientes estudados (143).

Boeckh et al (2011) relataram que a manifestação da HCMV-doença pode escapar da vigilância da viremia realizada pela PCR e/ou antigenemia em aproximadamente 25% dos pacientes (144). No presente estudo os mesmos dados foram observados já que a viremia foi diagnosticada pela PCR em tempo real em 75% dos pacientes que apresentaram HCMV-doença. Em todos os casos de HCMV-doença houve acometimento do TGI comprovado por biópsia, a qual revelou associação entre o HCMV e a DECH em 75% casos. Sessenta e seis por cento dos pacientes que tiveram HCMV-doença associada à DECH não responderam bem ao tratamento com GCV, evoluindo para o óbito em um curto período de tempo após o início do tratamento antiviral, confirmando a informação de que a ocorrência da HCMV-doença no TGI, bem como a gravidade da DECH afetam negativamente a sobrevida de pacientes submetidos ao TCTH alogênico (143). Outra razão apontada para a pobre resposta ao tratamento antiviral está na influência que as alterações

imunológicas causadas pela DECH e/ou decorrentes de sua terapia podem ter na resposta ao tratamento antiviral para a HCMV-doença no TGI (143). Além disso, a gravidade da HCMV-doença pode estar associada ao regime de condicionamento mieloablativo que estes pacientes foram submetidos no pré-TCTH. Nakamae et al (2009) concluíram que após o regime de condicionamento de intensidade reduzida, embora as células residuais do receptor tenham efeito limitado no controle da reativação do HCMV, sua memória imunológica HCMV-específica contribui para a limitação da progressão da carga viral do HCMV (145).

O fator de risco pré-TCTH mais importante para o aparecimento da HCMV-doença no pós-TCTH é o *status* sorológico do doador (D) e receptor (R), em que R+ apresentam maior risco, seguido por D+/R- (43). Atualmente o sorostatus do doador tem sido alvo de diversos trabalhos que afirmam que receptores de CTH de D- tendem sofrer, com maior frequência, reativação do HCMV no pós-TCTH, quando comparados com D+. Jaskulaet al (2012) observaram reativação do HCMV em 39% dos receptores de CTH de D- e em 24% dos receptores com D+, concluindo que a HCMV-soronegatividade do doador favorece o sucesso do transplante somente em R- (146).

No presente estudo, embora não tenha sido observada significância estatística entre a infecção ativa e HCMV-doença com a combinação sorológica D-/R+, provavelmente pelo pequeno tamanho amostral, os 2 pacientes que apresentaram esta combinação foram apontados como sendo de alto risco para tal evento. Ambos os pacientes apresentaram elevadas cargas do HCMV diagnosticadas pela PCR em tempo real e boa resposta ao tratamento com GCV. O paciente 19, com manifestação de SIDA (classificação C3), talvez tenha tido rápida resposta e boa evolução clínica atribuída ao tratamento antirretroviral, o qual, segundo Mihăilescu et al (2008), tem ação na redução da carga viral do HCMV, mesmo sem terapia antiviral específica para este vírus (147). Já o paciente 34 (submetido ao TCTH HLA idêntico não aparentado), embora tenha apresentado rápida resposta ao tratamento antiviral, evoluiu com infecção por *Serratia marcescens*, *Candida tropicalis* e óbito, corroborando com Varani et al (2011), que afirmaram que o HCMV eleva o risco de óbito por infecções, principalmente na combinação sorológica D-/R+ (141). Além disso, o alto risco de reativação do HCMV atribuído à combinação sorológica D-/R+

pode ser explicado pela falta de transferência do doador para o receptor de células T com memória imunológica específica para o controle da replicação do HCMV (146).

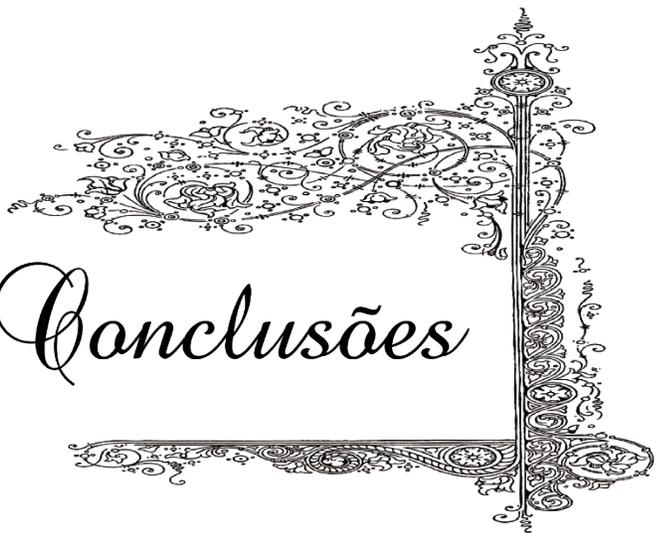
Outros fatores de risco para a reativação do HCMV incluem uso de doadores não aparentados, tratamentos imunossupressores e a manifestação da DECH (43). No presente estudo, o grau de parentesco entre o doador e o receptor apresentou associação estatisticamente significativa com a infecção ativa causada pelo HCMV. Segundo Mihăilescu et al (2008) o risco da reativação viral pode ser aumentado quando doadores HCMV IgG-negativos são utilizados (147), corroborando com os resultados apresentados pelo paciente 34, conforme supracitado. Por fim, a relação bidirecional entre a manifestação da DECH e a infecção ativa causada pelo HCMV também foi pesquisada, a qual não foi encontrada. Vale ressaltar que neste estudo 75% dos pacientes que tiveram diagnóstico da HCMV-doença apresentaram diagnóstico concomitante de DECH. Embora os artigos sobre o tema sugiram que a replicação do HCMV pode induzir o aparecimento da DECH, não existem dados que comprovem esta associação (90).

Segundo Boeckh et al (2011), a fonte das CTH e o regime de condicionamento afetam minimamente o risco de reativação e HCMV-doença, com exceção do transplante de sangue do cordão umbilical (43). No presente estudo, não houve correlação significativa entre o tipo de enxerto e a infecção ativa ou manifestação da HCMV-doença. Já o tipo do regime de condicionamento, embora não tenha apresentado correlação significativa com a infecção e doença causada pelo HCMV, observou-se que 100% dos pacientes submetidos ao regime de condicionamento mieloablativo com posterior manifestação de HCMV-doença evoluíram para o óbito por esta causa, ao passo que os pacientes que foram submetidos ao regime de intensidade reduzida e tiveram HCMV-doença apresentaram rápida resposta ao tratamento com GCV. Estes dados podem ser explicados por Boeckh (2011), que afirmou que o tipo de regime de condicionamento pode influenciar na gravidade da HCMV-doença (144). Já Nakamae et al (2009) constataram que a probabilidade de sobrevida dos pacientes que tiveram HCMV-doença não foi significativamente diferente entre os pacientes submetidos ao regime de condicionamento mieloablativo e de intensidade reduzida, discordando dos resultados apresentados neste trabalho (145).

No presente estudo, 17 pacientes (34,7%) evoluíram para o óbito após o TCTH, sendo que 82,3% destes morreram por causas não relacionadas à recidiva. A principal causa de óbito observada foi o aparecimento de infecções, responsável por 64,7% destes óbitos. Dentre as infecções, a HCMV-doença no TGI foi responsável por 11,8% dos óbitos ocorridos. Estudos similares foram anteriormente realizados na mesma Instituição. Em estudo realizado entre 2007 e 2009, a taxa de mortalidade observada foi de 43,3%. Destas, 46,1% foram causadas por infecções, excluindo o HCMV, 7,7% por doença causada pelo HCMV, 38,5% relacionadas à recidiva da doença de base e 7,7% por pericardite (148). Entre 1998 e 2000 Bonon et al (2005) observaram uma taxa de mortalidade de 26,3%, sendo 20% destes óbitos relacionados a recidiva da doença de base, 20% à DECH aguda, 20% à infecções bacterianas e 40% à HCMV-doença (149).

A mortalidade precoce é considerada o principal obstáculo para a ampla aplicação do TCTH alogênico. A toxicidade associada ao regime de condicionamento, o aparecimento de infecções, a DECH e a recidiva da doença de base são as principais causas do fracasso do transplante, em que, dependendo dos fatores de risco apresentados pelos pacientes, entre 10 e > 50% dos receptores morrem durante o primeiro ano do TCTH (150). Nas últimas décadas, várias alterações no âmbito do TCTH alogênico foram realizadas, observando-se uma redução no risco de mortalidade não relacionada à recidiva no pós-TCTH (151).

Embora muito progresso tenha sido visto durante a última década na prevenção da doença causada pelo HCMV no pós-TCTH, várias questões ainda não foram resolvidas, sendo necessário aumentar a especificidade da terapia preemptiva, da detecção da viremia e do monitoramento da resposta das células-T HCMV-específica (42).

A large, intricate decorative flourish in the bottom right corner, featuring a vertical stem with a circular medallion at the top, and horizontal arms extending to the left and bottom, both filled with dense, swirling floral and scrollwork patterns.

Conclusões

7. Conclusões

- ✓ O desenvolvimento de um protocolo de PCR em tempo real foi realizada com êxito e as análises feitas para a validação da técnica demonstraram que a mesma pode ser implantada na rotina clínica pós-TCTH para o diagnóstico e monitoramento do HCMV;
- ✓ O *cutoff* sugestivo para a infecção causada pelo HCMV com necessidade de tratamento antiviral no pós-TCTH alogênico é de 116 cópias do HCMV ou $2,06 \log_{10}$ cópias do HCMV;
- ✓ O *cutoff* sugestivo para o acometimento de órgãos pelo HCMV é de 479 cópias do HCMV ou $2,68 \log_{10}$ cópias do HCMV;
- ✓ Embora o desempenho da PCR em tempo real tenha apresentado correlação estatisticamente significativa com o da antigenemia, o diagnóstico da reativação do HCMV feito pela PCR em tempo real ocorreu 5 dias antes do que o da antigenemia;
- ✓ 40,8% dos pacientes apresentaram reativação do HCMV, com maior frequência de ocorrência entre os dias +41 e +50 pós-TCTH;
- ✓ 8,2% dos pacientes monitorados manifestaram a HCMV-doença no TGI;
- ✓ 11,8% dos óbitos ocorridos tiveram relação com a doença causada pelo HCMV;
- ✓ A única variável que apresentou associação estatisticamente significativa com a infecção ativa causada pelo HCMV foi o grau de parentesco entre o doador e o receptor;
- ✓ O regime de condicionamento mieloablativo parece agravar o quadro da doença causada pelo HCMV;

✓ A velocidade da replicação viral e o aumento da carga viral em amostras subsequentes se mostraram fatores prognósticos para o desenvolvimento da doença causada pelo HCMV, e sua gravidade parece estar associada à resposta ao tratamento antiviral;

✓ Os resultados observados sugeriram a seguinte classificação de risco para o óbito: (A) Baixo risco: altas cargas virais com rápida resposta ao tratamento atingindo a negatificação total do HCMV, (B) Médio risco: HCMV-doença com rápida resposta ao tratamento antiviral e progressiva redução da carga viral do HCMV, (C) Alto risco: altas cargas virais com resposta ao tratamento e diagnóstico persistente da infecção latente e, (D) Altíssimo risco: HCMV-doença com falha ao tratamento antiviral.

Referências Bibliográficas



8. Referências Bibliográficas

- 1.Silva AMC, Varkulja G. Infecções. In: Machado LN, Camandoni VO, Leal KPH, Moscatell ELM (org.). Transplante de Medula Óssea – Abordagem Multidisciplinar. São Paulo: Lemar; 2009. p. 259-78.
- 2.Gold E, Nankervis GA. Cytomegalovirus. 3 ed. New York: Plenum Press; 1991. 169p.
- 3.Pass RF. Cytomegalovirus. In: Knipe D, Howley P. Fields Virology. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins; 2001. p. 2675–705.
- 4.Pannuti CS. Citomegalia. In: Veronesi R. Tratado de Infectologia. 3 ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2005. p. 314-21.
- 5.Machado C, Cunha CA, Dias VMCH, Silva MMG, Guarnica M, Nucci M. Infecções em Transplantes de Células-Tronco Hematopoiéticas. In: Voltarelli JC, Pasquini R, Ortega ETT (org.). Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas. São Paulo: Atheneu; 2009. p. 589-630.
- 6.Gentile G, Capobianchi A, Ferraironi M, Greco E, Martino P. Relationship of serum human herpesvirus 6 DNA with cytomegalovirus pp65 antigenemia in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Transplantation*. 2004;77:1907-8.
- 7.Streblow DN, Orloff SL, Nelson JA. Acceleration of allograft failure by cytomegalovirus. *Curr Opin Immunol*. 2007;19:577-82.
- 8.Costa SCB. Infecção por Citomegalovírus (CMV): Epidemiologia, Diagnóstico e Tratamento. *Revista Brasileira de Clínica Terapêutica*. 1999;25(1):18-28.

9. Maya TC, Azulay DR. Infecção pelo Citomegalovírus. In: Lupi O, Silva AS, Pereira JrAC. Herpes: Clínica, Diagnóstico e Tratamento. 1 ed. Brasil: Medsi Editora Médica e Científica Ltda; 2000. p. 135-56.
10. Boeckh M, Boivin G. Quantification of Cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11:5333-4.
11. Lassener D, Geissler F, Bosse S, Hofmann J, Witzigmann H, Remke H et al. Diagnosis and monitoring of acute cytomegalovirus infection in peripheral blood of transplant recipients by nested reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). *Transpl Int.* 2000;13:366-71.
12. Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, Lembo D. The Human Cytomegalovirus. *Pharmacol Ther.* 2003;98:269-97.
13. Machida U, Kami M, Fukui T, Kazuyama Y, Kinoshita M, Tanaka Y et al. Real-Time automated PCR for early diagnosis and monitoring of cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation. *J Clin Microbiol.* 2000;38:2536-42.
14. Nitsche A, Steuer N, Schmidt CA, Landt O, Ellerbrok H, Pauli G et al. Detection of Human Cytomegalovirus DNA by Real-Time Quantitative PCR. *Clin Microbiol.* 2000;38(7): 2734-7.
15. Razonable RR, Paya C, Smith TF. Role of the laboratory in diagnosis and management of cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell and solid organ transplant recipients. *J Clin Microbiol.* 2002;40:746-52.
16. Gerna G, Lilleri D, Caldera D, Furione M, Zenone-Bragotti L, Alessandrino EP. Validation of a DNAemia cutoff for preemptive therapy of cytomegalovirus in adult hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* 2008;41:873-9.

17. Albuquerque DM de. Aspectos moleculares do citomegalovírus humano durante infecção ativa em pacientes submetidos ao transplante de medula óssea [Tese - Doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2006.
18. Choi SM, Lee DG, Lim J, Park SH, Choi JH, Yoo JH et al. Comparison of Quantitative Cytomegalovirus Real-time PCR in Whole Blood and pp65 Antigenemia Assay: Clinical Utility of CMV Real-time PCR in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *J Korean Med Sci.* 2009;24(4):571-8.
19. Ikewaki J, Ohtsuka E, Satou T, Kawano R, Ogata M, Kikuchi H et al. Real-time PCR assays based on distinct genomic regions for cytomegalovirus reactivation following hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2005;35(4):403-10.
20. Gimeno C, Solano C, Latorre JC, Hernández-Boluda JC, Clari MA, Remigia MJ 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 Microb.* 2008;46(10): 3311-8.
21. Kersey JH. Historical background to hematopoietic stem cell transplantation. In: Atkinson K, Champlin R, Ritz J, Fibbe WE, Ljungman P, Brenner MK (org.). *Clinical Bone Marrow and Blood Stem Cell Transplantation.* New York: Cambridge University Press; 2004. p. 1-10.
22. Thomas ED. Transplante de Medula Óssea no Mundo – Uma Revisão Histórica. In: Voltarelli JC, Pasquini R, Ortega ETT (org.). *Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas.* São Paulo: Atheneu; 2009. p. 3-13.
23. Voltarelli JC, Malmegrim KCR, Diamond HR; Almeida-Oliveira A, Ferreira E. Imunologia do Transplante de Células tronco Hematopoiéticas. In: Voltarelli JC, Pasquini

R, Ortega ETT (org.). Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas. São Paulo: Atheneu; 2009. p. 57-92.

24. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, Gress R, Sepkowitz K, Storek J et al. Guidelines for Preventing Infectious Complications among Hematopoietic Cell Transplantation Recipients: A Global Perspective. Biol Blood Marrow Transplant. 2009;15: 1143-238

25. Gea-banacloche J. Risks and Epidemiology of Infections after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. In: Bowden RA, Ljungman P, Snyderman DR (org.). Transplant Infections. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010. p. 53-66.

26. Castelli JB, Hackman R. Patologia do Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas. In: Voltarelli JC, Pasquini R, Ortega ETT (org.). Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas. São Paulo: Atheneu; 2009. p. 1001-29.

27. Palmer J, Azevedo W, Voltarelli JC, Chao N. Doença do Enxerto-Contra-Hospedeiro Aguda. In: Voltarelli JC, Pasquini R, Ortega ETT (org.). Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas. São Paulo: Atheneu; 2009. p. 677-92.

28. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. Biol Blood Marrow Transplant. 2005;11(12):945-56.

29. Bouzas LFS, Silva MM. Doença do Enxerto-Contre-Hospedeiro Crônica. In: Voltarelli JC, Pasquini R, Ortega ETT (org.). Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas. São Paulo: Atheneu; 2009. p. 938-63.

30. Rezvani AR, Deeg HJ. Introduction to Hematopoietic Cell Transplantation. In: Bowden RA, Ljungman P, Snyderman DR (org.). Transplant Infections. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010. p. 1-12.

31.Saboya R, Lerner D, Alousi A, Dulley FL, Lima M de. Regimes Quimioterápicos de Condicionamento para Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas. In: Voltarelli JC, Pasquini R, Ortega ETT (org.). Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas. São Paulo: Atheneu; 2009. p. 527-53.

32.Garnica M, Machado C, Cappellano P, Carvalho VVH, Nicolato A, Cunha CA et al. Recomendações no manejo das complicações infecciosas no transplante de células-tronco hematopoéticas. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2010;32(Supl. 1):140-162

33.Nucci M, Maiolin A. Infecções em transplante de medula óssea. Medicina, Ribeirão Preto. 2000;33: 278-93.

34. Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR); National Marrow Donor Program (NMDP); European Blood and Marrow Transplant Group (EBMT); American Society of Blood and Marrow Transplantation (ASBMT); Canadian Blood and Marrow Transplant Group (CBMTG); Infectious Disease Society of America (IDSA); Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA); Association of Medical Microbiology and Infectious Diseases Canada (AMMI); Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplant recipients: a global perspective. Bone Marrow Transplant. 2009;44(8):453-558.

35.Oliveira JSR, Kerbauy FR. Avaliação Pré-Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas. In: Voltarelli JC, Pasquini R, Ortega ETT (org.). Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas. São Paulo: Atheneu,; 2009. p. 589-630.

36.Löffel ABC, Tanaka EAK, Lago EGM, Silva MA, Attiê R. Quimioterapia em Altas Doses. In: Machado LN, Camandoni VO, Leal KPH, Moscatell ELM (org.). Transplante de Medula Óssea – Abordagem Multidisciplinar. São Paulo: Lemar; 2009. p. 179 -85.

37. Neto JZ, Calixto RF, Ostronoff M. Citopenias Hematológicas e Falha de Enxertia Pós-Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas. In: Voltarelli JC, Pasquini R, Ortega ETT (org.). Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas. São Paulo: Atheneu; 2009. p. 631-51.
38. Hebart H, Einsele H. Clinical Aspects of CMV Infection After Stem Cell Transplantation Hum Immunol. 2004;65(5):432-6.
39. Boeckh M, Nichols WG, Papanicolaou G, Rubin R, Wingard JR, Zaia J. Cytomegalovirus in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients: Current Status, Known Challenges, and Future Strategies. Biol Blood Marrow Transplant. 2003;9(9):543-58
40. Nichols WG. Management of Infectious Complications in the Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipient. J Intensive Care Med. 2003;18(6):295-312.
41. Mocarski ES, Courcelle CT. Cytomegalovirus and their replication. In: Knipe D.; Howley P. (Eds.), Fields Virology. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins; 2001. p. 2629-73.
42. Hakki M, Boeckh MJ, Ljungman P. Cytomegalovirus Infection after Stem Cell Transplantation. In: Bowden RA, Ljungman P, Snyderman DR (org.). Transplant Infections. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010. p. 311-27.
43. Boeckh M, Geballe AP. Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. J Clin Invest. 2011;121(5):1673-80
44. Gandhi MK, Khanna R. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. Lancet Infect Dis. 2004;4(12):725-38.

45. Matos SB, Meyer R, Lima FWM. Citomegalovírus: Uma Revisão de Patogenia, Epidemiologia e Diagnóstico da Infecção. *Revista Saúde.Com.* 2011;7(1):44-57.
46. Bresnahan WA, Shenk T. A subset of viral transcripts packaged within human cytomegalovirus particles. *Science.* 2000;288(5475):2373-6.
47. Silva AG. Propriedades Gerais dos Herpesvírus. In: Lupi O, Silva AS, Pereira Jr AC. *Herpes – Clínica, Diagnóstico e Tratamento.* Medsi Editora Médica e Científica Ltda; 2000. p. 135-56.
48. Peres RMB. Detecção e Monitorização da Infecção Ativa pelo Citomegalovírus Humano (HCMV) pelas Técnicas de Antigenemia, Nested-PCR e Real-Time PCR em Pacientes Submetidos ao Transplante Alogênico de Células-Tronco Hematopoéticas [Dissertação de Mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2009.
49. Fortunato EA, Spector DH. Regulation of human cytomegalovirus gene expression. *Adv Virus Res.* 1999;54:61-128.
50. Sanchez V, Greis KD, Sztul E, Britt WJ. Accumulation of virion tegument and envelope proteins in a stable cytoplasmic compartment during human cytomegalovirus replication: characterization of a potential site of virus assembly. *J Virol.* 2000;74(2):975-86.
51. Disponível em: http://viromedica.blogspot.com.br/2010_04_01_archive.html [Acesso em 20 jun. 2013]
52. Sinclair J. Human cytomegalovirus: Latency and reactivation in the myeloid lineage. *J Clin Virol.* 2008;41(3):180-5.
53. Döcke WD, Prösch S, Fietze E, Kimel V, Zuckermann H, Klug C et al. Cytomegalovirus reactivation and tumour necrosis factor. *Lancet.* 1994; 343(8892):268-9.

- 54.Santos NOS, Romanos MTV, Wigg MD. Introdução à Virologia Humana. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan; 2002. 254 p.
- 55.Soderberg-Naucler C. Human Cytomegalovirus Persists in Its Host and Attacks and Avoids Elimination by the Immune System. *Crit Rev Immunol*. 2006;26(3):231-64.
- 56.Ljungman P, Brandan R. Factors influencing cytomegalovirus seropositivity in stem cell transplant patients and donors. *Haematologica*. 2007;92(8):1139-42.
- 57.Hengel H, Brune W, Koszinowski UH. Immune evasion by cytomegalovirus-survival strategies of a highly adapted opportunist. *Trends Microbiol*. 1998;6(5):190-7.
- 58.Sinzger C, Digel M, Jahn G. Cytomegalovirus cell tropism. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2008;325:63-83.
- 59.Leite AMM, Migotto KC, Fumero AC. Toxicidade Pulmonar. In: Machado LN, Camandoni VO, Leal KPH, Moscatell ELM (org.). *Transplante de Medula Óssea – Abordagem Multidisciplinar*. São Paulo: Lemar, 2009. p. 223-31.
- 60.Conceição OJG, Focaccia R, Veronesi R. Citomegalia. In: Veronesi R (org.). *Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2005. p. 206-10.
- 61.Disponível em: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Cytomegalovirus_01.jpg [Acesso em 20 jun. 2013]
62. Heineman TC. Human cytomegalovirus vaccines. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R et al. (org.). *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge: Cambridge University Press; 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK47380/> [Acesso em 01 mai. 2013]

63. Junqueira JJM, Sancho TM, Santos VA. Citomegalovírus: Revisão dos Aspectos Epidemiológicos, Clínicos, Diagnósticos e de Tratamento. *News Lab*. 2008;86:88-104.
64. Griffiths PD. Cytomegalovirus. In: Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattison JR (org.). *Principles and Practice of Clinical Virology*. London: John Wiley and Sons; 2000. p. 79-116.
65. 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(11):1439-47.
66. Hyde TB, Schmid DS, Cannon MJ. Cytomegalovirus seroconversion rates and risk factors: Implications for congenital CMV *Rev Med Virol*. 2010;20(5):311-26
67. Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of Cytomegalovirus Infection and Disease in Transplant Recipients. *Clin Infect Dis*. 2002;34(8):1094-7.
68. Souza MA, Passos AM, Treitinger A, Spada C. Seroprevalence of cytomegalovirus antibodies in blood donors in southern, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2010;43(4):359-61.
69. Gerna G, Lilleri D, Furione M, Baldanti F. Management of human cytomegalovirus infection in transplantation: validation of virologic cut-offs for preemptive therapy and immunological cut-offs for protection. *New Microbiol*. 2011;34(3):229-54.
70. Ljungman P, Hakki M, Boeckh M. . Cytomegalovirus in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2011;25(1):151-69.
71. Peres RMB, Bonon SHA, Costa CRC, Durante PA, Albuquerque DM, Oliveira C et al. Cytomegalovirus Infection in Hematopoietic Stem Cell transplantation; Review in the Literature and a Single Center Experience, (State University of Campinas, Brazil). In:

Lautenschlager I (org.). Cytomegalovirus Infections: Risk factors, Causes and Management. Nova Iorque: Nova Science Publishers; 2012. p. 137-57.

72.Sagedal S, Nordal KP, Hartmann A, Sund S, Scott H, Degré M et al. The impact of cytomegalovirus infection and disease on rejection episodes in renal allograft recipients. Am J Transplant. 2002;2(9):850-6.

73.Schroeder R, Michelon T, Fagundes I, Bortolotto A, Lammerhirt E, Oliveira J et al. Cytomegalovirus disease latent and active infection rates during the first trimester after kidney transplantation. Transplant Proc. 2004;36(4):896-8.

74.Boeckh M, Ljungman P. How we treat CMV in hematopoietic cell transplant recipients. Blood. 2009;113(23):5711-9.

75.Eid AJ, Bakri SJ, Kijpittayarit S, Razonable RR. Clinical features and outcomes of cytomegalovirus retinitis after transplantation. Transpl Infect Dis. 2008;10(1):13-8.

76.Crippa F, Corey L, Chuang EL, Sale G, Boeckh M. Virological, clinical, and ophthalmologic features of cytomegalovirus retinitis after hematopoietic stem cell transplantation. Clin Infect Dis. 2001;32(2):214-9.

77.Piñana JL, Martino R, Barba P, Margall N, Roig MC, Valcárcel D et al. Cytomegalovirus infection and disease after reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation: single-centre experience. Bone Marrow Transplant. 2010;45(3):534-42.

78.Burgunder MR. Pulmonary and Cardiac Effects. In: Ezzone S, Schmit-Pokorny K. (org.). Blood and marrow Stem cell Transplantation: Principles, Practice and nursing Insights. Jones and Bartlett Publishers; 2007. p. 245-62.

79. Frare e Silva RL, Pallotta R. Complicações Pulmonares em Pacientes Submetidos a Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas. . In: Voltarelli JC, Pasquini R, Ortega ETT (org.). Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas. São Paulo: Atheneu; 2009. p. 729-39.
80. Vogel MN, Brodoefel H, Hierl T, Beck R, Bethge WA, Claussen CD et al. Differences and similarities of cytomegalovirus and pneumocystis pneumonia in HIV-negative immunocompromised patients – thin section CT morphology in the early phase of the disease . Br J Radiol. 2007;80(955):516-23.
81. Cathomas G, Morris P, Pekle K, Cunningham I, Emanuel D. Rapid diagnosis of cytomegalovirus pneumonia in marrow transplant recipients by bronchoalveolar lavage using the polymerase chain reaction, virus culture, and the direct immunostaining of alveolar cells. Blood. 1993;81(7):1909-14.
82. <http://www.pathology.washington.edu/about/education/gallery/infections/> [Acessado em 26 jun. 2013]
83. Pereira DV, Fagundes RB, Müller LB. Complicações digestivas e hepáticas do transplante de células-tronco hematopoéticas. In: Voltarelli JC, Pasquini R, Ortega ETT (org.). Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas. São Paulo: Atheneu; 2009. p. 709-27.
84. Page MJ, Dreese JC, Poritz LS, Koltun WA. Cytomegalovirus enteritis. A highly lethal condition requiring early detection and intervention. Dis Colon Rectum. 1998;41(5):619-23.
85. Nagata N, Kobayakawa M, Shimbo T, Hoshimoto K, Yada T, Gotoda T et al. Diagnostic value of antigenemia assay for cytomegalovirus gastrointestinal disease in immunocompromised patients. World J Gastroenterol. 2011;17(9):1185-91.

86.Spencer GD, Shulman HM, Myerson D, Thomas ED, McDonald GB. Diffuse intestinal ulceration after marrow transplantation: a clinicopathologic study of 13 patients. *Hum Pathol.* 1986;17(6):621-33.

87.Mcdonald GB. Steinbach G. Gastrointestinal Infections after Solid Organ or Hematopoietic Cell Transplantation. In: Bowden RA, Ljungman P, Snyderman DR (org.). *Transplant Infections.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2010. p. 236-55.

88.Mori T, Okamoto S, Matsuoka S, Yajima T, Wakui M, Watanabe R et al. Risk-adapted pre-emptive therapy for cytomegalovirus disease in patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2000;25(7):765-9.

89.Jang EY, Park SY, Lee EJ, Song EH, Chong YP, Lee SO et al. Diagnostic performance of the cytomegalovirus (CMV) antigenemia assay in patients with CMV gastrointestinal disease. *Clin Infect Dis.* 2009;48(12):121-4.

90.Cantoni N, Hirsch HH, Khanna N, Gerull S, Buser A, Bucher C et al. Evidence for a bidirectional relationship between cytomegalovirus replication and acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2010;16(9):1309-14.

91.Guarnica M, Machado C, Cappellano P, Carvalho VVH, Nicolato A, Cunha CA et al. Recomendações no manejo das complicações infecciosas no transplante de células-tronco hematopoéticas. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2010;32(Supl. 1):140-162

92.Marty FM, Bryar J, Browne SK, Schwarzberg T, Ho VT, Bassett IV et al. Sirolimus-based graft-versus-host disease prophylaxis protects against cytomegalovirus reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a cohort analysis. *Blood.* 2007;110(2):490-500.

93. Martin SI, Marty FM, Fiumara K, Treon SP, Gribben JG, Baden LR. Infectious complications associated with alemtuzumab use for lymphoproliferative disorders. *Clin Infect Dis.* 2006;43(1):16-24.
94. Delgado J, Pillai S, Benjamin R, Caballero D, Martino R, Nathwani A et al. The effect of in vivo T cell depletion with alemtuzumab on reduced-intensity allogeneic hematopoietic cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2008;14(11):1288-97.
95. Hirsch HH, Lautenschlager I, Pinsky BA, Cardenoso L, Aslam S, Cobb B et al. An International Multicenter Performance Analysis of Cytomegalovirus Load Tests. *Clin Infect Dis.* 2013;56(3):367-73.
96. Meyers JD, Ljungman P, Fisher LD. Cytomegalovirus excretion as a predictor of cytomegalovirus disease after marrow transplantation: importance of cytomegalovirus viremia. *J Infect Dis.* 1990;162(2):373-80.
97. Ljungman P, de la Camara R, Cordonnier C, Einsele H, Engelhard D, Reusser P et al. Management of CMV, HHV-6, HHV-7 and Kaposi-sarcoma herpesvirus (HHV-8) infections in patients with hematological malignancies and after SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2008;42(4):227-40.
98. Ljungman P, Reusser P, de la Camara R, Einsele H, Engelhard D, Ribaud P et al. Management of CMV: recommendations from the infectious diseases working party of the EBMT. *Bone Marrow Transplant.* 2004;33(11):1075-81.
99. Lazzarotto T. The best practices for diagnosis and monitoring of CMV infection in immunocompromised patients. *HAART.* 2010;9:290-8.

100. van der Bij W, Torensma R, van Son WJ, Anema J, Schirm J, Tegzess AM et al. Rapid immunodiagnosis of active cytomegalovirus infection by monoclonal antibody staining of blood leucocytes. *J Med Virol.* 1988;25(2):179-88.
101. Zaia JA. Cytomegalovirus Infection. In: Thomas ED, Blume KG, Forman SJ (org.). *Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation.* Wiley-Blackwell; 2004. p. 701-26.
102. Grossi P, Minoli L, Percivalle E, Irish W, Vigano M, Gerna G. Clinical and virological monitoring of human cytomegalovirus infection in 294 heart transplant recipients. *Transplantation.* 1995;59(6):847-51.
103. Kotton CN. Management of cytomegalovirus infection in solid organ transplantation. *Nat Rev Nephrol.* 2010;6(12):711-21.
104. Drew WL. Laboratory diagnosis of cytomegalovirus infection and disease in immunocompromised patients. *Curr Opin Infect Dis.* 2007;20(4):408-11.
105. Boeckh M, Boivin G. Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(3):533-54.
106. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem.* 2009;55(4):611-22.
107. Atkinson C, Emery VC. Cytomegalovirus quantification: Where to next in optimising patient management? *J Clin Virol.* 2011;51(4):223-8.
108. Emery VC, Sabin CA, Cope AV, Gor D, Hassan-Walker AF, Griffiths PD. Application of viral-load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation. *Lancet.* 2000;355(9220):2032-6.

- 109.Lischka P, Zimmermann H. Antiviral strategies to combat cytomegalovirus infections in transplant recipients. *Curr Opin Pharmacol*. 2008;8(5):541-8.
- 110.De Clercq E. Antivirals: past, present and future. *Biochem Pharmacol*. 2013;85(6):727-44.
- 111.Disponível em:
http://www.dialogoroche.com.br/content/dam/dialogo/pt_br/Bulas/V/Valcyte/Valcyte_HealthCare_Professional_CDS_4B.pdf [Acesso em 20 jun. 2013]
112. Disponível em: <http://www.medicinanet.com.br/bula/2628/foscavir.htm> [Acesso em 20 jun. 2013]
- 113.De Clercq E, Holý A. Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(11):928-40.
- 114.Mercorelli B, Sinigalia E, Loregian A, Palù G. Human cytomegalovirus DNA replication: antiviral targets and drugs. *Rev Med Virol*. 2008;18(3):177-210.
- 115.Price NB, Prichard MN. Progress in the development of new therapies for herpesvirus infections. *Curr Opin Virol*. 2011;1(6):548-54.
- 116.Biron KK. Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. *Antiviral Res*. 2006;71(2-3):154-63.
- 117.Marty FM, Boeckh M. Maribavir and human cytomegalovirus-what happened in the clinical trials and why might the drug have failed? *Curr Opin Virol*. 2011;1(6):555-62.
- 118.Prichard MN, Kern ER. The search for new therapies for human cytomegalovirus infections. *Virus Res*. 2011;157(2):212-21.

119. Vere Hodge A. Scientific report: highlights of 24th ICAR, 8-11 May 2011, Sofia, Bulgaria. *Antivir Chem Chemother*. 2011;22(2):75-85.
120. Kaul DR, Stoelben S, Cober E, Ojo T, Sandusky E, Lischka P et al. First report of successful treatment of multidrug-resistant cytomegalovirus disease with the novel anti-CMV compound AIC246. *Am J Transplant*. 2011;11(5):1079-84.
121. Costa CRC. Detecção da carga viral dos herpesvirus HHV-5 (Citomegalovirus) e HHV-6 pela reação em cadeia da polimerase em tempo real e transcrição reversa acoplada a Nested-PCR em pacientes receptores de transplante de células tronco hematopoiéticas [Tese - Doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2009.
122. Whelan JA, Russell NB, Whelan MA. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *J Immunol Methods*. 2003;278(1-2):261-9.
123. Forti MC, Alcaide RLM. Validação de Métodos Analíticos do Laboratório de Aerosóis, Soluções Aquosas e Tecnologias – Laquatec. INPE: São José dos Campos, 2011.
124. Brito NM, Amarante Jr OP, Polese L, Ribeiro ML. Validação de métodos analíticos: Estratégia e Discussão. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*. 2003;13:129-46.
125. R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
126. Muñoz-Cobo B, Solano C, Costa E, Bravo D, Clari MÁ, Benet I et al. Dynamics of cytomegalovirus (CMV) plasma DNAemia in initial and recurrent episodes of active CMV infection in the allogeneic stem cell transplantation setting: implications for designing preemptive antiviral therapy strategies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17(11):1602-11.

- 127.Xuan L, Huang F, Fan Z, Zhou H, Zhang X, Yu G et al. Effects of intensified conditioning on Epstein-Barr virus and cytomegalovirus infections in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies. *J HematolOncol.* 2012;5:46.
- 128.Khansarinejad B, Soleimanjahi H, MirabSamiee S, Hamidieh AA, Paryan M, Sanahmadi Y. Quantitation of human cytomegalovirus DNA in plasma using an affordable in-house qPCR assay.*J Virol Methods.* 2012 Aug;183(2):170-5.
- 129.Green LM, Leisenring W, Stachel D, Pergam SA, Sandmaier BM, Wald A et al. Efficacy of a viral load-based, risk-adapted, preemptive treatment strategy for prevention of cytomegalovirus disease after hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2012;18(11):1687-99
- 130.Singh N. Late-onset cytomegalovirus disease as a significant complication in solid organ transplant recipients receiving antiviral prophylaxis: a call to heed the mounting evidence. *Clin. Infect. Dis.* 2005, 40:704-8.
- 131.Mori T, Kato J. Cytomegalovirus infection/disease after hematopoietic stem cell transplantation.*Int J Hematol.* 2010;91(4):588-95.
- 132.Hardie DR, Korsman SN, Hsiao NY.Cytomegalovirus load in whole blood is more reliable for predicting and assessing CMV disease than pp65 antigenaemia.*J Virol Methods.* 2013;193(1):166-8.
- 133.Gerna G, Sarasini A, Lilleri D, Percivalle E, Torsellini M, Baldanti F et al. In vitro model for the study of the dissociation of increasing antigenemia and decreasing DNAemia and viremia during treatment of human cytomegalovirus infection with ganciclovir in transplant recipients. *J Infect Dis.* 2003;188(11):1639-47.

134. Breda G, Almeida B, Carstensen S, Bonfim CM, Nogueira MB, Vidal L et al. Human cytomegalovirus detection by real-time PCR and pp65- antigen test in hematopoietic stem cell transplant recipients: a challenge in low and middle-income countries. *Pathog Glob Health*. 2013;107(6):312-9.

135. Lilleri D, Gerna G, Furione M, Bernardo ME, Giorgiani G, Telli S et al. Use of a DNAemia cut-off for monitoring human cytomegalovirus infection reduces the number of preemptively treated children and young adults receiving hematopoietic stem-cell transplantation compared with qualitative pp65 antigenemia. *Blood*. 2007;110(7):2757-60.

136. Kraft CS, Armstrong WS, Caliendo AM. Interpreting quantitative cytomegalovirus DNA testing: understanding the laboratory perspective. *Clin Infect Dis*. 2012;54(12):1793-7.

137. Martín-Gandul C, Pérez-Romero P, Sánchez M, Bernal G, Suárez G, Sobrino M et al. Determination, validation and standardization of a CMV DNA cut-off value in plasma for preemptive treatment of CMV infection in solid organ transplant recipients at lower risk for CMV infection. *J Clin Virol*. 2013;56(1):13-8.

138. Halfon P, Berger P, Khiri H, Martineau A, Pénaranda G, Merlin M, Faucher C. Algorithm based on CMV kinetics DNA viral load for preemptive therapy initiation after hematopoietic cell transplantation. *J Med Virol*. 2011;83(3):490-5.

139. Baldanti F, Lilleri D, Gerna G. Human cytomegalovirus load measurement and its applications for pre-emptive therapy in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Hematol Oncol*. 2008;26(3):123-30.

140. Buyck HC, Griffiths PD, Emery VC. Human cytomegalovirus (HCMV) replication kinetics in stem cell transplant recipients following anti-HCMV therapy. *J Clin Virol*. 2010;49(1):32-6.

141. Varani S, Landini MP. Cytomegalovirus-induced immunopathology and its clinical consequences. *Herpesviridae*. 2011;2(1):6.
142. Ruell J, Barnes C, Mutton K, Foulkes B, Chang J, Cavet J et al. Active CMV disease does not always correlate with viral load detection. *Bone Marrow Transplant*. 2007;40(1):55-61.
143. Cho BS, Yahng SA, Kim JH, Yoon JH, Shin SH, Lee SE et al. Impact of cytomegalovirus gastrointestinal disease on the clinical outcomes in patients with gastrointestinal graft-versus-host disease in the era of preemptive therapy. *Ann Hematol*. 2013;92(4):497-504.
144. Boeckh M. Complications, diagnosis, management, and prevention of CMV infections: current and future. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011:305-9.
145. Nakamae H, Kirby KA, Sandmaier BM, Norasetthada L, Maloney DG, Maris MB et al. Effect of conditioning regimen intensity on CMV infection in allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15(6):694-703.
146. Jaskula E, Bochenska J, Kocwin E, Tarnowska A, Lange A. CMV Serostatus of Donor-Recipient Pairs Influences the Risk of CMV Infection/Reactivation in HSCT Patients. *Bone Marrow Res*. 2012;2012:375075.
147. Mihăilescu R, Arama V, Paraschiv S, Streinu-Cercel A, Oțelea D, Munteanu Det al. Impact of highly active antiretroviral therapy on cytomegalovirus viraemia in the absence of specific anti-cytomegalovirus therapy. *Rom J Intern Med*. 2008;46(4):305-11.
148. Peres RM, Costa CR, Andrade PD, Bonon SH, Albuquerque DM, de Oliveira C 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.

149. Bonon SH, Menoni SM, Rossi CL, De Souza CA, Vigorito AC, Costa DB et al. Surveillance of cytomegalovirus infection in haematopoietic stem cell transplantation patients. *J Infect.* 2005;50(2):130-7.

150. Gratwohl A, Brand R, Frassoni F, Rocha V, Niederwieser D, Reusser P et al. Cause of death after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in early leukaemias: an EBMT analysis of lethal infectious complications and changes over calendar time. *Bone Marrow Transplant.* 2005;36(9):757-69.

151. Kurosawa S, Yakushijin K, Yamaguchi T, Atsuta Y, Nagamura-Inoue T, Akiyama H et al. Recent decrease in non-relapse mortality due to GVHD and infection after allogeneic hematopoietic cell transplantation in non-remission acute leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 2013;48(9):1198-204.



ANEXO 1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa FCM/ UNICAMP

PARECER CEP: N° 1157/2009 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0892.0.146.000-09

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “PCR EM TEMPO REAL BASEADA EM REGIÕES GENÔMICAS DISTINTAS PARA O DIAGNÓSTICO DA REATIVAÇÃO DO CITOMEGALOVÍRUS HUMANO E VALIDAÇÃO DO CUT-OFF PARA INICIAR A TERAPIA PRECOCE EM PACIENTES SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOPOÉTICAS”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Renata Maria Borges Peres
INSTITUIÇÃO: Departamento de Clínica Médica/FCM/UNICAMP
APRESENTAÇÃO AO CEP: 06/12/2009

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 09/02/11 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Acompanhar pacientes que foram submetidos à transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH) em relação á reativação do citomegalovírus humano, durante os 05 primeiros meses pós-transplante

III - SUMÁRIO

Serão acompanhados 30 pacientes de ambos os sexos, de qualquer fenótipo e etnia submetidos ao transplante alogênico de células tronco hematopoéticas, na Unidade de Transplante de Medula Óssea (HEMOCENTRO-UNICAMP) os quais serão monitorizados semanalmente desde o dia do transplante até o término do 5º mês de pós-transplante. Serão coletados 3 tubos (4ml cada) contendo anticoagulante EDTA de sangue periférico de cada paciente no dia do transplante e nos 5 meses pós-transplante, após a assinatura do TCLE. As amostras de sangue serão utilizadas para realização de exames laboratoriais pelas técnicas de antigemia e PCR em tempo real no Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnica de Biologia Molecular da FCM-UNICAMP. Os critérios de inclusão dos pacientes são: aqueles submetidos ao transplante alogênico de células tronco hematopoéticas; que consentiram as coletas de sangue para monitorização durante 5 meses pós-transplante; pacientes com sobrevida ao transplante de, no mínimo, 1 mês pós-transplante; e com monitorização regular. Os critérios para suspensão ou encerramento: pacientes que evoluírem a óbito ou perderem o enxerto antes de completar 1 mês de monitorização pós-transplante, pacientes que não tiverem seguimento regular ou adequado. O estudo será encerrado quando atingir o número de pacientes necessário para serem feitas análises conclusivas sobre o proposto inicial.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.



Referente à fonte de financiamento, não precisa constar no Termo de Consentimento e sim na folha de orçamento. Essa informação não é relevante para o sujeito de pesquisa, mais sim ao Comitê, razão pela qual deve ser informada no formulário de orçamento. Sugerimos que essas informações sejam consideradas na elaboração de futuros projetos ao Comitê.

V - PARECER DO CEP

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

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII- DATA DA REUNIÃO

Homologado na XII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 15 de dezembro de 2009.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP



CEP, 23/03/10.
(PARECER CEP: Nº 1157/2009)

PARECER

I - IDENTIFICAÇÃO:

~~PROJETO: "PCR EM TEMPO REAL BASEADA EM REGIÕES GENÔMICAS DISTINTAS PARA O DIAGNÓSTICO DA REATIVAÇÃO DO CITOMEGALOVÍRUS HUMANO E VALIDAÇÃO DO CUT-OFF PARA INICIAR A TERAPIA PRECOCE EM PACIENTES SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOPOÉTICAS".~~

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Renata Maria Borges Peres

II - PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou o novo título "PADRONIZAÇÃO DO PCR EM TEMPO REAL PARA DIAGNÓSTICO DA REATIVAÇÃO DO CITOMEGALOVÍRUS HUMANO E DETERMINAÇÃO DO CUT-OFF PARA GUIAR O TRATAMENTO PREEMPTIVO EM PACIENTES RECEPTORES DE CÉLULAS TRONCOS HEMATOPOÉTICAS"; a utilização de uma região genômica para detecção da reativação do HCMV; os novos objetivos e o novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

III - DATA DA REUNIÃO.

Homologado na III Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 23 de março de 2010.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

ANEXO 2. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa FCM/ UNICAMP quanto à Dispensa da Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



CEP, 24/05/11.
(PARECER CEP: Nº 1157/2009)

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

www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

PARECER

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "PADRONIZAÇÃO DO PCR EM TEMPO REAL PARA DIAGNÓSTICO DA REATIVAÇÃO DO CITOMEGALOVÍRUS HUMANO E DETERMINAÇÃO DO CUT-OFF PARA GUIAR O TRATAMENTO PREEMPTIVO EM PACIENTES RECEPTORES DE CÉLULAS TRONCOS HEMATOPOÉTICAS".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Renata Maria Borges Peres

II – PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

III – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na V Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 24 de maio de 2011.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

ANEXO 3. Resultados obtidos ao longo do monitoramento

ID PACIENTE	AGM	PCR EM TEMPO REAL	TTO HCMV	DOENÇA POR HCMV	DECH	ALTERAÇÕES E COMPLICAÇÕES CLÍNICAS CONTIDAS NOS PRONTUÁRIOS MÉDICOS	ÓBITO
PACIENTE 1	- *Sem coleta após o D+98*	D+42(20,67); D+49(29,07) *Sem coleta após o D+98*	Não tratado	-	-	<p>*TCTH autólogo prévio*</p> <p>D+13 a D+20: febre D+19: diarreia D+20: ↑ bilirrubina total (2,67mg/dL), TGO (51U/L) e GGT (141U/L) acompanhados por diarreia (aspecto mucoso com consistência líquida) com pesquisa + para <i>Microsporidium</i> D+28: ↑ LDH (762U/L) D+56: episódios de vômito pós-prandial D+59 a D+64: internação hospitalar por osteomielite média aguda supurada e hemocultura + para <i>Staphylococcus</i> sp D+59 a D+60: febre D+68: valor elevado de LDH (625U/L) D+78: tomografia computadorizada abdominal (aparecimento de linfonodomegalia mesenterial na região peripancreática, perigástrica e mesenterial, inferior perirretal e retroperitoneal e imagens nodulares sólidas ao polo superior do rim esquerdo) D+84: dor abdominal, v náusea e suspeita de massa palpável no epigastro D+97: infusão de linfócitos do doador D+102: internação hospitalar por insuficiência renal aguda e derrame pleural neoplásico bilateral D+104: cultura de líquido pleural negativo para bactérias e fungos (visualizadas numerosas células sugestivas de células neoplásicas) D+106: fezes líquidas com cultura + para <i>Aeromonas hydrophila</i> D+109: fezes semipastosas com aspecto mucoso e exame parasitológico negativo D+112 a D+116: pleurodese e febre D+127: hemocultura + para <i>Enterococcus faecalis</i> D+137: hemocultura + para <i>Staphylococcus</i> sp e ↑ proteína C reativa (6,34mg/dL), LDH (1310U/L), TGP (134U/L), TGO (143U/L), bilirrubina total (11,09md/dL), FAL (381U/L) e GGT (366U/L) D+142: hematúria (urina com presença de hemácias superior a 100,00/campo)</p>	D+144 (progressão da doença de base - LNH)

PACIENTE 2	D+28(5,94) ² ; D+40(56,22) ¹	D+45 a D+82	<p>D+1: hematúria (urina com presença de hemácias superior a 100,00/campo) D+1 a D+8: febre D+9 a D+16: febre e mucosite D+8: ↑ TGP (136U/L), TGO (73U/L), bilirrubina total (1,07md/dL) e GGT (65U/L) D+9 a D+44: bilirrubina total e GGT acima dos valores de referência D+10 e D+11: hemocultura + para <i>Staphylococcus epidermidis</i> D+12: endoscopia/Bx esôfago (negativo para HCMV) D+16: ↑ bilirrubina total (3,13md/dL) D+18: ↑ TGP (140U/L), TGO (82U/L), bilirrubina total (4,09md/dL) e GGT (234U/L) D+25 a D+29: febre D+27: hemocultura + para <i>Staphylococcus</i> sp e <i>Pseudomonas</i> sp D+40: ↑ LDH (756mg/dL) D+44 a D+51: internação hospitalar por febre, epigastralgia e tratamento com ganciclovir D+51: febre e epigastralgia D+53: normalização da bilirrubina total D+74: normalização de TGP e redução de TGO (31U/L) e GGT (80U/L) D+82: redução de LDH (507mg/dL) D+145: citologia da mucosa oral (negativo para HCMV)</p>	
PACIENTE 3	D+33(1); D+96(2); D+103(4); D+110(3); D+124(2) D+21 (9,14); D+33(32,6); D+49(6,24) ¹ ; D+56(25,44) ¹ ; D+63(10,21); D+68(3,63) ¹ ; D+75(4,31) ¹ ; D+82(9,76); D+89(18,55); D+96(86,58); D+103(189,75); D+110(139,19); D+117(104,39); D+124(34,48); D+131(3,5)	D+40 a D+63 D+103 a D+152	D+42 (pele - grau II) D+44 (TGI, olho, boca - overlap grave)	<p>D+5: fezes com aspecto mucoso e consistência líquida com exame parasitológico + para <i>Blastocystis hominis</i> D+8 a D+13: mucosite e febre D+13: ↑ GGT (409U/L) D+18: ↑ FAL (137U/L) e GGT (627U/L) D+21 a D+28: febre D+27: ↑ FAL (151U/L) e GGT (790U/L) D+28: hemocultura + para <i>Staphylococcus haemolyticus</i> D+29 a D+33: leucocitose D+40: citologia da mucosa oral (negativo para HCMV) D+41: disfagia, erosões em antro e duodenite erosiva – endoscopia e Bx esôfago, estômago e duodeno (negativa para HCMV e sugestivo de DECH no duodeno), ↑ FAL (261U/L) e ↓ GGT (590U/L) D+42: febre e Bx de pele compatível com DECH – grau II D+53: ↑ TGO (82U/L), FAL (329U/L) e GGT (1497U/L) D+57: ↑ TGP (60U/L), TGO (82U/L), FAL (304U/L) e GGT (1695U/L) D+60: valores elevados de TGP (126U/L), TGO (66U/L), FAL (357U/L) e GGT (1806U/L) D+60 a D+63: neutropenia febril D+67: ↑ LDH (779U/L) D+68: DECH (olhos, pele e TGI) D+103: dor e hiperemia em olho esquerdo com diminuição da acuidade visual e diminuição da salivação D+105: ↑ TGP (144U/L) e TGO (83U/L) D+123 e D+124: sinusite D+131: manchas hiperocrômicas em MMSS (suspeita de hemocromatose 2ária e DECH sobreposição) D+144: valores elevados de TGP (81U/L), TGO (60U/L), FAL (196U/L) e GGT (1026U/L)</p>

<p style="text-align: center;">PACIENTE 4</p>	<p style="text-align: center;">-</p> <p style="text-align: center;">D+21(1,85)²; D+42(72,1)¹; D+47(124,32)¹; D+54(236,26)¹; D+61(76,26); D+68(5,23)¹</p>	<p style="text-align: center;">D+57 a D+90</p>	<p style="text-align: center;">-</p> <p style="text-align: center;">-</p> <p>D+1: urocultura + para <i>Escherichia coli</i> superior a 100000 UFC D+1 a D+22: ↑ TGP e TGO D+5 a D+19: mucosite grau IV e febre D+4 a D+36: ↑ GGT D+7: hemocultura + para <i>Streptococcus mitis</i> D+8 a D+74: ↑ bilirrubina total D+8: citologia mucosa oral (negativo para HCMV) D+15 e D+17: hemocultura + para <i>Enterococcus faecalis</i> D+35 e D+36: diarreia aquosa associada à ↑ TGP (606U/L) e TGO (460U/L) D+36 a D+43: internação hospitalar por diarreia aquosa associada à piora das transaminases hepáticas e da função renal - ciclosporinemia D+54: valores elevados de TGP (158U/L), TGO (114U/L) e bilirrubina total (3,20mg/dL) D+74: ↑ LDH (1197U/L) D+95: citologia mucosa oral (negativo para HCMV) D+103: quimerismo misto e enxerto instável até D+100 e normalização de LDH D+109: normalização das taxas de TGP e TGO D+130: neutropenia mesmo com uso de fator estimulador de colônias das células progenitoras da medula óssea (G-CSF) D+133: infecção das vias aéreas superiores com febre, coriza, espirros, tosse e mialgia D+142: último episódio de febre</p>
<p style="text-align: center;">PACIENTE 5</p>	<p style="text-align: center;">-</p> <p style="text-align: center;">D+35(7,01); D+98(4,36)</p>	<p style="text-align: center;">Não tratado</p>	<p style="text-align: center;">-</p> <p style="text-align: center;">-</p> <p>*Incompatibilidade ABO complexa: receptor B/ doador A2*</p> <p>D+1 a D+28: GGT acima do valor de referência D+28: ↑ LDH (648U/L) D+35 a D+36: cefaleia occipital, lesão em lábios semelhante a herpes simples (HSV) D+77 e D+78: há mais de 20 dias com ardência nos olhos sem secreção e azia D+84: cefaleia em região têmporo-parietal, secura nasal, dor muscular em região cervical, hiperemia de orofaringe D+107: dor à palpação abdominal, ainda com cefaleia e com dores articulares D+112: ↑ FAL (184U/L) e LDH (671U/L) D+142: Bx de medula óssea compatível com Mielofibrose grau II - perda do enxerto</p>
<p style="text-align: center;">PACIENTE 5 2º TC/TH</p>	<p style="text-align: center;">-</p> <p style="text-align: center;">D+35(5,12); D+42(11,18); D+51(12,38); D+65(11,39); D+77(14,67); D+91(7,87)</p>	<p style="text-align: center;">Não tratado</p>	<p style="text-align: center;">-</p> <p style="text-align: center;">D+128 (pele)</p> <p>D+1: ↑TGP (44U/L), TGO (42U/L), FAL (151U/L) e GGT (165U/L) D+10: ↑TGP (141U/L), bilirrubina total (2,41mg/dL), FAL (392U/L) e GGT (476U/L) D+20: valores elevados de TGP (79U/L), TGO (53U/L), bilirrubina total (1,72mg/dL), FAL (552U/L) e GGT (608U/L) D+35: ↑ LDH (580U/L) D+100: normalização das enzimas hepáticas D+128: ↑ FAL (120U/L) e GGT (95U/L) e DECH agudo tardio (pele)</p>

PACIENTE 6	D+61(1)	D+14(5,73); D+131(6,27); D+138(17,13)	D+72 a D+110	-	D+41 (boca, pele e fígado – overlap grave grau III)	<p>*TCTH autólogo prévio*</p> <p>D+15: ↑ TGO (50U/L) e hemocultura + para <i>Staphylococcus epidermidis</i> D+15 e D+16: febre D+20 e D+25: ↑ proteína C reativa (6,57 e 5,46mg/dL, respectivamente) D+33: ↑TGP (100U/L), TGO (77U/L) e LDH (840U/L) D+49 e D+50: trombose venosa profunda em membro superior direito e DECH global moderado (boca grau I/fígado grau II) D+50: ↑TGP (157U/L) e TGO (102U/L) D+55: ↑TGP (216U/L) e TGO (149U/L) D+89: DECH global grave (boca, fígado e pele) - grau III D+98: ↑ TGO (454U/L), TGP (678U/L), GGT (760U/L), FAL (460U/L), bilirrubina total (4,64mg/dL) e LDH (837U/L) D+105: ↑ TGO (1064U/L), TGP (1776U/L), FAL (439U/L), GGT (1645U/L), bilirrubina total (7,65 mg/dL) e LDH (1176U/L) D+105 a D+112: internação hospitalar por piora da função renal e tratamento da DECH D+124: redução de TGO (87U/L), TGP (470U/L), FAL (298U/L), GGT (1570U/L) e bilirrubina total (1,24 mg/dL) D+145: valores elevados de TGO (60U/L), TGP (227U/L), FAL (228U/L) e GGT (1389U/L)</p>	-
PACIENTE 7	-	-	Não tratado	-	-	<p>D+4 a D+32: valores elevados de TGO, TGP , FAL, GGT e bilirrubina total D+13: Bx pele + para <i>Fusarium</i> sp e <i>Staphylococcus</i> sp D+15: leucocitose D+39: normalização de TGP D+53: ↑ GGT (114 U/L) e FAL (194 U/L) D+60: normalização da bilirrubina total D+74: normalização da taxa de GGT D+88 a D+109: ↑ TGO D+109: ↑ TGP e GGT D+110: 2 episódios de febre após vacina contra <i>Haemophilus</i> D+111: episódio de vômito com sangue e coágulos, astenia e queda de hemoglobina D+115: hemocultura + para bacilo gram-negativo não fermentador e <i>Staphylococcus</i> sp e normalização das taxas de TGO, TGP e GGT D+115 a D+128: febre D+121: Bx fígado (hepatopatia crônica com fibrose perissinusoidal com congestão sinusoidal com aspecto morfológico sugestivo de quadro de bloqueio de efluxo venoso) D+122: internação na UTI por queda de estado geral D+129 a D+133: febre e ↑ GGT, FAL, TGO e TGP D+136: tratamento cirúrgico para hipertensão portal e retirada do baço com pneumonia no pós-operatório</p>	-

PACIENTE 8	-	-	Não tratado	-	-	<p>D+3 a D+17: mucosite, febre e ↑ FAL, GGT, TGO e bilirrubina total D+5: ↑ proteína C reativa (1,03mg/dL) D+9: ↑ proteína C reativa (22,20mg/dL) D+13: redução da proteína C reativa (9,90mg/dL) D+16: redução da proteína C reativa (3,54mg/dL) D+21: normalização das taxas de TGP e TGO D+23: redução da proteína C reativa (2,38mg/dL) D+41: normalização das taxas de FAL e GGT D+56: sinusite e resfriado comum com coriza e tosse pouco produtiva D+57: normalização da taxa de GGT D+76: normalização da bilirrubina total D+85: sinusite em tratamento, dispneia, tosse seca, inapetência e emagrecimento D+97: Bx mucosa labial (negativo para HCMV e DECH) e ↑ TGO (62U/L) D+128 a D+146: ↑ TGO, TGP e GGT</p>
PACIENTE 9	D+50(2)	D+45(16,01); D+50(645,8); D+71(12,79)	D+58 a D+101	-	-	<p>D+0: ↑ proteína C reativa (1,23mg/dL) D+8 a D+22: mucosite D+9: ↑ proteína C reativa (1,97mg/dL) D+9 a D+14: febre D+14: citologia mucosa oral (negativo para HCMV) D+16: Bx pele (quadro 2^{ário} ao condicionamento) D+23: ↑ TGP (158U/L), TGO (163 U/L), GGT (618 U/L) e valor elevado da proteína C reativa (1,30mg/dL) D+27: normalização das taxas de TGP e TGO D+28: ↑ GGT (824 U/L) D+45: astenia, disúria e ↑ da bilirrubina total (1,13mg/dL) e GGT (171U/L) D+50: taxas acima dos valores de referência de bilirrubina total (1,09mg/dL) e GGT (120U/L) D+58: normalização da bilirrubina total D+63: normalização da taxa de GGT D+70: cultura cateter + para <i>Staphylococcus</i> sp D+101: Bx mucosa oral (negativo para DECH) D+137: disfagia para sólidos associado à queimação esofágica D+150: plenitude gástrica pós-prandial</p>

PACIENTE 10	D+49(2); D+56(2)	D+28(10,07); D+42(18,51); D+49(12,9); D+56(33,17)	D+55 a D+98	-	<p>*Incompatibilidade ABO: receptor AB+/ doador A+*</p> <p>*TCTH autólogo prévio*</p> <p>D+37 (pele grave [>50% pele]) D+112 (boca – grau II/III)</p> <p>D+1: neutrofilia e ↑ bilirrubina total (1,51mg/dL), TGO (196 U/L), TGP (81 U/L) e proteína C reativa (0,79mg/dL) D+37: DECH aguda grave (II b - IV) (>50% pele) - grau II: monilíase oral D+42 a D+84: LDH aumentado (649 a 1052 U/L) D+62: ↑ bilirrubina total (1,23 mg/dL) D+65: resolução total da DECH de pele D+71: queixa de insônia, parestesia e eventual perda de sensibilidade em mãos e pés D+98: paciente icterico e descorado com hemólise a esclarecer D+107: normalização da taxa de bilirrubina total D+112: microscopia mucosa oral (estomatite crônica superficial de interface com áreas de clivagem dermo-epidérmica, compatível com DECH crônica - grau II/III) D+119: anemia hemolítica D+126: fraqueza e falta de ar D+153: hemocromatose 2^{ária} e anemia hemolítica</p>
PACIENTE 11	D+43(18); D+48(16); D+55(1); D+132(1)	D+27(6,3); D+34(84,61); D+43(696,67); D+48(3043,66); D+55(26,69); D+62(23,54); D+90(7,49); D+118(6,3); D+125(8,74)	D+48 a D+104	-	<p>D+5: ↑ GGT (80U/L) D+9: ↑ proteína C reativa (1,72mg/dL) D+14: ↑ bilirrubina total (1,67mg/dL) e GGT (87U/L) D+20: ↑ GGT (126U/L) e LDH (546U/L) D+27: ↑ bilirrubina total (1,67mg/dL), GGT (167U/L), TGP (56U/L) e TGO (40U/L) D+34: valores aumentados de bilirrubina total (1,31mg/dL) e GGT (128U/L) D+43: valor aumentado de GGT (115U/L) D+48: valores aumentados de bilirrubina total (1,22mg/dL) e GGT (127U/L) D+61: ↑TGO (41U/L) e GGT (182U/L) D+71: sintomas de labirintite e lesão escurecida em face direita D+83: lesões pápulo eritematosas em antebraço (DECH de pele) e ↑ LDH (689U/L) D+91: Bx mucosa oral (negativo para DECH)</p>

PACIENTE 12	-	D+33(71,45); D+40(87,15); D+47(92,63); D+54(4,76)	Não tratado	-	-	<p>D+6: hemocultura + para <i>Staphylococcus epidermidis</i> e <i>Pseudomonas mendocina</i> D+6 a D+14: febre e mucosite D+8: ↑ proteína C reativa (14,50mg/dL) D+12: valor elevado de proteína C reativa (13,50mg/dL) D+15: redução da proteína C reativa (3,47mg/dL) D+38: Bx mucosa labial e glândula salivar menor (negativo para DECH) D+40: ↑ TGO (43 U/L) D+54: escurecimento da pele com descamação (2^{ário} ao condicionamento) D+89: Bx mucosa oral (negativo para DECH) D+135: cintilografia óssea (sugestiva de envolvimento neoplásico em clavícula esquerda, terço médio do esterno, 5º arco costal esquerdo, 10º e 11º arcos costais bilaterais, crista ilíaca esquerda e sacro ilíaca direita) e TC de tórax (sugestiva de processo inflamatório em lobo pulmonar superior direito e base direita)</p>
PACIENTE 13	D+140 (109)	D+140 (7814,27); D+154(209,82)	Início em D+140	D+147 (CÓLON)	D+122 (pele, fígado e TGI)	<p>D+4 a D+18: valores elevados de bilirrubina total D+8: ↑ proteína C reativa (2,14mg/dL) D+26: hemocultura + para <i>Staphylococcus</i> sp D+41 e D+49: ↑ bilirrubina total D+42: ↑ LDH (599U/L) D+105: Bx mucosa oral (estomatite crônica superficial moderada negativo para DECH) D+109: hemocultura + para <i>Staphylococcus epidermidis</i> D+110 a D+112: mal estar, astenia e febre D+116: prurido, lábios secos, hipossalivação, farmacodermia com rash cutâneo ~25% e liquen plano na mandíbula D+117: Bx pele (dermatite crônica inespecífica leve perivascular superficial e negativo para DECH) e ↑ TGP (66U/L), TGO (42U/L), GGT (197U/L) e ↑ LDH (599U/L)LDH (599U/L) D+123: ↑ TGP, TGO, FAL, GGT e DECH agudo (pele + fígado [?] + TGI). Fezes com aspecto mucoso com exame parasitológico negativo e com presença de bactérias D+125 e D+127: ↑ TGP, TGO, bilirrubina total e GGT D+132: ↑ bilirrubina total (2,88mg/dL), TGP (125U/L) e TGO (414 /L) D+139: ↑ bilirrubina total (3,48mg/dL) e GGT (114U/L) D+140: ↑ bilirrubina total (3,70mg/dL), TGP (76U/L) e GGT (115U/L) <u>D+147: diarreia a esclarecer. Colonoscopia e Bx de cólon e reto (colite crônica erosiva com alterações celulares compatíveis com infecção por HCMV)</u> D+147: Bx esôfago e duodeno (ausência de sinais de infecção viral ou DECH) D+148: ↑ bilirrubina total (6,01mg/dL), TGP (114U/L), TGO (38U/L) e GGT (342U/L) D+153: redução de bilirrubina total (5,16mg/dL), TGP (79/L), TGO (27U/L) e ↑ GGT (415 U/L) D+158: DECH aguda acometendo tórax frente e dorso (pele + TGI + fígado)</p>

PACIENTE 14	D+38(3); D+43(4); D+50(2)	D+29(6,88); D+38(28,43); D+43(255,51); D+50(50,01); D+57(8,89); D+157(5,6)	D+43 a D+87	-	D+29 (pele, TGI, fígado, boca - overlap grave)	<p>D+4: ↑ proteína C reativa (2,37mg/dL) D+7: hemocultura + para <i>Streptococcus mitis</i> e ↑ TGP (52 U/L) e TGO (31U/L) D+8: ↑ proteína C reativa (8,00mg/dL) D+9: ↑ proteína C reativa (17,90mg/dL) D+11: Bx pele (extravasamento de hemácias para a pele e negativo para DECH) e valor elevado de proteína C reativa (15,10mg/dL) D+14: ↑ TGP (76U/L) e TGO (31U/L) D+17: redução da proteína C reativa (4,38mg/dL) D+18: ↑ TGP (120U/L) e TGO (69U/L) D+21: ↑ TGP (217U/L), TGO (135U/L), bilirrubina total (1,36mg/dL), FAL (141U/L) e GGT (77U/L) D+29: lesões maculopapulares pruriginosas em todo o corpo e ↑ das transaminases hepáticas e TGO (219U/L) D+30: Bx pele (dermatite de interface sugestivo de quimiotoxicidade) D+42: Bx mucosa oral (negativo para DECH) D+43: ↑ TGP (61U/L), FAL (108U/L) e GGT (95U/L) D+59: mielocromatose D+63: ↑ GGT (159U/L) D+127: internação hospitalar por 7 dias por bacteremia. Hemocultura + para <i>Acinetobacter haemolyticus</i> e <i>Serratia marcescens</i> D+148: náuseas, vômitos biliosos, perda de peso e DECH em cavidade oral D+152: internação hospitalar por DECH de sobreposição (pele, TGI, fígado e boca) D+154: fezes com aspecto líquido e consistência mucosa sanguinolenta com exame parasitológico negativo e pesquisa de <i>Microsporidium</i> + (disenteria) D+157: colonoscopia e Bx cólon e reto (negativo para HCMV e DECH) D+157: endoscopia (erosões em 2ª porção duodenal e lesão elevada em antro) e Bx estômago e duodeno (gastrite crônica erosiva e duodenite crônica erosiva moderada, ambos negativos para HCMV e com sinais sugestivos de DECH)</p>	D+170 (DECH grave e choque séptico refratário)
PACIENTE 15	D+42(5); D+49(7)	D+35(27,4); D+42(125,87); D+49(186,34); D+54(12,94); D+133(8,2)	D+49 a D+96	-	-	<p>D+7: ↑ proteína C reativa (19,80mg/dL) D+8: ↑ bilirrubina total (1,24mg/dL) e GGT (67U/L) D+5 a D+18: mucosite e febre D+15: neutropenia febril de foco pulmonar D+22: normalização das tacas de FAL e GGT D+35 a D+61: ↑LDH (>500) D+49: ↑ bilirrubina total (1,36mg/dL) D+97: leucocitose (22.400) D+112: queixa de olho e boca seca, desidratado, descolorado e líquen] em bordo da língua</p>	-

PACIENTE 16

Sem coleta após D+55

D+32(80,52);
D+41
(3112,15)¹;
D+48(952,11)¹;
D+55(641,55)¹

Sem coleta após D+55

Não tratado

SUGESTIVO CISTITE HEMORRÁGICA POR HCMV (sem confirmação por Bx)

TCTH não aparentado
Incompatibilidade ABO

D+3: ↑ bilirrubina total (1,14mg/dL) e GGT (268U/L)
D+7: ↑ TGP (90U/L), TGO (110U/L), FAL (240U/L) e GGT (605U/L)
D+14: hemocultura + para *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia*
D+16: hematúria (urina com presença de hemácias superior a 100,00/campo)
D+18: fezes semipastosas com aspecto mucoso e ↑ proteína C reativa (4,47mg/dL)
D+21: hematúria (urina com presença de hemácias superior a 100,00/campo)
D+24: ↑ proteína C reativa (12,30mg/dL)
D+25: endoscopia digestiva alta normal e urina com inclusão viral (não foi possível identificar o vírus)
D+28: hematúria (urina com presença de hemácias superior a 100,00/campo) e ↑ bilirrubina total (1,58mg/dL) e GGT (150U/L)
D+30: falha da pega do enxerto
D+31: redução da proteína C reativa (4,74mg/dL)
D+32: cistite hemorrágica - viral (?)
D+33: ↑ bilirrubina total (1,78mg/dL) e GGT (138U/L)
D+38 e D+42: ↑ bilirrubina total (1,51mg/dL e 2,11mg/dL, respectivamente)
D+40: náusea e vômito (100mL)
D+42: urocultura + para *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* superior a 100000 UFC
D+44: febre
D+45: hematúria prolongada e abdome globoso, flácido e indolor. ↑ TGP (74U/L), TGO (56U/L), bilirrubina total (1,53mg/dL), FAL (215U/L) e GGT (195U/L)
D+49: piora importante da hematúria (maciça). ↑ TGP (99U/L), TGO (57U/L), bilirrubina total (1,37mg/dL), FAL (197U/L) e GGT (227U/L)
D+50: dor abdominal difusa - íleo paralítico (?). Melhora da hematúria após aumento da irrigação vesical com soro gelado e transfusão de plaquetas 12/12h. Ainfia febril
D+51: TC abdominal - 3 úlceras + perfuração
D+52: ↑ TGP (119U/L), TGO (79U/L) e bilirrubina total (3,58mg/dL)
D+54: ↑ TGP (285U/L), TGO (386U/L) e bilirrubina total (7,60mg/dL)
D+55: soro/urina: poliomavirus (-), HHV-6 e HHV-7 (-), HCMV (+). ↑ TGP (122U/L), TGO (76U/L), bilirrubina total (7,97mg/dL), FAL (404U/L) e GGT (487U/L)
D+56: paciente inapetente tentando reintroduzir líquidos e PO4 rãfia de bexiga (cistite hemorrágica)
D+59: febre, hematúria (urina com presença de hemácias superior a 100,00/campo) e valores aumentados de TGP (103U/L), TGO (50U/L), bilirrubina total (8,83mg/dL), FAL (416U/L) e GGT (579U/L)
D+60: nova infusão de CPP

PACIENTE 16
2º TCTH

-
D+0(263,42);
D+9(37,66)¹;
D+14(6,33)¹

D+2 a D+26

D+10 (pele - grau III)

TCTH não aparentado
Incompatibilidade ABO
Falha 1^ªria de pega do enxerto

D+1: ↑TGP (90U/L), TGO (57U/L), bilirrubina total (9,41mg/dL), FAL (599U/L) e GGT (648U/L)
D+4: valores aumentados de TGP (73U/L) e bilirrubina total (6,21mg/dL)
D+5: hematúria (urina com presença de hemácias superior a 100,00/campo com cor hemorrágica) e hemocultura + para *Staphylococcus* sp
D+6: ↑ proteína C reativa (19,40mg/dL)
D+8: ↑ TGP (87U/L), TGO (42U/L), bilirrubina total (5,34mg/dL), FAL (606U/L) e GGT (534U/L)
D+9: febre e hematúria
D+10: hematúria (urina com presença de hemácias superior a 100,00/campo) e eritema em 100% superfície corpórea - DECH estágio III
D+14: rash cutâneo disseminado e Bx pele (dermatite crônica inespecífica compatível com quimiotoxicidade e negativo para DECH)
D+15: hemocultura + para *Candida krusei* e *Candida albicans*
D+19: cultura de Bx orofaringe + para *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*
D+25: hematúria (urina com presença de hemácias superior a 100,00/campo) e urocultura + para *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* igual a 10000 UFC
D+31: hematúria (urina com presença de hemácias superior a 100,00/campo) com urocultura + para *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* superior a 100000 UFC
D+44: hemocultura + para *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus haemolyticus* e hematúria (urina com presença de hemácias superior a 100,00/campo)
D+50: hematúria (urina com presença de hemácias superior a 100,00/campo) e Bx orofaringe (+ para *Candida* sp e pelo vírus do grupo herpes) e cultura Bx orofaringe + para *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*
D+52: urocultura + para *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* superior a 100000 UFC
D+55: Bx medula óssea (medula óssea intensamente hipocelular, com intenso aumento da relação granulocítica/eritróide e moderado retardo maturativo; série megacariocítica intensamente hipocelular e hemossiderose intensa)
D+57: cultura secreção nasofaringe + para *Staphylococcus aureus*
D+59: hematúria (urina com presença de hemácias superior a 100,00/campo)
D+64: fezes pastosa com muco e sangue (disenteria), exame parasitológico negativo e pesquisa de *Microsporidium* +
D+66: urocultura + para *Staphylococcus aureus* e *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* superior a 10000 UFC
D+73: hematúria (urina com presença de hemácias superior a 100,00/campo) e urocultura + para *Staphylococcus aureus* superior a 100000 UFC
D+77 e D+81: hemocultura + para *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia*
D+88: hemocultura + para *Candida krusei*

D+94 (insuficiência respiratória aguda, bronco pneumonia basal, LMC com falência do TCTH e septicemia por candidemia)

PACIENTE 17

-

D+28(4,61)

Não tratado

-

-

D+1: ↑TGP (53U/L), TGO (159U/L), bilirrubina total (4,89mg/dL) e GGT (274U/L) e urocultura + para *Escherichia coli* superior a 100000 UFC
D+2: ↑ TGP (42U/L), LDH (967U/L) e hemocultura + para *Corynebacterium* sp
D+4: valores elevados de TGO (46U/L), bilirrubina total (1,15mg/dL) e GGT (213U/L)
D+6: ↑ proteína C reativa (8,07mg/dL), TGP (79U/L), TGO (67U/L), bilirrubina total (1,43mg/dL) e GGT (315U/L)
D+10 e D+12: hemocultura + para *Fusarium* sp
D+13: cultura de pele + para *Fusarium* sp e ↑TGP (180U/L), TGO (117U/L), FAL (142U/L) e GGT (311U/L)
D+14: Bx de pele (compatível com fusariose)
D+18: valores elevados de TGO (35U/L) e GGT (157U/L)
D+21: Bx de fossa nasal (processo inflamatório com presença de fungos filamentosos - Zigomicetos)
D+22: valores elevados de TGO (43U/L), bilirrubina total (1,63mg/dL) e GGT (196U/L)
D+25: cultura de secreção nasal + para *Staphylococcus* sp
D+29: ↑TGP (54U/L), bilirrubina total (3,28mg/dL) e GGT (245U/L)
D+0 a D+32: resumo de internação hospitalar - durante período de aplasia evoluiu com fusariose disseminada (pele, seios da face, sangue), choque séptico e sangramento (hemorragia) alveolar com síndrome de angústia respiratória aguda (SARA) associada. Evoluiu com hipoxemia grave e prolongada, com subsequente parada cardiorrespiratória em atividade elétrica sem pulso (AESP), sem reversão.

D+32 (infecção fúngica disseminada – *Fusarium* sp)

PACIENTE 18

-

D+23(5,62);
D+28(7,38);
D+42(18,57)

Não tratado

-

-

D+8: ↑ proteína C reativa (1,58mg/dL)
D+9 a D+19: mucosite
D+11: valor elevado de proteína C reativa (6,37mg/dL)
D+13: ↑ proteína C reativa (4,31mg/dL), TGO (399U/L), TGP (417U/L), bilirrubina total (1,66mg/dL), FAL (546U/L) e GGT (638U/L)
D+14 e D+15: febre e valores aumentados de TGO e TGP, FAL, GGT e bilirrubina total
D+15: hemocultura + para *Staphylococcus haemolyticus*
D+16: ↑ proteína C reativa (10,00mg/dL)
D+19 a D+25: plaquetocitose
D+20: redução da proteína C reativa (2,07mg/dL)
D+28: ↑ LDH (550U/L)
D+37: valores elevados de FAL (122U/L) e GGT (96U/L)
D+42: ↑ FAL (136U/L) e GGT (166U/L)
D+55: quadro de paralisia periférica (posteriormente descobriu tratar-se de leucemia recidivada)
D+56 a D+70: otalgia bilateral
D+70: sensação de plenitude gástrica e desvio de rima bucal para esquerda
D+84: ↑ TGP (36U/L), TGO (67U/L) e GGT (74U/L)
D+105: ↑ FAL (117U/L) e GGT (126U/L)
D+107: ↑ TGO (277U/L), TGP (538U/L), FAL (445U/L) e GGT (834U/L)
D+112: Bx mucosa oral e lábio inferior (sem particularidades histológicas)
D+120 a D+127: náuseas, vômitos e valores aumentados de FAL, GGT e LDH
D+135: ↑ GGT (144U/L)
D+140: ↑ LDH (1029U/L) e internação hospitalar por recidiva medular e extramedular da doença de base
D+148: cultura secreção ouvido médio + para *Staphylococcus* sp
D+157: Bx fragmento ósseo de mastoide e mucosa de mastoide (presença de células imaturas compatíveis com infiltração por leucemia mieloide aguda)
D+161: ↑ proteína C reativa (8,45mg/dL)
D+164: fezes com aspecto mucoso e exame parasitológico negativo
D+170: ↑ proteína C reativa (26,30mg/dL)
D+140 a D+170: resumo de internação hospitalar - durante internação apresentou novo episódio de paralisia facial. Após esquema de MEC evoluiu com quadro de neutropenia febril de foco abdominal complicada com necessidade de intubação orotraqueal, ventilação mecânica e drogas vasoativas. Evoluiu com insuficiência renal aguda e choque refratário, apresentando parada cardiorrespiratória em assistolia

D+170 (infecção intestinal bacteriana não especificada e recidiva da doença de base)

PACIENTE 19

D+35(10);
D+54(1);
D+112(2)

D+21(11,42);
D+26(70,46);
D+35(630,02);
D+40(7,78);
D+47(30,1);
D+54(305,8);
D+68(52,24)¹;
D+75(137,48)¹;
D+89(97,81)²;
D+105(12,6);
D+119(5,79);
D+154(7,69)

D+36 a D+46
D+55 a D+133

Paciente SIDA C3 em TARV

Sorologia pré-TCTH IgG-HCMV de alto risco: doador -/ receptor+

D+0: fezes líquidas com presença de bactérias e *Microsporidium* (em pouca quantidade)

D+3: hemocultura + para *Staphylococcus epidermidis* e ↑ bilirrubina total (3,34mg/dL)

D+3 a D+15: valores aumentados de bilirrubina total e febre

D+3 a D+22: mucosite

D+4: lesão em mucosa oral com citologia oncótica negativa

D+5: ↑ proteína C reativa (9,95mg/dL)

D+5 a D+20: picos hipertensivos

D+8: ↑ proteína C reativa (15,90mg/dL)

D+12: valor elevado da proteína C reativa (14,30mg/dL)

D+15: hematúria (urina com presença de hemácias superior a 100,00/campo)

D+18: redução da proteína C reativa (4,86mg/dL)

D+18 a D+19: valores aumentados de TGO, TGP e bilirrubina total

D+19: hemocultura + para *Staphylococcus* sp

D+20: fezes líquidas com presença de leveduras e exame parasitológico negativo

D+22: hematúria (urina com presença de hemácias superior a 100,00/campo)

D+23 a D+28: leucocitose com neutropenia

D+28 a D+37: febre

D+31: cultura swab anal + para *Enterococcus faecium*

D+34: ↑TGP (75U/L), TGO (169U/L), bilirrubina total (4,23mg/dL), FAL (235U/L) e GGT (245U/L)

D+35: fezes líquidas com presença de bactérias e exame parasitológico negativo

D+36: urocultura + para *Enterococcus faecium* igual a 10000 UFC

D+42: hemocultura + para *Acinetobacter lwoffii*

D+45: hemocultura + para *Staphylococcus* sp

D+51: pico febril e diarreia

D+54: valores aumentados de TGO (42U/L), bilirrubina total (2,38mg/dL), FAL (147U/L),GGT (215U/L) e LDH (985U/L)

D+70 a D+74: ↑ LDH

D+91: determinação da carga viral do HIV: 1882 cópias/mL

D+104: Bx mucosa oral (sem particularidades histológicas)

D+105: artralgia com piora progressiva, epigastralgia, vômitos e hemocromatose

D+154: determinação da carga viral do HIV: 261 cópias/mL

<p style="text-align: center;">PACIENTE 20</p>	<p style="text-align: center;">-</p>	<p style="text-align: center;">-</p>	<p style="text-align: center;">-</p>	<p style="text-align: center;">-</p> <p style="text-align: center;">Não tratado</p> <p>D+4: ↑ TGP (52U/L), TGO (49U/L) e GGT (304U/L) D+4 a D+7: mucosite D+8: hemocultura + para <i>Staplylococcus epidermidis</i> e febre D+11: ↑ proteína C reativa (20,90mg/dL) D+13: hemocultura + para <i>Staplylococcus epidermidis</i> e febre D+16: febre D+18: ↑ proteína C reativa (41,80mg/dL), bilirrubina total (3,09mg/dL), FAL (248U/L), GGT (703U/L) e hemocultura + para <i>Staplylococcus sp</i> D+18 a D+28: aumento progressivo da bilirrubina total (atingindo 13,35mg/dL) D+20: ↑ TGP (494U/L), TGO (1033U/L), FAL (256U/L) e GGT (523U/L) D+21: intubação orotraqueal D+23: valores elevados de TGP (488U/L) e TGO (1299U/L) D+25: ↑ TGO (289U/L), FAL (302U/L) e GGT (313U/L) D+26: ↑ bilirrubina total (11,90mg/dL) e febre D+28: febre D+29: hematúria (urina com presença de hemácias superior a 100,00/campo)</p>
<p style="text-align: center;">PACIENTE 21</p>	<p style="text-align: center;">-</p> <p style="text-align: center;">D+5(4,57); D+14(12,43); D+19(15,39); D+33(10,12); D+49(20,89); D+56(19,35); D+63(17,04); D+70(8,14); D+124(2,89); D+147(9,12)</p>	<p style="text-align: center;">-</p>	<p style="text-align: center;">-</p> <p style="text-align: center;">Não tratado</p> <p style="text-align: center;">D+124 (fígado e boca – grau II)</p>	<p style="text-align: center;">-</p> <p>*TCTH autólogo prévio*</p> <p>D+4: cultura swab anal + para <i>Enterococcus faecium</i> D+6 a D+14: picos hipertensivos D+19: hemocultura + para <i>Staplylococcus sp</i> e ↑ TGO (43U/L) e TGP (44U/L) D+48 e D+73: febre D+110: aumento da sensibilidade aos alimentos D+112: ↑ TGO (387U/L), TGP (248U/L), bilirrubina total (1,73mg/dL), FAL (418 U/L) e GGT (243U/L) D+117 a D+124: ↑ TGO, TGP, FAL, GGT e bilirrubina total (atingindo os valores de 550U/L, 390U/L, 324U/L, 132U/L e 9,35mg/dL, respectivamente) D+124: icterícia e DECH sobreposição fígado/boca. Bx musosa oral (estomatite crônica inespecífica superficial de interface compatível com DECH grau II [NIH 4]; glândula salivar com leve infiltrado periductal e exocitose focal, bem como as atipias epiteliais decorrentes do condicionamento, compatível com DECH grau I de Horn [NIH 3]) D+132: piora da icterícia, xerostomia na cavidade oral e eosinofilia a esclarecer D+146: Bx pele (dermatite crônica inespecífica superficial de interface dermo-epidérmica e anaxial, compatível com DECH aguda) D+147: assimetria supraclavicular, líquen em língua (20% da superfície)</p>

D+31 (VOD - doença veno-oclusiva hepática)

PACIENTE 22	D+34(1)	D+15(2,23); D+34(52,71); D+43(483,97); D+55(22,26) ² ; D+125(1,49)	D+51 a D+91	-	D+99 (estômago – grau II)	<p>*TCTH não aparentado*</p> <p>D+1: febre e hemocultura + para <i>Staphylococcus epidermidis</i> D+2: ↑ TGO (146U/L), TGP (266U/L) e GGT (290U/L) D+5: valores elevados de TGO (89U/L), TGP (244U/L) e GGT (397U/L) D+7 a D+15: mucosite D+9: ↑ TGO (380U/L), TGP (602U/L) e bilirrubina total (1,73mg/dL) D+10: plaquetopenia D+11: ↑ TGO (1580U/L), TGP (2530U/L) e bilirrubina total (5,60mg/dL) D+11 a D+21: valores elevados de TGO, TGP e bilirrubina total D+13: ↑ proteína C reativa (5,16mg/dL) D+23 a D+42: ↑ TGO, TGP, bilirrubina total, FAL e GGT D+43: ↑ TGO (59U/L), TGP (104U/L), bilirrubina total (1,96mg/dL) e GGT (134U/L) e sem queixas relacionadas à pele, boca, quadro respiratório, TGI e TGU D+51: internação hospitalar por quadro de náusea, vômito, diarreia e febre. Início de tratamento com GCV D+54: normalização das taxas de TGO e TGP D+56 e D+57: cefaleia, náuseas e vômitos D+92: normalização das taxas de bilirrubina total, FAL e GGT D+96: fezes com consistência mucosa com presença de bactérias e pesquisa de <i>Microsporidium</i> + D+98: endoscopia e Bx estômago (gastrite crônica ativa leve a moderada em mucosa e negativo para HCMV e DECH) D+99: Bx cavidade bucal (estomatite crônica inespecífica superficial de interface, focal, compatível com DECH crônica grau II - NIH grau III) D+102: diagnóstico de degeneração do espaço osteofitose D+111: náusea e vômito D+146: fraqueza, falta de ar, náusea e inapetência</p>
PACIENTE 23	-	D+40(1,57); D+49(8,38); D+54(3,78)	Não tratado	-	-	<p>D+0: ↑ proteína C reativa (3,91mg/dL) D+1: urocultura + para <i>Escherichia coli</i> igual a 1000 UFC D+2 a D+15: mucosite D+10: neutropenia febril e hemocultura + para <i>Streptococcus mitis</i> D+11: neutropenia febril e ↑ TGO (37U/L), TGP (68U/L), bilirrubina total (7,41mg/dL), GGT (98U/L) e proteína C reativa (16,20mg/dL) D+12: valor elevado da proteína C reativa (15,90mg/dL) D+33: ↑ TGO (137U/L), TGP (139U/L), bilirrubina total (4,29mg/dL) e LHD (681U/L) D+49: normalização das taxas de TGO, TGP e LHD D+95: Bx mucosa oral (mucosa oral e glândula salivar menor sem alterações, exceto atipias do condicionamento) D+98: normalização do valor de bilirrubina total D+117: mialgia leve em panturrilhas</p>

PACIENTE 24	-	D+54(11,42)	Não tratado	-	-	<p>D+0: ↑ proteína C reativa (4,27mg/dL) D+4: ↑ TGO (49U/L) e TGP (76U/L) D+6: hemocultura + para <i>Streptococcus mitis</i> e ↑ TGO (77U/L), TGP (146U/L) e bilirrubina total (1,31mg/dL) D+7: ↑ GGT (253U/L) e proteína C reativa (16,90mg/dL) D+12: valor elevado da proteína C reativa (16,60mg/dL) D+15: redução da proteína C reativa (10,50mg/dL) D+13: valores elevados de TGO (69U/L), TGP (71U/L), bilirrubina total (1,51mg/dL) e GGT (508U/L) D+18: ↑ TGO (170U/L), TGP (392U/L), bilirrubina total (1,59mg/dL) e GGT (379U/L) e redução da proteína C reativa (6,31mg/dL) D+26: hemocultura + para <i>Staphylococcus</i> sp, TGO (95U/L), GGT (165U/L) e LDH (680U/L) D+33: valores elevados de TGO, TGP, bilirrubina total, GGT e LDH D+41: vômitos e candidíase oral D+46: vômitos D+47: ↑ TGO (401U/L), TGP (596U/L), bilirrubina total (2,52mg/dL), GGT (181U/L) e LDH (1003U/L) D+61: normalização da taxa de bilirrubina total D+63 a D+81: vômitos e náuseas D+77: normalização das taxas de TGO, TGP e GGT D+82: melhora dos vômitos D+131: Bx mucosa oral (negativo para DECH)</p>	-
PACIENTE 25	-	D+33(39,64); D+49(48,66); D+63(12,57)	Não tratado	-	-	<p>D+0: ↑ proteína C reativa (2,87mg/dL) D+4: ↑ TGO (59U/L) e TGP (84U/L) D+5: hematúria (urina com presença de hemácias superior a 100.00/campo) D+11: valores elevados de TGO (36U/L), TGO (77U/L), bilirrubina total (1,15mg/dL), GGT (108U/L) e proteína C reativa (3,83mg/dL) D+26: normalização das taxas de TGO, TGP e bilirrubina total D+28 a D+33: disúria intermitente D+33: hemocromatose 2^{ária} e ↑ LDH (858U/L) D+70: normalização da taxa de LDH D+89: Bx mucosa oral (glândulas salivares sem alterações, exceto sinais de condicionamento)</p>	-

PACIENTE 26	D+97(2)	D+26(9,51); D+42(24,92); D+91(11,7)	D+96 a D+138	-	-	<p>D+0 a D+22: mucosite grave D+11 a 15: ↑ bilirrubina total e GGT D+26: hemocultura + para <i>Staphylococcus</i> sp D+31: ↑ TGO (37U/L) e DLH (842U/L) D+36 e D+40: internação hospitalar por infecção relacionada ao cateter venoso central D+42: ↑ TGO (56U/L) e TGP (52U/L) D+103: Bx mucosa oral (alterações do condicionamento e sem DECH)</p>	-
PACIENTE 27	-	D+42(27,95); D+47(25,57); D+54(150,65); D+61(91,72); D+68(37,66)	Não tratado	-	-	<p>D+0: hemocultura + para <i>Staphylococcus</i> sp D+1 a D+8: ↑ GGT D+5: ↑ proteína C reativa (11,40mg/dL) D+8: ↑ bilirrubina total (2,90mg/dL) D+11: ↑TGP (305U/L), TGO (427U/L), bilirrubina total (2,02mg/dL), FAL (231U/L) e GGT (623U/L) D+12 a D+15: valores aumentados de TGP, TGO, bilirrubina total, FAL e GGT D+22 a D+27: ↑ bilirrubina total e GGT D+23 a D+30: internação hospitalar por TVP de veia subclávia esquerda D+27: GGT acima do valor de referência (73U/L) D+47: ↑ TGO (31U/L), FAL (177U/L) e GGT (131U/L) D+54: ↑ FAL (162U/L) e valor elevado de GGT (117U/L) D+61: ↑ TGO (32U/L), FAL (188U/L) e GGT (144U/L) D+68: ↑ TGO (32U/L), FAL (207U/L) e GGT (162U/L) D+75: valores elevados de TGO (32U/L), FAL (201U/L) e GGT (152U/L) D+116: herpes simples (HVS) na boca D+127: esfregaço mucoso oral (candidíase oral) D+138: Bx mucosa oral (sem sinais de DECH)</p>	-

PACIENTE 28	D+40(48) *Sem coleta após o D+40*	D+33(23,31); D+40(1305,52) *Sem coleta após o D+40*	D+41 a D+49	D+42 (CÓLON)	D+42 (TGI e fígado - grau IV)	<p>D+5: fezes com aspecto mucoso com presença de bactérias e exame parasitológico negativo</p> <p>D+6: hemocultura + para <i>Staphylococcus epidermidis</i></p> <p>D+26: ↑ TGP (896 U/L), TGO (692 U/L), bilirrubina total (9,64 mg/dL), FAL (914 U/L), GGT (536 U/L)</p> <p>D+28: colúria, acoli fecal, náuseas, vômitos, além de exames laboratoriais compatíveis síndrome colestática associada a hepatite aguda</p> <p>D+33: ↑ TGP (1226U/L), TGO (708U/L), bilirrubina total (21,51mg/dL), FAL (1573U/L) e GGT (638 U/L)</p> <p>D+33: internação hospitalar por sintomas e sinais de DECH agudo, icterícia, dor abdominal, hiperexia com febre, diarreia e piora do estado geral</p> <p>D+34: DECH agudo de sobreposição grave, vômito, diarreia, enterorragia e lesões liquenoides na mucosa oral com Bx negativa para DECH</p> <p>D+35: fezes com consistência muco-sanguinolenta com exame parasitológico negativo</p> <p>D+36: enterorragia com suspeita de encefalopatia hepática grau 2 - falência hepática aguda</p> <p>D+39: ↑ proteína C reativa (2,02mg/dL), 1 episódio de vômito, 4 episódios de diarreia sanguinolenta e 1 episódio de dor abdominal intensa</p> <p>D+40: ↑ GGT (659 U/L), vômito e enterorragia</p> <p>D+41: enterorragia e afebril</p> <p><u>D+42: Bx de colon/reto (colite ulcerativa com tecido de granulação e alterações citopáticas compatíveis com infecção por HCMV. Presença focalizada e de corpos apoptóticos em base de criptas favorecendo DECH associado)</u></p> <p>D+42: enterorragia com aumento do volume das evacuações</p> <p>D+43: enterorragia, boca seca, muita fraqueza, abdome globoso, flácido, doloroso à palpação do hipocôndrio direito, fígado palpável a 4 cm rebordo costal direito e cultura de escarro + para <i>Aspergillus</i> sp</p> <p>D+44: episódios de enterorragia e 1 de melena</p> <p>D+45: diminuição do volume de diarreia (3 episódios com sangue) e afebril</p> <p>D+46: ↑ proteína C reativa (8,79mg/dL)</p> <p>D+47: melhora das evacuações, em menor volume e sem sangue vivo, porém bastante icterico</p> <p>D+49: importante piora de traquidispnéia e rebaixamento do nível de consciência. DECH aguda IV (TGI e fígado) sem resposta ao tratamento</p> <p>D+50: instável hemodinamicamente e choque séptico</p>	D+50 (DECHa ASSOCIADA A DOENÇA POR HCMV-TGI)
PACIENTE 29	-	D+35(15,24)	Não tratado	-	-	<p>D+8: ↑ TGO (43U/L) e bilirrubina total (1,20mg/dL)</p> <p>D+11: ↑ proteína C reativa (6,01mg/dL)</p> <p>D+22: ↑ bilirrubina total (1,63mg/dL)</p> <p>D+25: ↑ bilirrubina total (1,78mg/dL)</p> <p>D+49: normalização da bilirrubina total</p> <p>D+89: Bx mucosa oral (alterações do condicionamento)</p>	

PACIENTE 30 (LAD)

D+36(4)

D+20(46,43);
D+27(473,7);
D+36(63,51);
D+50(115,63);
D+57(127,23);
D+62(33,81);
D+69(4,32)

D+26 a D+71

D+9: ↑ bilirrubina total (1,55mg/dL)
D+12: piora do quadro respiratório (febre, tosse e dispneia) - tratado como síndrome de pega e ↑ TGO (128U/L), TGP (76U/L), bilirrubina total (1,57mg/dL), FAL (168U/L), GGT (184U/L) e proteína C reativa (20,50mg/dL)
D+13: fezes com consistência mucosa com presença de bactérias e exame parasitológico negativo
D+15: ↑ TGO (248U/L), TGP (287U/L), bilirrubina total (1,41mg/dL), FAL (258U/L) e GGT (506U/L)
D+21: rouquidão, tosse seca e melhora das taxas de TGO (35U/L), TGP (52U/L), bilirrubina total (1,12mg/dL), FAL (145U/L) e GGT (205U/L)
D+27: TGO (36U/L), bilirrubina total (1,65mg/dL) e GGT (139U/L) acima dos valores de referência
D+27: piora do quadro respiratório com rouquidão e tosse seca. Raio X de tórax com infiltrado intersticial bilateral viral (?). Internar para tomografia computadorizada e broncoscopia
D+27 a D+58: internação hospitalar por tosse e hipoxemia. Tomografia computadorizada de tórax mostrou imagens de consolidação em ápice bilateral com pesquisa de H1N1 e BAAR negativo. Broncoscopia sugestiva para BOOP e Bx sem material suficiente
D+28: redução da proteína C reativa (2,02mg/dL)
D+29: suspeita de tuberculose descartada após broncoscopia (LBA negativo para BAAR)
D+33: broncoscopia (diminuto fragmento constituído por raríssimas células epitelióides parcialmente degeneradas e, predominantemente, elementos figurados do sangue), ↑ TGO (39U/L), bilirrubina total (1,81mg/dL) e GGT (79U/L)
D+35: ↑ TGO (44U/L), bilirrubina total (1,85mg/dL) e GGT (75U/L)
D+37: ↑ TGO (52U/L), bilirrubina total (2,03mg/dL) e GGT (98U/L)
D+44: normalização da taxa de TGO e redução de bilirrubina total (1,56mg/dL) e GGT (91U/L)
D+51: normalização de bilirrubina total e ↑ GGT (123U/L)
D+68: valor elevado de GGT (120U/L)
D+71: infecção das vias aéreas superiores, lesões bolhosas e Bx pele (dermatite crônica inespecífica compatível com reação medicamentosa)
D+71 a D+92: tosse com expectoração esbranquiçada e afebril
D+97: ↑ FAL (161U/L) e microscopia de escarro (negativa para fungo)
D+104 a D+117: internação hospitalar por quadro de hipoxia e tosse. Tomografia computadorizada de tórax e Bx pulmonar (D+105) sugestivas para BOOP (bronquiolite obliterante com pneumonia organizada)
D+106: Bx pulmão (quadro morfológico compatível com BOOP com cultura negativa para fungos ou bactérias)

PACIENTE 31	D+24(1); D+87(5)	D+52(22,15); D+59(34,62); D+66(12,26); D+73(63,51); D+87(10,39)	D+92 a D+192	-	-	-	<p>D+1: ↑ proteína C reativa (13,60mg/dL) D+4: ↑ GGT (159U/L) D+5: hematúria (urina com presença de hemácias superior a 100,00/campo) D+7: fezes com consistência semipastosa com muco com pesquisa de <i>Microspodium</i> + D+11: GGT acima do valor de referência (109U/L) D+14: redução da ↑ proteína C reativa (1,53mg/dL) D+16: ↑ bilirrubina total (1,32mg/dL) e normalização de GGT D+24: ↑ bilirrubina total (1,34mg/dL) D+52: redução de bilirrubina total (1,20mg/dL) D+87: normalização da bilirrubina total D+108: Bx mucosa oral (sem sinais de DECH)</p>

PACIENTE 32

D+47(130);
D+49(67)

D+28(46,05);
D+33(68);
D+47(483,97);
D+49(4071,47)

D+48 a D+51

D+40 (ESTÔMAGO) e D+47 (CAVIDADE ORAL)

D+40 (estômago)

TCTH autólogo prévio

D+2: hemocultura + para *Staphylococcus hominis*

D+4: ↑ bilirrubina total (1,29mg/dL) e GGT (122U/L) e proteína C reativa (14,40mg/dL)

D+5: ↑ proteína C reativa (17,69mg/dL)

D+6: normalização da bilirrubina total, valor elevado de GGT (92U/L) e cultura do cateter + para *Staphylococcus hominis*

D+11: redução de GGT (88U/L)

D+20: ↑ TGP (62U/L), TGO (74U/L) e GGT (169U/L)

D+28: ↑ LDH (566U/L), bilirrubina total (1,20mg/dL) e GGT (134U/L)

D+32 a D+35: febre e obstrução nasal

D+35: internação hospitalar por quadro de febre, plaquetopenia, obstrução nasal e tosse seca de leve intensidade

D+39: ↑ TGO (31U/L), FAL (111U/L) e GGT (150U/L)

D+40: suspeita de rinossinusite e Bx mucosa nasal (processo inflamatório crônico inespecífico com esparços eosinófilos. Observadas atipias citológicas epiteliais 2^{árias} ao condicionamento, espessamento da zona da membrana basal do epitélio e fibrose do cório)

D+40: erosões gástricas e enantema corpo/fundo - endoscopia /Bx de estômago (gastrite ativa moderada com alterações compatíveis com efeito citopático viral por HCMV. Presença de alterações sugestivas para DECH associado. Negativo para *Helicobacter pylori*)

D+41: febre

D+43: febre de origem indeterminada, ↑ TGO (48U/L), FAL (141U/L) e GGT (254U/L)

D+44: febre, sinusite e derrame pleural não puncionável

D+45: episódio de fezes pastosas

D+46: febre, vômito, diarreia, úlceras na cavidade oral e ↑ proteína C reativa (20,70mg/dL), TGP (82U/L), TGO (186U/L), bilirrubina total (1,46mg/dL), FAL (261U/L), GGT (421U/L) e LDH (803U/L)

D+47: plaquetopenia, vômito e diarreia. Bx cavidade oral (histologia observa-se crosta fibrino-necrótica espessa, com grão bacteriano. A mucosa apresenta clivagem subepitelial, acentuado edema subepitelial e infiltrado inflamatório misto no tecido conjuntivo subepitelial. Notam-se 2 células endoteliais com alterações citopáticas sugestivas de HCMV, epiteliais para HSV e nem alterações para DECH) e esfregaço da lesão oral (sem critérios sugestivos de infecção herpética e por HCMV)

D+48: febre, ↑ TGP (346U/L), TGO (951U/L), bilirrubina total (2,61mg/dL), FAL (316U/L), GGT (463U/L), piora da função renal e 2 episódios de fezes pastosas

D+49: insuficiência respiratória aguda, aumento das transaminases e distensão abdominal

D+50: paciente em estado grave com piora do padrão respiratório, instabilidade hemodinâmica, plaquetopenia, distensão abdominal e piora da função renal

D+51: paciente em estado gravíssimo com abdome distendido, choque séptico com falência multiorgânica (renal, respiratória, cardíaca e hepática) e necessidade de hemodiálise

D+52: hipotensão apresentando assistolia não responsiva às medidas de ressuscitação

D+ 52 (DOENÇA POR HCMV-TGI, insuficiências respiratória e renal, falência hepática e coagulopatia de consumo com hemorragia digestiva)

PACIENTE 33	D+126(2); D+131(2); D+138(1)	D+33(10,09); D+47(54,48); D+56(26,91); D+119(14,31); D+126(30,6); D+131(21,05)	Início em D+131	-	D+96 (pele, boca e fígado - overlap grave)	<p>D+1: ↑ bilirrubina total (1,38mg/dL) e GGT (150U/L) D+4: ↑ TGP (70U/L), TGO (58U/L), bilirrubina total (2,62mg/dL) e GGT (234U/L) D+15: valores elevados de TGP (65U/L), bilirrubina total (1,08mg/dL) e GGT (82U/L) D+18: normalização das taxas de TGP, TGO e GGT D+40: ↑ bilirrubina total (1,32mg/dL) D+70: normalização da bilirrubina total D+82: prurido generalizado D+96: ↑ TGP (144U/L), TGO (108U/L), bilirrubina total (4,74mg/dL), FAL (251U/L) e GGT (327U/L) e DECH de sobreposição grave (boca/fígado/pele) - grau III D+105: diarreia D+123: fezes pastosas com exame parasitológico negativo e presença de bactérias D+126: ↑ TGP (184U/L), TGO (111U/L), bilirrubina total (6,74mg/dL), FAL (331U/L) e GGT (862U/L)</p>	-
PACIENTE 34	D+37(10); D+44(46)	D+21(10,5); D+23(8,58); D+30(106,83); D+37(1451,97); D+44(52,67)	D+38 a D+45	-	-	<p>*TCTH não aparentado* *Sorologia pré-TCTH IgG-HCMV de alto risco: doador -/ receptor+*</p> <p>D+2: hemocultura + para <i>Staphylococcus haemolyticus</i> D+3: hemocultura + para <i>Staphylococcus haemolyticus</i> e <i>Enterococcus faecalis</i> D+6: hematúria (urina com presença de hemácias superior a 100,00/campo) e urocultura + para <i>Escherichia coli</i> igual a 1000 UFC D+7 a D+24: febre D+13: ↑ TGP (35U/L), TGO (38U/L) e GGT (46U/L) D+17: ↑ TGO (42U/L) e GGT (47U/L) D+22: ↑ GGT (51U/L) e piora do padrão respiratório necessitando de IOT D+26 a D+30: febre D+27: 1 episódio de vômito (90mL) D+29: ↑ bilirrubina total (1,20mg/dL) e GGT (72U/L) D+34 a D+36: febre D+36: ↑ TGO (47 U/L), bilirrubina total (1,29mg/dL) e GGT (57U/L) D+37: hipotermia (34,4°C) D+38: ↑ TGO (48 U/L), bilirrubina total (1,26mg/dL), FAL (157 U/L), GGT (63 U/L) e extubação acidental (auto-extubação) com aspiração de grande quantidade de sangue vivo após reintubação D+39: cultura secreção traqueal + para <i>Serratia marcescens</i> D+40: ↑ TGO (56 U/L) D+41: valores elevados de TGO (37 U/L), bilirrubina total (1,74mg/dL), FAL (190U/L) e proteína C reativa (23mg/dL) D+42: febre D+44: hematúria (urina com presença de hemácias superior a 100,00/campo) e hemocultura + para <i>Candida tropicalis</i>, hemodinamicamente instável e hemodiálise</p>	D+46 (sepses, insuficiência respiratória aguda e disfunção de múltiplos órgãos)

<p>PACIENTE 35</p>	<p>-</p> <p>-</p>	<p>Não tratado</p>	<p>D+1: ↑ TGP (195U/L), TGO (91U/L), bilirrubina total (1,76mg/dL), FAL (119U/L) e GGT (142U/L) D+8: valores elevados de TGP (46U/L), bilirrubina total (1,20mg/dL), FAL (118U/L) e GGT (91U/L) D+13: normalização das taxas de TGP e bilirrubina total D+20: normalização de GGT e ↑ FAL (137U/L) D+28 hemocultura + para <i>Enterococcus faecalis</i>, <i>Acientobacter baumannii</i> e <i>Staphylococcus</i> sp e ↑bilirrubina total (1,60mg/dL), FAL (157U/L) e LDH (781U/L) D+29 hemocultura + para <i>Enterococcus faecalis</i>, <i>Acientobacter baumannii</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> não mucóide e <i>Elizabethkingia (Chryseobact) meningosepticum</i> D+29 a D+49: internação hospitalar por falha 1^ª de pega e febre D+32: ↑bilirrubina total (1,92mg/dL) D+33: cultura swab anal + para <i>Enterococcus faecalis</i> D+48: ↑ TGP (65U/L), TGO (45U/L), bilirrubina total (3,24mg/dL) e GGT (84U/L), hemocultura + para <i>Enterococcus faecium</i>, insuficiência respiratória aguda com necessidade de IOT e ventilação mecânica, instabilidade hemodinâmica e choque séptico refratário</p>	<p>D+49 (septicemia – infecção bacteriana por <i>Enterococcus faecium</i>)</p>
<p>PACIENTE 36</p>	<p>D+41(3)</p> <p>D+29(28,18); D+36(22,97); D+41(154,93)</p>	<p>D+43 a D+83</p>	<p>*TCTH não aparentado*</p> <p>D+5: ↑ TGP (55U/L) D+9: Bx pele (dermatite crônica inespecífica) D+13: ↑ proteína C reativa (6,47mg/dL) D+23: ↑ TGO (38U/L) D+30: ↑ TGO (47U/L) D+33: normalização da taxa de TGO D+41: ↑ LDH (580U/L) D+50: prurido no corpo, sem lesões, edema nos olhos e aumento do volume do abdome D+134: ↑ TGP (177U/L) e TGO (121U/L) D+139: normalização de TGO e TGP</p>	<p>-</p>

PACIENTE 37	D+100(60); D+107 (115); D+114(25); D+135(3); D+140(5)	D+2(24,61); D+9(23,04); D+37(19,7); D+70(9,89); D+77(73,3); D+93(12,92); D+100(716,47); D+107(84,33); D+114(11,94); D+121(18,39); D+135(22,41); D+140 (7,81); D+149(5,02)	Início em D+101	-	D+90 (TGI, pele e boca - overlap grave)	<p>D+9: esfregaço mucosa oral (células escamosas isoladas sem atipias)</p> <p>D+15: ↑ TGP (90U/L) e TGO (74U/L)</p> <p>D+30: normalização das taxas de TGP e TGO e ↑ bilirrubina total (1,22mg/dL)</p> <p>D+42: ↑ bilirrubina total (1,53mg/dL)</p> <p>D+51: náusea</p> <p>D+70: ↑ TGP (52U/L), TGO (46U/L) e bilirrubina total (1,32mg/dL)</p> <p>D+90 a D+129: internação hospitalar para tratamento de DECH crônica de sobreposição (TGI + boca)</p> <p>D+90: normalização das taxas de TGP, TGO e bilirrubina total, ↑ proteína C reativa (2,51mg/dL), hemocultura + para <i>Enterococcus faecalis</i> e vômito</p> <p>D+91: vômito e diarreia – 700 mL</p> <p>D+92: diarreia – 1800 mL (fezes líquidas com exame parasitológico negativo)</p> <p>D+93: diarreia– 1250 mL</p> <p>D+94: endoscopia sugestiva de DECH e lesões liquenoides - Bx mucosa oral (estomatite crônica inespecífica superficial liquenoide leve. Nota: os achados são discretos, mas DECH não pode ser afastada) e endoscopia sugestiva para DECH</p> <p>D+95: diarreia – 325 mL (3X)</p> <p>D+96: diarreia – 450 mL (4X)</p> <p>D+97: diarreia – 500 mL (6X)</p> <p>D+98: diarreia – 150 mL (2X)</p> <p>D+99: diarreia – 500 mL e ↑ FAL (133U/L) e GGT (674U/L)</p> <p>D+100: diarreia – 250 mL</p> <p>D+101: diarreia – 300 mL e valores elevados de TGP (53U/L) e GGT (573U/L)</p> <p>D+106: valores elevados de TGP (63U/L) e GGT (351U/L)</p> <p>D+108: normalização de TGP e redução de GGT (229U/L)</p> <p>D+115: ↑ bilirrubina total (1,37mg/dL) e redução de GGT (114U/L)</p> <p>D+120: fezes líquidas com consistência mucosa e exame parasitológico negativo</p> <p>D+134: normalização das taxas de bilirrubina total e GGT, ↑ LDH (989U/L) e recidiva da doença da doença de base (LMA)</p> <p>D+139: ↑ LDH (1559U/L)</p> <p>D+141 a D+142: dor e inchaço na perna esquerda</p> <p>D+142: internação hospitalar para antibioticoterapia</p> <p>D+143 a D+154: febre</p> <p>D+148: ↑ TGO (46U/L), FAL (224U/L) e GGT (272U/L)</p> <p>D+142 a D+163: internação hospitalar por recidiva da LMA, neutropenia febril, com aparecimento de aspergilose pulmonar, evoluindo insuficiência respiratória aguda e choque séptico refratário</p>

D+163 (recidiva da doença de base – LMA, aspergilose pulmonar, insuficiência respiratória aguda e choque séptico refratário)

PACIENTE 38

Não tratado

D+2: hemocultura + para *Bacillus* sp
D+9: ↑ TGP (155U/L) e TGO (135U/L)
D+11: fezes semipastosas com exame parasitológico negativo e pesquisa de *Microsporidium* +
D+21: normalização das taxas de TGP (101U/L) e TGO (77U/L)
D+25 a D+39: internação hospitalar por neutropenia febril
D+26: hemocultura + para *Staphylococcus epidermidis*
D+43: ↑ TGO (37U/L)
D+52: quimerismo misto com enxerto instável e ↑ TGP (81U/L) e TGO (71U/L)
D+78: ↑ FAL (145U/L)
D+108: perda do enxerto com nova infusão de CPP

PACIENTE 39

D+42(5);
D+54(9);
D+63(1);
D+84(2);
D+91(6)

D+28(42,93);
D+33(27,72);
D+35(31,83);
D+42(29,46);
D+54(69,19);
D+63(7,61);
D+84(88,67);
D+91(27,15)

D+40 a D+99

D+31 (TGI e fígado – grave grau IV)

D+4: ↑ GGT (94U/L)
D+18: ↑ TGO (32U/L) e GGT (82U/L)
D+20: fezes líquidas com exame parasitológico negativo
D+28: ↑ LDH (637U/L) e TGO (38U/L)
D+30 a D+33: indisposição gástrica
D+31 a D+33: diarreia (4 a 5 vezes/dia) com muita cólica
D+33: internação hospitalar por DECH aguda grave (TGI + fígado)
D+34: fezes líquidas com exame parasitológico negativo e ↑ bilirrubina total (3,93mg/dL) e GGT (62U/L)
D+36: Bx de estômago e duodeno (duodenite crônica erosiva negativa para HCMV) e ↑ bilirrubina total (12,44mg/dL) e GGT (69U/L)
D+39: valores elevados de proteína C reativa (17,90mg/dL), TGO (35U/L), bilirrubina total (10,51mg/dL), GGT (81U/L) e hemocultura + para *Candida glabrata*
D+44: hemocultura + para *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia*
D+46: ↑ TGO (70U/L), bilirrubina total (18,19mg/dL) e GGT (124U/L) e valor elevado da proteína C reativa (17,70mg/dL)
D+51: ↑ proteína C reativa (22,30mg/dL)
D+53: valores elevados de TGO (45U/L), bilirrubina total (13,97mg/dL) e GGT (411U/L)
D+55: ↑ TGO (59U/L), bilirrubina total (11,92mg/dL), FAL (165U/L) e GGT (604U/L)
D+57: ↑ proteína C reativa (23,10mg/dL) e Bx de estômago e duodeno (duodenite crônica inespecífica sem sinais de DECH e de HCMV)
D+60: ↑ proteína C reativa (18,00mg/dL)
D+64: valores elevados de TGO (70U/L), bilirrubina total (8,07mg/dL), FAL (255U/L) e GGT (879U/L)
D+67: ↑ TGP (46U/L), TGO (77U/L) e bilirrubina total (89,84mg/dL)
D+69: ↑ FAL (262U/L) e GGT (1019U/L) e redução da proteína C reativa (13,00mg/dL)
D+74: valor elevado da proteína C reativa (15,70mg/dL)
D+78 e D+81: hemocultura + para *Staphylococcus epidermidis*
D+79: hematúria (urina com presença de hemácias superior a 100,00/campo)
D+82: ↑ proteína C reativa (22,30mg/dL)
D+83: valores elevados de TGO (53U/L), FAL (206U/L), GGT (819U/L) e LDH (1877U/L) e ↑ da proteína C reativa (26,90mg/dL)
D+90: ↑ TGO (78U/L), bilirrubina total (10,42mg/dL), FAL (340U/L) e GGT (1668U/L)
D+97: Bx de estômago (sem sinais citopáticos virais, *Helicobacter pylori* negativo e ausência de neoplasia) e ↑ TGP (51U/L), TGO (154U/L), bilirrubina total (26,22mg/dL), FAL (445U/L), GGT (1744U/L) e proteína C reativa (26,20mg/dL)

D+100 (DECHa – TGI e fígado e choque séptico refratário)

PACIENTE 40	D+140(1); D+147(3)	-	Não tratado	-	-	D+6: ↑ TGO (47U/L) D+93: ↑ LDH (523U/L) D+126: ↑ LDH (858U/L)	-
PACIENTE 41	D+40(1)	D+28(14,69); D+33(31,57); D+40(5,88); D+89(4,27)	Início em D+42	-	-	<p>D+4: ↑ TGP (78U/L), TGO (91U/L) e GGT (85U/L) D+10: normalização de TGO e melhora de TGP (40U/L) D+12: hemocultura + para <i>Candida parapsilosis</i> D+13: citologia mucosa oral (efeito de tratamento oncológico sem efeito citopático viral e/ou fungos) e ↑ TGO (30U/L), bilirrubina total (2,07mg/dL), GGT (87U/L) e proteína C reativa (17,20mg/dL) D+15: ↑ TGP (56U/L), TGO (54U/L), bilirrubina total (1,80mg/dL), FAL (128U/L) e GGT (116U/L) D+20: endoscopia e Bx de esôfago e estômago (mucosa gástrica com discreta congestão vascular e sinais inflamatórios mínimos, com pesquisa negativa para <i>Helicobacter pylori</i>, HCMV e DECH) e ↑ TGP (134U/L), TGO (96U/L), bilirrubina total (1,13mg/dL), FAL (140U/L) e GGT (240U/L) D+25: normalização da bilirrubina total e redução das taxas de TGP (47U/L), TGO (37U/L), FAL (114U/L), GGT (129U/L) e proteína C reativa (1,08mg/dL) D+32: normalização de TGP e valores elevados de TGO (45U/L), bilirrubina total (1,40mg/dL), FAL (124U/L) e GGT (104U/L) D+40: hemocultura + para <i>Candida parapsilosis</i> e ↑ LDH (539U/L) D+55: ↑ TGO (51U/L), FAL (143U/L) e GGT (169U/L) D+89: ↑ TGP (70U/L), TGO (52U/L), FAL (237U/L), GGT (584U/L) e LDH (759U/L) D+109: normalização das taxas de TGP e TGP e redução de FAL (115U/L), GGT (250U/L) e LDH (667U/L) D+116: normalização de FAL e redução de GGT (134U/L) D+118: ↑ proteína C reativa (2,28mg/dL) D+119: ↑ proteína C reativa (3,50mg/dL) D+120: ↑ TGO (58U/L) e GGT (154U/L) D+123: ↑ bilirrubina total (2,24mg/dL) <u>Resumo de internação hospitalar:</u> internação por LMA recidivada interna para nova indução e condicionamento, evoluiu com insuficiência pulmonar bacteriana bem como aspergilose pulmonar invasiva e possível tuberculose miliar, evoluindo com insuficiência respiratória aguda e choque séptico refratário a antibioticoterapia</p>	D+123 (recidiva da doença de base – LMA, choque séptico, insuficiência pulmonar bacteriana, aspergilose pulmonar invasiva e possível tuberculose miliar)

<p>PACIENTE 42</p>	<p>D+42(2); D+49(33); D+56(13); D+58(2); D+65(2); D+70(1); D+77(1)</p> <p>D+35(91,57); D+42(345,76); D+49(772,27); D+56(757,15); D+58(34,26); D+65(552,19); D+70(10,37); D+84(5,36)</p>	<p>D+56 a D+84</p>	<p>*Doador IgM-HCMV positivo no pré-TCTH*</p> <p>D+0 a D+19: internação hospitalar apresentando mucosite grau IV D+23: hemocultura + para <i>Staphylococcus</i> sp D+35: ↑ LDH (587U/L), empachamento pós-prandial e cefaleia D+56: ↑ LDH (532U/L) e bilirrubina total (1,02mg/dL) D+83: normalização de LDH D+110: Bx mucosa oral (sem sinais de DECH) D+101: Bx medula óssea (agregado linfoide paratrabecular, compatível com infiltração por linfoma não-Hodgkin)</p>
<p>PACIENTE 43</p>	<p>D+63(5); D+70(400); D+77 (>400); D+82(33); D+84(35); D+89(40); D+91(15)</p> <p>D+54(5,43); D+63(177,2); D+70(735,62); D+77(2615,37); D+82(685,28); D+84(708,25); D+89(1066,81); D+91(3275,32); D+98(32,2); D+112(1,6)</p> <p>*Sem coleta após o D+112*</p> <p>*Sem coleta após o D+112*</p>	<p>D+64 a D+125</p> <p>*SUGESTIVO* HCMV (TGU + TGI) - D+70 (AGM>400 células positivas)</p>	<p>D+0 a D+21: internação hospitalar com tratamento de infecção relacionada ao cateter (<i>Staphylococcus epidermidis</i>) e cistite hemorrágica leve D+8: hematúria (urina com presença de hemácias superior a 100,00/campo), irrigação vesical e ↑ GGT (131U/L) D+11, D+15 e D+19: hematúria (urina com presença de hemácias superior a 100,00/campo) D+20: normalização de GGT D+26: ↑ TGP (123U/L), TGO (75U/L) e bilirrubina total (1,05mg/dL) D+48: ↑ TGP (254U/L), TGO (102U/L), FAL (133U/L) e GGT (195U/L) e internação hospitalar por quadro de sepse D+49: fezes com consistência muco-sanguinolenta, exame parasitológico negativo e pesquisa de <i>Microsporidium</i> e germes enteropatogênicos negativa D+50: valores elevados de TGP (142U/L), TGO (55U/L) e GGT (146U/L), diarreia (1200mL) e vômito (100mL) D+51: DECH agudo e discreta melhora da diarreia D+53: ↑ TGP (214U/L), TGO (90U/L), bilirrubina total (1,05mg/dL) e GGT (284U/L) e evacuação líquida sem resíduos (2300mL). Suspeita de pancolite ulcerativa em atividade - DECH?/HCMV? D+54: diarreia (2150mL) e vômito (150mL) D+54: endoscopia e Bx de esôfago, estômago e duodeno (duodenite e esofagite crônica ulcerativa com alterações epiteliais regenerativas, agressão linfoepitelial e células apoptóticas, compatíveis com DECH e negativo para HCMV) D+54: colonoscopia e Bx de íleo, cólon e reto (sugestivo para DECH e negativo para HCMV) D+55: cólicas abdominais e diarreia em grande quantidade (2150mL) D+56: diarreia profunda (1950mL), cólicas e dores abdominais com valores elevados de TGP, TGO bilirrubina total e GGT D+58 a D+66: diarreia profunda (atingindo volume de 2950mL em D+61) com normalização de TGO D+63: ↑ proteína C reativa (2,78mg/dL) D+66: diarreia profunda (2650mL) em vigência de metilprednisona e micofenolato sódico D+67: normalização da bilirrubina total D+70: diarreia profunda D+71 a D+73: diarreia profunda com normalização de TGP e ↑ GGT (298U/L)</p> <p>D+54 (duodeno e cólon)</p> <p>D+132 (choque séptico, fusariose disseminada e DECH-TGI)</p>

D+74: desnutrição grave e valor elevado de proteína C reativa (2,02mg/dL)
D+75: hematúria (urina com presença de hemácias superior a 100,00/campo)
D+76: fezes líquidas com pesquisa de sangue oculto +, exame parasitológico, pesquisa de *Microsporidium*, coccidios e germes enteropatogênicos negativos
D+78: hematúria (urina com presença de hemácias superior a 100,00/campo) – HCMV - e melhora da diarreia e GGT (274U/L)
D+79: HCMV (TGU + TGI)
D+88: redução da proteína C reativa (1,35mg/dL)
D+90: Úlceras profundas acometendo epiderme/derme/subcutâneo em pé direito (interdigital) com Bx + para *Fusarium* sp e *Acinetobacter lwoffii*. Hemocultura + para *Staphylococcus* sp e redução de GGT (166U/L)
D+94: fezes semipastosas (1000mL)
D+97: dor torácica (Raio X e tomografia de tórax normais) e ↑ GGT (193U/L)
D+102: hemocultura + para *Pseudomonas aeruginosa* não mucoide e *Sphingobacterium (Flavobacterium) multivorum*
D+105: cultura líquido sinovial + para *Fusarium* sp
D+108: tomografia computadorizada de tórax (pneumopatia intersticial)
D+112: Bx intra-articular de joelho direito + para *Fusarium* sp
D+114: fusariose disseminada (pele, joelho e pulmão)
D+127: instabilidade hemodinâmica
D+128: cultura de líquido sinovial de joelho esquerdo + para *Fusarium complexo solani* e choque séptico
D+129: ventilação mecânica e distensão abdominal. Evoluiu com oligúria
D+130: ↑ TGP (880U/L), TGO (4026U/L) e bilirrubina total (4,06mg/dL)
D+131: hemodiálise por insuficiência renal aguda dialítica
D+132: ↑ FAL (424U/L), GGT (193U/L) e LDH (2166U/L), assistolia e choque séptico

PACIENTE 44	D+33(1); D+91(2); D+98(1)	D+21(5,73); D+33(13,11); D+47(7,34); D+91(7,2); D+131(15,77); D+147(9,94); D+154(13,02)	Início em D+79	D+69 (DUODENO)	D+69 (duodeno – grau IV)	*TCTH autólogo prévio*
	Sem coleta entre D+61 e D+77	*Sem coleta entre D+61 e D+77*	D+8: hemocultura + para <i>Cryseobacterium indologenes</i> D+12: ↑ TGO (46U/L) e GGT (49U/L) D+13: cultura do cateter + para <i>Cryseobacterium indologenes</i> e <i>Acinetobacter baumannii</i> D+22: ↓ TGO (29U/L) e ↑ GGT (69U/L) D+33: ↑ LDH (513U/L) D+63: quadro de tosse progressiva com escarro esverdeado, sem febre e com quadro de prurido D+65: dor abdominal com cólica e vômito D+67: diarreia, prurido e normalização de GGT e ↑ TGP (52U/L), TGO (60U/L) e LDH (516U/L) D+67 a 119: internação hospitalar por DECH aguda de TGI e aparecimento de trombose venosa profunda em membro superior direito D+68: fezes líquidas com muco, exame parasitológico negativo e coprocultura para germes enteropatogênicos e <i>Salmonella</i> negativa e normalização de LDH <u>D+69: Endoscopia e Bx duodeno (duodenite ulcerativa com total desnudamento da mucosa, intensa atrofia de vilos, depleção de criptas e corpos apoptóticos focais, compatível com DECH grau IV. Alterações citológicas focais sugestivas de infecção por HCMV associada)</u> D+73: ↑ proteína C reativa (1,81mg/dL) D+74: ↑ GGT (307U/L) D+76: ↑ TGO (32U/L), bilirrubina total (1,25mg/dL) e GGT (351U/L) D+78: Colonoscopia e Bx cólon e reto (compatível com a hipótese clínica de DECH e negativo para HCMV) D+83: úlceras duodenais ativas - endoscopia e Bx de duodeno (sugestivo para DECH e negativo para HCMV) e valores elevados de bilirrubina total (1,60mg/dL), GGT (230U/L) e proteína C reativa (3,31mg/dL) D+85: urocultura + para <i>Escherichia coli</i> superior a 100000 UFC e ↑ GGT (252U/L) D+87: hemocultura + para <i>Escherichia coli</i> D+88: ↑ proteína C reativa (5,89mg/dL) D+99: urocultura + para <i>Escherichia coli</i> superior a 100000 UFC e ↑ TGP (47U/L), bilirrubina total (2,29mg/dL) e GGT (228U/L) D+101: hemocultura + para <i>Escherichia coli</i> D+106: ↑ TGP (87U/L), TGO (52U/L), bilirrubina total (3,29mg/dL) e GGT (258U/L) D+112: ↑ TGP (229U/L), TGO (73U/L), FAL (105U/L) e GGT (349U/L) D+118: ↑ TGP (385U/L), TGO (145U/L) e GGT (344U/L) D+123: diarreia, vômito, DECH aguda, febre (pneumonia?) e dor na panturrilha direita com aumento de inchado. Internação hospitalar para investigação D+124: hemocultura + para <i>Escherichia coli</i> D+127: ↑ FAL (256U/L), GGT (389U/L) e normalização de TGP e TGO D+131: úlceras duodenais e duodenite atrófica - endoscopia e Bx de estômago e duodeno (duodenite crônica inespecífica leve com atrofia de vilosidade e focos de neoplasia intraepitelial de baixo grau/dislplasia leve em mucosa duodenal)			

D+161 (pneumonia, insuficiência renal e hepática)

						<p>D+132: ↑ TGO (63U/L), TGO (31U/L), FAL (249U/L), GGT (559U/L) D+136 e D+138: cultura de escarro + para <i>Fusarium</i> sp e <i>Acinetobacter baumannii</i> e negativa para BAAR D+140: cultura de escarro + para <i>Acinetobacter baumannii</i> e <i>Mycobacterium</i> sp (não tuberculosis) D+148: esteatorreia e disenteria com fezes semipastosas com muco e cultura + para <i>Candida albicans</i> D+149: urocultura + para <i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC+ superior a 100000 UFC D+151: fezes com pesquisa microscópica + para leveduras D+161: insuficiência respiratória não responsiva a ventilação não invasiva. Submetida a intubação orotraqueal, evoluindo com parada cardiorrespiratória</p>	
PACIENTE 45	D+44(1); D+49(1); D+63(2); D+84(1)	-	D+55 a D+93	-	-	<p>D+0 a D+20: aumento progressivo da bilirrubina total, atingindo 2,28mg/dL D+30: ↑ LDH (587U/L) D+49: bilirrubina total acima do valor de referência (1,24mg/dL) D+76: bilirrubina total acima do valor de referência (1,23mg/dL) D+112: ↑ bilirrubina total (1,31mg/dL), fraqueza e desânimo D+140: normalização da taxa de bilirrubina total</p>	D+204 (septicemia não especificada)
PACIENTE 46	D+46(1); D+76(1); D+83(4); D+90(8); D+97(2); D+116(2)	D+46(2,35); D+62(6,14); D+76(8,84); D+83(1,16); D+90(102,26); D+97(6,59); D+111(65,58); D+116(1,44); D+118(33,95)	D+48 a D+118	-	D+43 (duodeno)	<p>D+10: ↑ TGP (47U/L), TGO (34U/L) e GGT (188U/L) D+12: ↑ proteína C reativa (10,70mg/dL) D+17: ↓ proteína C reativa (2,97mg/dL) e ↑ TGP (72U/L), TGO (63U/L) e GGT (334U/L) D+25: ↑ LDH (520U/L) D+32: internação hospitalar por pneumonia D+33: ↑ TGP (89U/L), TGO (100U/L) e bilirrubina total (1,06mg/dL) D+35: fezes com aspecto mucoso e consistência líquida (disenteria) com exame parasitológico negativo e pesquisa de <i>Microsporidium</i> e germes enteropatogênicos negativa D+42: endoscopia e Bx duodeno (compatível com DECH e negativo para HCMV) e valores elevados de TGP (78U/L), TGO (42U/L) e GGT (336U/L) D+47: ↑ bilirrubina total (1,46mg/dL) e GGT (547U/L) D+50: hematúria (urina com presença de hemácias superior a 100,00/campo) e urocultura + para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Staphylococcus</i> sp superior a 100000 UFC D+52: ↑ proteína C reativa (8,84mg/dL) D+52 e D+56: hematúria (urina com presença de hemácias superior a 100,00/campo) e urocultura + para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> superior a 100000 UFC D+56: hemocultura + para <i>Staphylococcus epidermidis</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> não mucoide e ↑ bilirrubina total (5,18mg/dL), FAL (153U/L) e GGT (706U/L) D+59: ↑ proteína C reativa (11,80mg/dL) D+63: hemocultura + para <i>Staphylococcus</i> sp D+83, D+85, D+94 e D+106: hemocultura + para <i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL+ D+105: cultura pele + para <i>Fusarium</i> sp e <i>Candida parapsilosis</i> D+111: Bx pele (processo inflamatório crônico leve com presença de hifas septadas com brotamentos em ângulo reto, na derme superficial e profunda) D+112: Broncoscopia (compatível com leveduras e pseudohifas de <i>Candida</i> sp e pesquisa de BAAR negativa) e valores elevados de bilirrubina total (1,23mg/dL), FAL (228U/L) e GGT(393U/L) D+113 e D+116: cultura escarro negativo para BAAR</p>	D+118 (septicemia - infecção bacteriana)

PACIENTE 47	D+21(1); D+86(3)	D+21(9,7); D+30(8,53); D+70(4,07); D+77(8,1)	D+21 a D+47 e D+86 a D+93	D+70 (boca - grau I)	<p>*TCTH autólogo prévio*</p> <p>*Quadro de Herpes zoster prévio*</p> <p>D+6: ↑ TGP (89U/L) e TGO (81U/L)</p> <p>D+8: redução de TGP (88U/L) e TGO (61U/L) e ↑ FAL (131U/L) e GGT (139U/L)</p> <p>D+10: ↑ proteína C reativa (17,00mg/dL)</p> <p>D+13: normalização de TGP e TGO e ↑ de bilirrubina total (1,57mg/dL), FAL (133U/L), GGT (213U/L) e proteína C reativa (9,48mg/dL)</p> <p>D+20: valor elevado da proteína C reativa (8,48mg/dL)</p> <p>D+21: redução da proteína C reativa (3,94mg/dL)</p> <p>D+22: ↑ TGP (65U/L), TGO (66U/L), bilirrubina total (1,59mg/dL), FAL (136U/L) e GGT (272U/L)</p> <p>D+27: redução da proteína C reativa (0,65mg/dL)</p> <p>D+29: normalização de FAL</p> <p>D+48: normalização TGP, TGO e bilirrubina total, redução de GGT (80U/L) e ↑ LDH (776U/L)</p> <p>D+77: normalização de LDH e GGT</p> <p>D+142: ↑ TGP (52U/L), TGO (44U/L) e FAL (153U/L)</p>
PACIENTE 48	D+103(1)	-	Não tratado	-	<p>D+0 a D+22: internação hospitalar apresentando neutropenia febril e mucosite</p> <p>D+8: ↑ bilirrubina total (1,34mg/dL) e GGT (103U/L)</p> <p>D+11: ↑ bilirrubina total (2,17mg/dL), FAL (174U/L) e GGT (153U/L)</p> <p>D+15: redução de bilirrubina total (1,39mg/dL) e ↑ FAL (215U/L) e GGT (294U/L)</p> <p>D+22: normalização de FAL e redução de bilirrubina total (1,40mg/dL) e GGT (98U/L)</p> <p>D+40: normalização de bilirrubina total e GGT</p> <p>D+41: ↑ proteína C reativa (16,10mg/dL)</p> <p>D+68: ↑ TGO (55U/L), FAL (161U/L) e GGT (365U/L)</p> <p>D+103: ↑ TGP (66U/L), TGO (64U/L), FAL (223U/L) e GGT (275U/L)</p> <p>D+130: redução de TGP (41U/L) e TGO (38U/L) e ↑ de bilirrubina total (1,04mg/dL), FAL (379U/L), GGT (481U/L) e LDH (576U/L)</p>

PACIENTE 49									D+0 a D+21: internação hospitalar (apresentou neutropenia febril e mucosite)
									D+2: vômito (20mL)
									D+3 a D+10: febre
									D+5: ↑ GGT (122U/L)
									D+7: vômito (1 episódio)
									D+10: vômito (5 episódios)
									D+12: ↑ GGT (168U/L) e proteína C reativa (7,56mg/dL) e vômito
									D+13 e D+15: vômito
									D+16: ↑ GGT (255U/L)
									D+19: normalização da proteína C reativa
								D+34: normalização de GGT	
								D+117: anemia persistente e astenia com momentos de cansaço	
								D+127: hematúria (urina com presença de hemácias superior a 100,00/campo)	
								D+145: disúria sem hematúria	

ID (identificação); AGM (antigenemia): dia pós-TCTH (nº de células positivas); PCR em Tempo Real: dia pós-TCTH (nº de cópias virais); HCMV (citomegalovírus humano); Doença por HCMV: dia do diagnóstico pós-TCTH (local do alojamento viral); DECH (doença do enxerto contra hospedeiro); Óbito: dia pós-TCTH (causa de óbito); TCTH (transplante de células-tronco hematopoiéticas); LDH (exame de lactato desidrogenase); TGP (transaminase glutâmica pirúvica); TGO (transaminase glutâmica oxalacética); FAL (fosfatase alcalina); GGT (gama glutamil transpeptidase); Bx (biópsia); UFC (unidades formadoras de colônias); TGI (trato gastrointestinal); ⁽¹⁾ Na presente data o exame de antigenemia não pode ser por neutropenia; ⁽²⁾ Sem liberação de resultado devida à baixa qualidade da amostra coletada; Sublinhado: referente à doença por HCMV

