

*CARLA APARECIDA TAVARES*

**DETECÇÃO DO CITOMEGALOVÍRUS E POLIOMAVÍRUS  
NA CISTITE HEMORRÁGICA EM TRANSPLANTADOS  
ALOGÊNICOS DE CÉLULAS PROGENITORAS  
HEMATOPOÉTICAS**

*CAMPINAS*

*2006*



**CARLA APARECIDA TAVARES**

**DETECÇÃO DO CITOMEGALOVÍRUS E POLIOMAVÍRUS  
NA CISTITE HEMORRÁGICA EM TRANSPLANTADOS  
ALOGÊNICOS DE CÉLULAS PROGENITORAS  
HEMATOPOÉTICAS**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação  
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade  
Estadual de Campinas, para obtenção do título de  
Mestre em Farmacologia.*

***ORIENTADORA: Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa***

**CAMPINAS**

**2006**



**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

T197d      Tavares, Carla Aparecida  
              “Detecção do citomegalovírus e poliomavírus na cistite  
              hemorrágica em transplantados alogênicos de células progenitoras  
              hematopoéticas” / Carla Aparecida Tavares. Campinas, SP : [s.n.],  
              2006.

Orientador :Sandra Cecília Botelho Costa  
Dissertação ( Mestrado ) Universidade Estadual de Campinas.  
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Citomegalovírus. 2. Polyomavírus. 3. Transplante de  
células - Tronco hematopoéticas. I. Costa, Sandra Cecília Botelho.  
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências  
Médicas. III. Título.

**Título em inglês : Detection of cytomegalovirus and polyomavirus in  
hemorrhagic cystitis in allogenic recipients in haematopoetic stem cell  
transplantation**

**Keywords:** • Cytomegalovirus  
              • Polyomavirus  
              • Haematopoetic stem cell transplantation

**Titulação: Mestrado em Farmacologia**

**Banca examinadora: Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa  
                              Profa. Dra. Olga Maria Fernandes de Carvalho  
                              Prof Dr Julio César Voltareli**

**Data da defesa: 25- 08- 2006**

## **Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado**

---

**Orientadora:**

**Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa**

**Membros:**

**Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa**

**Profa. Dra. Olga Maria Fernandes de Carvalho**

**Prof. Dr. Júlio César Voltareli**

**Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas.**

**Data: 25/08/2006**



## ***DEDICATÓRIA***

*“Aos meus pais, Lúcio e Lúcia, pela dedicação, força, coragem e incentivo e por sempre estarem ao meu lado nos momentos mais difíceis.”*



*“Homenagem à Profa. Dra. Sandra Cecília Botelho Costa e à Dra. Sandra Helena Alves Bonon, pela orientação, pelos ensinamentos e sugestões valiosas, que muito contribuíram para a finalização de um sonho e de mais uma etapa percorrida em minha vida.”*



## *AGRADECIMENTOS*

---

A Deus, que com sua sabedoria e bondade infinita tornou-me capaz de ajudar e ser ajudada e sempre iluminando e protegendo-me durante estes anos de dedicação aos estudos.

Aos meus irmãos, em especial ao Heleno que é meu maior incentivo, pois tudo o que faço hoje é por ele.

Ao meu noivo pela paciência, compreensão e carinho.

A Profa. e Dra. Ana Laura Remédio Z. Beretta que me iniciou na pesquisa.

A minha grande e especial amiga Vanessa de Mello Borella e seus pais pela valiosa ajuda, incentivo e apoio em todas as horas deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Aos amigos do laboratório: Débora, Bruna, Daniela, Juliana, Cristiane, Vinícius, Telma, Juliana Manfrinato, Patrícia e Felipe pelo apoio e pela ajuda nas horas de aperto.

À equipe de Médicos e Enfermeiros do Hemocentro que muito contribuíram para a realização deste projeto.

Á todos os meus pacientes que aceitaram participar deste estudo.



*“Quem crê é forte; quem duvida é fraco.  
Fortes convicções precedem grandes ações”.*

***J. F. Clarke***



Trabalho realizado no Laboratório de Diagnóstico de Doenças Infecciosas por Técnicas de Biologia Molecular, Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) com a colaboração do Serviço de Transplantes de Medula Óssea do Centro de Hematologia e Hemoterapia (HEMOCENTRO/UNICAMP).



	<i>Pág.</i>
<b>RESUMO</b> .....	<i>xlvii</i>
<b>ABSTRACT</b> .....	<i>li</i>
<b>1-INTRODUÇÃO</b> .....	55
<b>1.1- Propriedades Gerais do Citomegalovírus Humano (HCMV)</b> .....	60
1.1.1- Características Biológicas.....	60
1.1.2- Patogênese.....	61
1.1.3- Epidemiologia.....	63
1.1.4- Transmissão.....	64
1.1.5- Manifestações Clínicas.....	65
1.1.6- Diagnóstico do HCMV.....	66
1.1.6.1- Detecção do antígeno pp65 do HCMV em sangue periférico (antigenemia).....	66
1.1.6.2- “Nested-PCR” (PCR-Dupla).....	67
1.1.7- Tratamento: antivirais.....	68
<b>1.2- Propriedades Gerais do Poliomavírus Humano (tipo BKV)</b> .....	68
1.2.1- Características Biológicas.....	68
1.2.2- Patogênese.....	72



1.2.3- Epidemiologia.....	74
1.2.4- Transmissão.....	74
1.2.5- Manifestações Clínicas.....	75
1.2.6- Diagnóstico do Poliomavírus Humano (tipo BKV).....	76
1.2.6.1- Citologia Urinária.....	76
1.2.6.2- Amplificação do Gene pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e “Nested- PCR”.....	76
1.2.7- Tratamento: Antivirais.....	77
<b>2- OBJETIVOS.....</b>	<b>79</b>
<b>3- CASUÍSTICA E MÉTODOS.....</b>	<b>83</b>
<b>3.1- Casuística.....</b>	<b>85</b>
3.1.1- Pacientes.....	85
3.1.2- Critérios para Inclusão dos Pacientes.....	86
3.1.3- Critérios para Exclusão dos Pacientes.....	86
3.1.4- Aspectos Éticos da Pesquisa.....	86
3.1.5- Correlação Clínica.....	86
3.1.6- Protocolo de Acompanhamento para realização das Coletas.....	87
3.1.7- Critérios utilizados para definição de infecção ativa pelo HCMV...	87
3.1.8- Critérios utilizados para definição de infecção ativa pelo BKV.....	88



3.1.9- Critérios utilizados para definição de doença pelo HCMV.....	8
3.1.10- Critérios utilizados para definição de recorrência de infecção ativa pelo HCMV.....	89
3.1.11- Critérios utilizados para definição de infecção ativa e/ou doença tardia pelo HCMV.....	89
3.1.12- Protocolo de administração de Ganciclovir nos receptores no caso de infecção ativa e/ou doença pelo HCMV.....	89
3.1.13- Protocolo de condicionamento para o preparo do transplante.....	90
3.1.14- Protocolo de Profilaxia da Doença do enxerto contra o Hospedeiro (DECH).....	91
3.1.15- Protocolo de Condicionamento para o Preparo de Transplante Mini-Alogênico ou Não-Mieloablativo Aparentado.....	91
3.1.16- Protocolo de Profilaxia da Doença do Enxerto contra o Hospedeiro em Transplante Mini-Alogênico ou Não-Mieloablativo Aparentado.....	92
<b>3.2- Métodos.....</b>	<b>92</b>
3.2.1- Método para Detecção do Citomegalovírus (HCMV).....	92
3.2.1.1- Antigenemia.....	92
A- Extração de Polimorfonucleares.....	92
B- Preparação das Lâminas.....	93
C- Coloração das Lâminas.....	93
D- Leitura das Lâminas.....	94



3.2.1.2- “Nested-PCR” para Detecção do DNA do HCMV.....	95
A- Extração rápida de DNA com NaOH / Tris HCl.....	95
3.2.2- Detecção do Gene $\beta$ -Globina Humana pela reação em Cadeia da Polimerase.....	96
3.2.3- Detecção do Gene do Citomegalovírus Humano (HCMV) pela Reação em Cadeia da Polimerase.....	97
3.2.4- Métodos para Detecção do Poliomavírus (BKV).....	99
3.2.4.1- Citologia Urinária.....	99
A- Preparação das Lâminas.....	99
B- Coloração de Papanicolau.....	100
C- Leitura das Lâminas.....	100
3.2.4.2- Detecção do gene do Poliomavírus (BKV) pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e “Nested-PCR”.....	101
3.2.5- Cuidados Especiais para evitar Contaminação das amostras durante a PCR.....	102
3.2.6- Análises Estatísticas.....	103
<b>4- RESULTADOS.....</b>	<b>105</b>
<b>4.1- Características dos receptores estudados e exames realizados durante a monitorização.....</b>	<b>107</b>
<b>4.2- Características dos receptores de TCPH.....</b>	<b>1007</b>



<b>4.3- Status sorológico para HCMV dos doadores e receptores relacionados neste estudo.....</b>	<b>110</b>
<b>4.4- Resultados dos testes diagnósticos de infecção ativa pelo HCMV em TCPH.....</b>	<b>111</b>
<b>4.5- Avaliação do teste de “Nested-PCR” e antigenemia no diagnóstico de infecção ativa pelo HCMV nos receptores estudados.....</b>	<b>114</b>
<b>4.6- Resultados dos testes laboratoriais em relação à infecção ativa pelo HCMV e pelo BKV nos receptores de TCPH.....</b>	<b>116</b>
<b>4.7- Avaliação da detecção do Poliomavírus Humano pela técnica de “Nested-PCR” em amostras de urina e sangue de receptores de TCPH e grupo controle.....</b>	<b>125</b>
<b>4.8- Causas dos óbitos ocorridos durante o seguimento dos receptores estudados.....</b>	<b>125</b>
<b>5- DISCUSSÃO.....</b>	<b>127</b>
<b>6- CONCLUSÕES.....</b>	<b>133</b>
<b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>137</b>
<b>8 -ANEXOS.....</b>	<b>149</b>
<b>Anexo 1- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....</b>	<b>151</b>
<b>Anexo 2- Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....</b>	<b>152</b>



## *LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS*

---

<b>AA</b>	Anemia Aplástica
<b>AAG</b>	Anemia Aplástica Grave
<b>AD169</b>	Linhagem de HCMV isolada em laboratório
<b>AEC</b>	Amino-etil-carbazol
<b>AGM</b>	Antigenemia
<b>AIDS</b>	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
<b>ALT</b>	Alanina amino-transferase
<b>β-Globina</b>	Beta-Globina
<b>BKV</b>	Poliomavírus
<b>CH</b>	Cistite Hemorrágica
<b>CPP</b>	Células Progenitoras Periféricas
<b>CSA</b>	Ciclosporina
<b>D</b>	Doador
<b>DECH</b>	Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro
<b>DHPG</b>	Dihidroxiproximetil Guanina
<b>DIC</b>	Doença de Inclusão Citomegálica
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico ou ADN



<b>dNTP</b>	Desoxinucleotídeos Trifosfato
<b>dATP</b>	Dexoxirribonucleotídeo Adenina Trifosfato
<b>dCTP</b>	Dexoxirribonucleotídeo Citosina Trifosfato
<b>dGTP</b>	Dexoxirribonucleotídeo Guanina Trifosfato
<b>dTTP</b>	Dexoxirribonucleotídeo Timina Trifosfato
<b>DOV</b>	Doença oclusiva venocular
<b>EDTA</b>	Ácido Etileno Diaminotetracético
<b>EV</b>	Endovenoso
<b>Ex.:</b>	Exemplo
<b>FCM</b>	Faculdade de Ciências Médicas
<b>g</b>	Gramas
<b>Gcv</b>	Ganciclovir
<b>g/l</b>	Gramas por litro
<b>HC</b>	Hospital das Clínicas
<b>HCMV</b>	Citomegalovírus Humano
<b>HHV</b>	Herpes simples
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>ICT</b>	Irradiação Corporal Total
<b>IE</b>	Antígeno imediatamente precoce (“Immediately early antigens”)



<b>IgG</b>	Imunoglobulina da Classe G
<b>IH</b>	Infecção Hospitalar
<b>IR</b>	Seqüências Internas Repetidas do genoma do HCMV (“Inverted Repeats”)
<b>JCV</b>	JC vírus
<b>KDa</b>	Quilodaltons
<b>Kb</b>	Kilobase
<b>Kg</b>	Kilograma
<b>L</b>	Componente longo do genoma do Citomegalovírus
<b>LH</b>	Linfoma Hodgkin
<b>LLA</b>	Leucemia Linfóide Aguda
<b>LMA</b>	Leucemia Mielóide Aguda
<b>LMC</b>	Leucemia Mielóide Crônica
<b>LMP</b>	Leucoencefalopatia multifocal progressiva
<b>LNH</b>	Linfoma não-Hodgkin
<b>M</b>	Molar
<b>m<sup>2</sup></b>	Metros quadrados
<b>MIE</b>	Principal Antígeno imediatamente precoce
<b>mg</b>	Miligramas



<b>ml</b>	Mililitros
<b>MM</b>	Mieloma Múltiplo
<b>Mm</b>	Milimolar
<b>mM</b>	Micromol
<b>MMF</b>	Micofenolatomicotil
<b>MO</b>	Medula Óssea
<b>NC</b>	Não contagem Celular
<b>Nested-PCR</b>	Dupla Reação em Cadeia da Polimerase
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>ns</b>	Sem significância estatística
<b>pb</b>	pares de base
<b>PBS</b>	Tampão Fosfato Aminometano
<b>PCR</b>	Reação em Cadeia da Polimerase ou Polymerase Chain Reaction
<b>pH</b>	Ponto Hidrogeniônico
<b>pp</b>	Fosfoproteínas
<b>pp65</b>	matriz fosfoproteica 65 ou proteína matricial de peso molecular 65 KDa
<b>PVH</b>	Poliomavírus Humano
<b>R</b>	receptor
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucléico ou ARN



<b>RNA<sub>m</sub></b>	Ácido Ribonucléico mensageiro ou mRNA
<b>rpm</b>	Rotação por minuto
<b>S</b>	Componente curto do genoma do Citomegalovírus
<b>SMD</b>	Síndrome Mielodisplásica
<b>SV40</b>	Símio 40
<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>TCPH</b>	Transplante de células progenitoras hematopoéticas
<b>TCLE</b>	Termo de Compromisso Livre e Esclarecido
<b>TGT</b>	Trato gastrointestinal
<b>TMO</b>	Transplante de Medula Óssea
<b>TR</b>	Seqüências de Terminações Repetitivas do genoma do HCMV (“Terminal Repeats”)
<b>TRIS</b>	Hidroximetil Aminometano
<b>U</b>	Única
<b>UL</b>	Seqüência única longa (“Unique Long”) do genoma do HCMV
<b>US</b>	Seqüência única curta (“Unique Short”) do genoma do HCMV
<b>UNICAMP</b>	Universidade Estadual de Campinas
<b>µl</b>	Microlítros
<b>µg</b>	Microgramas



<b>VNTR</b>	Repetições em tanden de números variados
<b>VO</b>	Via Oral
<b>Vp</b>	Proteína do capsídeo viral
<b>5' --- 3'</b>	Sentido de Transcrição
<b>§</b>	Número de Nucleotídeos
<b>%</b>	Porcentagem
<b>°</b>	Graus
<b>° C</b>	Graus Celsius
<b>&lt;</b>	Menor que
<b>&gt;</b>	Maior que
<b>≤</b>	Menor ou Igual
<b>≥</b>	Maior ou Igual



		<i>Pág.</i>
<b>Tabela 1-</b>	Seqüência de <i>primers</i> que flanqueiam uma região conservada do gene da $\beta$ - globina utilizados na PCR.....	97
<b>Tabela 2-</b>	Seqüência dos <i>primers</i> externo e internos que flanqueiam uma região conservada do genoma do HCMV, utilizados na PCR e na “Nested-PCR”.....	98
<b>Tabela 3-</b>	Seqüência dos <i>primers</i> externo e internos que flanqueiam uma região conservada do genoma do Poliomavírus (BKV), utilizados na PCR e na “Nested-PCR”.....	102
<b>Tabela 4-</b>	Distribuição dos testes realizados nos pacientes submetidos à TCPH para detecção da infecção ativa pelo HCMV.....	107
<b>Tabela 5-</b>	Características dos 41 receptores de TCPH estudados.....	109
<b>Tabela 6-</b>	Relação entre sorotipos dos receptores (R) e doadores (D) e infecção ativa / doença pelo HCMV, óbito pelo HCMV e DECH .....	110
<b>Tabela 7-</b>	Comparação entre “Nested-PCR” e Antigenemia (AGM) em relação à infecção ativa e doença pelo HCMV nos receptores de TCPH.....	115
<b>Tabela 8-</b>	Resultados dos testes laboratoriais em relação à infecção ativa pelo HCMV e pelo BKV nos 41 receptores alogênicos submetidos à TCPH .....	117



<b>Tabela 9-</b>	Resultados nos testes laboratoriais no grupo total de pacientes n=41.....	118
<b>Tabela 10-</b>	Pacientes submetidos à TCPH que apresentaram <b>Cistite Hemorrágica</b> e resultados dos testes de detecção de infecção ativa pelo BKV e pelo HCMV.....	119
<b>Tabela 11-</b>	Resultados dos testes laboratoriais nos 16 pacientes TCPH que apresentaram <b>Cistite Hemorrágica</b> .....	120
<b>Tabela 12-</b>	Resultados dos testes de diagnósticos de infecção ativa pelo HCMV e BKV em receptores de TCPH em relação à ocorrência ou não de <b>Cistite Hemorrágica</b> .....	120
<b>Tabela 13-</b>	Exames utilizados para diagnóstico de infecção ativa pelo HCMV e BKV, comparados com <b>Cistite Hemorrágica</b> e óbitos e o acompanhamento dos receptores de TCPH.....	121
<b>Tabela 14-</b>	Mediana dos tempos de início de detecção de infecção ativa pelo HCMV e BKV pela “Nested-PCR”, AGM e citologia urinária dos 16 pacientes monitorizados e com a presença de <b>Cistite Hemorrágica</b> .....	125
<b>Tabela 15-</b>	Causa dos óbitos nos receptores de TCPH.....	126



	<i>Pág.</i>
<b>Figura 1-</b> Citomegalovírus Humano (HCMV).....	61
<b>Figura 2-</b> Mecanismo de infecção do HCMV nas células do hospedeiro.....	62
<b>Figura 3-</b> Poliomavírus Humano .....	70
<b>Figura 4-</b> Organização genômica do poliomavírus.....	71
<b>Figura 5-</b> Mecanismo de infecção do BKV nas células do hospedeiro.....	73
<b>Figura 6-</b> Células antígeno-positivas e negativas para reação de antigenemia para detecção do HCMV.....	113
<b>Figura 7-</b> Resultado da amplificação dos fragmentos do HCMV e da $\beta$ -globina humana pela “Nested-PCR”.....	114
<b>Figura 8-</b> Citologia Urinária com coloração de Papanicolau comparada com a Citologia Urinária normal.....	122
<b>Figura 9-</b> Resultado da amplificação do BKV - DNA na urina, através da análise direta do fragmento em gel de agarose a 2%.....	123
<b>Figura 10-</b> Resultado da amplificação do BKV - DNA no sangue, através da análise direta do fragmento em gel de agarose a 2%.....	124



	<i>Pág.</i>
<b>Gráfico 1-</b> Ocorrência de infecção ativa/doença pelo HCMV pós-transplante dos 41 pacientes relacionados pelo tempo de positividade dos testes.....	112
<b>Gráfico 2-</b> Concordância dos testes diagnósticos entre Antigenemia e “Nested-PCR” dos 41 receptores de TCPH monitorizados .....	115





## ***RESUMO***



A reativação da infecção pelo Citomegalovírus humano (HCMV) e pelo Poliomavírus (BKV) no uroendotélio, vem sendo relacionada a complicações como a Cistite Hemorrágica (CH) em receptores de transplante de células progenitoras hematopoéticas (TCPH), o que representa um fator de risco para estes pacientes. Este estudo prospectivo de 41 receptores de TCPH teve como objetivos, detectar a infecção ativa pelo HCMV no sangue e pelo BKV em amostras de sangue e urina após TCPH, usando as técnicas de antigenemia (AGM), citologia urinária e Reação em Cadeia da Polimerase tipo Nested (“Nested-PCR”) para se verificar a participação do HCMV e BKV como possíveis fatores de risco para CH e o impacto clínico destas viroses nestes pacientes. O monitoramento dos receptores de TCPH foi baseado em coletas de sangue para realização de AGM e “Nested-PCR” para detecção do HCMV e Citologia urinária para verificar células Decoy como um marcador de replicação viral, e também “Nested-PCR” de urina e sangue para diagnóstico de replicação do poliomavírus de todos os receptores (independente de Citologia urinária positiva ou negativa). Nos receptores estudados, a frequência de AGM positiva para HCMV foi de 63,4%, com “Nested-PCR” positivo de 78%. A doença pelo HCMV ocorreu em 8/41 (21,1%) dos receptores, dos quais 1/8 (12,5%) veio a óbito. Dos 41 receptores 14 (34,1%), tiveram BKV detectado na urina e 13 (31,7%) no sangue, todos os receptores que apresentaram infecção ativa pelo BKV tiveram também pelo HCMV, sendo que 16 (39%) evoluíram com CH. Estes resultados sugerem que o BKV juntamente com o HCMV em receptores de TCPH pode estar envolvidos na patogênese da CH, sendo assim, medidas preventivas baseadas na inibição da replicação viral de ambos os vírus poderão minimizar o impacto clínico da cistite hemorrágica nesse grupo de transplantados.

**Palavras-chaves:** Citomegalovírus, Poliomavírus, Cistite Hemorrágica, “Nested-PCR”, Transplante de células progenitoras hematopoéticas.





***ABSTRACT***



The reactivation of infection by Human Cytomegalovirus (HCMV) and by Polyomavirus (BKV) in the uroendothelium, has been related with haemorrhagic cystitis (HC) in haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) receptors, which represents a factor of risk for those patients. This prospective study of 41 HSCT receptors has the purpose of detect the active HCMV infection in the blood and BKV in blood and urine samples after HSCT, using antigenemia assay (AGM), urine cytology and Nested polymerase chain reaction (“Nested-PCR”), to verify the chance of participation of HCMV and BKV as factor of risk for HC and the clinic impact of these virus on those patients. The HSCT receptor’s monitoring was based in blood collection for AGM and “Nested-PCR” to detect HCMV and urine cytology to verify decoy cells as a marker of BK virus replication, and “Nested-PCR” on urine and blood in all receptors (independently of positive or negative cytology) as well. In the HSCT receptors, the frequency of positive AGM for HCMV was 63,4%, with a positive “Nested-PCR” of 78%. The HCMV disease occurred in 8/41 (21,1%) of the receptors, and 1/8 (12,5%), dead. Among the 41 receptors, 14 (34,1%) had BKV detected in the urine and 13 (31,7%) in the blood. All the receptors that showed active infection by BKV, had active infection by HCMV, as well, and 16 (39%) developed HC. These results suggest that BKV and HCMV, together, in HSCT receptors might be involved in HC pathogenesis. Being thus, prevents measurements based on viral replication inhibition for both virus could minimize the clinic impact of hemorrhagic cystitis on those transplanted group.

**Keywords:** Cytomegalovirus, Polyomavirus, Haemorrhagic cystitis, “Nested-PCR”, haematopoietic stem cell transplantation





## ***1- INTRODUÇÃO***



A Cistite Hemorrágica (CH) é uma importante complicação pós-transplante de células progenitoras hematopoéticas (TCPH) com uma incidência variando de 7 a 70% entre estes pacientes. Uma CH leve pode causar disúria e hemorragia microscópica e muitas vezes está associada aos efeitos tóxicos do condicionamento realizado no pré-transplante. Isto também pode ocorrer durante ou imediatamente após o condicionamento (Leung *et al.*, 2002a).

A CH grave causa uma hematúria que está freqüentemente associada com retenção de coágulos e obstrução do trato urinário. Ocorre tardiamente com desenvolvimento prolongado requerendo uma persistente irrigação da bexiga e cistoscopia repetida, tendo relevância nas causas de morbidade e ocasionalmente mortalidade depois do TCPH (Leung *et al.*, 2002b).

De acordo com o grau de gravidade da hematúria a CH pode ser classificada em quatro graus:

Grau 1: hematúria microscópica;

Grau 2: hematúria macroscópica;

Grau 3: hematúria com coágulos;

Grau 4: hematúria macroscópica com coágulos e função renal prejudicada secundária à obstrução do trato urinário (Bedi *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2003).

Clinicamente, a CH também pode ser classificada em: leve (hematúria microscópica contínua), moderada (hematúria importante e disúria com ou sem coágulos) e grave (dor pela passagem do coágulo requerendo irrigação da bexiga

ou presença de complicações incluindo obstrução do trato urinário e função renal prejudicada, requerendo intervenção cirúrgica ou coagulação química) (Sencer *et al.*, 1993; Veronique *et al.*, 2004).

Os fatores de risco associados com a CH vêm sendo analisados em inúmeros estudos. Estes incluem, entre outros, reativação do Poliomavírus (BKV) no uroendotélio e do Citomegalovírus Humano (HCMV); pacientes idosos, TCPH alogênico e doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) (Childs, 1998).

O HCMV pertence ao gênero *Herpesvírus* da família *Herpesviridae*. Estudos por microscopia eletrônica mostram que a sua ultra-estrutura é semelhante à de outros herpesvírus, sendo considerado o maior membro desta família (Stinski *et al.*, 1990).

Como acontece com outros herpesvírus, a infecção pelo HCMV é freqüentemente seguida por infecção persistente e/ou recorrente. A infecção recorrente é em geral causada pela reativação do vírus latente (Costa, 1999). O HCMV infecta aproximadamente 60% dos adultos em países desenvolvidos e quase 100% em países em desenvolvimento. O vírus pode ser adquirido por infecção intra-uterina (aproximadamente 1%); transmissão perinatal da mãe para a criança durante o parto ou através do aleitamento materno (5-20%); contato direto entre os indivíduos, incluindo a transferência de saliva e outros fluidos corporais durante a relação sexual. Além dessas rotas naturais de transmissão, a contaminação pode ocorrer durante transfusões de sangue, através da doação de órgãos sólidos e de medula óssea (Griffiths *et al.*, 2000). A infecção ativa pelo HCMV e suas complicações têm sido demonstradas com um impacto significativo na sobrevida após transplante. Além dos efeitos diretos imediatos (ex.: enterocolite, hepatite, pneumonite e síndromes virais), há várias conseqüências indiretas tais como aceleração da aterosclerose em pacientes transplantados cardíacos, aumento da rejeição ao enxerto e predisposição aumentada a outras infecções oportunistas (Razonable *et al.*, 2003).

O HCMV após a infecção primária permanece em estado latente até que se apresentem fatores que comprometam a imunidade do hospedeiro, entre eles a quimioterapia imunossupressora a que é submetido o transplantado (Pannuti, 1984; Myers *et al.*, 1997).

Entre os pacientes que apresentam elevado risco de contrair a doença disseminada por HCMV, incluem-se pacientes submetidos a transplante de rim, fígado, medula óssea e portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e aqueles

submetidos à quimioterapia antineoplásica, especialmente para tratamento de linfomas e leucemias. Um dos fatores que mais tem contribuído para o aumento de ocorrência de infecções pelo HCMV é a utilização de medicamentos imunossupressores para evitar o risco de rejeição ao transplante (Ho, 1990).

É importante diagnosticar precocemente a infecção ativa pelo HCMV e a seguir analisar os dados laboratoriais apresentados pelo paciente. A partir do conjunto desses dados deve-se identificar se a infecção é ou não acompanhada de manifestações significativas, que caracterizam a doença pelo HCMV (Costa, 1999).

O diagnóstico clínico da infecção pelo HCMV é extremamente difícil de ser firmado e depende, em última análise de confirmação laboratorial. Quadro febril não-infeccioso, como rejeições de transplantes, reação do enxerto ao hospedeiro e efeitos colaterais de certos medicamentos podem ser confundidos ou até ocorrerem em associações com a citomegalovirose (Costa, 1999).

Os Poliomavírus Humanos (PVH) são membros da família *Poliomaviridae* (Boubenider *et al.*, 1999) e vêm sendo apontados como uma importante causa de CH em pacientes transplantados imunossuprimidos (Peinemann *et al.*, 2000).

As principais espécies conhecidas neste gênero são o BKV (patógeno de nosso interesse), o JC vírus (JCV) e o símio SV 40 (Boubenider *et al.*, 1999). O PVH tipo BK tem soroprevalência de 60 – 90%, infectando humanos em idade precoce e permanecendo latente no rim, sangue periférico e cérebro podendo ser reativado com a deficiência imunológica (Priftakis *et al.*, 2003).

Nos pacientes de TCPH alogênico, a reativação do BKV tem-se associado, à ocorrência da CH, com uma incidência de 5 – 34% , caracterizada por dor abdominal fraca, disúria, micção freqüente e hematúria (Bogdanobvic *et al.*, 1998).

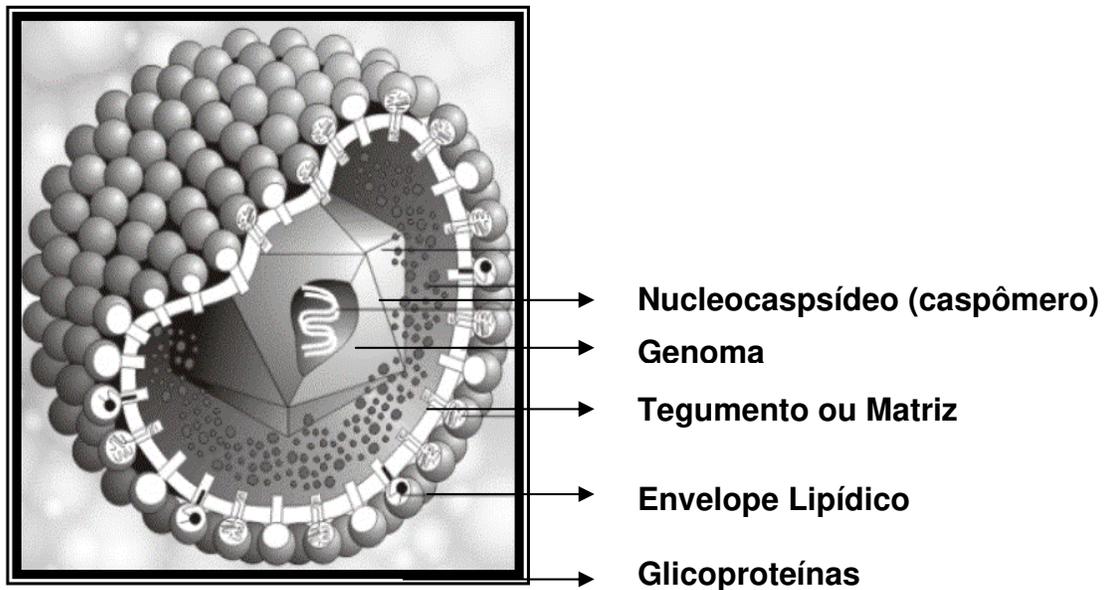
Vários estudos estão investigando fatores adicionais envolvidos no desenvolvimento da CH. A DECH vem sendo implicada, mas não tem sido confirmada como um co-fator (Leung *et al.*, 2002a).

## 1.1- Propriedades gerais do citomegalovírus humano (HCMV)

### 1.1.1- Características biológicas

O HCMV foi classificado como membro da família *Herpesviridae* segundo os critérios bioquímicos e morfológicos, em 1973, pelo grupo de Estudos dos Herpesvírus do Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus. A família *Herpesviridae* foi dividida em três sub-famílias: *Alphaherpesvirinae* (Herpes simples tipo 1 e 2, herpes zoster–HHV3), *Bethaherpesvirinae* (Citomegalavírus, herpesvírus humano 6 e 7) & *Gammaherpesvirinae* (Epstein barr e herpesvírus humano 8) (Brennan, 2001).

O vírus do HCMV (*Figura 1*) possui dupla fita de DNA podendo também se encontrar RNA viral (Brennan, 2001). O vírion do HCMV, assim como de todos os herpesvírus, apresenta 4 elementos estruturais: 1) um núcleo capsídeo icosaédrico com aproximadamente 150 - 200 nm de diâmetro que contém 162 capsômeros; 2) uma estrutura protéica eletrodensa contendo o DNA viral fechado em um envelope; 3) um envelope derivado da membrana celular e contendo glicoproteínas virais e proteínas integrais e o 4) um tegumento entre o núcleo capsídeo e o envelope. O tamanho do genoma do DNA é de aproximadamente 240 pares de bases (pb), entre os herpesvírus este é designado como sendo o maior, com comprimento estimado de 65-68 nm, podendo ser dividido em dois segmentos: um componente longo (L) e um curto (S), com possibilidade de sofrer inversão durante a replicação. Os segmentos estão delimitados por seqüências repetitivas terminais (TR) e internas (IR). O capsídeo icosaédrico, que é formado por subunidades de capsômero e envolvido por um tegumento amorfo, é constituído por três fosfoproteínas predominantes: *pp150*, *pp65* e *pp71*, derivados do genes UL32, UL83 e UL82, respectivamente. Suas funções não são bem conhecidas, entretanto, elas são antigênicas e marcadores recentes de infecção viral, uma característica que esta sendo utilizada no diagnóstico, em particular a *pp65* na técnica de antigenemia (Zaia *et al.*, 1999; Brennan, 2001; Hoz *et al.*, 2002)



**Figura 1-** Citomegalovírus humano (HCMV) (Zaia JA, Thomas ED, Blume KG, Forman SJ 1999, 2: 561).

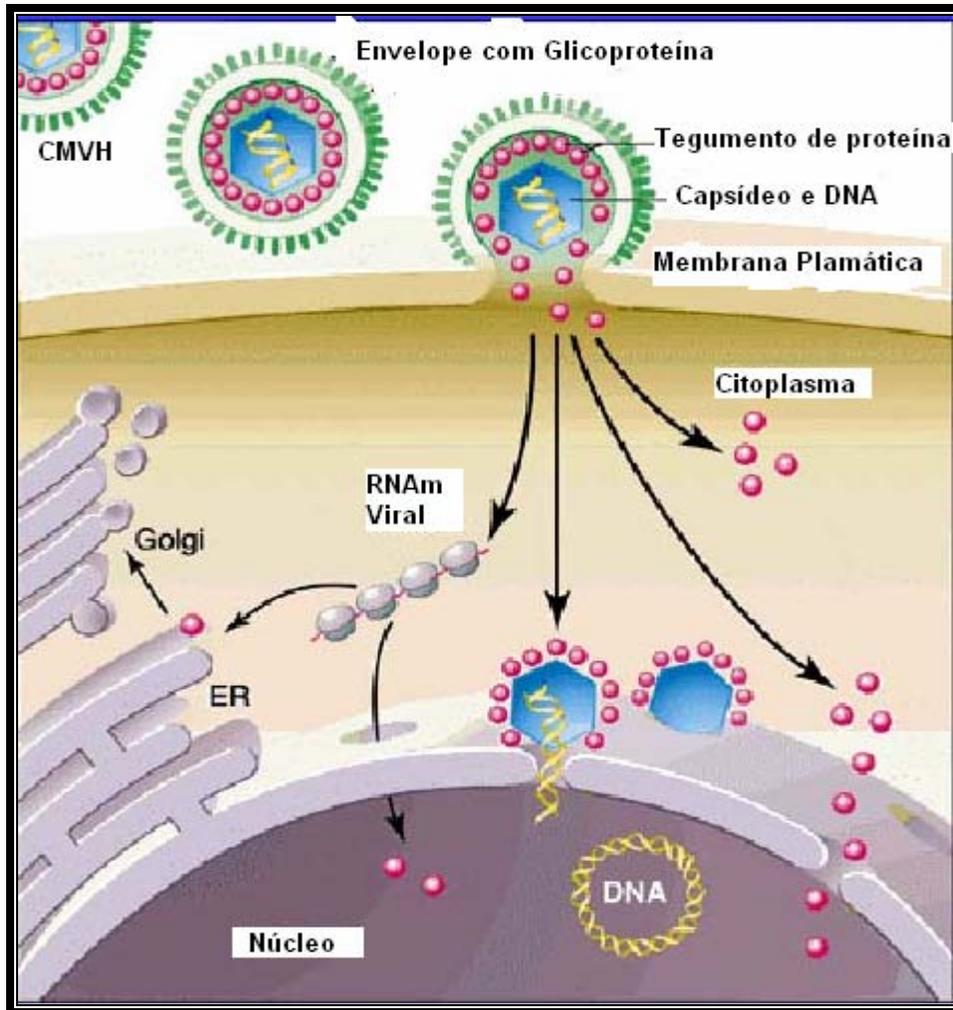
### 1.1.2- Patogênese

Em geral a patogênese da doença do HCMV é similar para as doenças causadas por outros herpesvírus. O vírus estabelece uma infecção latente no hospedeiro podendo ser reativado por imunossupressão (Murray *et al.*, 1998).

A replicação do HCMV em células do ducto epitelial promove a excreção do vírus em muitos fluídos corporais. A replicação do HCMV é altamente associada à célula e é transmitida por células infectadas, incluindo linfócitos e leucócitos (Murray *et al.*, 1998).

O ciclo de replicação do HCMV é lento em cultura celular e no hospedeiro, persistindo latente por muitos anos. Recentemente, Bresnahan e Shenk, relataram que as partículas de HCMV não contêm só DNA, mas também quatro tipos de RNA mensageiro (RNAm). Os quatro RNAm estão provavelmente localizados no tegumento viral que é uma capa de proteína entre o capsídeo e o envelope (Roizman, 2000).

Ao penetrar na célula de um hospedeiro, o capsídeo viral é transportado ao poro nuclear onde sua carga de DNA é lançada ao núcleo (*Figura 2*).



**Figura 2-** Mecanismo de infecção do HCMV nas células do hospedeiro (Roizman B. Enhanced: redefining virology. *Science* 2000, 288 (5457): 2327).

Após a fusão do envelope viral com a membrana citoplasmática, o capsídeo com algumas proteínas associadas ao tegumento, é transportado para o poro nuclear onde o DNA viral é lançado no núcleo e forma um círculo. Outras proteínas do tegumento permanecem no citoplasma ou são transportadas independentemente ao núcleo. O RNAm viral é transportado para a célula hospedeira com o capsídeo e é traduzido no citoplasma. Pelo menos uma das proteínas codificadas pelo RNAm viral está associada com a cadeia retículo endoplasmático - Complexo de Golgi (Roizman, 2000).

O material genômico do HCMV pode ser encontrado em monócitos / macrófagos, neutrófilos, linfócitos e células endoteliais (Sia; Patel, 2000).

### 1.1.3- Epidemiologia

A infecção pelo HCMV é freqüente na maioria da população, infectando 0,5 a 1% de todos os recém-nascidos e cerca de 50% da população adulta de países desenvolvidos. A prevalência de anticorpos em adultos é cerca de 40 a 100%, e tem relação com seu nível sócio-econômico (Ho, 1991; van der Merr *et al.*, 1996). É de menor prevalência em países europeus, Austrália e América do Norte (40 a 60% dos indivíduos são infectados), enquanto em populações de nível sócio-econômico mais baixo, a prevalência é significativamente maior, variando entre 80 a 100% (Ho, 1991; Sia; Patel, 2000).

A infecção por HCMV pode ocorrer durante todo o ano, e não se observa nenhuma variação sazonal nas taxas de infecção (Ho, 1991).

Aproximadamente 50% dos pacientes transplantados excretam HCMV em secreções do corpo (como por exemplo; saliva e urina) em alguns estágios após o transplante de órgão, isto usualmente se inicia no primeiro mês seguido do transplante. Altos níveis de carga viral durante o segundo e terceiro mês pós-transplante podem estar associados com doença por HCMV.

No Brasil, os dados epidemiológicos de infecção por HCMV disponíveis são restritos a algumas áreas, mas estudos usando soros coletados de pessoas saudáveis de diferentes grupos de idade em São Paulo e testados para anticorpos anti-HCMV mostraram que em crianças de 0 a 4 anos de idade a soroprevalência era de 60%, com um lento aumento após os 15 anos de idade e 80% de positividade no grupo de idade entre 51 a 60 anos (Almeida *et al.*, 2001).

Dados de soroprevalência da infecção pelo HCMV a partir de trabalhos realizados em nosso laboratório demonstram valores de aproximadamente 93% nos pacientes de TCPH (Bonon *et al.*, 2005).

#### 1.1.4- Transmissão

Os seres humanos são os únicos hospedeiros conhecidos do HCMV. A transmissão exige contato entre pessoas. O vírus pode ser eliminado através da urina, sêmen, saliva, leite materno e secreções cervicais, sendo transportado nos leucócitos circulantes. Pode também ser propagado por via transplacentária, através de transfusões de sangue, transplante de órgãos e contato sexual (Ho, 1991; Zaia *et al.*, 1999).

O HCMV é o mais importante patógeno entre os receptores de transplantes, sendo que a infecção é evidenciada em 2/3 dos casos, embora a doença clínica seja encontrada com menor frequência (Camargo *et al.*, 1996).

Existem três padrões de infecção por HCMV em receptores de órgãos transplantados: infecção primária, reativação de infecção latente e reinfeção (Ljungman *et al.*, 2002).

A infecção primária é definida como a detecção de infecção por HCMV no indivíduo, anteriormente HCMV soronegativo. Após a infecção primária, o HCMV permanece em uma condição de infecção latente, mas ocasionalmente pode-se reativar e os vírions infecciosos aparecem no sangue, na saliva e/ou na urina. Essas reativações temporárias são assintomáticas, mas permitem ao vírus que ele se espalhe horizontalmente e ainda verticalmente se a reativação ocorrer durante a gestação (Drago *et al.*, 2000; Ljungman, 2002; Griffiths, 2000; Paya *et al.*, 2002).

A reativação é induzida pelo vírus latente endógeno e é desencadeada pela imunossupressão (Drago *et al.*, 2000; Ljungman, 2002; Griffiths, 2000; Paya *et al.*, 2002).

A reinfecção é definida como a detecção de linhagens de HCMV diferentes das linhagens que causaram a infecção original. Portanto, a reinfecção é devida a um vírus novo com um diferente tipo antigênico (Ljungman,2002; Griffiths,2000; Paya *et al.*, 2002).

#### 1.1.5- Manifestações clínicas

A infecção por HCMV ocorre na maioria dos humanos, principalmente durante a primeira e segunda décadas de vida e persiste no organismo em estado de latência; podendo se reativar em períodos de imunossupressão, como ocorre nos transplantados (van der Merr *et al.*, 1996; Costa, 1999; Razonable, 2002; Paya *et al.*; 2002).

Do ponto de vista clínico, em pacientes transplantados, as manifestações clínicas são bem variáveis, pois dependem do tipo de transplante, da o status sorológico do doador e do receptor, da presença ou não de reações devido à incompatibilidade dos antígenos de histocompatibilidade e do regime de imunossupressão utilizada. Nestes pacientes a doença pode se apresentar com sinais de síndrome de mononucleose. O achado principal é febre de duração variável. Em ordem de frequência podem ser observados: hepatomegalia, esplenomegalia, mialgia e/ou artralgia, elevações de enzimas hepáticas e linfocitose. Linfócitos atípicos são menos evidentes nesses pacientes e, particularmente, devido à imunossupressão, leucopenia ocorre mais frequentemente que leucocitose, juntamente com anemia e trombocitopenia. Após a síndrome da mononucleose, a pneumonia pelo HCMV é a mais freqüente manifestação em pacientes imunossuprimidos, principalmente em transplantados de medula. A infecção concomitante por fungos, bactérias gram-negativas e/ou *Pneumocystis carinii* é comum. O trato gastrointestinal vem sendo cada vez mais atingido pelo HCMV, principalmente nos pacientes com AIDS. O cólon é o local mais frequentemente acometido, seguido pelo esôfago, reto e intestino delgado. As manifestações clínicas no trato gastrointestinal dependem do nível e grau de acometimento do órgão, bem como da ocorrência ou não de infecções concomitantes ou tumores (Costa, 1999).

### 1.1.6- Diagnóstico do HCMV

#### 1.1.6.1- Detecção do antígeno pp65 DO HCMV em sangue periférico (antigenemia)

O método da antigenemia tem sido considerado um grande avanço no diagnóstico da infecção ativa pelo HCMV em transplantes de órgãos. A presença de antígenos em leucócitos do sangue periférico proporciona um marcador precoce de infecção ativa pelo HCMV e é um teste rápido (van der Berg *et al.*, 1991). Esse método depende do uso de anticorpos monoclonais que detectam o antígeno viral *pp65*, uma proteína estrutural expressa nos leucócitos do sangue durante a fase precoce do ciclo de replicação do HCMV (Yen-Lieberman, 2000)

Este teste é limitado à detecção de antígenos virais nos leucócitos. O resultado não é somente qualitativo, mas é também quantitativo, correlacionando a viremia com a gravidade da doença clínica (The *et al.*, 1992; Niubó *et al.*, 1996; Lo *et al.*, 1997).

O teste de antigenemia consiste em um número de fases incluindo o isolamento dos leucócitos do sangue periférico pela sedimentação com dextran, lise direta de leucócitos, preparação de lâminas microscópicas, imunocoloração com o uso de anticorpos monoclonais (C10 e C11) contra o HCMV, avaliação microscópica e contagem quantitativa (The *et al.*, 1990; Ho, 1991; Erice *et al.*, 1995; The *et al.*, 1995). As lâminas citocentrifugadas contêm um dado número de células que são preparadas por centrifugação com um sobrenadante rico em leucócitos. A fixação das lâminas é feita ou com acetona ou paraformaldeído; resultados superiores foram obtidos com a fixação com paraformaldeído (Gerna *et al.*, 1992; The *et al.*, 1992; Boeckh *et al.*, 1994).

A imunodeteção do antígeno do HCMV é possível através dos métodos de imunoperoxidase ou imunofluorescência indireta (The *et al.*, 1995).

Em 1988, Van der Bij *et al.*, acreditava que diagnósticos rápidos de infecção ativa pelo HCMV eram de grande importância para evitar o excesso de tratamento com drogas imunossupressoras (em receptores de transplantes) e guiar a terapia antiviral. A demonstração do HCMV em amostras de sangue é particularmente importante porque a

viremia pelo HCMV é considerada um marcador de infecção ativa e tem demonstrado boa correlação com doença grave. A detecção do antígeno de HCMV em leucócitos do sangue periférico (antigenemia) tem sido demonstrada como uma técnica rápida (5 horas) e sensível na detecção de HCMV (van der Bij *et al.*, 1988; The *et al.*, 1990).

O teste de antigenemia é um método sensível para a estimativa da carga viral sistêmica do HCMV. O método é uma boa escolha para laboratórios com baixo a médio volume de testes, sendo considerado o mais adequado para guiar a início da terapia precoce e para a monitorização da eficácia do tratamento com ganciclovir (Gondo *et al.*, 1994). A desvantagem é que a amostra deve ser processada em curto espaço de tempo, sendo recomendável até 8 horas após a coleta para não haver a diminuição da sensibilidade e em pacientes com grave neutropenia o exame não pode ser realizado devido à baixa contagem de granulócitos. Alternativamente, a PCR para HCMV no plasma ou soro poderá ser realizada nessa situação (Solano *et al.*, 2001; Boeckh & Boivin, 1998; Boeckh *et al.*, 1992).

#### 1.1.6.2- “NESTED-PCR” (PCR dupla)

Uma das técnicas utilizadas para diagnóstico precoce da infecção ativa pelo HCMV é a PCR que é um método recentemente introduzido em biologia molecular que, permite a produção de grande quantidade de fragmentos específicos de DNA a partir de substratos complexos e em concentrações diminutas (Saiki *et al.*, 1985). Devido a sua elevada sensibilidade, a PCR permite a detecção de quantidades reduzidas de partículas virais, facilitando assim o diagnóstico de indivíduos doentes, mas com pequeno número de células infectadas, o que, com métodos classicamente empregados, seria de difícil concretização (Costa, 1999).

A “Nested-PCR” apresenta um aumento da especificidade e sensibilidade para o diagnóstico do HCMV. Assim, o fundamento dessa técnica é a realização de duas reações de amplificação. A primeira é feita de forma habitual da PCR. No entanto, uma segunda reação é realizada, utilizando-se como amostra a ser amplificada o produto da PCR da primeira reação e um novo par de *primers* localizados mais internamente àqueles utilizados na primeira reação, resultando num produto interno da PCR de menor tamanho. Dessa forma, a especificidade da reação obtida é maior (The *et al.*, 1993; Abecassis *et al.*, 1997).

A introdução de testes rápidos laboratoriais tem permitido a detecção da replicação viral e auxiliado no diagnóstico, sendo determinada a infecção ativa por HCMV antes do início da doença. Isso proporciona a oportunidade de iniciar o tratamento antiviral precocemente (Sia; Patel, 2000).

#### 1.1.7- Tratamento: antivirais

Nas últimas décadas, um progresso considerável vem sendo realizado no uso da quimioterapia antiviral para prevenir e tratar a doença por HCMV principalmente em pacientes transplantados. O tratamento preconizado, utilizado para estes pacientes é a introdução do medicamento Ganciclovir (Gcv), este é comumente conhecido como dihidroxipropoximetil guanina (DHPG) com sua fórmula molecular de  $C_9H_{13}N_5O_4$  e o peso molecular de 255,23 g/l. O mecanismo de ação do Gcv foi definido por estudos *in vitro* em células humanas infectadas pelo HCMV, e essa capacidade consiste em inibir a replicação viral decorrente de sua inibição seletiva na síntese do DNA viral pela forma trifosforilada da droga. As DNA polimerases das células do hospedeiro são consideravelmente menos sensíveis do que a polimerase viral em relação aos efeitos do Gcv trifosfato. (Sia; Patel, 2000).

O Gcv demonstrou ser efetivo na prevenção do desenvolvimento de doença pelo HCMV pelos pacientes assintomáticos com infecção ativa pelo HCMV que receberam TCPH alogênico, aumentando a taxa de sobrevivência destes pacientes (Ho, 1991).

### 1.2- Propriedades gerais do poliomavírus humano (tipo BKV)

#### 1.2.1- Características biológicas

O BKV foi isolado pela primeira vez por Gardner *et al.* (1971), da urina de um paciente transplantado renal, do sexo masculino que também apresentava disfunção do enxerto e características de estenose ureteral quatro meses após o transplante (Azzi *et al.*, 1999; Fioriti *et al.*, 2005).

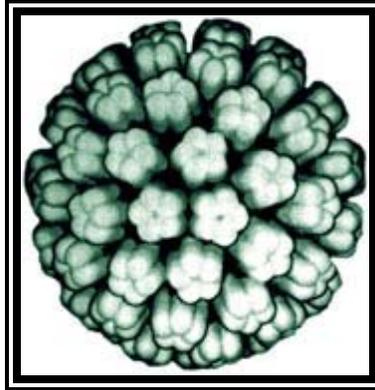
O JCV, também foi descoberto em 1971 no cérebro de um paciente americano que apresentava a doença de Hodgkin e leucoencefalopatia multifocal progressiva (LMP). O terceiro membro desta família o poliomavírus SV40 está associado com uma síndrome clínica de tumores como o linfoma não-Hodgkin. O BKV e o JCV são semelhantes, com 70% de homologia no nível de seqüência de nucleotídeos, mas são antígenicamente diferentes (Randhawa *et al.*, 2002; Fioriti *et al.*, 2005).

O BKV é ubíquo na população humana exceto em algumas populações segregadas que vivem em regiões isoladas do Brasil, Paraguai e Malásia. (Knowles *et al.*, 2003).

Em pacientes imunocomprometidos a infecção viral pelo BKV vem sendo associada com doenças do trato urinário: estenose uretral em pacientes transplantados renais e CH em pacientes submetidos à TCPH (Arthur *et al.*, 1986).

O papel do BKV na CH em pacientes com TCPH foi primeiramente sugerido por Arthur (1986) e subsequentemente confirmado por outros pesquisadores que de fato demonstraram que todos os pacientes com CH tardia eliminavam o BKV na urina antes e durante o episódio de CH e algumas vezes após o restabelecimento do paciente (Azzi *et al.*, 1994).

O BKV pertence ao gênero *Poliomavirus* da família *Poliomaviridae*, que é definido por uma morfologia típica: vírion não envelopado com capsídeo icosaédrico de 40-nm de diâmetro (*Figura 3*), que envolve um DNA circular de dupla fita com genoma de 5 Kb (Shah *et al.*, 1996; Hilleman, 1998).



**Figura 3-** Poliomavírus Humano (MAS, SB. Detecção e caracterização do Poliomavírus presentes na população a partir de amostras ambientais [Tese-Doutorado]. Universidade de Barcelona – Faculdade de Biologia – Departamento de Microbiologia; 2003.)

O BKV possui duas espécies que provocam doenças em seres humanos o BKV vírus (patógeno de nosso interesse) e o JCV que acomete pacientes com vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Kang *et al.*, 2003).

O capsídeo viral do BKV contém três proteínas Vp1, Vp2 e Vp3, sendo que a Vp 1 constitui 70 % da massa molecular viral (360 cópias) com peso molecular de 44 KDa. O capsídeo contém também de 30 a 60 cópias de Vp2 e Vp3, que dão forma a 72 capsômeros pentaméricos. A arquitetura do genoma (*Figura 4*) é conservada e dividida funcionalmente em três regiões, que codificam proteínas de expressão:

- a. Precoce: É expressa precocemente na infecção do vírus, isto é, antes da replicação do genoma. A expressão de genes precoces continua durante o estágio tardio da infecção. Codifica as proteínas não estruturais.
- b. Tardia: É detectado mais tardiamente na expressão do vírus, isto é, durante e após a replicação do genoma. Codifica as proteínas estruturais.

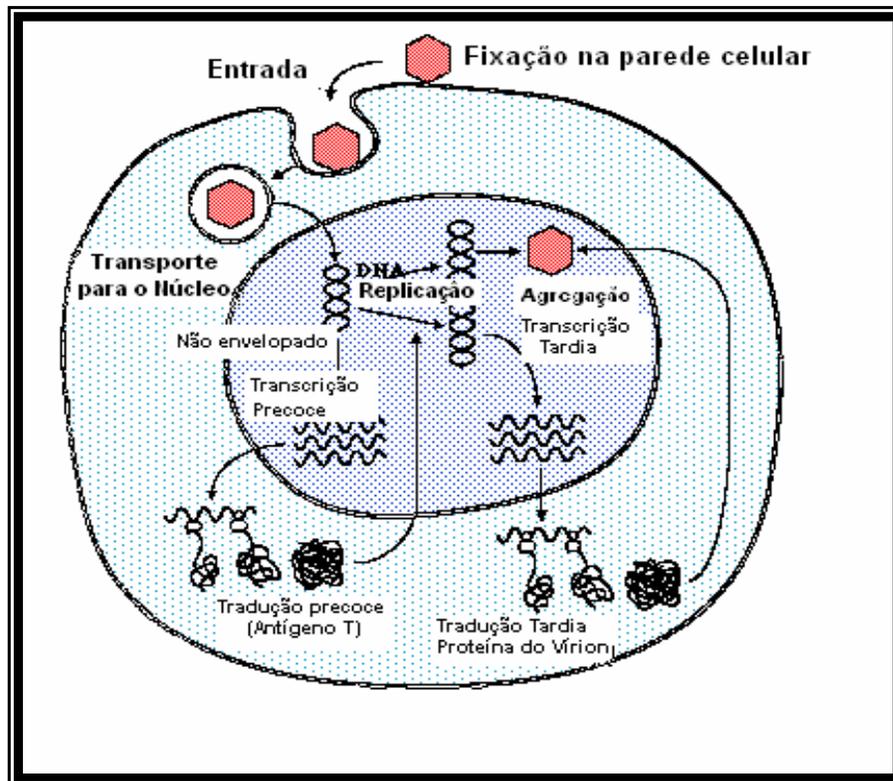


### 1.2.2- Patogênese

O BKV causa doenças no trato geniturinário em associação com malignidades hematológicas, imunodeficiência congênita e adquirida e síndrome de Wiskott-Aldrich (Kwak *et al.*, 2002).

Randhawa *et al.* (1999) demonstrou em um estudo que a infecção pelo BKV ocasionou falência do enxerto de TMO em 36% dos pacientes afetados. O aumento da imunossupressão tem um papel importante na reativação do poliovírus, e estudos indicam que a diminuição da imunossupressão está associada com uma diminuição da carga viral do BKV e com uma redução de inflamação no enxerto. Não há uma terapia antiviral específica para o poliovírus, porém atualmente, é utilizada como apoio a redução das doses de agentes imunossupressivos (Kwak *et al.*, 2002).

O grupo de risco mais comumente afetado pelo BKV são os pacientes transplantados incluindo os transplantados renais e de medula óssea. Um estudo prospectivo com pacientes transplantados mostrou que aproximadamente 45% destes pacientes tiveram evidências sorológicas para reativação do BKV, mas somente 2,5 a 5% dos pacientes desenvolveram doenças sintomáticas e nefrite tubular intersticial (Randhawa, 2001).



**Figura 5-** Mecanismo de infecção do BKV nas células do hospedeiro (Hilleman MR. Descoberta do símio vírus (SV40) e sua relação com a vacina para Poliomelite. Dev Biol Stand 1998; 94:186).

A proteína VP1 externa do capsídeo do vírus, é responsável pela fixação do mesmo na célula do hospedeiro, as outras proteínas VP2 e VP3 acredita-se serem responsáveis pela interação com a membrana celular para facilitar a entrada do vírus, através do processo de endocitose (Hilleman, 1998).

Dentro do núcleo o vírus é transcrito na célula do hospedeiro pela RNA polimerase, pois a simplicidade do genoma do BKV o torna altamente dependente da célula do hospedeiro para realização da transcrição e replicação do genoma. O genoma contém sinais regulatórios que controlam a replicação dirigindo assim a transcrição (*Figura 5*) (Hilleman, 1998).

Depois que a replicação do DNA ocorreu, a transcrição dos genes tardios promovem a síntese de proteínas estruturais (VP1, VP2 e VP3) para garantir a geração infecciosa do vírus (Hilleman, 1998).

### 1.2.3- Epidemiologia

A infecção primária ocorre tipicamente durante a infância, depois da diminuição dos anticorpos maternos. Antes dos 10 anos de idade, a soroprevalência tem aumento de 50% e pode atingir aproximadamente 70% nos adultos (Knowles, 2003).

Esta prevalência pode aumentar durante a gravidez, nos idosos ou por ocasião de imunodeficiência. Em adição, o nível de replicação pode aumentar a carga viral do DNA do BKV de  $<10^5$  para  $>10^7$  cópias/ml na urina. (Hirsch, 2005).

### 1.2.4- Transmissão

A via de transmissão do BKV é caracterizada pela maioria dos pesquisadores tendo como porta de entrada o trato respiratório e alimentos contaminados. Acredita-se que o modo natural de transmissão desse vírus ocorre tanto por via respiratória como também pela rota gastrointestinal. Este vírus pode ser encontrado nas amígdalas podendo causar amigdalite aguda e também na saliva de indivíduos adultos imunossuprimidos e imunocompetentes, tendo como procedência o trato gastrintestinal como via de entrada do poliomavírus. Pode ocorrer também a transmissão do BKV por via transplacentária, onde normalmente ocorre a reativação do vírus durante a gestação (Mas, 2003).

O BKV como o JCV são razoavelmente resistentes e podem ser detectados em fezes humanas. O estado de infecção não replicativo, denominado latência, é estabelecido no epitélio tubular renal e nas células uroepiteliais. A reativação e replicação de baixo nível com virúria assintomática ocorre em 5% dos indivíduos sadios (Hirsch, 2005)

Critérios de definição por infecção pelo BKV, replicação pelo BKV e doença pelo BKV :

- **Infecção pelo BKV:** ocorre nos casos de evidência sorológica e virológica, com exposição do vírus incluindo estado replicativo e não-replicativo.
- **Replicação pelo BKV:** ocorre nos casos com evidência de multiplicação do vírus (infecção ativa) obtida pela detecção do vírus, vírions, proteínas estruturais de seu RNAm, ou células livres de DNA em estado de não-latência, por exemplo: plasma, por análise citológica (célula “Decoy”) ou por análise histológica.
- **Doença pelo BKV:** ocorre em casos com evidencia histológica por BKV e confirmação com dados laboratoriais (Hirsch, 2005).

#### 1.2.5- Manifestações clínicas

A infecção primária com BKV em crianças saudáveis é usualmente assintomática. A infecção secundária deve-se à reativação do vírus latente ou reinfeção com uma nova linhagem. Estudos clínicos incluindo pacientes imunossuprimidos e imunocompetentes indicaram que a reativação do BKV em latência é principalmente associada à imunossupressão. (Lin *et al.*, 2001; Tognon *et al.*,2003).

O BKV pode ser transmitido via doadores de órgãos ou também pode ser adquirido na comunidade. Febre moderada, mal-estar, vômito, doenças respiratórias, pericardite, disfunção hepática e cistite hemorrágica em pacientes transplantados de medula óssea também foram relatados (Fioriti *et al.*, 2005).

### 1.2.6- Diagnóstico do poliomavírus humano (tipo BKV)

Os métodos diagnósticos utilizados para a detecção do BKV incluem isolamento em cultura celular, microscopia eletrônica, investigação citológica com microscopia óptica e coloração por imunofluorescência de células esfoliativas urinárias, ensaio imuno-enzimático específico para antígeno, hibridização por sonda de ácidos nucléicos e PCR (Arthur *et al.*, 1989; Boubenider *et al.*, 1999).

Como se pode perceber os métodos de diagnóstico para o BKV são diversos, sendo os mais utilizados recentemente a identificação de células “Decoy” na citologia urinária sendo confirmada pela coloração específica (Papanicolau) e a detecção do vírus em amostras de sangue e/ou urina feita pela PCR e “Nested-PCR (Santos *et al.*, 2004).

#### 1.2.6.1- Citologia urinária

O termo célula “Decoy” foi utilizado inicialmente para descrever as células com inclusão viral. Nestas células pode-se observar um núcleo aumentado com inclusão basofílica “gelatinosa”, substituindo a cromatina nuclear ou deslocando-a para a periferia. Um halo claro pode raramente aparecer ao redor da inclusão viral, requerendo então, a diferenciação com inclusão de HCMV. Esta distinção é geralmente fácil porque células infectadas pelo BKV têm um aumento da proporção nuclear citoplasmática e carência de inclusão citoplasmática (Itoh *et al.*, 1998; Drachenberg *et al.*, 2005).

#### 1.2.6.2- amplificação do gene pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e “NESTED-PCR”

Este é o método mais sensível e específico para o diagnóstico do BKV na urina e sangue. (Holman *et al.*, 2003). A amplificação gênica pela PCR permite a produção de grandes quantidades de fragmentos específicos de DNA a partir de substratos complexos e em concentrações diminutas. Basicamente, este procedimento permite a amplificação de um fragmento de DNA escolhido, cuja concentração final excede em milhares de vezes a do restante do DNA presente na amostra amplificada, o que gera maior especificidade e sensibilidade (Costa, 1992; Leung *et al.*, 2001)

### 1.2.7- Tratamento: antivirais

Não há uma terapia antiviral específica para poliomavírus. Atualmente, o tratamento é um amplo suporte clínico que envolve a redução da dose dos agentes imunossupressivos. Uma variedade de agentes antivirais vem sendo estudada *in vitro* contra os poliomavírus. Estes incluem o Cidofovir, ácido retinóico, inibidores da topoisomerase e 5'-bromo 2'-dioxiuridina. A droga mais promissora é o Cidofovir, que é um análogo acíclico de nucleosídeo fosfonato, que é conhecido por ter atividade *in vitro* contra os três poliomavírus que são capazes de infectar os humanos (JCV, BKV e SV40). Há poucos casos reportados de pacientes de TCPH com CH em que o Cidofovir foi utilizado. (Kwak *et al.*, 2002; Drachenberg *et al.*, 2005).





## ***2- OBJETIVOS***



- 1) Detectar a infecção ativa pelo Citomegalovírus Humano em amostras de sangue de pacientes após transplante de células progenitoras hematopoéticas utilizando antigenemia e “Nested-PCR”;
- 2) Detectar a infecção ativa causada pelo Poliomavírus (BKV) em amostras de sangue e urina de pacientes após transplante de células progenitoras hematopoéticas utilizando citologia urinária e “Nested-PCR”;
- 3) Estudar a possibilidade da replicação ativa do HCMV e/ou do poliomavírus serem possíveis fatores de risco para a cistite hemorrágica, avaliando o impacto clínico destas viroses nos pacientes transplantados de células progenitoras hematopoéticas.





### ***3- CASUÍSTICA E MÉTODOS***



### 3.1- Casuística

#### 3.1.1- Pacientes

Foram estudados prospectivamente 41 pacientes receptores de TCPH em seguimento no Hospital das Clínicas da UNICAMP (HC/UNICAMP), em relação à infecção e doença causadas pelo Citomegalovírus e Poliomavírus. Foram coletadas amostras de sangue em tubos com ácido etileno diaminotetracético (EDTA) para a Antigenemia (AGM) e PCR e urina em coletores estéreis.

Neste trabalho foram realizados 2 tipos de métodos para a detecção do Citomegalovírus:

- 1) Reação em cadeia da polimerase tipo Nested-PCR para detecção de partículas virais no sangue;
- 2) Antigenemia, para detecção e quantificação de antígenos do HCMV no sangue periférico.

E também, foram realizados 2 tipos de métodos para detecção do Poliomavírus (tipo BKV):

- 1) Citologia urinária com coloração de papanicolau para observar células com inclusão viral;
- 2) Reação em cadeia da polimerase tipo “Nested-PCR” para detecção do Poliomavírus (tipo BKV), em amostras de sangue e urina.
- 3) Os graus de hematúria foram verificados através das tiras reativas urinárias. Hematúria microscópica foi considerada como (+) grau leve, hematúria macroscópica foi considerada como (++) grau moderado e (+++) grau grave.

### 3.1.2- Critérios para inclusão dos pacientes

1. Pacientes submetidos à TCPH alogênico;
2. Consentimento do paciente para coleta de amostras de sangue e urina para análise;
3. Sobrevida ao transplante e acompanhamento do receptor por pelo menos um mês após o mesmo.

### 3.1.3- Critérios para exclusão dos pacientes

1. Foram excluídos os pacientes que evoluíram para óbito no ato do transplante ou que não sobreviveram ao primeiro mês pós-transplante;
2. Os pacientes que tiveram descontinuidade do seguimento no Hospital das Clínicas da FCM/UNICAMP, ou número insuficiente de amostras para análises;
3. Pacientes pediátricos

### 3.1.4- Aspectos éticos da pesquisa

O projeto foi aprovado e acompanhado pelo Comitê de Ética e o material somente foi coletado com consentimento do paciente ou do responsável, através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) pós-informação, de como seria realizado o trabalho (ANEXO 1).

### 3.1.5- Correlação clínica

Para a realização do processamento dos dados foram realizadas revisões dos prontuários médicos para coletar informações sobre: doença de base, tipo de doador, tipo de enxerto, condicionamento, imunossupressão inicial, doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH), doença oclusiva venocular (DOV), mucosite, infecções oportunistas, profilaxia de infecções virais, que fazem parte da rotina de acompanhamento ambulatorial dos pacientes transplantados de medula óssea, manifestações clínicas supostamente atribuíveis a doença pelo HCMV e manifestações clínicas de CH.

### 3.1.6- Protocolo de acompanhamento para realização das coletas

Para o acompanhamento dos pacientes transplantados de medula óssea foram realizados os seguintes procedimentos, para investigação de infecção do HCMV e BKV:

- No dia do transplante foram coletadas amostras de sangue total e de urina do receptor;
- Coletas semanais subsequentes foram realizadas no receptor a partir do dia 0 (zero) até o dia + 150 ou até o óbito;
- As amostras foram coletadas durante o período de internação na enfermaria de transplantes de medula óssea (TMO) do HC/UNICAMP e durante os retornos dos pacientes ao ambulatório de Transfusão e Quimioterapia do Hemocentro/UNICAMP, pela equipe de enfermagem;
- Amostras foram enviadas imediatamente após a coleta ao laboratório de diagnóstico de doenças infecciosas por técnicas de biologia molecular e antígenoemia FCM/UNICAMP, onde, foram realizados os teste de antígenoemia e “Nested-PCR” para HCMV e Citologia urinária e “Neste-PCR” para o BKV.

### 3.1.7- Critérios utilizados para definição de Infecção ativa pelo HCMV

A presença de pelo menos um dos itens abaixo foi considerada indicativa de infecção ativa por HCMV:

- **“Nested PCR”** - duas ou mais reações positivas, consecutivas (Einsele *et al*, 1995);
- **Antigenemia** - uma ou mais células antígeno-positivas para HCMV, detectadas nos leucócitos polimorfonucleares (Boeckh *et al*, 1999).

### 3.1.8- Critérios utilizados para definição de Infecção ativa pelo BKV

Consideramos infecção ativa por BKV a presença de 2 ou mais testes positivos de Nested-PCR na urina e/ou no sangue, consecutivos. (Leung, 2001).

### 3.1.9- Critérios utilizados para definição de doença pelo HCMV

Para caracterização de doença por HCMV, além das evidências laboratoriais de infecção ativa citadas acima, fez-se necessária a presença de manifestações clínicas compatíveis com aquelas sabidamente causadas pelo HCMV (Ljungman & Plotkin, 1995; Ljungman *et al*, 2002):

- **Pneumonia (HCMV-IP)** - a presença de sinais e/ou sintomas de doença pulmonar combinado com a detecção do HCMV em lavado brônquio-alveolar ou biópsia de pulmão. A detecção deverá ser realizada por cultura celular, testes histopatológicos, análise imunohistoquímica ou hibridização *in situ*.
- **Doença Gastrointestinal (HCMV-TGI)** - sintomas gastrointestinais (colite, gastrite ou esofagite) associados com histologia ou imunohistoquímica positiva para HCMV de biópsias de lesões macroscópicas do tracto gastrointestinal;
- **Hepatite** - O vírus deverá ser demonstrado em biópsias hepáticas (por cultura, imunohistoquímica, hibridização “*in situ*” ou PCR) em combinação com:
  - Aumento de pelo menos duas vezes o valor máximo normal de alanina-amino-transferase (ALT);
  - Achados histopatológicos consistentes com hepatite ou colangite;
- **Doenças Neurológicas** - Sintomas como encefalite, mielite transversa ou outros sinais de doença difusa do sistema nervoso central juntamente com a detecção de HCMV em fluido cerebrospinal por PCR, por cultura ou detecção do antígeno;

- **Retinite** - lesões oftalmológicas típicas, com ou sem provas virológicas, diagnosticadas pelo exame de fundo de olho, realizado pelo oftalmologista, com presença de retinite necrotizante com infiltrado branco algodoso, áreas de hemorragia e irite e vitrite mínima (Panutti *et al*, 1996).

3.1.10- Critérios utilizados para definição de recorrência de infecção ativa pelo HCMV

- Recorrência da infecção ativa pelo HCMV foi definida como infecção ocorrendo após a negatificação dos testes de AGM e/ou PCR após o tratamento do episódio inicial da infecção.

3.1.11- Critérios utilizados para definição de infecção ativa e/ou doença tardia pelo HCMV

- Infecção ativa e doença pelo HCMV tardia foram definidas como aquelas que ocorreram mais de 100 dias após o transplante.

3.1.12- Protocolo de administração do ganciclovir nos receptores em caso de infecção ativa e/ou doença pelo HCMV

Ganciclovir endovenoso foi administrado nos pacientes com infecção ativa pelo HCMV (duas ou mais PCRs positivas consecutivas e/ou uma ou mais células antígeno positivas por AGM), conforme tabela abaixo:

<b>Esquema</b>	<b>Dose</b>
<b>Tratamento da Infecção Ativa</b>	10 mg/kg/dia, por 7 dias + manutenção
Manutenção	5 mg/kg/dia, 3 vezes por semana até 12 doses
<b>Tratamento da doença</b>	10 mg/Kg/dia, por 21 dias + manutenção
Manutenção	5 mg/Kg/dia, 3 vezes por semana até 12 doses

### 3.1.13- Protocolo de condicionamento para preparo do transplante

#### **Leucemia Mielóide Crônica (LMC), Leucemia Mielóide Aguda (LMA), e Síndrome Mielodisplásica (SMD):**

**Bussulfano:** 4 mg/Kg/dia, VO ao dia -7 ao dias - 4. Dose total de 16 mg /Kg.

**Ciclofosfamida:** 60 mg/Kg/dia, EV, dia -3 e -2, dose total de 120 mg/Kg/dia.

#### **Leucemia Linfóide Aguda (LLA):**

**Bussulfano:** 4 mg/Kg/dia, VO ao dia -7 ao dias - 4. Dose total de 16 mg /Kg.

**Ciclofosfamida:** 60 mg/Kg/dia, EV, dia -3 e -2, dose total de 120 mg/Kg/dia.

**Etoposide:** 40 mg/Kg/dia, EV, dia - 2 ou,

**Bussulfano + Ciclofosfamida com Irradiação Corporal Total (ICT),** de dose total de 13,2 Gy hiperfracionado.

**Anemia Aplástica (AA):**

**Bussulfano:** 4 mg/Kg/dia, VO ao dia – 6.

**Ciclofosfamida:** 50 mg/Kg/dia, EV, dia -5 e -2, dose total de 200 mg/Kg/dia.

3.1.14- Protocolo de profilaxia da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH)

**Ciclosporina:** 3 mg/Kg/dia, EV, iniciado no dia - 1.

**Metotrexato:** 15 mg/m<sup>2</sup>, dia +1 e 10 mg/m<sup>2</sup>, dias +3, +6, +11.

3.1.15- Protocolo de condicionamento para preparo de transplante mini-alogênico ou não-mieloablativo aparentado

**Fludarabina:** 30 mg/m<sup>2</sup>/dia, iniciado no dia -4 a - 2.

**Dia -1:** Baixa dose de ICT (200 cGY)

**Dia 0:** Transplante de CPP

**Dia – 1 ao + 56:** imunossupressão com Ciclosporina (CSA) + Micofenolatomicotil (MMF)

**Dia + 28 e + 56:** avaliar o quimerismo com VNTR ou marcador de sexo. Se houver quimerismo misto (células CD<sub>3+</sub> do doador ≤ 95 % das células CD<sub>3+</sub>) no dia + 56 infundir linfócitos do doador + 65.

3.1.16. Protocolo de profilaxia da doença do enxerto contra o hospedeiro em transplante mini-alogênico ou não- mieloablativo aparentado

**Ciclosporina:** 3 mg/Kg/dia, EV, iniciado no dia - 1.

**Micofenolatomicotil:** 30 mg/m<sup>2</sup>, dia + 0 ao +27.

### 3.2- Métodos

3.2.1- Métodos para detecção do citomegalovírus

3.2.1.1- Antigenemia

O teste de antigenemia foi realizado através do método descrito por Van der Bij *et al.*, 1988; Van der Bij *et al.*, 1989; Jiwa *et al.*, 1989 e Boeckh *et al.*, 1992, com algumas modificações:

A- Extração de polimorfonucleares: as amostras de sangue foram enviadas ao laboratório no máximo até 6 horas após a coleta; e coletadas de 5 a 10 ml de sangue em tubo com EDTA.

Após a recepção do sangue, este material foi transferido para tubo de plástico de 15 ml (Tipo Falcon), e adicionado 2 ml de solução Dextran 5% diluído em PBS, pH 7.4 (sangue/dextran na proporção 4:1), para cada 4 ml de sangue foi adicionado 1 ml de Dextran 5%, homogeneizado por inversão e colocado em estante inclinada para tubos em ângulo de 45° por 10 minutos em estufa à temperatura de 37° C.

A seguir, o sobrenadante foi transferido com pipeta Pasteur para outro tubo de plástico de 15 ml e centrifugado por 5 minutos a 2000 rpm, o sobrenadante foi desprezado e o pellet agitado no vórtex vigorosamente.

Para remover as células vermelhas persistentes, o pellet foi ressuscitado com 10 ml da solução de Tampão Lise, pH 7.4, homogeneizado e mantido em temperatura de 4° C por 10 minutos; a seguir, foi centrifugado à 2000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet lavado por 2 a 3 vezes com PBS e centrifugado 5 minutos à 2000 rpm. O sedimento celular foi ressuscitado em 200 a 1000 µl de PBS (dependendo da quantidade de pellet).

B- Preparação das lâminas: foi preparada uma suspensão com 1,5 a 2 x 10<sup>6</sup> células/ml, colocado 100 µl desta solução por “cup” da citocentrífuga (Marca Revan – mod. Citociclo) e centrifugada por 5 minutos à 970 rpm (as lâminas foram feitas em duplicatas). A seguir as lâminas foram demarcadas com esmalte em volta do “spot” e fixadas com Paraformaldeído por 15 minutos, lavadas 3 a 4 vezes com PBS e permeabilizadas com Nonidet P- 40 por 5 minutos; após nova lavagem, as lâminas foram secas, embrulhadas em papel manteiga e papel alumínio e estocadas à temperatura de – 80° C, até o momento da revelação.

Após a preparação das lâminas, o precipitado de leucócitos remanescentes foi utilizado para o teste da PCR.

C- Coloração das lâminas: as lâminas foram hidratadas com PBS por 5 minutos e foram secas ao redor do “spot”.

O anticorpo monoclonal a ser utilizado foi o CLONAB HCMV do laboratório IQ Products (Netherlands), contendo uma combinação de anticorpos monoclonais C – 10 e C – 11, que reconhecem o antígeno pp65.

As lâminas foram lavadas com PBS e escurridas. A seguir, foram aplicados 35 µl de monoclonal diluído 1:10 em PBS por área de reação, incubado por 1 hora em câmara úmida à temperatura de 37° C na estufa. A área de reação na lâmina a partir desse ponto, não poderá secar. A seguir, as lâminas foram lavadas 3 vezes, 5 minutos cada, com PBS.

O conjugado a ser utilizado foi o “anti-mouse” marcado com peroxidase do laboratório DAKO. Foi aplicado 35 µl do conjugado “anti-mouse peroxidase” diluído à 1:40 em PBS na área da reação. A seguir, as lâminas foram incubadas por 1 hora, à temperatura de 37° C em câmara úmida e foram lavadas por 3 vezes com PBS, 5 minutos cada lavagem.

As lâminas foram cobertas com solução de AEC (amino-etil-carbazol- Sigma), recém preparada (20 mg de AEC dissolvida em 5 ml de dimetilformamida – Sigma e 100 ml de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4.9). Filtrado, se necessário, e adicionado 1 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% - mantido no escuro, por 10 minutos, à temperatura ambiente. A seguir, foram lavadas por 10 minutos, com tampão acetato de sódio a 0.1 M, pH 4.9. Finalmente foram lavadas 3 vezes com água destilada, 1 minuto, 2 minutos e 5 minutos.

As lâminas foram coradas com hematoxilina de Mayer, marca MERCK, (na diluição 1:10), por 20 a 30 segundos, a seguir foram lavadas com água destilada até eliminar todo o corante e montadas com glicerina tamponada,

D- Leitura das lâminas: foi utilizado um microscópio óptico, marca NIKON e foram observadas:

Células positivas: Núcleo marrom, coloração total ou perinuclear em polimorfonuclear e ocasionalmente em monócitos.

Células negativas: Núcleo azul.

### 3.2.1.2- “NESTED-PCR” para detecção do DNA do HCMV

#### A- Extração rápida de dna com NaOH / TRIS-HCL

Para a extração rápida foi certificado que o pellet estivesse bem branquinho (sem hemácias), podendo centrifugar o pellet por 5 minutos por 3300 rpm (desprezando cuidadosamente o sobrenadante para que pellet não caísse). Foi adicionada a solução de NaOH a 50mM (2g/l), a cada tubo. Ressuspensando as células com o vórtex em alta velocidade. O volume da solução depende do tamanho do pellet. Como descrito a seguir:

- PELLET GRANDE 500 µl
- PELLET MÉDIO 250 µl
- PELLET PEQUENO 125 µl

Após colocar a solução e passa-lá no vórtex em alta velocidade, esta foi transferida para o eppendorf. Sendo colocada uma fita crepe na tampa para não abrir com a alta temperatura. Após isso foi Incubado por 20 minutos a 100° C em **banho seco** (verificando a temperatura com termômetro). Os tubos foram retirados do banho seco cuidadosamente, passando no spin para concentrar o líquido no fundo do tubo. A tampa foi retirada com gaze para evitar contaminação. E adicionada a solução de Tris HCL com pH 7,5 (121,1g/l) em cada tubo. O volume da solução dependeu do volume de NaOH que foi adicionado. Como descrito a seguir:

- para 500 µl de NaOH, adicionar 100 µl de Tris HCL;
- para 250 µl de NaOH, adicionar 50 µl de Tris HCL;
- para 125 µl de Na OH, adicionar 25 µl de Tris HCL.

Logo após a adição do Tris, o tubo foi passado no vórtex, e centrifugado por 5 minutos para formação de um precipitado de restos celulares. O DNA estava presente no sobrenadante, e transferido o sobrenadante para outro eppendorf estéril e numerado.

**OBS:** O DNA foi permanecido na geladeira até que se emitisse o resultado. Este DNA pode ser armazenado durante 1 ano no freezer.

### 3.2.2- Detecção do gene da beta-globina humana pela reação em cadeia da polimerase

A amplificação de um fragmento do gene da Beta-Globina ( $\beta$ - Globina) humana foi utilizada para checar a qualidade do DNA em todas as amostras testadas. O produto obtido de 110 pares de bases indicou principalmente a presença de DNA nas amostras, que o DNA extraído era boa qualidade e que não continha substâncias inibidoras da reação, garantindo assim, um controle interno de qualidade do experimento, indispensável à segurança dos resultados.

A reação em cadeia da polimerase foi realizada pelo método descrito por Saiki *et al.*, (1988) para PCR simples, com algumas modificações.

Foram complementados 40 ciclos de amplificação para cada amostra e cada ciclo foi constituído de 3 etapas: a) separação das hélices de DNA por aquecimento a 94° C durante 30 segundos; b) ligação complementar entre *primers* e o DNA em temperatura de 55° C por 1 minuto (anelamento) e c) síntese do DNA pela *Taq* DNA polimerase, em temperatura de 72° C por 2 minutos (extensão).

Os ciclos foram realizados automaticamente em equipamento apropriado (“DNA Thermal Cycler” – MJ, EUA). As amostras foram aquecidas inicialmente a 94° C por 3 minutos, para inativação de qualquer atividade de protease que pudesse interferir com a reação enzimática e, após o último ciclo, o período de extensão final (72° C) será de 8 minutos.

Foram utilizados dois iniciadores que flanqueiam uma região constante do gene da  $\beta$ - Globina (*Tabela 1*).

**Tabela 1-** Seqüência de *primers* que flanqueiam uma região conservada do gene da  $\beta$ -Globina utilizados na PCR.

<i>Primers</i>	Seqüência (5'→3')	
PCO3	ACACAACCTGTGTTCACTAGC	“Sense”
PCO4	CAACTTCATCCACGTTTCACG	“Antisense”

**Legenda:** Seqüências de *primers* gentilmente obtida pelo Laboratório de Biologia Molecular da UNESP-Botucatu e extraída de Saiki *et al.* (1988); com algumas modificações.

### 3.2.3- Detecção do gene do citomegalovirus humano (HCMV) pela reação em cadeia da polimerase

A Reação em Cadeia da Polimerase seguiu o método descrito por Saiki *et al.* (1985), com algumas modificações. Cada reação de amplificação utilizará 0,5 a 1  $\mu$ g do DNA (obtido pelo método de extração de DNA anteriormente descrito) em volume total de 20  $\mu$ l, contendo 50 mM de cloreto de potássio, 10 mM de TRIS 9pH 8.4), 2,5 mM de cloreto de magnésio, 0,1 mM de cada *primer*, 200 mM da mistura desoxirribunucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e 2 unidades de *Taq* DNA polimerase.

Foram complementados 30 ciclos de amplificação para cada amostra e cada ciclo foi constituído de 3 etapas: a) separação das hélices de DNA por aquecimento a 94° C durante 1 minuto; b) ligação complementar entre *primers* e o DNA em temperatura de 55° C por 1 minuto (anelamento) e c) síntese do DNA pela *Taq* polimerase, em temperatura de 72° C por 1 minutos (extensão).

Os ciclos foram realizados automaticamente em equipamento apropriado (“DNA Thermal Cycler” – Perkin Elmer Cetus, Norwalk, Conn, EUA). As amostras serão aquecidas inicialmente a 94° C por 7 minutos para inativação de qualquer atividade de protease que pudesse interferir com a reação enzimática e, após o último ciclo, o período de extensão final (72° C) será de 7 minutos.

Foram usados dois pares de iniciadores que flanqueiam uma região conservada nas diversas cepas de vírus HCMV, não amplificando DNA de outros herpesvírus (Tabela 2).

**Tabela 2-** Seqüência dos *primers* externos e internos que flanqueiam uma região conservada do genoma do HCMV, utilizados na PCR e na “Nested-PCR”.

<b>Primers Externos*</b>	<b>Seqüências (5' → 3')</b>	<b>Localização do produto amplificado no genoma §</b>
MIE 4	CCAAGCGGCCTCTGATAACCAAGCC	731 – 755
MIE 5	CAGCACCATCCTCCTCTTCCTCTGG	1165 -1141
<b>Primers Internos*</b>	<b>Seqüências (5' → 3')</b>	<b>Localização do produto amplificado no genoma §</b>
IE 1	CCACCCGTGGTGCCAGCTCC	926 – 945
IE 2	CCCGCTCCTCCTGAGCAC CC	1087 – 1067

\*MIE = Principal antígeno imediatamente precoce – Human cytomegalovírus (Towne) major immediate – early antigen (MIE) gene, exon 4. (GeneBank HS5MIE4).

§ = Expresso como número de nucleotídeos. Os nucleotídeos são numerados seqüencialmente dentro de cada gene.

\*IE = antígeno imediatamente precoce – Human cytomegalovirus (Towne) immediate – early antigen (IE) gene, exon 4. (GeneBank HS5MIE4).

O par de *primers* denominados *primers* MIE, amplificam uma seqüência de **435** pb do DNA do HCMV que codificam uma porção do antígeno “major immediate – early” (MIE) do HCMV (cepa Towne). A porção do gene MIE que é amplificado está contido no exon 1 deste gene (Demmler *et al.*, 1988).

O par de *primers* denominados *primers* IE, amplificam uma seqüência de **159** pares de base do DNA do HCMV que codificam uma porção do antígeno “immediate - early” (IE) do HCMV (cepa Towne). A porção do gene IE que é amplificado está contido no exon 4 deste gene.

Após as 2 reações de amplificação e reamplificação, 5 µl do produto da PCR dupla foi submetido a eletroforese em gel de agarose 2% contendo brometo de etídeo para visualização do fragmento com luz ultravioleta. Nas amostras positivas será observado um fragmento de DNA de 159 pb ao passo que não será observado nenhum fragmento nas amostras negativas.

Em todos os experimentos realizados, foram utilizados como controle positivo da reação a cepa AD-169 do HCMV e como controle negativo a água.

### 3.2.4- Métodos para detecção do poliomavírus

#### 3.2.4.1- Citologia urinária

##### A- Preparação das lâminas

Foi preparada, uma solução de urina com etanol a 100% na proporção 1:1 (foi transferido para um tubo tipo falcon 7 ml de urina e 7 ml de etanol a 100%), homogeneizado por inversão e centrifugado por 5 minutos a 1500 rpm, sendo que esta urina coletada foi processada logo após a coleta e examinada antes de 24 horas após a preparação.

Descartou-se o sobrenadante deixando-se de 1 a 2 ml no tubo (dependendo do tamanho do pellet), posteriormente ressuspendemos o pellet para montagem dos citoclipes com as lâminas que foram feitos em duplicata para cada paciente devidamente identificados.

Foram colocados nestes citoclipes 150 µl da amostra em cada citofunil e centrifugado por 10 minutos a 800 rpm em centrífuga (Marca Revan – mod. Citociclo), estas lâminas foram posteriormente coradas com a técnica de Papanicolau.

#### B- Coloração de papanicolau

Após a citocentrifugação a lâmina foi mergulhada no etanol 99% e em água destilada por 5 vezes para hidratar e limpar a lâmina. Após isso, iniciou-se a coloração com Hematoxilina de Harris (MERCK 109253.1002) por 1 minuto e 30 segundos e lavada em água destilada para retirar o excesso de corante. Posteriormente emergiu-se a lâmina em etanol 99% duas vezes em cubas separadas. Logo após utilizou-se a solução de Orange G (MERCK 10688.1002) por 1 minuto, lavando-se a lâmina novamente em etanol 99% e em água destilada. A última solução utilizada para a finalização da coloração de Papanicolau foi a contra-coloração de Eosina Ácida (MERCK 109271.0500) por 30 segundos, onde posteriormente mergulhou-se a lâmina em Etanol 99% por 3 vezes em cubas separadas para retirar o excesso do corante.

Após a coloração da lâmina, a mesma foi mergulhada em uma solução de Xilol em capela de fluxo laminar por 6 vezes, retirado cuidadosamente o excesso de Xilol da lâmina com gaze estéril e seco em temperatura ambiente dentro da capela de fluxo laminar. Posteriormente, a lâmina foi montada com Entelan, para leitura.

#### C- Leitura das lâminas

Foi utilizado um microscópio óptico, marca NIKON e foram observadas a presença de células “Decoy”.

Células positivas: têm um aumento da proporção nuclear citoplasmática e carência de inclusão citoplasmática.

Células negativas: núcleo normal e citoplasma abundante.

### 3.2.4.2- Detecção do gene do poliomavírus (BKV) pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e “NESTED-PCR”

A detecção do genoma do poliomavírus das cepas BKV foi realizada por “Nested-PCR” baseada em estudos prévios (Arthur *et al.*, 1989). Cada reação de amplificação utilizou 0,5 µg de DNA por reação (obtido pelo método de extração de DNA anteriormente descrito).

Foram completados 40 ciclos de amplificação e cada ciclo foi constituído de 3 etapas: a) separação das hélices de DNA por aquecimento a 94° C durante 3 minutos; b) ligação complementar entre os *primers* e o DNA em temperatura de 55° C por 1 minuto e 30 segundos (anelamento) e c) síntese do DNA pela *Taq* polimerase, em temperatura de 72° C por 2 minutos (extensão).

Os ciclos foram realizados automaticamente em equipamento apropriado (“DNA Thermal Cycler” – Perkin Elmer Cetus, Norwalk, Conn, EUA). As amostras foram aquecidas inicialmente a 94° C por 1 minuto para inativação de qualquer atividade de protease que pudesse interferir com a reação enzimática e, após o último ciclo, o período de extensão final (72° C) foi de 7 minutos.

Foram usados dois pares de iniciadores que flanqueiam uma região conservada nas diversas cepas de vírus BK, não amplificando DNA de outros vírus (*Tabela 3*). O tamanho do fragmento que foi amplificado com os *primers* externos foi de 176 pb que é comum para os poliomavírus tipo BK e JC. O tamanho do fragmento amplificado pela “Nested-PCR” com o par de *primers* internos para o vírus BK foi de 149 pb. Estes fragmentos foram observado em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo e sob luz ultra-violeta.

**Tabela 3-** Seqüência dos *primers* externos e internos que flanqueiam uma região conservada do genoma do Poliomavírus (BKV), utilizados na PCR e na “Nested-PCR”.

<i>Primers</i> Externos	Seqüências (5' → 3')	Localização do produto amplificado no genoma §
1	AAGTCTTTAGGGTCTTCTAC	4391 – 4410
2	GTGCCAACCTATGGAACAGA	4547 – 4566
<i>Primers</i> Internos	Seqüências (5' → 3')	Localização do produto amplificado no genoma §
1	AAGTCTTTAGGGTCTTCTAC	4391 – 4410
3	GAGTCCTGGTGGAGTTC	4523 – 4539

Genoma de *Homo sapiens*, região do complexo genômico do *Polyomavírus* (GeneBank NC001538).

§ = Expresso como número de nucleotídeos. Os nucleotídeos são numerados seqüencialmente dentro de cada gene.

### 3.2.5- Cuidados especiais para evitar contaminação das amostras durante a PCR

- As amostras a serem amplificadas foram manipuladas em salas diferentes (sala pré-PCR) de onde a amplificação será feita (sala pós-PCR);
- Todos os reagentes e materiais pré-PCR e pós-PCR foram preparados e utilizados em ambientes diferentes;
- Antes da abertura dos tubos de microcentrífuga, foi efetuada rápida centrifugação para concentrar o líquido contido no tubo na região inferior e evitar sua dispersão por evaporação.
- Todo material plástico (ponteiras e tubos plásticos para PCR) utilizado foi novo e não autoclavado;

- Trocas constantes de luvas foram feitas durante todo procedimento.

### 3.2.6- Análises estatísticas

As variáveis foram estudadas de maneira descritiva, através do cálculo de frequências absolutas e relativas, e no caso das variáveis contínuas, através do cálculo de média, percentis (25% e 75%), mediana, valores de mínimo e máximo.





## ***4- RESULTADOS***



#### 4.1- Características dos receptores estudados e exames realizados durante a monitorização

Foram analisados entre Outubro/2003 a Abril/2006, 41 pacientes submetidos à TCPH no HC/UNICAMP. Estes pacientes foram monitorizados pós-transplante, sendo realizados 3.041 exames com finalidade diagnóstica de detecção de infecção ativa pelo HCMV e BKV. Destes exames foram realizadas 724 “Nested-PCRs” e 724 antigenemias para HCMV; já para detecção de BKV foram realizadas 593 “Nested-PCRs” no sangue e 500 “Nested-PCRs” na urina e 500 Citologias urinárias.

O total de exames realizados para a detecção de infecção ativa pelo HCMV, pode ser observado na *Tabela 4*.

**Tabela 4-** Distribuição dos testes realizados nos pacientes submetidos à TCPH para detecção da infecção ativa pelo HCMV.

<i>Testes</i>	<i>Positivos</i>	<i>Negativos</i>	<i>NC</i>	<i>Total</i>
<b>Nested-PCR</b>	180 (24,9%)	544 (75,1%)	0 (0%)	724 (100%)
<b>AGM</b>	71 (9,8%)	597 (82,5%)	56 (7,7%)	724 (100%)
<b>Total</b>	251 (17,8%)	1131 (78,3%)	56 (3,9%)	1448 (100%)

*Legenda:* AGM: antigenemia; NC: não contagem celular (os quais não apresentaram DNA ou número de células suficientes para realização dos testes).

#### 4.2- Características dos receptores de TCPH

Participaram do protocolo de monitorização 41 receptores TCPH alogênicos, sendo que 22 (53,6%) eram do sexo masculino e 19 (46,4%) do sexo feminino. A idade mediana dos receptores foi de 42 anos (variação de 23 a 65 anos). A idade mediana referente ao sexo foi de 40,5 anos para o sexo masculino (variação de 26 a 53 anos) e 44 anos para o do sexo feminino (variação de 23 a 65 anos) Em relação à doença de base dos

41 receptores submetidos à TCPH, 17 (41,5%) apresentavam leucemia mielóide crônica (LMC), e 7 (17,1%) leucemia mielóide aguda (LMA). Estes dados completos estão representados na *Tabela 5*.

Em relação aos doadores, foram relacionados 41 doadores referentes aos receptores incluídos no estudo, sendo 21 (51,2%) do sexo masculino e 20 (49,8%) do sexo feminino. A idade mediana referente ao sexo foi de 44 anos para o sexo masculino (variação de 29 a 59 anos) e 39 anos sexo para o sexo feminino (variação de 24 a 54 anos).

**Tabela 5-** Características dos 41 receptores de TCPH estudados.

	<i>n / %</i>
<i>Número de Pacientes</i>	41
<i>Sexo M/F</i>	22/19 (53,6%/43,4%)
<i>Tipo de enxerto:</i>	
• CPP	27/41 (65,8%)
• MO	14/41 (34,2%)
<i>Doença de Base:</i>	
• LMC	17/41 (41,5%)
• LMA	7/41 (17,1%)
• MM	7/41(17,1%)
• AAG	4/41 (9,8%)
• LLA	3/41 (7,2%)
• LNH	2/41 (4,9%)
• LH	1/41 (2,4%)
<i>Doenças associadas ao TCPH:</i>	
• Mucosite	22/41 (53,7%)
• DECH	20/41 (48,8%)
• IH	19/41 (46,3%)
• CH	16/41 (39%)
• Herpes simples	10/41 (24,4%)
• HCMV	8/41 (19,5%)
• DVO	4/41 (9,8%)

**Legenda:** *M/F*: sexo masculino/sexo feminino; Tipo de Enxerto: *MO*: Medula óssea; *CPP*: Célula progenitora periférica; *CH*: cistite hemorrágica; *IH*: infecção hospitalar (*Acynetobacter*, *Staphylococcus* coagulase negativo, *Klebsiela pneumoniae*, *Pneumocystis carinii*); *DVO*: doença venoclusiva; *DECH*: doença do enxerto contra o hospedeiro; *LMC*: leucemia mielóide crônica; *LLA*: leucemia linfóide aguda; *LMA*: leucemia mielóide aguda; *LNH*: linfoma não-Hodgkin; *LH*: linfoma de Hodgkin; *MM*: mieloma múltiplo; *AAG*: anemia aplástica grave.

#### 4.3- status sorológico para HCMV dos doadores e receptores relacionados neste estudo

É importante identificar a exposição à infecção pelo HCMV antes da realização do TCPH, tanto no doador (D) quanto no receptor (R). Em relação à sorologia IgG-HCMV realizada pré-transplante nos receptores, 38/41 (92,7%) apresentaram IgG positiva para HCMV e 3/41 (7,3%) IgG negativa para HCMV.

Em relação ao *status* sorológico dos doadores, todos apresentaram soropositividade IgG para o HCMV.

A comparação das características de infecção ativa e doença pelo HCMV referentes ao sorotipo do receptor (R) e do doador (D) está representada na *Tabela 6*. Podemos observar que o sorotipo D+/R+ apresentou infecção ativa em 38/41 (92,7%) dos casos estudados, e que os casos que evoluíram para doença pelo HCMV também pertenciam a este sorotipo.

**Tabela 6-** Relação entre sorotipos dos receptores (R) e doadores (D) e infecção ativa/doença pelo HCMV, óbito pelo HCMV e DECH.

<i>Sorotipo de HCMV</i>	<i>Pacientes n (%)</i>	<i>Infecção ativa pelo HCMV n (%)*</i>	<i>AGM+ n (%)</i>	<i>Nested-PCR + n (%)</i>	<i>Doença por HCMV n (%)</i>	<i>Óbito por HCMV n (%)</i>	<i>DECH n (%)</i>
D+/R+	38/41 (92,7%)	31/38 (81,6%)	25/38 (65,8%)	31/38 (81,6%)	8/38 (21,1%)	1/38 (2,63%)	17/38 (44,7%)
D+/R-	3/41 (7,3%)	1/3 (33,3%)	1/3 (33,3%)	1/3 (33,3%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	3/3 (100%)

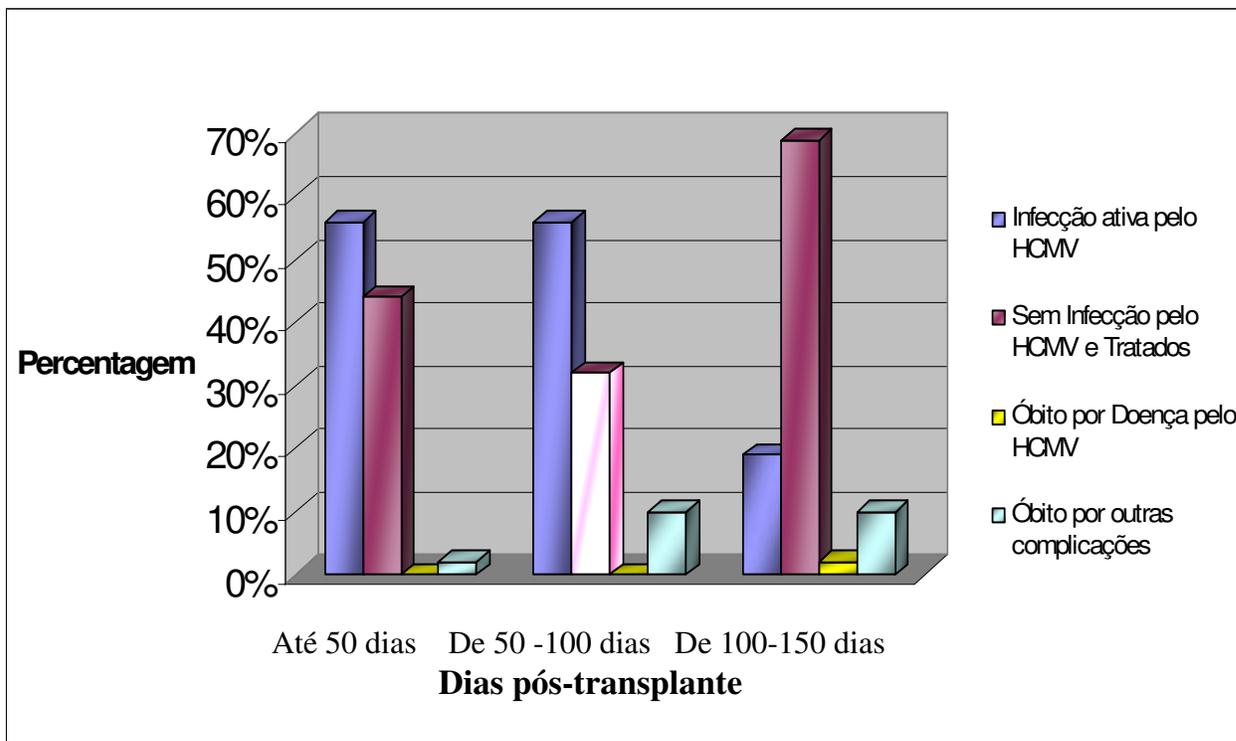
**Legenda-** HCMV: citomegalovírus humano; D+: doador com sorologia IgG positiva contra o HCMV; R+: receptor com sorologia IgG positiva contra HCMV; D-: doador com sorologia IgG negativa contra o HCMV; R-: receptor com sorologia IgG negativa contra HCMV; AGM: antigenemia; DECH: doença do enxerto contra o hospedeiro. \*: N-PCR+ e/ou AGM+

#### 4.4- Resultados dos testes diagnósticos de infecção ativa pelo HCMV EM TCPH

Infecção ativa pelo HCMV foi identificada pelos métodos diagnósticos AGM e “Nested-PCR”. Utilizamos como critérios para caracterização de infecção ativa por HCMV (Ljungman, 2002b; Bonon *et al*, 2005):

- **“Nested-PCR”** – duas ou mais reações positivas, consecutivas (Figura 5);
- **AGM** – uma ou mais células antígeno-positivas para HCMV detectadas em leucócitos polimorfonucleares (Figura 6).

A infecção ativa pelo HCMV é importante ser diagnosticada, para análise do eventual risco por doença pelo HCMV. Dos 41 receptores estudados, a infecção ativa foi detectada em 32/41 (78,1%), e 20/32 (62,5%) destes receptores apresentaram DECH. O Gráfico 1 demonstra a ocorrência de infecção ativa e doença pelo HCMV durante os 150 dias de seguimento, divididos em 3 períodos de 50 dias cada.

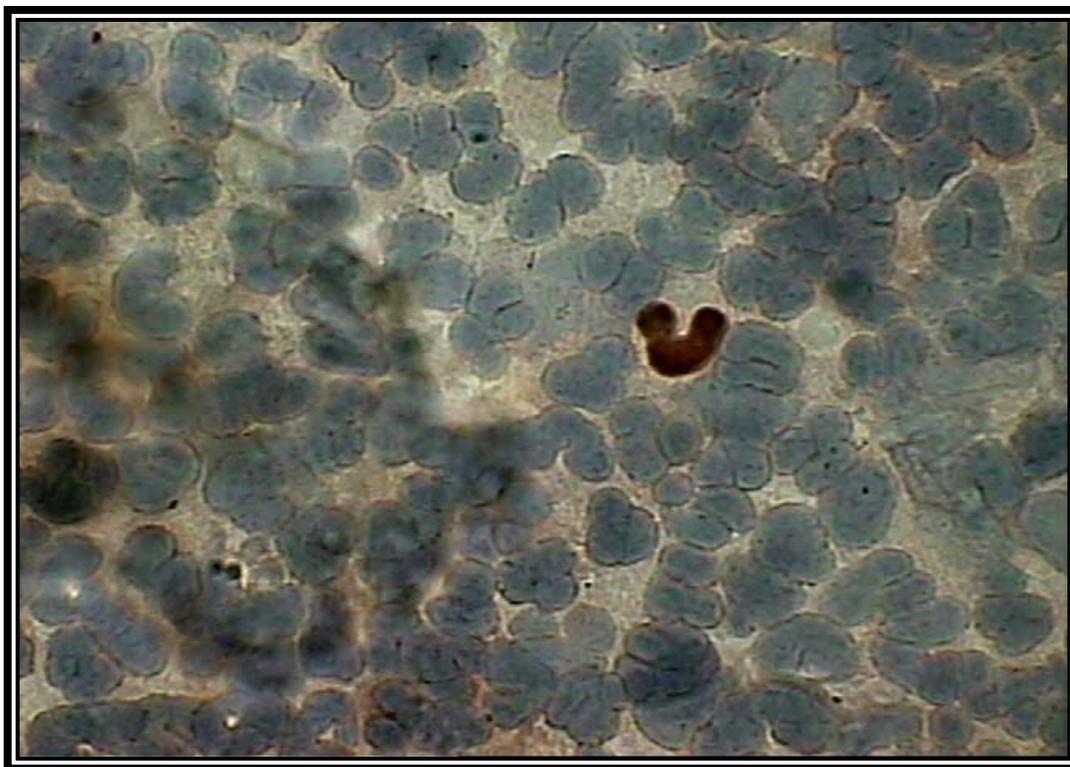


**Gráfico 1-** Ocorrência de infecção ativa/doença pelo HCMV pós-transplante dos 41 pacientes seguidos por 150 dias, divididos em 3 períodos de 50 dias cada.

O aparecimento de infecção ativa pelo HCMV foi observado em 23/41 (56,1%) dos receptores estudados de 0 a 100 dias após o TCPH. Dos 23 pacientes com infecção ativa pelo HCMV, 7 (30,5%) desenvolveram doença pelo HCMV, sendo que todos apresentaram cistite hemorrágica.

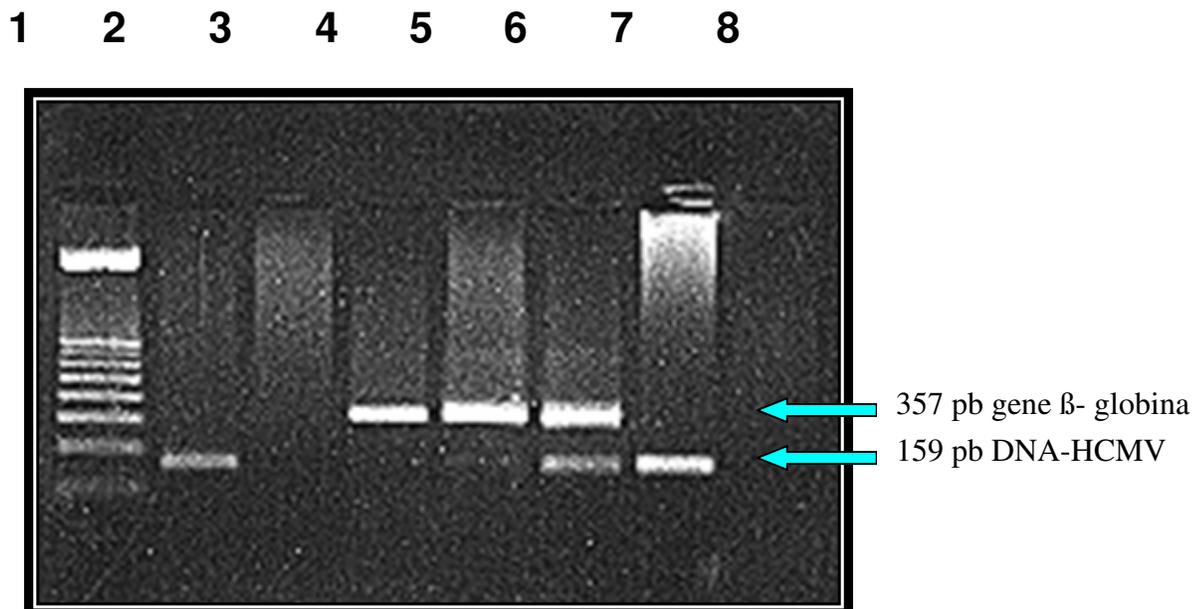
A média do tempo de aparecimento de infecção ativa pelo HCMV foi de 33 dias, variando do dia 14 ao dia 54 após transplante.

Na *Figura 6* podemos observar a reação de imunoperoxidase (antigenemia), sendo que as células antígeno-positivas *pp65* do HCMV, são identificadas pela coloração castanho-avermelhada nuclear ou perinuclear em leucócitos polimorfonucleares, e as células negativas possuem o núcleo azul.



**Figura 6-** Células antígeno-positivas e negativas para a reação de antigenemia para detecção do HCMV. Reação de Imunoperoxidase. Células antígeno-positivas *pp65* do HCMV, identificadas pela coloração castanho-avermelhada nuclear ou perinuclear em leucócitos polimorfonucleares; células negativas – núcleo azul. Os leucócitos foram preparados em lâminas microscópicas, fixadas com Paraformaldeído/NP40 e submetidos a coloração com imunoperoxidase com a utilização dos anticorpos monoclonais C10/C11.

Na *Figura 7*, podemos observar a análise direta do fragmento amplificado, do HCMV após eletroforese em gel de agarose 2%.



**Figura 7-** Resultado da amplificação dos fragmentos do HCMV e da  $\beta$ -Globina humana pela “Nested-PCR”. *Coluna 1:* Marcador de peso molecular (Ladder de 100pb); *Coluna 2:* Controle positivo (cepa *AD169* do HCMV); *Coluna 3:* Controle negativo; *Coluna 4 e 5:* amostras de DNA de sangue para o gene da  $\beta$ -Globina humana; *Coluna 6:* amostra de DNA de sangue de receptor positivo para o gene da  $\beta$ -Globina humana e para o HCMV; *Coluna 7:* controle positivo: cepa *AD169* do HCMV; *Coluna 8:* controle negativo.

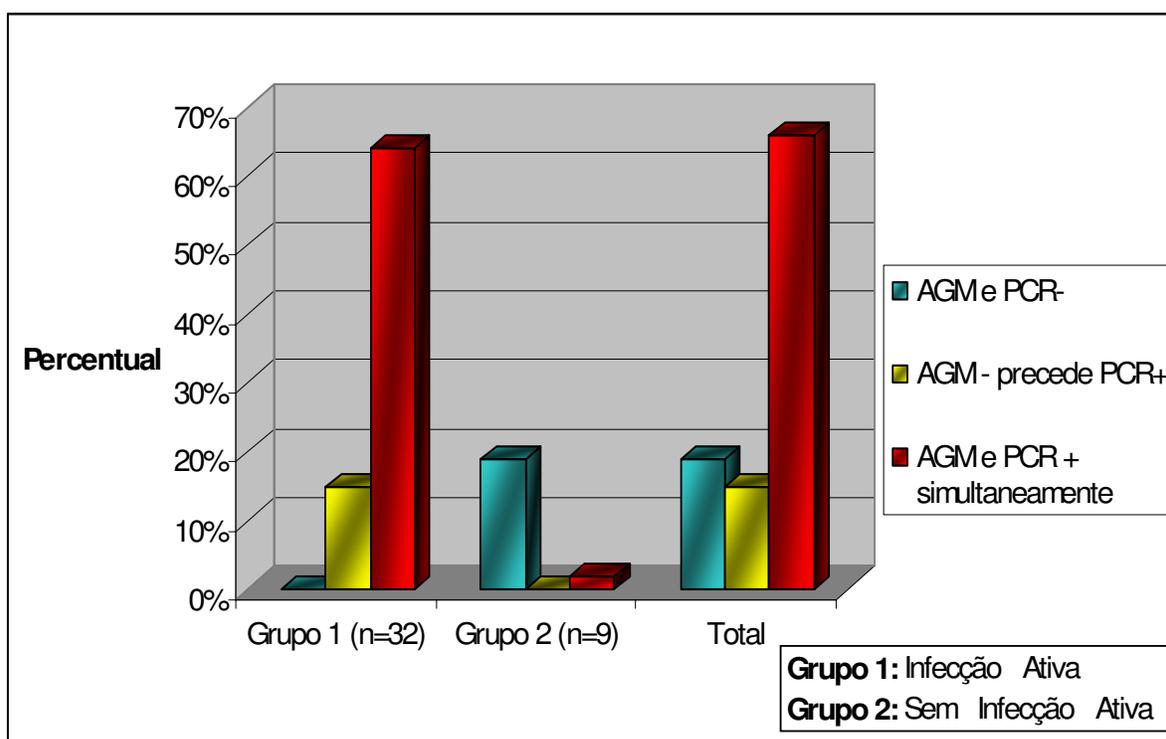
#### 4.5- Avaliação do teste de “NESTED-PCR” E AGM no diagnóstico de infecção ativa pelo HCMV nos receptores estudados

Os testes de “Nested-PCR” e de AGM foram realizados na mesma amostra obtida dos 41 receptores, desde o dia 0 até o dia 150 pós-transplante. 32/41 (78,1%) destes receptores apresentaram duas “Nested-PCR” positivas consecutivas para HCMV e 26/41 (63,4%) pelo menos 1 célula positiva por AGM. Observamos que a “Nested-PCR” apresentou-se com maior sensibilidade no diagnóstico da infecção ativa pelo HCMV (*Tabela 7*). No *Gráfico 2* podemos observar os resultados obtidos com as duas técnicas.

**Tabela 7-** Comparação entre “Nested-PCR” e antigenemia (AGM) em relação à infecção ativa e doença pelo HCMV nos receptores de TCPH.

	<i>*Infecção ativa (+)</i>	<i>Infecção ativa (-)</i>	<i>Doença (+)</i>	<i>Doença (-)</i>
<i>N-PCR (+)</i>	32	0	8	24
<i>N-PCR(-)</i>	0	9	0	9
<b>Total</b>	<b>32</b>	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>33</b>
<i>AGM (+)</i>	26	0	7	19
<i>AGM (-)</i>	6	9	1	14
<b>Total</b>	<b>32</b>	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>33</b>

\* Utilizando PCR+ como referência padrão+



**Gráfico 2-** Concordância dos testes diagnósticos entre AGM e “Nested-PCR” dos 41 receptores de TCPH monitorizados.

#### **4.6- Resultados dos testes laboratoriais em relação à infecção ativa pelo HCMV e pelo BKV nos receptores de TCPH.**

Nos 41 receptores incluídos no presente estudo, foram realizados exames diagnósticos de infecção ativa pelo HCMV e BKV, para verificar a provável relação com a cistite hemorrágica. Os resultados estão representados na *Tabela 8*.

**Tabela 8-** Resultados dos testes laboratoriais em relação à Infecção Ativa pelo HCMV e pelo BKV nos 41 receptores alogênicos submetidos à TCPH.

Pacientes	Idade/Sexo	Tipo de Enxerto	AGM	Citologia Urinária	CH	Nested-PCR		
						BKV Sangue	BKV urina	HCMV Sangue
1	45/F	MO	Negativa	Negativa	+	Negativa	Negativa	Negativa
2	31/M	CPP	Negativa	Negativa	-	Negativa	Negativa	Negativa
3	30/M	MO	Negativa	Negativa	+	Negativa	Negativa	<b>Positiva</b>
4	45/M	MO	<b>Positiva</b>	Negativa	-	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>
5	32/F	CPP	<b>Positiva</b>	Negativa	-	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>
6	48/M	CPP	<b>Positiva</b>	Negativa	-	Negativa	Negativa	<b>Positiva</b>
7	33/M	CPP	<b>Positiva</b>	Negativa	-	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>
8	41/F	MO	<b>Positiva</b>	Negativa	+	Negativa	Negativa	<b>Positiva</b>
9	61/F	CPP	<b>Positiva</b>	Negativa	-	Negativa	Negativa	<b>Positiva</b>
10	54/M	CPP	Negativa	Negativa	+	Negativa	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>
11	42/F	CPP	<b>Positiva</b>	Negativa	-	Negativa	Negativa	<b>Positiva</b>
12	51/M	MO	<b>Positiva</b>	Negativa	+	Negativa	Negativa	<b>Positiva</b>
13	37/F	MO	Negativa	<b>Positiva</b>	-	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	Negativa
14	52/M	CPP	Negativa	Negativa	-	<b>Positiva</b>	Negativa	<b>Positiva</b>
15	53/M	CPP	<b>Positiva</b>	Negativa	-	Negativa	Negativa	<b>Positiva</b>
16	45/M	CPP	<b>Positiva</b>	Negativa	+	Negativa	Negativa	<b>Positiva</b>
17	26/M	CPP	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	++	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>
18	59/F	CPP	Negativa	<b>Positiva</b>	-	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>
19	59/F	CPP	Negativa	Negativa	-	Negativa	Negativa	Negativa
20	37/M	CPP	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	+++	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>
21	41/F	CPP	<b>Positiva</b>	Negativa	++	Negativa	Negativa	<b>Positiva</b>
22	53/F	CPP	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	+	Negativa	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>
23	41/M	CPP	<b>Positiva</b>	Negativa	-	Negativa	Negativa	<b>Positiva</b>
24	50/F	MO	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	++	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>
25	36/F	CPP	Negativa	Negativa	-	Negativa	Negativa	Negativa
26	36/M	CPP	Negativa	Negativa	-	Negativa	Negativa	Negativa
27	33/F	MO	<b>Positiva</b>	Negativa	+	Negativa	Negativa	<b>Positiva</b>
28	32/M	CPP	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	+++	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>
29	65/F	CPP	<b>Positiva</b>	Negativa	-	Negativa	Negativa	<b>Positiva</b>
30	52/F	CPP	<b>Positiva</b>	Negativa	-	Negativa	Negativa	<b>Positiva</b>
31	41/M	CPP	Negativa	Negativa	-	Negativa	Negativa	Negativa
32	32/F	MO	Negativa	Negativa	-	Negativa	Negativa	<b>Positiva</b>
33	36/M	CPP	<b>Positiva</b>	Negativa	-	Negativa	Negativa	<b>Positiva</b>
34	40/M	MO	<b>Positiva</b>	Negativa	-	Negativa	Negativa	<b>Positiva</b>
35	27/F	CPP	Negativa	Negativa	-	Negativa	Negativa	<b>Positiva</b>
36	38/M	CPP	Negativa	Negativa	+	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	Negativa
37	41/M	MO	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	+	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>
38	44/F	MO	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	-	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>
39	29/M	CPP	<b>Positiva</b>	Negativa	-	Negativa	Negativa	<b>Positiva</b>
40	23/F	MO	Negativa	Negativa	-	Negativa	Negativa	Negativa
41	53/M	MO	<b>Positiva</b>	Negativa	+	Negativa	Negativa	<b>Positiva</b>

**Legenda:** *M*: masculino; *F*: feminino; *MO*: medula óssea; *CPP*: células progenitora periférica; *AGM*: antigenemia; *CH*: cistite hemorrágica; (-) : negativa; (+): CH clinicamente leve; (++) : CH clinicamente moderada; (+++): CH clinicamente grave; *BKV DNA*: Nested-PCR de sangue para Poliomavírus; *BKV urina*: Nested-PCR em urina para Poliomavírus; *HCMV DNA*: Nested-PCR em sangue para Citomegalovírus.

**Tabela 09-** Resultados dos testes Laboratoriais no Grupo Total de Pacientes n=41

<b>Pacientes</b>	<b>Tipo de Enxerto (MO/ CPP)</b>	<b>Infecção Ativa pelo HCMV</b>	<b>Infecção Ativa pelo BKV</b>	<b>Cistite Hemorrágica +</b>	<b>Citologia Urinária +</b>
Total=41	14/27 (34,1%/65,8%)	32/41 (78%)	14/41 (34,1%)	16/41 (39%)	9/41 (22%)

**Legenda:** *MO:* medula óssea; *CPP:* células progenitoras periféricas; *BKV:* Poliomavírus; *HCMV:* Citomegalovírus Humano; (+):positiva.

**Tabela 10-** Pacientes submetidos à TCPH que apresentaram **Cistite Hemorrágica** e Resultados dos Testes de Detecção de Infecção Ativa pelo BKV e pelo HCMV.

Pacientes	Idade/Sexo	Tipo de Enxerto	AGM	Citologia Urinária	CH	"Nested-PCR"		
						BKV Sangue	BKV urina	HCMV Sangue
1	45/F	MO	Negativa	Negativa	+	Negativa	Negativa	Negativa
3	30/M	MO	Negativa	Negativa	+	Negativa	Negativa	<b>Positiva</b>
8	41/F	MO	<b>Positiva</b>	Negativa	+	Negativa	Negativa	<b>Positiva</b>
10	54/M	CPP	Negativa	Negativa	+	Negativa	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>
12	51/M	MO	<b>Positiva</b>	Negativa	+	Negativa	Negativa	<b>Positiva</b>
16	45/M	CPP	<b>Positiva</b>	Negativa	+	Negativa	Negativa	<b>Positiva</b>
17	26/M	CPP	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	++	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>
20	37/M	CPP	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	+++	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>
21	41/F	CPP	<b>Positiva</b>	Negativa	++	Negativa	Negativa	<b>Positiva</b>
22	53/F	CPP	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	+	Negativa	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>
24	50/F	MO	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	++	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>
27	33/F	MO	<b>Positiva</b>	Negativa	+	Negativa	Negativa	<b>Positiva</b>
28	32/M	CPP	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	+++	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>
36	38/M	CPP	Negativa	Negativa	+	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	Negativa
37	41/M	MO	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	+	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>	<b>Positiva</b>
41	53/M	MO	<b>Positiva</b>	Negativa	+	Negativa	Negativa	<b>Positiva</b>

**Legenda:** *M:* masculino; *F:* feminino; *MO:* medula óssea; *CPP:* células progenitoras periféricas; *AGM:* antigenemia; *CH:* cistite hemorrágica; (-) : negativa; CH(+): leve; CH (++) : moderada; CH (+++) : grave; *BKV-sg:* Nested-PCR no sangue para Poliomavírus; *BKV-ur:* Nested-PCR na urina para Poliomavírus; *HCMV:* Nested-PCR no sangue para Citomegalovírus.

**Tabela 11-** Resultados dos Testes Laboratoriais nos 16 pacientes TCPH que apresentaram Cistite Hemorrágica

Pacientes com Cistite Hemorrágica	Tipo de Enxerto (MO/ CPP)	Infecção Ativa pelo HCMV	Infecção Ativa pelo BKV	Citologia Urinária +	Infecção Ativa pelo HCMV e BKV
N=16	8/8 (50%/50%)	14/16 (87,5%)	8/16 (50%)	6/16 (37,5%)	7/16 43,7%

**Legenda:** MO: medula óssea; CPP: células progenitoras periféricas; BKV: Poliomavírus; HCMV: Citomegalovírus Humano; (+):positiva.

Nos pacientes com cistite hemorrágica, podemos observar pelos dados da Tabela 11 a presença de infecção ativa por BKV na urina e/ou no sangue detectada pela "Nested-PCR" em 8/16 (50%) pacientes. Também podemos observar que 14/16 (87,5%) dos receptores que apresentaram cistite hemorrágica, também apresentaram infecção ativa pelo HCMV. E destes, 7/16 (43,7%) tiveram também concomitantemente, infecção pelo BKV na urina e/ou sangue.

**Tabela 12-** Resultados dos testes de diagnóstico de infecção ativa pelo HCMV e BKV em receptores de TCPH em relação à ocorrência ou não de Cistite Hemorrágica.

	Receptores n/n (%)	Infecção ativa (+) pelo BKV (sangue)*	Infecção ativa (+) pelo BKV (urina)*	Infecção ativa (+) pelo HCMV **
CH positiva	16/41 (39%)	6/16 (37,5%)	8/16 (50%)	14/16 (87,5%)
CH negativa	25/41 (61%)	7/25 (28%)	6/25 (24%)	18/25 (72%)
<b>Total</b>	<b>41/41 (100%)</b>	<b>13/41 (31,7%)</b>	<b>14/41 (34,1%)</b>	<b>32/41 (78%)</b>

\* "Nested-PCR" positiva para BKV

\*\* Duas "Nested-PCR" positivas consecutivas e/ou uma ou mais células na antigenemia positiva no sangue.

**Legenda:** CH: Cistite Hemorrágica, BKV: Poliomavírus, HCMV: Citomegalovírus humano, (+): positivo.

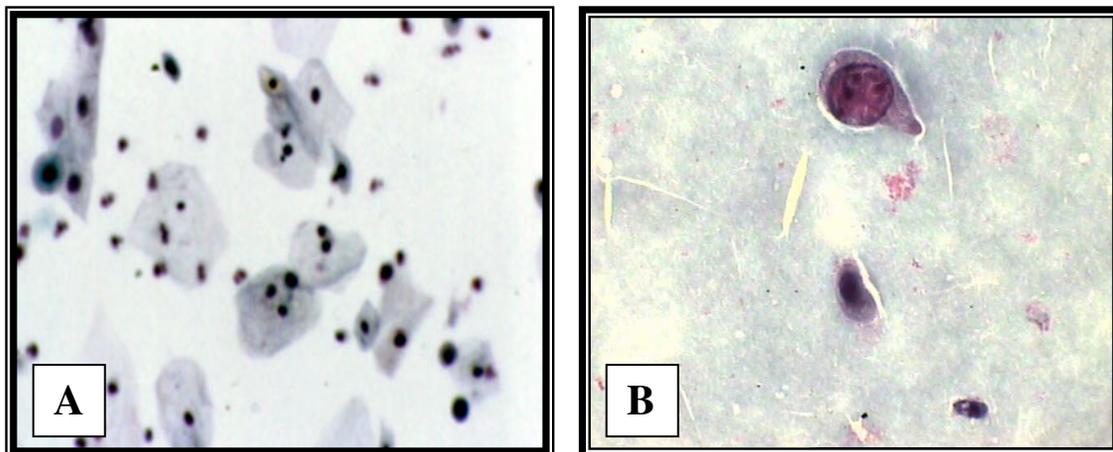
**Tabela 13-** Exames utilizados para diagnóstico de infecção ativa pelo HCMV e BKV, comparados com Cistite Hemorrágica.

	<i>Receptores</i>		<i>CH</i>	<i>Infecção ativa pelo BKV (n, %)</i>		<i>Infecção ativa pelo HCMV (n, %)</i>	
	<i>(n, %)</i>	<i>(n, %)</i>	<i>(n, %)</i>	<i>Sangue</i>	<i>Urina</i>		
				<i>N-PCR</i>	<i>N-PCR</i>		
<i>Citologia Urinária (+)</i>	9/41 (21,9%)		6/9 (66,7%)	8/9 (88,9%)	9/9 (100%)	9/9 (100%)	
<i>Citologia Urinária (-)</i>	32/41 (78,0%)		10/32 (31,2%)	5/32 (15,6%)	5/32 (15,6%)	23/32 (71,9%)	
<b>Total</b>	<b>41 (100%)</b>		<b>16/41 (39%)</b>	<b>13/41 (31,7%)</b>	<b>14/41 (34,1%)</b>	<b>32/41 (78%)</b>	

**Legenda:** *Citologia urinária (+)*: presença de células “Decoy”; *Citologia urinária (-)*: ausência de Células “Decoy”; *PCR (+)*: Reação em cadeia da polimerase positiva; *PCR (-)*: Reação em cadeia da polimerase negativa; *CH*: Cistite Hemorrágica; *BKV*: Poliomavírus humano; *HCMV*: Citomegalovírus humano.

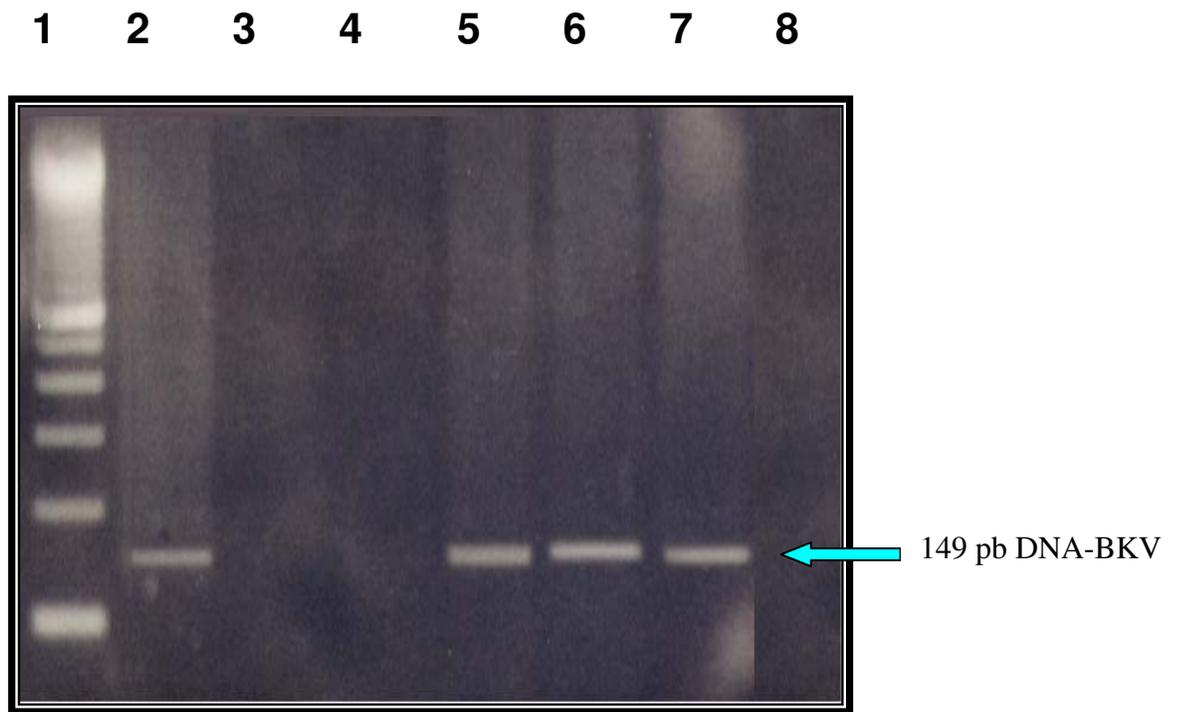
Os resultados obtidos com a citologia urinária mostraram que 9/41 (22%) pacientes apresentaram células “Decoy” nas amostras (*Figura 8*).

Dos 9 pacientes com citologia urinária positiva 6/9 (66,7%) também apresentaram cistite hemorrágica, “Nested-PCR” para BKV e “Nested-PCR” para HCMV positivas.



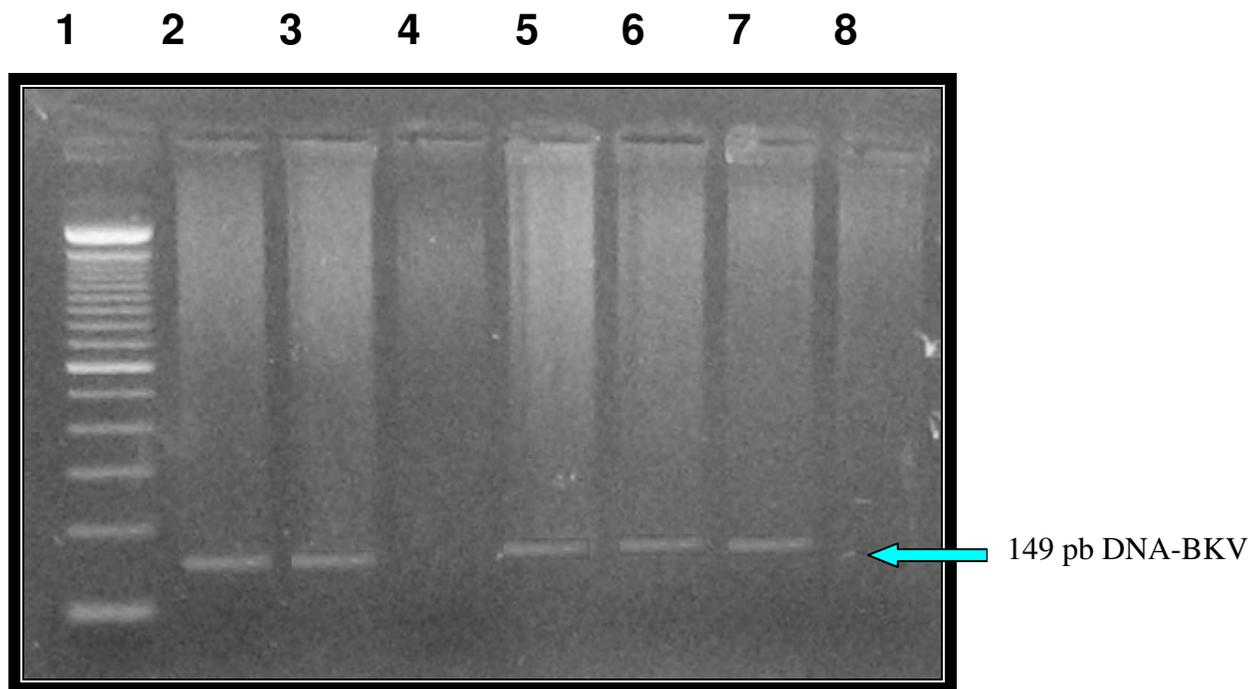
**Figura 8-** Citologia Urinária com coloração de Papanicolau comparada com Citologia Urinária normal. Onde: A) Amostra negativa para células “Decoy” (Citologia normal); B) Amostra positiva apresentando células com inclusão viral (células “Decoy”), caracterizada por inclusão intranuclear com um halo transparente, aumento do volume nuclear, núcleo basofílico e cromatina condensada.

Observamos a análise direta do fragmento amplificado, após eletroforese em gel de agarose 2% do BKV na urina (*Figura 9*).



**Figura 9-** Resultado da amplificação do BKV DNA na urina através da análise direta do fragmento em gel de agarose a 2%. *Coluna 1:* Marcador de peso molecular (Ladder de 100pb); *Coluna 2:* Controle positivo de urina de paciente com BKV positivo; *Coluna 3:* Controle negativo; *Coluna 4:* amostra negativa para BKV, *Coluna 5, 6 e 7:* amostras positivas de DNA de urina para o BKV humano; *Coluna 8:* controle negativo.

Observamos a análise direta do fragmento amplificado, após eletroforese em gel de agarose 2% do BKV no sangue (*Figura 10*).



**Figura 10-** Resultado da amplificação do BKV DNA no sangue através da análise direta do fragmento em gel de agarose a 2%. *Coluna 1:* Marcador de peso molecular (Ladder de 100pb); *Coluna 2:* Controle positivo de sangue de paciente com BKV positivo; *Coluna 3:* amostra positiva de DNA de paciente para BKV; *Coluna 4:* amostra negativa para BKV, *Coluna 5, 6 e 7:* amostras positivas de DNA de sangue para o BKV humano; *Coluna 8:* controle negativo.

**Tabela 14-** Mediana dos tempos de início de detecção de infecção ativa pelo HCMV e BKV por "Nested-PCR", AGM e Citologia Urinária dos 16 pacientes que apresentaram cistite hemorrágica..

	<b>MEDIANA</b>	<b>VARIAÇÃO</b>
	<b>(dias)</b>	
Dia início infecção ativa pelo HCMV detectada pela PCR	33 dias	(14-54)
Dia início infecção ativa pelo HCMV detectada pela AGM	49 dias	(14-72)
Dia início infecção ativa pelo BKV detectada pela PCR no sangue	28 dias	(7-89)
Dia início infecção ativa pelo BKV detectada pela PCR na urina	24 dias	(7-75)
Dia início da detecção de células "Decoy" na urina pela citologia urinária	33 dias	(15-54)
<b>Dia início da detecção da Cistite Hemorrágica</b>	28,5 dias	(0-68)

#### **4.7- Detecção do poliomavírus humano pela "NESTED-PCR" em amostras de urina e sangue de grupo controle (não imunossuprimido).**

Para comprovar a eficácia da "Nested-PCR" para BKV em amostras de urina e sangue realizadas nos pacientes TCPH, realizamos a "Nested-PCR" para BKV em um grupo de 10 indivíduos normais imunocompetentes e todos apresentaram resultados negativos para o BKV. Todos os exames no grupo controle foram feitos em duplicata para comprovação dos resultados.

#### **4.8- Causa dos óbitos ocorridos durante o seguimento dos receptores estudados (tabela 15)**

A Tabela 15 demonstra a causa dos óbitos ocorridos durante o tempo do seguimento (até 150 dias pós-transplante).

**Tabela 15-** Causa dos óbitos dos receptores de TCPH estudados.

<b>Paciente</b>	<b>Data do Óbito</b>	<b>Sobrevida (dias pós-transplante)</b>	<b>Causa principal do Óbito</b>
<b>16</b>	<b>08/07/04</b>	<b>142</b>	<b>Doença por HCMV, Pneumonia intersticial</b>
17	20/06/04	145	<b>Hemorragia Gastrointestinal</b>
18	31/05/04	30	<b>IB</b>
20	24/09/04	79	<b>IB e IR</b>
21	30/04/05	86	<b>Síndrome Respiratória Grave</b>
28	15/08/05	83	<b>IB</b>
35	01/12/05	104	<b>IF</b>
37	04/02/06	138	<b>DECH crônico extenso</b>
39	12/04/06	145	<b>DECH crônico extenso</b>
41	27/12/04	58	<b>IB</b>

**Legenda:** IB: Infecção Bacteriana, IR: Insuficiência Renal, IF: Infecção Fúngica, DECH: Doença do Enxerto contra Hospedeiro.



## ***5- DISCUSSÃO***



A CH é uma das complicações que ocorrem nos receptores de transplantes de células progenitoras hematopoéticas, e tem como um dos principais fatores de risco a reativação do HCMV e do BKV. Sabe-se que a maioria da população humana é soropositiva tanto para o HCMV quanto para o BKV. Em países desenvolvidos cerca de 60% da população é soropositiva para o HCMV, e em países subdesenvolvidos cerca de 100% (Bedi *et al.*, 1995; Leung *et al.*, 2002). Para o BKV a população humana tem soroprevalência de 50 a 70% (Knowles, 2003). Estes vírus permanecem latentes após uma infecção primária. Em indivíduos imunocompetentes, a infecção primária para ambos, é geralmente assintomática ou apresenta quadro clínico discreto. Em pacientes imunossuprimidos, como os receptores de TCPH, esses vírus podem causar doenças sérias, com manifestações clínicas mais graves que podem até mesmo levar ao óbito (Leung *et al.*, 2002).

Com o aumento crescente de pacientes imunossuprimidos, principalmente aqueles associados à TCPH, as infecções pelo HCMV e pelo BKV tornaram-se mais comuns.

A cistite hemorrágica após o TCPH tem vários fatores que contribuem para o seu aparecimento, tais como toxinas químicas, radiação, viroses e mecanismos imunológicos. Estudos anteriores demonstraram que a ciclofosfamida está bem definida como sendo uma das causas da cistite hemorrágica (Lee *et al.*, 2003).

A excreção urinária dos vírus BKV, adenovírus e HCMV tem sido fortemente associada à ocorrência da cistite hemorrágica. O vírus mais frequentemente implicado é o BKV, aparecendo em cerca de 50% dos pacientes com cistite hemorrágica após o TCPH. A presença do BKV deverá sempre ser considerada no diagnóstico diferencial da CH em pacientes TCPH (Bedi *et al.*, 1995).

A presença de virúria causada por poliomavírus pode ser detectada através da observação de células "Decoy" por citologia urinária. A utilização da citologia urinária tem seu mérito por ser uma técnica de fácil execução, porém com uma baixa sensibilidade, mas atualmente, não há consenso em relação às melhores técnicas laboratoriais para o monitoramento clínico do BKV (Drachemberg *et al.*, 2001).

A PCR pode detectar o BKV em muitos casos de virúria e pode ser utilizada para o monitoramento clínico, podendo resolver as limitações da citologia (Randhawa et al, 2005).

Neste trabalho, utilizamos a técnica da “Nested-PCR” no diagnóstico da infecção ativa por BKV em amostras de sangue e urina dos pacientes TCPH e observamos uma positividade de 50% nos pacientes que apresentaram cistite hemorrágica. A citologia urinária positiva ocorreu em apenas 37,5% destes pacientes.

Recentes estudos têm demonstrado o valor clínico da PCR quantitativa na urina para BKV. Embora existam variações e discordâncias em relação à carga viral nos pacientes com BKV, existe consenso em que valores acima de  $10^7$  cópias por mililitro podem estar associados com infecção ativa (Drachemberg et al, 2005).

Estudamos 41 receptores de TCPH, em relação a infecção ativa e doença pelo HCMV e 8/41 destes pacientes apresentaram doença pelo HCMV e destes, 1/8 (12,5%) veio a óbito.

No nosso estudo, os receptores de TCPH não receberam profilaxia universal para HCMV, sendo realizado o tratamento precoce (preemptivo) (Bonon et al, 2005). A DECH ocorreu em 20/41 (48,8%) dos receptores estudados, sendo que destes 2/20 (10%) foram a óbito. Na maioria dos casos a DECH foi grave, principalmente naqueles que evoluíram para óbito. (Chan *et al.*, 1994).

Para a detecção do BKV pode ser utilizada a observação de células “Decoy” na citologia urinária para receptores de TCPH, sendo este um método de baixo custo, simples e que pode ser aplicado em muitos hospitais. No entanto, em centros de transplantes a rotina por métodos moleculares é uma ferramenta fundamental para a detecção de infecção ativa pelo BKV (Santos *et al.*, 2004; Sempere *et al.*, 2005).

Resultados falso-positivos na citologia urinária podem ocorrer devido à presença de núcleo reativo hipertrófico de células uroepiteliais ou pela presença de outras infecções virais, assim como pelo HCMV ou Adenovírus, os quais imitam as transformações citológicas vistas nas células “Decoy”. Por outro lado, casos falso-negativos podem ocorrer devido ao baixo número de células “Decoy”. (Sempere *et al.*, 2005).

Para o diagnóstico de infecção ativa pelo BKV neste estudo, nossos critérios foram: detectar a presença de partículas virais no sangue e/ou urina pela “Nested-PCR” e/ou diagnóstico persistente de células “Decoy” na urina. Assim observamos que 9/41 (22%) dos transplantados apresentaram citologia urinária positiva, destes 6/9 (66,7%) apresentaram CH, 8/9 (88,8%) transplantados com “Nested-PCR” positiva para BKV no sangue, 9/9 (100%) na urina e 9/9 (100%) apresentaram infecção ativa pelo HCMV. É importante notar que a positividade do BKV detectada pela “Nested-PCR” na urina foi de 24 dias, anterior à ocorrência de cistite hemorrágica e de “Nested-PCR” positiva no sangue. Seis transplantados de 41 estudados (14,6%) apresentaram BKV na urina, porém, não apresentaram CH.

Excreção urinária do BKV tem sido detectada em 48 a 60% dos pacientes TCPH e em 50 a 100% dos pacientes com cistite hemorrágica após transplante em grupos de estudo com mais de 50 pacientes (Arthur *et al.*, 1986; Azzi *et al.*, 1994; Bedi *et al.*, 1995; Peinemann *et al.*, 2000)

No presente estudo evidenciamos que 16/41 (39%) dos receptores apresentaram CH (o que não difere da literatura). Destes receptores, 14/16 (87,5%) apresentaram infecção ativa pelo HCMV e 8/16 pelo BKV, sugerindo que a CH pode estar associada com a reativação destes vírus.

Portanto os resultados desse trabalho poderão ser úteis para um melhor monitoramento dos pacientes receptores de TCPH em relação à cistite hemorrágica melhorando o prognóstico e o impacto clínico nesse grupo de risco para essas duas viroses.





## ***6- CONCLUSÕES***



- Detectou-se a infecção ativa pelo HCMV em 32/41 (78,1%) dos receptores de TCPH, utilizando as técnicas de AGM e/ou “Nested-PCR”;
- Detectou-se a infecção ativa causada pelo BKV em 14/41 (34,1%) dos receptores de TCPH, utilizando a técnica de “Nested-PCR” e em 9/41 (21,9%) utilizando a técnica de Citologia Urinária;
- Infecção ativa pelo HCMV e pelo BKV ocorreu concomitantemente em 8/14 (57,1%) dos pacientes com CH.
- Sugere-se que as infecções ativas pelo BKV e HCMV em receptores de TCPH podem estar envolvidas na patogênese da CH, sendo assim, importante a utilização de métodos diagnósticos precoces, sensíveis e específicos como os utilizados nesse trabalho, para o controle dessas viroses com possível melhora no prognóstico desses pacientes.





## ***7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***



Abecassis MM, Koffron AJ, Kaplan B, Buckingham M, Muldoon JP, Cribbins AJ et al. The role of PCR in the diagnosis and management of CMV in solid recipients. *Transplantation* 1997; 63: 2, 275-279, .

Almeida LNB, Azevedo RS, Amaku M, Massad E. Cytomegalovirus seroepidemiology in the urban community of São Paulo, Brazil *Rev Saude Pública* 2001; 35 (2): 124-129.

Arthur RR, Shah KV, Baust SJ, Santos GW, Saral R. Association of BK viraemia with haemorrhagic cystitis in recipients of bone marrow transplant. *N Eng J Med* 1986; 31: 230 – 234,.

Arthur RR, Dagostin S, Shah KV. Detection of BK virus and JC virus in urine and brain tissue by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1174 – 1179.

Azzi A, Fanci R, Bosi A, Ciappi S, Zakrzewska K, de Santis R, *et al.* Monitoring of polyomavirus BK viraemia in bone marrow transplantation patients by DNA hybridization assay and by polymerase chain reaction : an approach to assess the relationship between BK viraemia and hemorrhagic cystitis. *Bone Marrow Transplant* 1994; 14: 235 – 240,.

Azzi A, de Santis R, Ciappi S, Leoncini F, Bosi A, Zakrzewska K, *et al.* Human polyomavirus DNA detection in peripheral blood leukocytes from immunocompetent and immunocompromised individuals. *J Neurol Virol* 1996; 1: 411- 416.

Azzi A, Cesaro S, Laszlo D, Zakrzewska K, Ciappi S. Human polyomavirus BK (BKV) load and haemorrhagic cystitis in bone marrow transplantation patients. *J Clin Virol* 1999; 14 (2): 79 – 86.

Bedi A, Miller CB, Hanson JL, Goodman S, Ambinder RF, Charache P *et al.* Association of BK virus with failure of prophylaxis against haemorrhagic cystitis following bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 1995; 13: 1103 –1109.

Boeckh M, Bowden RA, Goosrich JM, Pettinger M, Meyers JD. Cytomegalovirus Antigen detection in peripheral blood leukocytes after allogeneic marrow transplantation. *Blood* 1992; 80 (5): 1358 – 1364.

Boeckh M, Woogerd PM, Stevens-Ayers T, Ray CG, Bowden RA. Factors influencing detection of quantitative cytomegalovirus antigenemia. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 832-834.

Boeckh M, Boivin G. Quantitation of Cytomegalovirus: methodologic aspects and Clinical Applications. *Clin. Microbiol* 1998; 11(3):533-554.

Boeckh M, Bowden RA, Gooley T, Myerson D, Corey L. Successful modification of a *pp65* antigenemia-based treatment strategy for prevention of CMV disease in allogeneic marrow transplant recipients. *Blood* 1999; 93: 1781-1782, (letter).

Bogdanovic G, Priftakis P, Taemmeraes B, Gustafsson A, Flaegstad T, Winiarski J. *et al.* Primary BK virus (BKV) infection due to possible BKV transmission during bone marrow transplantation is not the major cause of hemorrhagic cystitis in transplanted children. *Pediatr Transplant* 1998; 2 (4): 288 – 293.

Bonon SH A, Menoni SMF, Rossi CL, de Souza CA, Vigorito AC, Costa D, Costa SCB *et al.* Surveillance of Cytomegalovirus infection in haematopoietic stem cell transplantation patients. *Journal of Infection* 2005; 50 (2): 130-137.

Boubenider S, Hiesse C, Marchand S, Hafı A, Kriaa F, Charpentier B. *et al.* Post – transplantation polyomavirus infections. *J of Nephrology* 1999;12: 24-29.

Brennan DC. Cytomegalovirus in renal transplantation. *J.Am. Soc. Nephrol* 2001; 12: 848-855.

Camargo LFA, Granato CFH, Tomyiama HT, Cobo E, Ajze H, Pestana JOM. *et al.* Infecção pelo citomegalovirus em pacientes submetidos a transplante renal: estudo de 20 casos. *Jornal Brasileiro de Nefrologia* 1996; 18 (2): 130-136.

Chan PKS, IP KWY, Shiu SYW, Chiu EK, Wong MP, Yaen KY. Association between polyomaviruria and microscopic haematuria in bone marrow transplant recipients. *Journal of infections* 1994; 29: 139-146.

Childs R, Sanchez C, Engler H, Pressus J, Rosenfeld S, Dunbar C. et al. High incidence of adenovirus and polyomavirus – induced haemorrhagic cystitis in bone marrow allotransplantation for hematological malignancy following T cell depletion and cyclosporine. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22: 889 – 893.

Costa FF, Costa SCB. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR): princípios e aplicações clínicas. *Rev. Bras. Reumatol* 1992; 32: 142-146.

Costa SCB. Infecção por citomegalovírus (CMV); epidemiologia, diagnóstico e tratamento. *Revista Brasileira de Clínica* 1999; 25(1): 18-28.

Demmler GJ, Buffone GJ, Schimbor, CM *et al.* Detection of cytomegalovirus in urine from newborns by using polymerase chain reaction DNA amplification. *J Infect Dis* 1988; 158: 1177 – 1184.

Drachenberg RC, Drachenberg CP, Papadimitriou JC. Morphologic spectrum of polyomavirus disease in renal allografts: diagnostic accuracy of urine cytology. *Am J Transplant* 2001; 1:373.

Drachenberg CB, Hirsch HH, Ramos E, Papadimitriou PC. Polyomavirus disease in renal transplantation: Reviews of pathological findings and diagnostic methods. *Human Pathology* 2005; 36: 1245 – 1255.

Drago WR, Aragone MG, Lugani C. Cytomegalovirus infection in normal and immunocompromised humans. *Dermatology* 2002; 200: 189-195.

Einsele H, Ehninger G, Hebart H. Polymerase chain reaction monitoring reduces the incidence of cytomegalovirus disease and the duration and side effects of antiviral therapy after bone marrow transplantation. *Blood* 1995; 86: 2815- 2824.

Erice A, Holm MA, Sanjuan MV, Dunn DL, Gill PC, Balfour JR. Evaluation of CMV-vue antigenemia assay for rapid detection of cytomegalovirus in mixed-leukocyte blood fractions. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1014-1015.

Fioriti D, Videtta M, Mischitelli M, Decener AM, Russo G, Giordano A *et al.* Human polyomavirus BK: potential role in cancer. *J of Cellular Phys* 2005; 204: 402-406,.

Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet* 1971; 1:(7712). 1253-1257.

Gerna G, Zipeto EM, Percivall E, Párea M, Revello MG, Maccario R, Peri G, Milanesi G. Human cytomegalovirus infection of the major leukocyte subpopulations and evidence for initial viral replication in polymorphonuclear Leukocytes from viremic patients. *J Infect Dis* 1992; 166: 1236-1244.

Gondo H, Minematsu T, Harada M. Cytomegalovirus (CMV) antigenemia for a rapid diagnosis and monitoring of CMV-associated disease after bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 1994; 86 (1): 130-137.

Griffiths PD, Clark DA, Emery VC. Betaherpesviruses in transplant recipients. *J Antimicrobiol Chem* 2000; 45: 29 – 34.

Hilleman MR. Discovery of simian virus 40 (SV40) and its relationship to poliomyelitis virus vaccines. *Dev Bio Stand* 1998; 94: 183 – 190.

Hirsch HH, Steiger J. Polyomavirus BK. *Lancet Infect Diseases* 2003; 3: 611 – 623.

Hirsch HH. Bk virus: Opportunity make a pathogen. *Clinical Infectious Diseases* 2005; 41: 354 – 360.

Ho M. Epidemiology of Cytomegalovirus Infections. *Rev Infect Dis* 1990; 12 (7): 701 – 710.

Ho M. Principles and practice of infections disease: Cytomegalovirus. 2 Ed. New York 1991; Churchill Livingstone, p. 1159-1172.

Holman CJ, van Burik JH, Hinrichs, SH. Specific detection of human BK polioma vírus in urine sample of immunocompromised patients. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2003; 10 (1):66-69.

Hoz RE, Stephens G, Sherlock C. Diagnosis and treatment approaches to CMV infections in adult patients. *Journal of Clinical Virology* 2002; 25: 1-12.

Itoh S, Irie K, Nakamura Y, Yoshiataka O, Haratake A, Morimatsu M. Cytologic and genetic study of polyomavirus - infected or polioma vírus – activated cells in human urine. *Arch. Pathol Lab Med* 1988; 122: 333 – 337.

Jiwa NM, Van Gemert GW, Raap AK, Van der Rijke FM, Mulder A, et al. Rapid detection of human cytomegalovirus DNA in peripheral blood leukocytes of viremic transplant recipients by the polymerase chain reaction. *Transplantation* 1989; 48: 72-76.

Kang YN, Han SM, Park KK, Jeon DS, Kim HC. BK virus infection in renal allograft recipients. *Transplantation Proceedings* 2003; 35: 275 – 277.

Knowles WA, Pipkin P, Andrews N. Population- based study of antibody to human polyomaviruses BK and JC and the Simian polioma vírus SV40. *J Med Virol* 2003; 71: 115 – 123.

Kwak EJ, Vicchez RA, Randhawa PS, Butel JS. Pathogenesis and management of polioma vírus infection in transplant recipients. *Clinical Infectious Disease* 2002; 35 : 1081-1087.

Lee GW, Lee JH, Choi SG . Hemorrhagic Cystitis following allogenic hematopoietic cell transplantation. *J Korean Med Sci* 2003; 18: 191-195.

Leung AY, Suen CK, Lie AK, Liang Rh, Yuen KY, Kwong YL. Quantification of polioma vírus BK viruria in hemorrhagic cystitis complicating bone marrow transplantation. *Blood* 2001; 98: 1971-8.

Leung AY, Suen CK, Lie AK, Liang Rh, Yuen KY, Kwong YL. Clinicopathological features risk factors of clinically overt haemorrhagic cystitis complicating bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 2002; 29: 509-513.

Lin PL, Vats AN, Green M. BK virus infection in renal transplant recipients. *Pediatr Transplant* 2001; 5 (6): 398 – 405.

Ljungman P. Prevention and treatment of viral infections in stem cell transplant recipients. *British Journal of Haematology* 2002-a; (118): 44-57.

Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of Cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clinical infectious Diseases* 2002-b; 34: 1094-1097.

Lo CY, YUEN KY, Lui SL, Li FK, Chan TM, Lo WK and Cheng IK. Diagnosing cytomegalovirus disease in CMV seropositive renal allograft recipients: a comparison between the detection of CMV DNAemia by polymerase chain reaction and antigenemia by CMV pp65 assay. *Clin Transplant* 1997; 11: 286-293.

Mas SB. Detecció; caracterització dels poliomavírus presents en la població a partir de mostres ambientals [Tese-Doutorado]. Barcelona: Universitat de Barcelona – Facultat de Biologia – Departament de Microbiologia 2003.

Myers JB, Amsterdam D. The laboratory diagnosis of Cytomegalovirus infections. *Immunol Invest* 1997; 26 (3): 383-394.

Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi JS. Human Herpesviruses. Ed. *Medical Microbiology* 1998; p. 419-438.

Niubó J, Perez JL, Martinez-Lacasa JT, Garcia A, Roca J, Fabregat J. et al. Association between quantitative cytomegalovirus antigenemia with symptomatic infection in solid organ transplant patients. *Diagn. Microbiol. Infec* 1996; Dis. 24: 19-24.

Pannuti CS. Infecção por CMV. Revisão e ensaios. *Pediat* 1984; São Paulo (6) : 144 – 153.

Pannuti CS, Kallás EG, Muccioli C, Roland RK, Ferreira EC, Bueno MHS. et al. Cytomegalovirus Antigenemia in Acquired Immunodeficiency Syndrome Patients With Untreated Cytomegalovirus Retinitis. *Am J of Ophthalmology* 1996;122: 847-852.

Paya CV, Smith TF, Razonable RR. Role of the laboratory in Diagnosis and management of cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell and solid organ transplant recipients. *J.Clin. Microbiology* 2002; 746-752.

Peinemann F, Villiers EM de, Dorries K, Adams O, Vogeli TA, et al. Clinical course and treatment of haemorrhagic cystitis associated with BK type of human polyomavirus in nine paediatric recipients of allogeneic bone marrow transplants. *Eur. J. Pediatr* 2000; 159: 182-188.

Priftakis P, Bogdanovic G, Kokhaei P, Mellstedt H, Dalianis T. et al. BK virus (BKV) quantification in urine samples of bone marrow transplanted patients is helpful for diagnosis of hemorrhagic cystitis, although wide / individual variations exist. *Journal of Clinical Virology* 2003; 26: 71-77.

Randhawa PS, Finkelstein S, Scantlebury V. Human polyoma virus – associated interstitial nephritis in the allograft kidney. *Transplantation* 1999; 67: 103-109.

Randhawa PS, Baksh F, Aoki N. et al. JC virus infection in allograft kidneys: analysis by polymerase chain reaction and immunochemistry. *Transplantation* 2001; 71: 1300-1303.

Randhawa PS, Khaleel-Ur-Rehman K, Swalsky PA. et al. DNA sequencing of viral capsid protein VP-1 region in patients with BK virus interstitial nephritis. *Transplantation* 2002.;April, 73(7): 1090-4.

Razonable R R, Paya CV, Smith TF. Role of the laboratory in diagnosis and management of Cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell and solid-organ transplant recipients. *Journal Clinical Microbiology* 2002; 40 (3): 746-752.

Razonable RR, Rivero A, Brow RA. Detection of simultaneous  $\beta$ - herpesvirus infections in clinical syndromes due to defined cytomegalovirus infection. *Clin Transpl* 2003; 17: 114-120.

Roizman B. Enhanced: Redefining Virology. *Sciences* 2000; 288 (5457): 2327 – 2334.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Erlich HA. Enzymatic amplification of beta globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anaemia. *Science* 1985; 230: 1350-1354.

Saiki RK, Faloona F, Erlich HA. Primer - directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-491.

Santos RLS, Manfrinatto JA, Cia EMM, Carvalho RB, Quadros KRS, Alves-Filho G. et al . Urine Cytology as a screening method for polyoma vírus active infection. *Transplantation Proceedings* 2004; 36: 899-901.

Sempere FJV , Rubio L, Baylach MJM. et al. Polymerase Chain Reaction detection of BK vírus and monitoring of BK nephropathy in renal transplant recipients at the University Hospital La Fé. *Transplantation Proceedings* 2005 ;70-3773.

Sencer SF, Haake RJ, Weisdorf DJ. Haemorrhagic cystitis after bone marrow transplantation. *Transplantation* 1993; 56: 875 – 879.

Shah KV, Fields BN, Knipe DM, Howley PM. Polyomaviruses. *Fundamental Virology* 1996; Ed .Philadelphia: Lippincott - Raven . (2): 2027-2043.

Sia IG and Patel R. New strategies for prevention and therapy of Cytomegalovirus infection and disease in solid-organ transplant recipients. *Clinical Microbiology Reviews* 2000; 13 (1): 83-121.

Solano S, Muñoz I, Gutiérrez A, Farga A. Qualitative Plasma PCR Assay (AMPLICOR CMV Test) versus pp65 Antigenemia Assay for Monitoring Cytomegalovirus Viremia and Guiding Preemptive Ganciclovir Therapy in Allogeneic Stem Cell Transplantation. *J Clin Microbiol* 2001; 39 (11): 3938-3941.

Stinski MF. Cytomegaloviruses and its replication. *In: Fields BN, Knipe DN (editors). Virology* 1990; 2. ed. *Raven Press*: New York, 1950-80.

The TH, Van der Bij W, Van der Berg, A.P.; Van der Giessen M, Weits J, Sprenger HG. Van son WJ. Cytomegalovirus Antigenemia. *Infect. Dis* 1990; 12(7): 737-744.

The TH, Van der Ploeg M, Van der Berg AP. Direct detection of cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes: a review of the antigenemia assay and polymerase chain reaction. *Transplantation* 1992; 54(2): 193-198.

The TH, Van der Berg WJ, Van Son IJ. Monitoring for Cytomegalovirus after organ transplantation: a clinical perspectiva. Transplantation Proceedings 1993; 5 (25): 5-9, suppl 4.

The TH, Van der Berg AP, Harmsen MC, Van der Bij W, Van Son WJ. The cytomegalovirus antigenemia assay: a plea for standardization. Scand. J. Infect 1995; 99: 25-29.

Tognon M, Corallini A, Martini F, Negrini M. Oncogenic transformation by BK virus and association with human tumors. Oncogene 2003; 22 (33): 5192 -5200.

Van der Berg, AP, Klompaker IJ, Haagsma EB. Antigenemia in the Diagnosis and Monitoring of Active Cytomegalovirus Infection after Liver Transplantation. J Infect Dis 1991;164: 265-270.

Van der Bij W, Torensma R, Van Son WJ, Tegzess AM. The Rapid immunodiagnosis of active cytomegalovirus infection by monoclonal antibody staining of blood leukocytes. J Med Virol 1988; 25, 179 -188.

Van der Bij W, Van Son WJ, Van der Berg APM, Tegzess AM, *et al.* Cytomegalovirus (CMV) Antigenemia : Rapid Diagnosis and Relationship with CMV – Associated Clinical Syndromes in Renal allograft recipients. Transplant Proc 1989; 21 (1): 2061-2064.

Van der Bij W, Speich R. Management of Cytomegalovirus infection and disease after solid-organ transplantation. Clinical Infectious Diseases 2001;33 (1): 33-37

Van der Merr JTM, Drew LW, Bowden RA. Summary of the International consensus symposium on advances in the diagnosis, treatment and prophylaxis of Cytomegalovirus infection. Science 1996; 32: 119-140.

Veronique E, Barry S, Lawrence C, Jennifer N. Bk virus infection in hematopoietic stem cell transplant recipients : frequency, risk factors, and association with postengraftment hemorrhagic cystitis. Clinical Infec. Diseases 2004; 39: 1861 – 1865.

Zaia JA, Thomas ED, Blume KG. *Cytomegalovirus Infections*, Beackwell Science 1999; 2. Ed., p. 560-583.

Yen-Liberman B. Diagnosis of Human Cytomegalovirus Disease. *Clinical Microbiology* 2000;Newsletter, 14(22): 105-109.



## ***8- ANEXOS***



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, \_\_\_\_\_

RG: \_\_\_\_\_, aceito colaborar com o estudo “DETECCÃO DO CITOMEGALOVÍRUS E

POLIOMAVÍRUS NA CISTITE HEMORRÁGICA PÓS-TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE

MEDULA ÓSSEA” que será realizado na Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de

Campinas, para a pesquisa da infecção ativa pelo Citomegalovírus Humano, utilizaremos as técnicas de

Antigenemia e Nested-PCR e para a pesquisa da infecção causada pelo Poliomavírus (tipo BK) serão

realizadas técnicas citologia urinária, imunohistoquímica e Nested-PCR. Por isso, sei que colherão amostras

de sangue (4 ml em tubo contendo como anticoagulante EDTA) e urina (em frasco coletor estéril), uma vez

por semana, desde o dia do transplante até 150 dias após o transplante, para a realização dos referidos

exames. Estou ciente de que poderei desistir de participar deste estudo a qualquer hora, e que isto em nada

irá prejudicar o meu tratamento, e a minha colaboração em muito auxiliará os pacientes transplantados e os

que vierem também a serem transplantados. Estou ciente que todos os dados colhidos serão sigilosos, e que

meu nome não será colocado em qualquer publicação.

( ) autorizo o uso deste material em pesquisas futuras, desde que o projeto de pesquisa seja apresentado ao Comitê de Ética para análise e aprovação.

( ) não autorizo o uso deste material em pesquisas futuras.

Campinas, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Paciente ou Responsável

Pesquisador responsável: Carla Aparecida Tavares – tel. (19) 3541-1390 ou 9161.7637

E-mail: carlatavares@linkway.com.br

Orientador (a): Profª Drª Sandra Cecília Botelho Costa - tel. (19) 3289.2351

E-mail: costa@fcm.unicamp.br

Comitê de Ética em Pesquisa – tel. (19) 3788.8936



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
 Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas-SP  
 ☎ (0\_19) 3788-8936  
 FAX (0\_19) 3788-8925  
 🌐 [www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)  
 ✉ cep@fcm.unicamp.br

**PARECER CIRCUNSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA ANALISADO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FCM/UNICAMP**

IDENTIFICAÇÃO		
1. Título do Projeto: Detecção do citomegalovírus e poliomavírus na cistite hemorrágica pós-transplante de medula óssea		
2. Pesquisador Responsável: Carla Aparecida Tavares		
3. Instituição do Pesquisador: FCM/UNICAMP		
4. Local onde será realizada a Pesquisa: Serviço de Transplante de Medula Óssea - HC/UNICAMP		
5. Nº de inscrição no CEP/FCM: 441/2004.	6. Grupo: III	7. Data de apresentação ao CEP: 3/9/2004.

**Comentário:** Verificar o campo 6 da Folha de Rosto.

OBJETIVOS
8. Estudar a presença do citomegalovírus e do poliomavírus nos casos de cistite hemorrágica pós-transplante de medula óssea em pacientes do HC/UNICAMP; estudar a interação entre estes vírus e a possibilidade dos mesmos serem possíveis cofatores para causar a cistite hemorrágica e avaliar o impacto clínico destas viroses no pacientes transplantados de medula óssea.

SUMÁRIO DO PROJETO
9. Serão selecionados 50 pacientes receptores de transplante de medula óssea em seguimento no HC/UNICAMP, dos quais serão colhidas cerca de 20 amostras de sangue e urina para detecção dos vírus estudados, com intervalo aproximado de sete dias entre as coletas. Os exames serão colhidos juntamente com os exames de rotina pós-transplante aos quais o paciente já seria submetido.

**Comentário:** Descrição e caracterização da amostra; Critérios de inclusão e exclusão; Adequação da metodologia; Adequação das condições.

COMENTÁRIOS DO RELATOR
10. O projeto está bem elaborado e os riscos são mínimos já que se resumem a coleta de material. Os resultados obtidos serão de grande relevância para o conhecimento de uma frequente complicação dos transplantes de medula óssea. O TCLE está claro porém falta a informação de que o material coletado será usado exclusivamente para a finalidade desta pesquisa.

**Comentário:** Estrutura do protocolo; Justificativa do uso de placebo; Análise de riscos e benefícios; Adequação do Termo de Consentimento; Orçamento; Outros Centros (no caso de estudo multicêntrico).

PARECER FINAL			
<input checked="" type="checkbox"/> Recomenda a aprovação	<input type="checkbox"/> Com destaque	<input type="checkbox"/> Não recomenda a aprovação	<input type="checkbox"/> Em pendência
11. Deve ser acrescentada ao TCLE a informação de que o material coletado será utilizado somente para esta pesquisa.			

**Comentário:** Marque aqui se desejar que o projeto seja discutido em plenária.

Campinas, 13 de setembro de 2004.	Nome e assinatura do(s) membro(s) relator(es) do CEP:
-----------------------------------	---

**Comentário:** Em caso de não aprovação, retornar ao CEP duas cópias deste Formulário, uma identificada e outra não.

**Comentário:** Explicitar a pendência no campo 11 abaixo, e retornar ao CEP duas cópias deste Formulário, uma identificada e outra não.