



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS**

DOROTÉA DE FÁTIMA LOBATO DA SILVA

**“CITOMEGALOVÍRUS: DIVERSIDADE GENÉTICA E PESQUISA DE
RESISTÊNCIA ANTIVIRAL EM PACIENTES IMUNODEFICIENTES DA CIDADE
DE BELÉM”**

Belém - Pará

2015

DOROTÉA DE FÁTIMA LOBATO DA SILVA

“CITOMEGALOVÍRUS: DIVERSIDADE GENÉTICA E PESQUISA DE RESISTÊNCIA ANTIVIRAL EM PACIENTES IMUNODEFICIENTES DA CIDADE DE BELÉM”

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical, área de concentração Patologia Tropical da Universidade Federal do Pará.

Orientadora: Prof^a. Dra. Rita Catarina Medeiros Sousa

Belém - Pará

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto Evandro Chagas

Silva, Dorotéa de Fátima Lobato da.

Citomegalovírus: epidemiologia, diversidade genética e pesquisa de resistência antiviral em pacientes imunodeficientes da cidade de Belém / Dorotéa de Fátima Lobato da Silva. – Belém, 2015.

150 f.: il.; 30 cm

Orientadora: Dra. Rita Catarina Medeiros de Sousa

Tese (Doutorado em Doenças Tropicais) – Universidade Federal do Pará, Núcleo de Medicina Tropical, 2015.

1. Citomegalovírus. 2. Resistência antiviral. 3. Imunodeficiência. 4. Soroprevalência. 5. Mutação. I. Sousa, Rita Catarina Medeiros de, *orient.* II. Universidade Federal do Pará. III. Título.

CDD: 616.925

DOROTÉA DE FÁTIMA LOBATO DA SILVA

“CITOMEGALOVÍRUS: DIVERSIDADE GENÉTICA E PESQUISA DE RESISTÊNCIA ANTIVIRAL EM PACIENTES IMUNODEFICIENTES DA CIDADE DE BELÉM”

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de Doutor em Doenças Tropicais.

.

Banca examinadora:

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rita Catarina M. Sousa
Núcleo de Medicina Tropical/UFPA

Membro: Prof. Dr. Raimundo Nonato Leão
Universidade do Estado do Pará/UEPA

Membro: Prof^a. Dr^a. Joana D'arc Mascarenhas
Instituto Evandro Chagas/SVS/MS

Membro: Prof^a. Dr^a. Hellen Fuzii
Núcleo de Medicina Tropical/UFPA

Membro: Prof^a. Dr^a. Irna do Rosário Carneiro
Núcleo de Medicina Tropical/UFPA

Membro Suplente: Prof^a. Dr^a. Ivone Gabbay
Instituto Evandro Chagas/SVS/MS

Aprovada em: 17 /07/2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS de todo meu coração por mais essa vitória concedida, pois sem ELE nada poderia ser ou acontecer.

Meus sinceros agradecimentos a minha família, em especial minha mãe que muito orou por mim em tempos difíceis, assim como meu pai e minhas irmãs.

Meus agradecimentos ao meu marido e filhas que por muitas vezes em que me ausentei mais do que devia não reclamavam da minha "ausência".

Meus agradecimentos à direção do Instituto Evandro Chagas por conceder a oportunidade de executar o projeto utilizando a estrutura de laboratórios, técnicos, equipamentos e toda logística necessária para desenvolver esse trabalho.

Agradeço à Dra. Iracina Jesus, chefe da SAMAM/IEC pela amizade e compreensão em momentos difíceis durante o desenvolvimento do trabalho.

Meus agradecimentos à direção e aos profissionais dos hospitais João de Barros Barreto, Ofyr Loyola e Jean Bitar que direta ou indiretamente contribuíram para execução inicial desta tese.

Meus agradecimentos aos voluntários da pesquisa, pela participação, sem a qual era humanamente impossível acontecer.

Meus agradecimentos a Dra. Professora Conceição do Núcleo de Medicina Tropical, pessoa humana e amiga que muito me incentivou a levar à diante o trabalho quando eu pensava em desistir.

Agradeço aos meus colegas de trabalho: Marluce, Fernanda, Nádia, Leda, Madson, Arlete, Ari e aos técnicos do Laboratório de Virologia da SAMAM/IEC que nos ajudaram na execução das técnicas sorológicas.

Agradeço à Dra. Rita Medeiros pela contribuição dada como orientadora do trabalho e pela parceria em projeto de pesquisa desenvolvido no decorrer da tese.

Agradeço ao Dr. Márcio, responsável pelo CIT pela contribuição técnica fundamental em uma das etapas do trabalho para responder meu principal objetivo.

Agradeço aos técnicos e bioinformatas do CIT Sandro Patroca e Jedson Cardoso pela execução técnica da etapa de sequenciamento e auxílio na análise dos resultados.

Agradeço a bibliotecária Vânia e sua equipe pela colaboração na tradução do resumo, revisão bibliográfica e execução de ficha catalográfica, necessários para o escopo da tese.

A todos, meus sinceros agradecimentos.

A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.

Galileu Galilei

RESUMO

O citomegalovírus (CMV) é uma das principais causas de morbimortalidade em pacientes imunodeprimidos, devido seu mecanismo de latência e reativação que comumente ocorre nas imunodeficiências. Análises genéticas demonstram que a virulência das cepas pode estar relacionada à diversidade genotípica. O principal objetivo desse estudo foi descrever o perfil soropidemiológico e a diversidade genética do CMV por meio da detecção mutações que conferem resistência viral ao ganciclovir em pacientes imunodeficientes da cidade de Belém. Foi analisado um total de 672 amostras, sendo: 243 portadores do HIV/aids, 257 pacientes neoplásicos, 112 transplantados renais e 60 portadores de LES. A soroprevalência de anticorpos para o CMV foi correspondente a 96,1% e os índices de infecção ativa de 2,4% (n=16) inferior ao observado pelo método da qPCR que correspondeu a 15,63%. As diferenças nos índices de infecção deve-se a baixa sensibilidade (5,71%) do método sorológico comprovado no *Screening Test*. A pesquisa de mutações foi feita em 82 amostras pelo método do pirosequenciamento, sendo amplificado um fragmento de 741pb do gene UL97, entre os nucleotídeos 1087 – 1828. Foi observado que 100% (n=82) das amostras apresentavam duas mutações com alteração de aminoácidos, no códon 596 (E596K), e outra no códon 604 (S604F). A mutação S604F não foi encontrada em outras sequências virais do geneBank. Outras dez mutações ocorreram entre os códons 377 e 594 em oito amostras, entre elas a mutação A594V em um paciente transplantado renal que evoluiu a óbito. Concluiu-se que a prevalência de anticorpos e o perfil epidemiológico do grupo foram equivalentes aos observados em populações de países em desenvolvimento; os índices de infecção viral estão relacionados à reativação viral, sendo subestimados pela sorologia; a análise de sequência demonstrou importante diversidade genética nas amostras examinadas; a detecção da mutação A594V sugere circulação de cepas com mutação de resistência.

Palavras chaves: Citomegalovírus; resistência antiviral; imunodeficiência; soropidemiologia.

ABSTRACT

Cytomegalovirus (CMV) is one of the most common cause of morbidity and mortality in immunocompromised patients because its latency and reactivation mechanism that commonly occurs in immunodeficiencies. Genetic analysis showed that the virulence of the strains may be related to genotypic diversity. The main objective of this paper was to describe the seroepidemiology profile and genetic diversity of CMV by detecting mutations that confer viral resistance to ganciclovir in immunodeficient patients from Belém city. A total of 671 samples were analyzed: 243 HIV/AIDS, 257 neoplastic patients, 112 kidney transplant and 60 people with SLE. The seroprevalence of antibodies was 96.1% and active infection and levels of 2.4% (n = 16) lower than that observed by qPCR method which corresponded to 15.63%. Differences in infection rates due to low sensitivity (5.71%) of the serological method demonstrated in screening test. The mutation research was made in 82 samples for pyrosequencing method, a 741pb segment of the UL97 gene was amplified, between 1087-1828 nucleotides. It was observed that 100% (n = 82) of samples had two mutations in amino acid in codon 596 (E**596**K) and another one in codon 604 (S**604**F). The S**604**F mutation was not found in other viral sequences from GenBank. Ten other mutations occurred between codons 377 and 594 in eight samples, including the A**594**V mutation in a renal transplant patient who ended up dying. It was concluded that the prevalence of antibodies and the epidemiological profile of the group were similar to those observed in populations of developing countries; the viral infection rates are related to viral reactivation, being underestimated by serology; sequence analysis revealed significant genetic diversity in the samples examined; detection of A**594**V mutation suggests circulating strains with resistance mutation.

Key words: Cytomegalovirus; antiviral resistance; immunodeficiency; seroepidemiology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Pag
Figura 1. Representação gráfica da partícula viral do HCMV	9
Figura 2. Representação esquemática das regiões única longa e única curta	10
Figura 3. Estrutura do HCMV	11
Figura 4. Mecanismo de fusão vírus-célula através de receptores de membrana e glicoproteínas virais	15
Figura 5. Mecanismo de infecção HCMV na célula hospedeira	16
Figura 6. Mecanismo de ação dos antivirais para tratamento da infecção por HCMV	34
Figura 7. Apresentação das mutações de resistência em ambos os genes UL97 e UL54	39
Figura 8. Regiões conservadas do gene UL97 representadas em algarismos romanos	41
Figura 9. Cone e Barrete do Kit VIDAS [®] BIOMÉRIEUX	54
Figura 10. Esquema de reação da qPCR	57
Figura 11. Equipamento 7500 Real Time PCR, fabricante Applied Biosystem [®]	58
Figura 12. Curva de amplificação em tempo real das amostras analisadas	73
Figura 13. Gel de agarose 1,5% apresentando o produto da 2 ^a . reação de amplificação para o sequenciamento	81
Figura 14. Gel de agarose 1,5% apresentando o produto da 3 ^a . reação de amplificação para o sequenciamento	81

LISTA DE QUADROS

	Pag
Quadro 1. Agrupamento das glicoproteínas em complexos proteicos de alto peso molecular.	12
Quadro 2. Principais medicamentos utilizados no tratamento da infecção viral por HCMV.	35
Quadro 3. Condições de reação para amplificação dos segmentos do gene UL97 para o sequenciamento.	60
Quadro 4. Sequências dos iniciadores da reação de PCR do sequenciamento genômico parcial do gene UL97.	61
Quadro 5. Fatores de riscos favoráveis ao desenvolvimento da doença por HCMV entre os grupos de pacientes com imunodeficiência, Belém-Pará.	69
Quadro 6. Manifestações clínicas referidas pelos pacientes com imunodeficiência, Belém-Pará.	70
Quadro 7. Distribuição de anticorpos anti-HCMV nos grupos estudados de acordo com o sexo, Belém-Pará	72
Quadro 8. Distribuição de anticorpos de acordo com a faixa etária.	73
Quadro 9. Comparação entre os dados clínicos e laboratoriais qualitativos e quantitativos dos pacientes com imunodeficiência, Belém-Pará.	78
Quadro 10. Comparação entre a presença de manifestações clínicas e dados laboratoriais dos 50 pacientes que faleceram	80
Quadro 11. Mutações nucleotídicas detectadas no gene UL97 com alteração aminoácida nas amostras dos pacientes com imunodeficiência, Belém-Pará.	83
Quadro 12. Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes, relacionados aos genótipos e a mortalidade.	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Aspectos socioeconômicos identificados nas fichas epidemiológicas dos 672 pacientes com imunodeficiência, Belém-Pará.	68
Tabela 2.	Comparação dos perfis sorológicos entre os grupos de pacientes com imunodeficiência, Belém-Pará.	71
Tabela 3.	Comparação dos valores da carga viral entre os diferentes grupos de pacientes com imunodeficiência de Belém-Pará.	75
Tabela 4.	Comparação dos resultados qualitativos de infecção ativa por ambos os métodos laboratoriais nos grupos estudados.	76
Tabela 5.	Análise de sensibilidade e especificidade do método sorológico com método molecular no <i>Screening Test</i> (Teste do Crivo).	77
Tabela 6.	Comparação dos valores da carga viral do HCMV de acordo com a presença de manifestações clínicas referida pelos pacientes com imunodeficiência de Belém-Pará.	79

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
REFERENCIAL TEÓRICO	4
1. EPIDEMIOLOGIA DO CITOMEGALOVÍRUS	4
2. CITOMEGALOVÍRUS HUMANO	8
2.2 MECANISMOS DE INFECÇÃO E LATÊNCIA VIRAL	14
2.3 INFECÇÃO VIRAL EM PACIENTES IMUNODEPRIMIDOS	20
2.3.1 Infecção por HCMV em portadores do HIV/aids	21
2.3.2. Infecção por HCMV em portadores de LUPUS	24
2.3.3. Infecção por HCMV em pacientes transplantados	26
2.3.4. Infecção por HCMV em pacientes com câncer	29
2.4 TRATAMENTO	32
2.5 DIVERSIDADE GENÉTICA DO VÍRUS	37
2.5.1 Resistência antiviral	37
2.5.1.1. Caracterização genotípica do HCMV	43
3. JUSTIFICATIVA	47
4. OBJETIVOS	49
4.1. OBJETIVO GERAL	49

4.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
5.	CASUÍSTICA E MÉTODOS	50
5.1.	ASPECTOS ÉTICOS	50
5.2.	CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO	50
5.3.	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	51
5.4.	TAMANHO AMOSTRAL	51
5.5.	OBTENÇÃO DA AMOSTRA	52
5.6.	TÉCNICAS LABORATORIAIS	53
5.6.1	Sorologia	53
5.6.1.1.	Ensaio Imunoenzimático ELISA	53
5.6.1.2.	Teste ELFA	54
5.6.2.	Técnicas moleculares	55
5.6.2.1.	Extração do DNA viral	55
5.6.2.2.	Carga viral do HCMV	56
5.6.2.3.	Detecção de mutações que conferem resistência aos antivirais	59
5.6.2.4.	Reação em cadeia da polimerase - PCR	60
5.6.2.5.	Reação de <i>Nested</i> PCR	60
5.6.2.6.	Eletroforese	61
5.6.2.7.	Purificação dos produtos de PCR para o sequenciamento	62

5.6.2.8.	Reação de pirosequenciamento	63
5.6.2.9.	Análise computacional e montagem dos genomas obtidos por pirosequenciamento	65
5.7.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	66
6.	RESULTADOS	67
6.1.	DADOS SÓCIO-ECONÔMICOS	67
6.2.	RESULTADOS LABORATORIAIS	70
6.2.1.	Resultados das análises sorológicas	70
6.2.2.	Resultados das análises moleculares	80
7	DISCUSSÃO	87
8.	CONCLUSÕES	96
9	REFERÊNCIAS	98
	APÊNDICE	124
	ANEXOS	125

INTRODUÇÃO

O citomegalovírus humano (HCMV) é um dos principais agentes causadores de infecções congênitas, perinatais, infecções adquiridas na infância e idade adulta. A infecção primária pode ocorrer por vias naturais ou iatrogênicas (MENDRONE Jr., 2010). Quando a transmissão ocorre na fase do desenvolvimento intrauterino, é considerada pré-natal ou vertical e pode causar infecção congênita; se ocorrer no momento do nascimento ou nas primeiras mamadas, a transmissão é denominada de perinatal e, na fase mais tardia do nascimento, denomina-se transmissão pós-natal ou horizontal.

A capacidade de infectar o organismo humano em diferentes períodos da vida do indivíduo deve-se a vários fatores, tais como: fatores socioeconômicos, latência do vírus no organismo, elevada endemicidade e a presença do agente em diversos fluidos orgânicos (REYNOLDS *et al.*, 1973; LANG; KUMMER, 1975; STAGNO *et al.*, 1980; ALFORD; BRITT, 1996; PANNUTI, 2009).

O vírus apresenta características importantes e determinantes das infecções virais nas imunodeficiências devido à permanência no organismo em estado de latência, sendo responsável por ocasionar infecções secundárias (DINIZ; VAZ, 1988; TAYLOR-WIEDEMAN *et al.*, 1991; MOCARSKI, 1996; PASS, 2002).

A infecção recorrente é um tipo de infecção secundária ocasionada por reativação da cepa endógena, mas em alguns casos, também é possível a ocorrência de reativação viral por cepa exógena quando a via é iatrogênica. A reativação viral é comum em indivíduos imunodeficientes como transplantados, portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), pacientes com câncer em tratamento de quimioterapia, paciente com LES (lupus eritematoso sistêmico) e

mulheres grávidas com prejuízos graves para o feto em desenvolvimento, principalmente, no primeiro trimestre de gravidez (CHOU, 1986; GAYTANT *et al.*, 2003, OLIVEIRA *et al.*, 2011). A infecção viral pode comprometer diversos sistemas do organismo como o visual, gastrointestinal, respiratório, sistema nervoso central (SNC) entre outros (DREW, 1988, 1992; BRITT; ALFORD, 1996; LIMA *et al.*, 2000, CARAN *et al.*, 2000, MARIGUELA *et al.*, 2008).

Através dos métodos moleculares é possível compreender o mecanismo da infecção por HCMV, diferenciar infecções recorrentes por reativação de cepas endógenas ou exógenas, realizar o diagnóstico com maior precisão dos casos onde os sinais e sintomas clínicos da infecção viral podem ser confundidos com a doença de base, ou ainda diagnosticar a doença em suas formas subclínicas (CONCEIÇÃO; FOCACCIA; VERONESI, 1996; BRITT; ALFORD, 1996; SILVA *et al.*, 2005).

Outros aspectos importantes dessas ferramentas de análise é o uso de dados moleculares para compor a epidemiologia do HCMV, classificar os genótipos das cepas circulantes em determinadas áreas geográficas, identificar mutações que causam resistência aos medicamentos administrados na terapia antiviral entre outros.

O tratamento geralmente envolve várias opções como: a terapia combinada de antivirais, a introdução de imunoglobulinas e a redução da imunossupressão (BALISTRERI, 2010). A escolha da droga a ser utilizada depende da gravidade, do local da doença, da resistência ao medicamento, do grau de imunossupressão, e se a doença refere-se a primoinfecção ou reativação viral. Os antivirais mais comumente utilizados no tratamento intensivo contra o citomegalovírus são: ganciclovir, forcartet e cidofovir (CHOU *et al.*, 1999; ERICE, 1999; BALFOUR,

1999). Sendo o ganciclovir a primeira droga licenciada para o tratamento da citomegalovirose e é o único liberado para uso na rede pública.

Têm sido registrada resistência de cepas virais do citomegalovírus a esses medicamentos. Essa resistência geralmente ocorre em dois genes alvos, UL97 e UL54 e é devido à presença de mutações que levam o paciente a não responder ao tratamento de forma eficaz (SMITH *et al.*, 1997).

A infecção viral e a resistência medicamentosa associada à baixa imunidade são fatores de risco que contribuem para elevar a morbimortalidade em pacientes com imunodeficiência (LURAIN; CHOU, 2010), sendo necessários métodos laboratoriais adequados, como as análises por RFLP e sequenciamento, que possam detectar mutações e genótipos de resistência aos antivirais.

Todos os fatores acima relacionados são críticos e ressaltam a importância da realização de um estudo sobre a pesquisa de mutações e genótipos de resistência ao ganciclovir em pacientes com imunodeficiência, o qual poderá contribuir com a saúde pública de nosso Estado a fim de subsidiar a introdução de medicamentos alternativos no tratamento da citomegalovirose, nesse grupo de pacientes, tendo como benefício à redução no período de internação e o aumento na expectativa de vida dos pacientes.

REFERENCIAL TEÓRICO

1. EPIDEMIOLOGIA DO CITOMEGALOVÍRUS

O HCMV é um vírus endêmico, não sazonal, altamente prevalente no mundo, com especial predomínio de anticorpos em países em desenvolvimento da América Latina e países Africanos (PANNUTI, 1996; 2009).

De acordo com os dados soropidemiológicos, há uma relação proporcionalmente inversa entre a susceptibilidade das populações humanas e o status socioeconômico. Grupos populacionais com nível socioeconômico elevado apresentam maior susceptibilidade e, conseqüentemente, menor imunidade ao vírus, ao passo que indivíduos de baixo poder aquisitivo apresentam maior imunidade e menor susceptibilidade à doença (STAGNO *et al.*, 1982; PANNUTI *et al.*, 1985; LINHARES *et al.*, 1989).

A transmissão do vírus pode ocorrer de várias maneiras: no ventre materno através da placentária, também conhecida como transmissão vertical, a qual ocorre de mãe para filho durante o desenvolvimento fetal, ocasionando a infecção congênita com índices que varia entre 0,3 a 2,2%. Outra forma de infecção é a perinatal, onde a transmissão ocorre através da cérvix uterino ou através do leite materno. A transmissão ocorre durante a passagem da criança no canal de parto ou logo após o nascimento por meio da amamentação, com frequência estimada entre 5 e 20% dos casos. As crianças e os jovens são considerados importantes na cadeia de transmissão viral, pois excretam o vírus por longos períodos em grandes quantidades pela urina e saliva, contribuindo para a transmissão do vírus nas diferentes faixas etárias, principalmente para cuidadores de crianças. No período

pós-natal, a transmissão sexual passa a ser a principal forma de transmissão horizontal, principalmente na puberdade, quando se dá início a vida sexual (VAN DER MEER *et al.*, 1996; CARRARO, 2001).

As maiores taxas de soroprevalência para o HCMV estão entre as populações procedentes de países em desenvolvimento, variando entre 80 – 100%, e em populações de países desenvolvidos com taxas compreendidas entre 40 - 60% (PANNUTI, 1984; 1996; 2009; SANTOS *et al.*, 2002; JUNQUEIRA; SANCHO; SANTOS, 2008). De acordo com Pannuti (2009), as taxas de soroprevalência não estão relacionadas à distribuição geográfica, mas ao nível socioeconômico das populações.

Investigações conduzidas desde a década de 1960 sobre epidemiologia viral nas diferentes faixas etárias demonstram que a aquisição do vírus inicia nos primeiros anos de vida, ainda no ventre materno. Diversos autores descreveram taxas de infecção congênita por HCMV que variavam entre 0,2% a 3,2% (BIRNBAUN *et al.*, 1969; STARR *et al.*, 1970; HANSHAW, 1971; STAGNO *et al.*, 1977; STAGNO *et al.*, 1980; WEIRICH, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Ahumada-Ruiz *et al.* (2004) observaram que a soroprevalência do citomegalovírus na população adulta da Costa Rica correspondia a 95%, sendo que a infecção primária geralmente ocorria nos primeiros anos de vida do indivíduo. A precocidade na aquisição da infecção pelo HCMV também foi evidenciada em um amplo estudo sobre a frequência de anticorpos anti-HCMV, realizado em Portugal. Esse estudo abrangeu 2.143 amostras onde foi constatado que 77% dos indivíduos estudados já haviam sido infectados pelo HCMV e, aproximadamente, 66% da amostra eram da faixa etária de 2 a 4 anos, confirmando a aquisição da infecção pelo HCMV nos primeiros anos de vida (LOPO *et al.*, 2011).

Outros estudos comprovaram que a prevalência de anticorpos anti-HCMV inicia na infância e aumentam proporcionalmente com a idade, tendo maior predomínio de anticorpos após os 25 anos, estando este aumento relacionado ao início da atividade sexual do indivíduo (PANNUTI, 1984; NICHOLS; BOECKH, 2000).

Nos Estados Unidos, foi estimado que 58,9% dos indivíduos acima de 6 anos de idade são infectados pelo HCMV. Essa estimativa de acordo com Staras *et al.* (2006) é compatível com os índices de soroprevalência em populações da Inglaterra e Alemanha, sendo superior ao observado no Canadá, e inferior ao registrado na Índia, Israel, Chile, Peru e Arábia Saudita. Também foi observado aumento na soroprevalência de anticorpos com aumento na faixa etária dos indivíduos americanos estudados. De acordo com esses autores a taxa de soroprevalência aumenta com a faixa etária, sendo encontrado até 90,8% de frequência de anticorpos em indivíduos com idade ≥ 80 anos nos Estados Unidos.

Um estudo soroepidemiológico realizado em amostras de mulheres grávidas, em crianças e recém-nascidos hospitalizados na Palestina, demonstraram elevada frequência de anticorpos IgG anti-HCMV em 96,6% das mulheres, 88% das crianças hospitalizadas e 98,4% dos recém-nascidos. A infecção por HCMV baseado na sorologia positiva para IgM ocorreu em 11,5% das mulheres grávidas, 11,7% nas crianças e em 2% de recém-nascidos hospitalizados (NEIRUKH *et al.*, 2013). De acordo com Hamdan *et al.* (2011), são registrados na África elevados índices de soroprevalência de anticorpos para o HCMV em mulheres de diversos países africanos como em Benin (97,2%), Egito (96%) e Gambia (87%). Esses autores também encontraram prevalência de anticorpos IgG em gestantes do Sudão correspondente a 72,2%, segundo eles, os países do sudeste africanos tem as maiores prevalências.

Ressalta-se que elevada prevalência de anticorpos IgG anti-HCMV, nem sempre é fator de proteção para certos grupos de pacientes. A ocorrência de infecção na presença de anticorpos anti-HCMV é um fato comumente evidenciado em pacientes com imunodepressão tanto crônica quanto transitória (RASMUSSEN; COWAN, 2003; GANDHI; KHANNA, 2004; SILVA *et al.*, 2005; MATOS; MEYER; LIMA, 2011). Esse fato tem sido evidenciado, principalmente, em casos de infecção congênita, na ocorrência de reativação viral durante o período gestacional (HUANG *et al.*, 1980; SPANO *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2011). Nesse caso, não há consequências graves para a criança, mesmo na presença de anticorpos de infecção pregressa da mãe, antes da concepção, significando que os anticorpos não conferem imunidade completa ao feto contra o vírus, mas podem reduzir a intensidade dos efeitos clínicos da doença (BRITT; ALFORD, 1996; GAYTANT *et al.*, 2003).

No Brasil, alguns trabalhos foram publicados sobre prevalência do HCMV em diferentes faixas etárias e grupos populacionais. Em Santa Catarina foi realizado um estudo por SOUZA *et al.* (2010) em 1045 amostras de doadores de sangue, sendo demonstrado que a prevalência de anticorpos IgG para o HCMV correspondia a 96,45% com o percentual de infecção de 2,3%. Outra análise soropidemiológica realizada em uma comunidade urbana da cidade de São Paulo, Almeida *et al.* (2001) observaram que a idade média de aquisição do citomegalovírus no pós-natal estava compreendida entre 5 meses e 18 anos e que as mulheres em idade fértil, eram as mais vulneráveis à primoinfecção. Nesse estudo foi observado ainda que a prevalência de anticorpos anti-HCMV em crianças de 0-4 anos era de 60% e de 80% em indivíduos adultos com mais de 50 anos. Esses percentuais demonstravam o aumento da prevalência de anticorpos nas faixas etárias mais elevadas.

Na cidade de Belém, Estado do Pará, poucos dados têm sido publicados acerca da prevalência de anticorpos por HCMV. Na década de 1990, foi conduzido um estudo epidemiológico sobre a infecção congênita em 663 recém-nascidos da Maternidade da Santa Casa de Misericórdia do Pará, suspeitos de infecção por citomegalovírus, com base em dois métodos laboratoriais. Foi observado que o índice de infecção nos recém-nascidos por HCMV foi de 2,1% pelo método sorológico, enquanto que os resultados obtidos na mesma análise por isolamento viral, a infecção correspondeu a 3,2% (WEIRICH, 1998).

Estudos mais recentes sobre prevalência de anticorpos realizado por SILVA *et al.* (2011) em pacientes com imunodepressão da cidade de Belém-Pa, demonstraram que a prevalência de anticorpos IgG anti-HCMV nesse grupo de pacientes era de 87%, enquanto que 13% desses anticorpos eram IgM anti-HCMV. Posteriormente, SILVA *et al.* (2013), realizaram outro estudo sobre a distribuição de anticorpos anti-HCMV em mulheres gestantes e mulheres em idade fértil do Município de Juruti-Pa, na faixa etária compreendida entre 14 a 29 anos, correspondendo a 87,8% e 82,3% dos casos, respectivamente. A elevada endemicidade e as características biológicas, somados a fatores socioeconômicos contribuem para a manutenção do perfil epidemiológico do vírus em países em desenvolvimento.

2. CITOMEGALOVÍRUS HUMANO

O HCMV é o maior membro da família *Herpesviridae*, membro da sub-família *Beta-herpesvirinae*, gênero *Citomegalovirus*, também conhecido como herpesvírus humano-5 (HHV-5), vírus da glândula salivar, HCMV ou CMV. Cada partícula de

virion maduro mede em torno de 200 nm, envolto por uma membrana externa que corresponde ao envelope fosfolipídico onde estão localizadas as glicoproteínas responsáveis pela antigenicidade viral (COMPTON, 2004). O envelope delimita uma região amorfa, intermediária, chamada de tegumento a qual contém proteínas importantes para a replicação viral. Mais internamente o vírus apresenta um capsídeo de simetria icosaédrica, composto de 162 capsômeros, que contém o genoma viral (Figura 1) de DNA dupla fita, linear, composto de 230 kpb, totalmente sequenciado, com mais de 190 Regiões codificadoras (Open Reading Frames - ORFs) das proteínas virais (CHEE *et al.*, 1989; RASMUSSEN, 1999; SILVA MCC *et al.*, 2011).

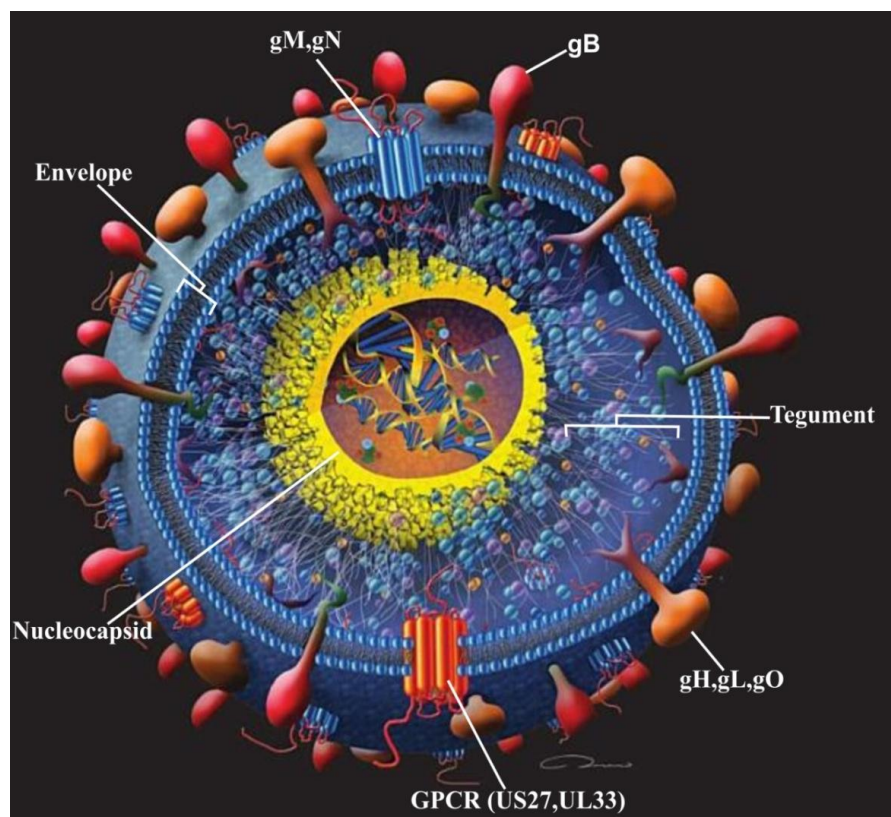


Figura 1. Representação gráfica da partícula viral do HCMV.

Fonte: http://www.books.google.com.br/books/about/cytomegaloviruses_and_their_replication.html)

As partículas virais são termolábeis, com vida média de 45 minutos à 37° C (PANNUTI, 1996), sensíveis a pH baixo, solventes lipídicos e ao calor (MOCARSKI, 1996). Apresenta crescimento e efeito citopático lentos em cultivo celular, sendo que a célula preferencial de cultivo para o vírus é o fibroblasto humano (HUANG *et al.*, 1976; GRIFFITHS, 2002).

A partícula viral é formada por quatro isômeros produzidos pela inversão de duas regiões genômicas (Figura 2) denominadas: região única Longa (UL) e região única Curta (US). A região UL está localizada entre as sequências terminal repetida longa e interna repetida longa (TRL e IRL) e a região US localiza-se entre as sequências terminal repetida curta e interna repetida curta (TRS e IRS) (GRIFFITHS; GRUNDY, 1987; SILVA MCC *et al.*, 2011; McSHARRY; AVDIC; SLOBEDMAN, 2012).

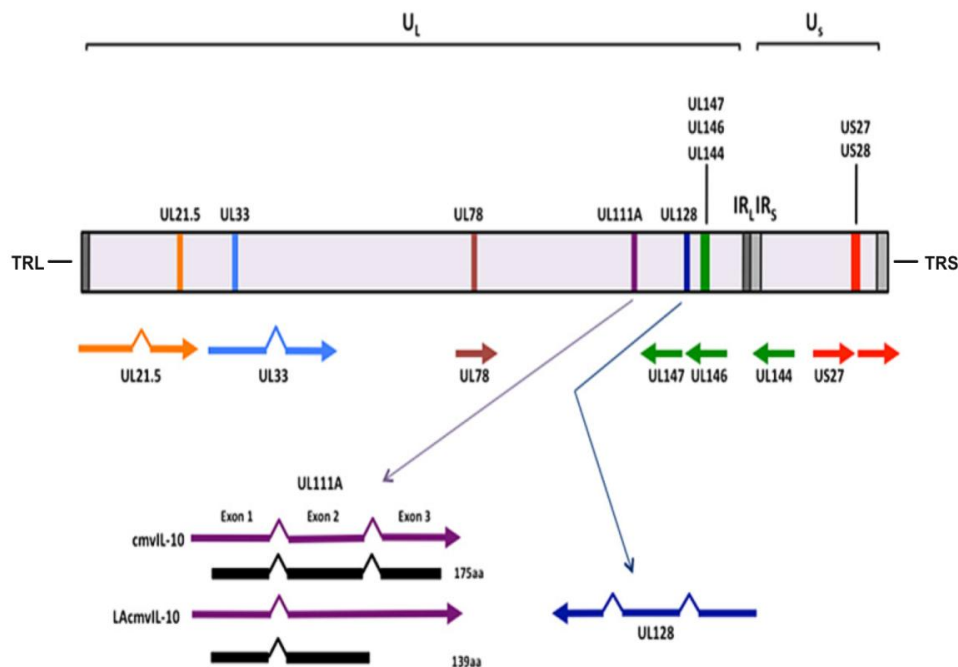


Figura 2. Representação esquemática das regiões única longa e única curta, flanqueadas por sequências terminais repetidas longas (TRL) e repetida interna longa (IRL) e interna repetida curta (IRS) e terminal repetida curta (TRS), adaptado de McSharry; Avdic; Slobedman (2012).

Nessas regiões encontram-se as sequências codificadoras para as proteínas do virion as quais estão distribuídas no capsídeo, tegumento e envelope (Figuras 2 e 3) (BRITT; BOPPANA, 2004). A principal proteína do capsídeo apresenta 1.370 aminoácidos, compõe 90% do teor proteico do tegumento viral, denominada PUL86, a qual possui algumas similaridades com a proteína VP5 do HSV1. Duas proteínas do tegumento localizadas entre o capsídeo e o envelope, as fosfoproteínas pp150 e pp65, as quais fazem parte da estrutura viral, têm importância imunogênica e desempenham importante papel na regulação de genes do HCMV e na modificação do metabolismo da célula hospedeira.

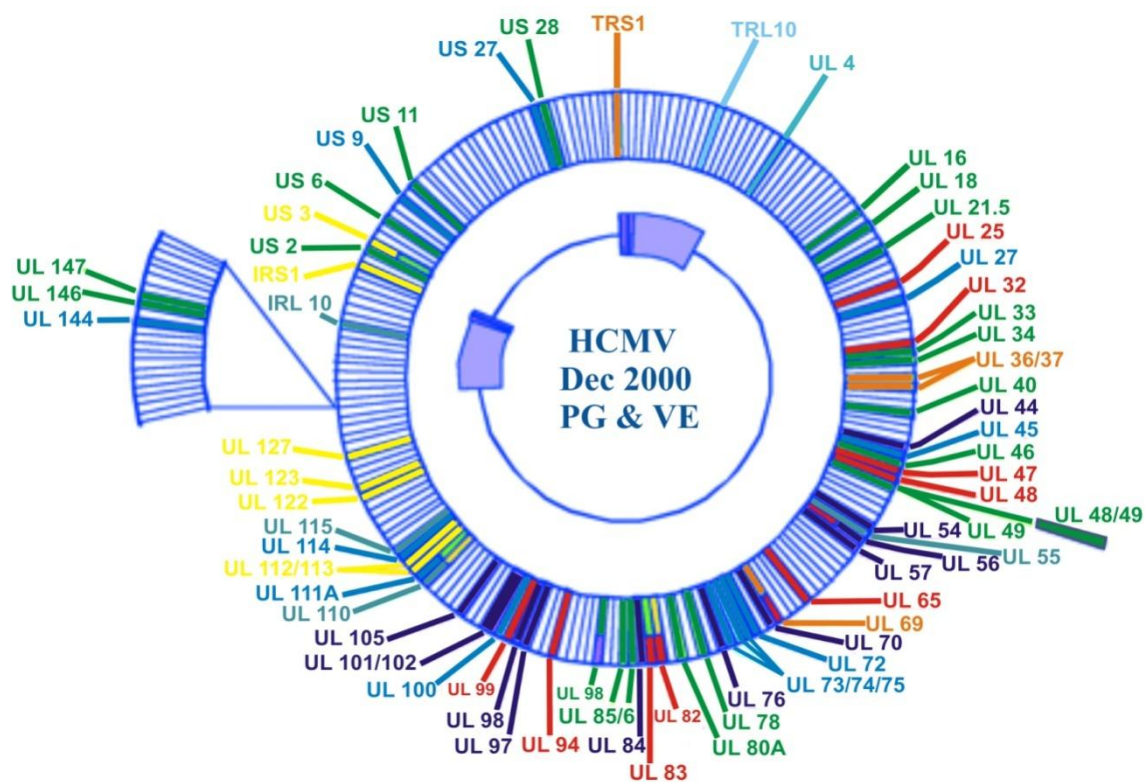


Figura 3. Estrutura do HCMV. Em verde estão representados os genes do capsídeo, em vermelho os genes do tegumento e em azul-claro e lilás, as glicoproteínas. O conjunto representa as proteínas estruturais do vírus (adaptado de Griffits, 2002)

Outras proteínas que fazem parte do virion são as glicoproteínas (gP) do envelope. Foram descritas por Rasmussen (1999) 12 glicoproteínas no tegumento viral, entre as quais seis foram mapeadas, denominadas de: gPUL₄ (gP48), gPUL₃₃ (GCR), gPUL₅₅ (gB), gPUL₇₅ (gH), gPUL₁₀₀ (gM) e gPUL₁₁₅ (gL).

Dentre o grupo das glicoproteínas, duas são consideradas importantes no HCMV por estarem envolvidas com a antigenicidade e imunogenicidade do vírus, uma é a glicoproteína B (gB) e outra a glicoproteína H (gH). A gB também denominada de gA, gP55-116, gP58, p130/55 e gP52, e a gH é denominada de p86, também referida como gPUL75. Parte das glicoproteínas são organizadas em complexos de alto peso molecular designados gcI, gcII e gcIII (quadro 1) (RASMUSSEN, 1999; PIGNATELLI *et al.*, 2004).

Quadro 1. Agrupamento das glicoproteínas em complexos proteicos de alto peso molecular

Complexo molecular	Glicoproteínas	Outras denominações
gcI	gB	gA, gP55-116, PUL55 gP58, p130/55 gP ₅₂
gcII	gM	gPUL ₁₀₀
	gN	gPUL ₇₃
gcIII	gH	P86, gPUL ₇₅
	gL	gPUL ₁₁₅
	gO	gPUL ₇₄

Fonte: Adaptado de Rasmussen (1999); Pignatelli *et al.* (2004).

A glicoproteína gB pertence ao complexo gcI (GRETCH; GEHRZ; STINSKI, 1988; SINZGER; JAHN, 1996; PIGNATELLI *et al.*, 2004), as glicoproteínas gM e gN pertencem ao complexo gcII e a glicoproteína gH em conjunto com as glicoproteínas gL e gO compõem outro complexo denominado gcIII (PIGNATELLI *et al.*, 2004; MATOS; MEYER; LIMA, 2011).

A gB é uma das principais proteínas do envelope viral, possui 150Kd de tamanho e juntamente com a gH desempenha importante papel na penetração do vírus na célula hospedeira, na transmissão e na formação de sincícios (CHOU, 1992; NAVARRO *et al.*, 1993). Essa glicoproteína em conjunto com a gH, são alvos de anticorpos neutralizantes contra o citomegalovírus no organismo humano e possíveis candidatas à produção de vacinas (CHOU; DENNISON, 1991; GHANDI; KHANNA, 2004; BROWNE, 2009).

As glicoproteínas gM e gN em conjunto com a gB e gH são essenciais para a infectividade do vírus (MATOS *et al.*, 2011). Além dessas proteínas, a fosfoproteína Pp71 da família UL82 localizada no tegumento viral, também desempenha um papel importante na replicação do vírus. Esta proteína funciona como ativador eficiente da expressão gênica viral na fase imediatamente inicial do ciclo de replicação lítica do vírus (MOCARSKI, 1996; TOMTISHEN, 2012).

Outras proteínas que se expressam na replicação do HCMV no interior da célula hospedeira são classificadas em α , β e γ . A proteína α é codificada por 3 genes em três regiões: IE₁ (gene principal ou maior), IE₂ (região adjacente ou secundária) e IE₃ (3ª. região). Esta proteína participa da transcrição do vírus na fase imediatamente inicial, e expressa dentro de 0 a 2 horas após a infecção. Ela está associada à regulação da replicação do vírus juntamente com a proteína β que se expressa em uma fase denominada inicial da replicação viral entre o período de 2 a

24 horas, antes da síntese do DNA viral, sendo que a principal proteína deste grupo está ligada ao DNA viral. A proteína γ se expressa numa fase considerada tardia, após 24 horas, estando mais envolvida com a estrutura viral. Várias glicoproteínas se expressam tanto na fase inicial quanto tardia após a infecção da célula hospedeira (RASMUSSEN, 1990).

2.2 MECANISMO DE INFECÇÃO E LATÊNCIA VIRAL

A infecção foi descrita pela primeira vez por Klemola; Kaariainen (1965), como um quadro similar ao da mononucleose infecciosa por *Epstein Barr* em pacientes com imunocompetência, e por esta razão, também ficou conhecida como uma das doenças do grupo "mononucleose símile".

O período de incubação da doença varia entre 4 a 12 semanas quando o vírus já pode ser detectado e a infecção, na maioria dos casos, pode evoluir de forma inaparente ou subclínica em pacientes com imunocompetência, sendo que nos casos sintomáticos o indivíduo pode apresentar febre persistente, mialgias e adenomegalia cervical (BRITT; ALFORD, 1996).

Após a primeira infecção, o vírus pode permanecer no organismo de forma latente e devido situações de baixa imunidade, este agente pode sofrer reativação ocasionando novo quadro clínico, que na maioria das vezes, difere do quadro da primoinfecção. A reativação viral também pode ocorrer em pacientes com imunocompetência, mas não é um fato comum (TAYLOR-WIEDEMAN *et al.*, 1991).

O HCMV infecta uma variedade de células como as epiteliais, endoteliais, fibroblastos, leucócitos, células especializadas como: dos neurônios, da retina, do músculo liso, do sistema gastrointestinal, hepatócitos e outras (DINIZ; VAZ, 1988;

TAYLOR-WIEDEMAN *et al.*, 1991; SINZGER; JAHN, 1996; MOCARSKI, 1996; JARVIS; NELSON, 2002), sendo as células mononucleadas do sangue periférico os principais sítios de latência do vírus (MENDRONE Jr., 2010). *In vitro*, o vírus apresenta crescimento lento em cultivo celular, mas rápida replicação no organismo vivo (HUANG *et al.*, 1976; GRIFFITHS, 2002).

O mecanismo de infecção ocorre inicialmente quando o vírus adsorve à célula hospedeira por meio da ligação de um complexo de glicoproteínas presentes no envelope viral, com receptores de membrana celular (figuras 4 e 5).

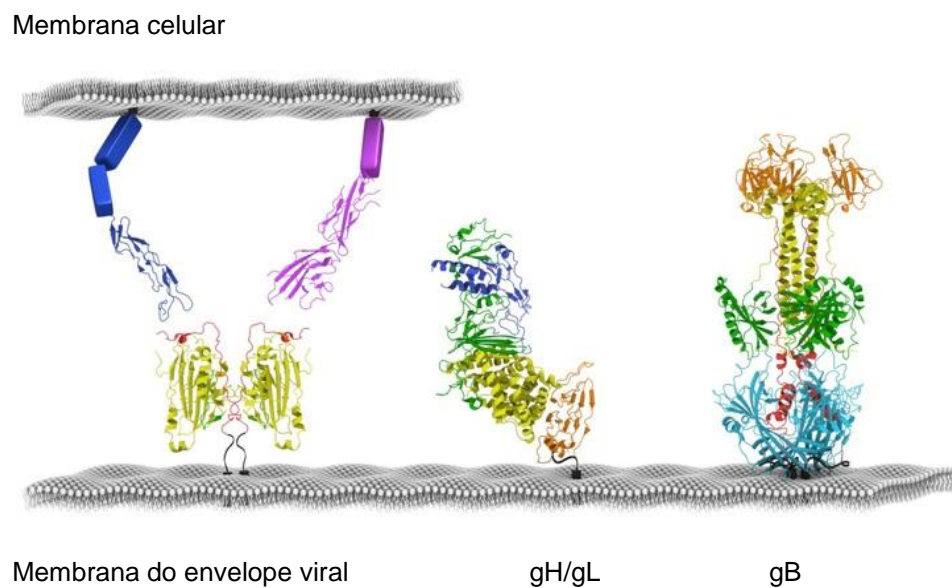


Figura 4. Mecanismo de fusão vírus-célula através de receptores de membrana e glicoproteínas virais. Adaptado de Eisenberg *et al.* (2012)

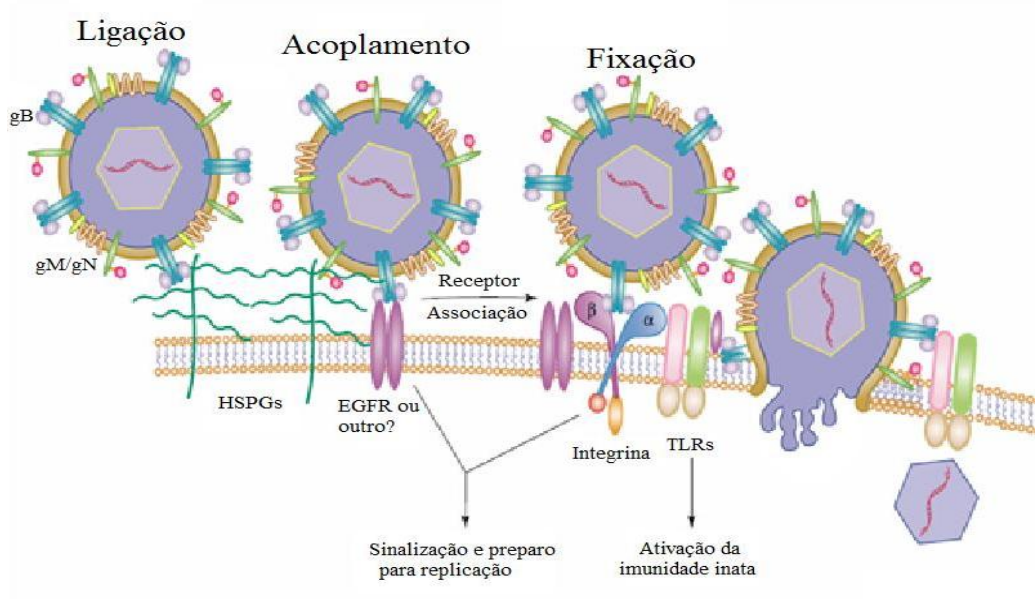


Figura 5. Mecanismo de infecção HCMV na célula hospedeira. Adaptado de Compton (2004)

Com a fusão das membranas viral e celular, ocorrerá ativação nas vias de sinalização da célula hospedeira que irão promover mudanças no mecanismo de transcrição celular, ocorrendo uma série de eventos que levarão à infecção lítica e ao mecanismo de latência.

Após a fusão, ocorre o rompimento das membranas com liberação de proteínas do capsídeo e do tegumento para o citoplasma da célula (figura 5) juntamente com a ejeção do material genético (DNA), que penetra nos poros nucleares por meio dos microtúbulos atingindo o núcleo (KALEJTA, 2008; MILLER; HERTEL, 2009). Com isso, dá-se o início à replicação viral que inicia entre 12-24 horas após a penetração do agente na célula, com expressão de genes virais em forma de cascata no núcleo celular. Esse evento começa por meio da transcrição de genes imediatamente-iniciais (genes IE) os quais irão ativar os genes iniciais (gene

E) e na sequência, outros genes (gene L) serão expressos (PENFOLD, MOCARSKI, 1997; JUNQUEIRA; SANCHO; SANTOS, 2008).

Esse complexo glicoproteico é formado pelas glicoproteínas gM/gN (UL100/UL73); gB (UL 55); gH/gL (UL75/UL115) e proteínas auxiliares UL128, UL130 e UL131 (KAYE; GOMPELS; MINSON, 1992; MILNE; PATERSON; BOOTH, 1998; BROWNE, 2009; EISENBERG *et al.*, 2012) as quais possuem receptores de membranas específicos, como: heparina solúvel, anexinas, fator de crescimento epidermal (EGFR) e as integrinas, os quais ligam-se à glicoproteínas B (figura 5); o “heparan sulfato proteoglican” (HSPG) é receptor do complexo glicoprotéico gM/gN e das glicoproteínas B, e as integrinas são receptores celulares do complexo gH/gL (BOEHME; COMPTON, 2006; ISSACSON; COMPTON 2009).

Com a ejeção do genoma viral na célula hospedeira, duas proteínas do tegumento, a pp65 e pp71, migram até o núcleo da célula permissiva dando início a infecção lítica (GRIFFITHS, 2002; KALEJTA, 2008). A pp71 é importante no ciclo de replicação viral devido participar do processo de ativação e expressão dos genes IE que favorecem o início da replicação lítica (TOMTISHEN, 2012), sendo que o produto desses genes irá controlar tanto a expressão de outros genes virais quanto de genes de origem celular. Este gene é importante tanto da infecção lítica quanto da infecção latente (SINCLAIR; SISSONS, 2006; KALEJTA, 2008).

A infecção lítica acontecerá por meio de três eventos importantes: o primeiro é a produção de proteínas regulatórias, o segundo é a produção da DNA polimerase e o terceiro, a produção de proteínas estruturais para montagem de novos vírus (JUNQUEIRA; SANCHO; SANTOS, 2008).

Nas células não permissivas, a infecção é interrompida por um bloqueio na expressão dos genes virais da fase imediatamente inicial (IE) impedindo a replicação

e, simultaneamente, favorecendo o mecanismo de latência (COMPTON, 2004; SINCLAIR; SISSONS, 2006) que ocorrerá em função da limitação da expressão desses genes. É importante registrar que algumas células não permissivas também poderão permitir a replicação viral após um processo de diferenciação celular como é o caso dos monócitos que não são células permissivas, mas no processo de diferenciação da linhagem celular para macrófagos tornam-se permissivos (SINZGER; JAHN, 1996) dando continuidade à fase replicativa e lítica do vírus (TOMTISHEN, 2012).

Os produtos dos genes IE codificam para que as fosfoproteínas regulatórias sejam expressas sem a necessidade da síntese de DNA polimerase ou de proteínas que possam transcrever a codificação. Esses genes também são responsáveis pela replicação do DNA viral e a expressão de genes tardios das principais proteínas estruturais, para a formação e liberação de novas partículas virais (TOMTISHEN, 2012). O produto dos genes E codificam para DNA polimerase e outras funções virais necessárias para síntese da DNA polimerase e de proteínas estruturais e do tegumento, enquanto que os produtos dos genes L codificam para proteínas estruturais necessárias para o empacotamento das partículas virais (HARKINS *et al.*, 2002).

A proteína pp65 é a responsável pelo mecanismo de evasão do vírus ao sistema imune, favorecendo o mecanismo de latência viral, durante a infecção por meio da inibição de células natural killer (NK) sobre as células infectadas (KALEJTA, 2008). Essa proteína desempenha um papel importante nos processos de degradação da cadeia alfa do HLA-DR e da fosforilação das proteínas virais da fase imediatamente inicial - IE, causando bloqueio na apresentação das mesmas por

moléculas do sistema MHC classe I (GILBERT *et al.*, 1996; LOENEN; BRUGGEMAN; WIERTZ, 2001; KALEJTA, 2008).

A resposta imunológica contra o vírus ocorre por meio da imunidade inata com ação das células NK e dos receptores Toll-like (TLRs) tipo 2 e 3. A resposta adaptativa celular ocorre por meio dos linfócitos TCD8 e TCD4, e a humoral por anticorpos IgA, IgM e IgG (COELHO; CASTELO, 2009; MATOS; MEYER; LIMA, 2011; LORENZI; COELHO-CASTELO, 2011).

Os receptores presentes na membrana hospedeira como os Toll-likes induzem a resposta imune inata contra o HCMV, ativando sinais de transdução na célula que vão estimular a expressão de genes importante com atividade antiviral, produção de citocinas inflamatórias, quimiocinas e ativação do fator nuclear- κ B (NF- κ B) (COMPTON, 2004; BOEHME; GUERRERO; COMPTON, 2006; COELHO; CASTELO, 2009).

A resposta adaptativa celular mediada por linfócitos T citotóxicos (TCD8+), importante no controle da replicação viral na infecção aguda, mas não tem a mesma eficiência na infecção latente (KHAN; PRASAD; KLEIN, 2009), uma vez que as células não permissivas que albergam vírus nessa condição (mas com potencial de reativação) não são alvos do sistema imune (SINCLAIR; SISSONS, 2006) devido à ação da proteína pp65.

A resposta adaptativa humoral ocorre com a produção das imunoglobulinas da classe IgM e posteriormente da classe IgG, sendo que o anticorpo IgM confirma a infecção ativa do vírus na infecção primária, podendo em alguns casos, ser encontrado em até mais de um ano, enquanto que os anticorpos IgG permanecerão no organismo de modo indefinido indicando infecção pregressa (JUNQUEIRA; SANCHO; SANTOS, 2008; MATOS; MEYER; LIMA, 2011).

2.3. INFECÇÃO VIRAL EM PACIENTES IMUNODEPRIMIDOS

Em pacientes com imunodepressão a infecção pode ser ocasionada tanto pelo contato com o agente pela primeira vez (primoinfecção) ou por reinfecção com nova (s) cepa (s), ou ainda, por reativação da cepa que ficou latente no organismo posterior a primeira infecção. É comum a reinfecção por reativação viral nas imunodeficiências. Isso acontece devido às terapias imunossupressoras as quais são submetidos alguns pacientes como transplantados, pacientes com câncer, pacientes com LES ou quando os indivíduos apresentam alguma deficiência imunológica que pode ser adquirida em decorrência da infecção por outros agentes como HIV ou deficiência na resposta imunológica devido à imaturidade do sistema imune como é o caso dos recém-nascidos infectados no ventre materno (SILVA *et al.*, 2007; JUNQUEIRA; SANTOS; SANCHO, 2008; PANNUTI 2009). Esta forma de infecção pode ocorrer tanto na forma disseminada quanto órgão específico (ARCE-SALINAS; VILLASENÛR-OVIES, 2012).

Outra característica do HCMV de importância em saúde humana é o acentuado tropismo pelo sistema nervoso central e retículoendotelial, sendo incluído entre os vírus neurotrópicos de importância médica (GARCIA, 1981; STAGNO; WHITLEY, 1985; DINIZ & VAZ, 1988).

Em indivíduos soropositivos para o HIV, o vírus pode atuar como indutor ou cofator de progressão na patogênese da infecção pelo HIV (DREW, 1988, 1992; BRITT; ALFORD, 1996), sendo que o quadro clínico desta comorbidade varia nos portadores de imunodeficiência. A citomegalia em portadores do HIV geralmente cursa com diarreia persistente acompanhada ou não de hematoquezia e alterações nos sistema visual e respiratório (LIMA *et al.*, 2000). Nos transplantados, promove

infecções graves e de repetição nos sistemas respiratório e visual podendo causar infecções subclínicas, além de estar envolvido na rejeição do enxerto (PANNUTI, 1995; DAL MONTE *et al.*, 1996).

Rasmussen (1999) refere que a detecção e a quantificação da carga viral do HCMV em pacientes transplantados e HIV soropositivos, são importantes para identificar pacientes sob o risco de desenvolver infecção viral. De acordo com esse autor, pacientes com carga viral elevada podem não desenvolver manifestações clínicas aparentes, e pacientes com carga viral baixa podem apresentar manifestações clínicas aparente. Com base nas análises de restrição dos genes codificadores das proteínas do envelope viral do citomegalovírus, a virulência em indivíduos com imunodeficiência pode estar relacionada à variabilidade genética das cepas virais, sendo esta relação ainda objeto de estudo (FRIES *et al.*, 1994; VILAS-BOAS *et al.*, 2003).

2.3.1 Infecção por HCMV em pessoas vivendo com HIV/aids

Em termos de morbidade e mortalidade dos portadores do HIV, o HCMV é extremamente importante devido à diminuição na contagem de células TCD4⁺ que favorece a infecção viral, principalmente, por reativação viral (ARIES & SCHAAF, 2007). Embora a reativação não seja um mecanismo bem compreendido, há hipótese de que o fator de necrose tumoral TNF- α seja responsável pelo acúmulo do fator nuclear NF- κ B nas células hospedeiras com ativação do processo de replicação viral do HCMV (SPRINGER; WEINBERG, 2004).

A maior gravidade da infecção por HCMV em pacientes HIV+ está relacionada a alguns fatores de risco como a diminuição das células CD4⁺

<50cels/mm³ e a elevada carga viral do HCMV (CUNHA *et al.*, 2011). Some-se a isso a gravidade das manifestações clínicas que de acordo com Matos; Meyer; Lima (2011) existe uma relação diretamente proporcional entre as manifestações clínicas e a carga viral do HCMV. Fielding *et al.* (2011) também observaram forte associação entre a presença do HCMV em elevado número de cópias, e a mortalidade de indivíduos portadores do HIV+, não sendo esta associação restrita a pacientes em estágio avançado da aids.

A infecção por HCMV nesse grupo de pacientes compromete vários órgãos levando ao desenvolvimento de doenças importantes como a retinite no sistema visual, pneumonia intersticial no trato respiratório, além de hepatite, artrite, cardite; doenças do sistema nervoso central como a encefalite e infecções diversas do trato gastrointestinal (LIMA *et al.*, 2000; TAYLOR, 2003; GRIFFITHS, 2004; RAFAILIDIS *et al.*, 2008).

A retinite é uma das principais doenças causadas pelo HCMV, mas apesar de considerável redução após a terapia antirretroviral, ainda é possível encontrar casos da doença com consequências graves para o paciente (TERRA *et al.*, 2000; FIGUEIREDO *et al.*, 2013). O risco de retinite é aumentado nos pacientes com diminuição dos linfócitos TCD4+ <50 cels/mm³ de sangue na presença do DNA viral (TERRA *et al.*, 2000; HAIDAR *et al.*, 2001; WAIB, 2003; DIMANTAS *et al.*, 2004). Ressalta-se ainda que a retinite e as afecções do trato gastrointestinais podem ser definidores do quadro da aids (FRANCIS *et al.*, 1989; FIGUEIREDO *et al.*, 2013; JUNQUEIRA; SANCHO; SANTOS, 2008).

Quando o sistema gastrointestinal é afetado, o paciente pode apresentar dor abdominal, diarreia, colite, gastrite, esofagite, vasculite, sangramento digestivo e lesões ulcerativas (FRANCIS *et al.*, 1989; PANNUTTI, 1995; SEDDON; BHAGANI,

2011). Segundo Francis *et al.* (1989), o HCMV é um dos agentes mais comuns nas infecções gastrointestinais nos pacientes com aids, diagnosticados por necropsia, ao passo que em vida, a maioria dos casos são subnotificados.

A importância do HCMV como patógeno entérico em pacientes HIV positivos foi constatada por Marques *et al.* (2007) realizando colonoscopia em 200 pacientes HIV positivos com quadro clínico de diarreia, confirmado pela técnica de imunohistoquímica, sendo constatado que 25,5% dos pacientes eram positivos para o HCMV. Lima *et al.* (2000) constataram menor sobrevida dos pacientes HIV com colite causada por HCMV, do que indivíduos portadores do HIV com diarreias ocasionadas por outros agentes oportunistas. Também foram observados pacientes com colite por HCMV com sangramento intestinal abundante, sendo necessária algumas vezes reposição volêmica em alguns pacientes.

A infecção pulmonar constitui-se outra causa de morbimortalidade importante em portadores de imunodeficiência (YADEGARYNIA *et al.*, 2009). Em indivíduos com HIV, agentes etiológicos de diferentes naturezas biológicas são potentes causadores de pneumonia. O *P.carinii*, é um dos principais agentes causadores de infecção pulmonar, entretanto quando a contagem de CD4+ está <50 células/ μ l o citomegalovírus constitui-se em importante causa de pneumonia nos pacientes com aids (PEREIRA *et al.*, 2002; COSTA, 2010). Este agente viral tem sido evidenciado, principalmente, em exames histológicos de material de necropsia de pacientes que foram a óbito por infecções pulmonares (CONCEIÇÃO *et al.*, 1996; PEREIRA *et al.*, 2002; ARIES & SCHAAF, 2007; LOURENÇO *et al.*, 2008). O acometimento neurológico é um quadro clínico de importância significativa, pois a encefalite por HCMV em pacientes com aids pode ocorrer de forma subaguda ou crônica, sendo um mau prognóstico em pacientes não tratados e com contagem de CD4+ <100

cels/mm³ (GRIFFITHS, 2004). Nos casos de doenças neurológicas ocasionadas por HCMV, 15 a 30% necessitam de confirmação diagnóstica, e esta confirmação tem sido feita em análise de necropsia (PANNUTTI, 1995; SALAMANO *et al.*, 2001).

A aplicação de medicamentos antirretrovirais altamente eficazes - Highly Active Antirretroviral Therapy (HAART) no tratamento do HIV apresentou novas perspectivas de sobrevida para os portadores deste agente, devido a melhora do estado imunológico do paciente com aumento na população de linfócitos TCD4+. Nesse caso, houve considerável diminuição das infecções secundárias oportunistas, redução nas hospitalizações e aumento na sobrevida dos pacientes infectados pelo HIV. Apesar desses benefícios, surgiram casos pediátricos graves de retinite pelo HCMV na era pós- HAART, tão agressivos quantos os casos da era pré-HAART (DIMANTAS *et al.*, 2004). Não obstante a isso, a restauração imunológica do paciente na era pós-HAART, tem levado o indivíduo a apresentar manifestações clínicas que podem estar mais relacionadas à Síndrome Inflamatória da Reconstituição Imunológica – SIRI do que às infecções propriamente ditas, em decorrência da exacerbação na resposta imunológica à infecção viral (NADAL; MANZIONE, 2009).

2.3.2 Infecção por HCMV em portadores de Lupus Eritematoso Sistêmico

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune, inflamatória, multissistêmica, caracterizada pela ativação de células T e B com produção desregulada de autoanticorpos. Diversos fatores como causas infecciosas, hormonais, ambientais, exposições a agentes físicos e químicos, além de fatores intrínsecos, são capazes de desencadear o processo de ativação da doença (SATO,

2008; CUHACOVICH; GEDALIA, 2009). Dentre essas causas, a de origem infecciosa foi considerada uma das mais comuns em pacientes com LES que evoluem para o óbito (GREENBERG, 2002).

Entre as infecções virais que acometem o paciente portador de LES, o Parvovírus B-19 e o HCMV são os mais frequentes (RAMOS-CASALS *et al.*, 2008), sendo o HCMV responsável por ocasionar infecções em pacientes severamente imunodeprimidos por exercer papel fundamental como agente imunossupressor, favorecendo outras infecções secundárias causadas por bactérias e/ou por fungos (FREEMAN, 2009).

O HCMV pode causar tanto a infecção sistêmica quanto infecção órgão específico. Durante a terapia com corticóides este agente pode ocasionar quadro de pneumonia intersticial, trombocitopenia, hepatite, meningite, vasculite, ulcerações dermatológicas, infecções do trato gastrointestinal, oftalmológicas, e sinais e sintomas não específicos (SEKIGAWA *et al.*, 2002; RAMOS-CASALS *et al.*, 2008; CUHACOVICH; GEDALIA, 2009; KHAN; PRASAD; KLEIN, 2009). No entanto, o quadro clínico do paciente pode evoluir para a melhora quando administrado o ganciclovir associado ou não a corticoterapia (VARANI; LANDINI, 2011).

De acordo com Sekigawa *et al.* (2002) a relação entre a infecção por HCMV e o LES ocorre em três padrões distintos de infecção. O primeiro seria de que a infecção por HCMV ocorreria no curso do tratamento com corticóides. Este padrão de infecção é o mais comum em pacientes LES devido à predisposição as inúmeras infecções ocasionadas por diferentes agentes biológicos (GREENBERG, 2002). O segundo padrão poderia ou não estar relacionado à terapia imunossupressora, pois em pacientes portadores de LES, principalmente com agravo reumático, a infecção oportunista por HCMV ocorreria quando houvesse uma desregulação no sistema

imune do paciente e não exatamente relacionado ao uso dos corticoides (EISENSTEIN; WOLF, 2010).

O terceiro padrão de infecção seria a ativação do lupus pelo HCMV em pacientes com diagnóstico, desta doença, ainda não confirmada e sem tratamento. Nesse caso, o vírus é o agente desencadeante do LES como cogitado por outros pesquisadores (CUCHACOVICH; GEDALIA, 2009; ARCE-SALINAS; VILLASENŌR-OVIES, 2012; SODERBERG-NAUCLÉR, 2012).

Devido ao pleomorfismo do quadro clínico do LES, o HCMV também faz parte do diagnóstico diferencial juntamente com outros agentes de natureza infecciosa e não infecciosa (SATO, 2008). Uma das complicações clínicas em termos de diagnóstico é a semelhança entre as manifestações clínicas do LES e a da citomegalia (ARNEZ *et al.*, 2012), sendo importante o diagnóstico laboratorial por métodos adequados, principalmente, na ocorrência de reativação viral. Pois é comum em métodos sorológicos a ocorrência de anticorpos IgM falso positivos produzidos por células B autorreativas (ARCE-SALINAS; VILLASENŌR-OVIES, 2012) podendo levar a erros no diagnóstico laboratorial do paciente.

2.3.3 Infecção por HCMV em pacientes transplantados

A infecção por HCMV em receptores de órgãos é favorecida por alguns fatores de risco como a latência do HCMV, o perfil sorológico do doador/receptor; a imunodeficiência induzida pelo emprego da corticoterapia após o transplante e a resposta imunológica ao enxerto (GRANATO, 2001; RAZONABLE, 2008; KIM; KIM, 2011).

Há dois principais mecanismos de infecção por HCMV na relação doador/receptor. A infecção viral em receptores soronegativos ocorre quando o doador tem história de infecção pregressa e o vírus, na forma latente, reativa nas células do órgão enxertado desencadeando a infecção no receptor. Outro mecanismo de infecção ocorre quando o doador e o receptor são soropositivos e há reativação da cepa exógena presente no órgão transplantado reinfectando o receptor. Geralmente esse tipo de infecção ocorre devido a imunossupressão causada pela corticoterapia administrada após o transplante (SILVA *et al.*, 2007; JUNQUEIRA; SANCHO; SANTOS, 2008).

Em receptores de órgãos sólidos, o impacto da infecção por HCMV leva à manifestações clínicas com efeitos direto e/ou indireto, que podem evoluir para o óbito. Destaca-se como efeito direto a doença invasiva com comprometimento gastrointestinal (diarreia, náuseas, colite, esofagite, gastrite e enterite), hepatite, pneumonia, afecções do SNC e retinite, além de quadro sindrômico caracterizado por febre, neutropenia, trombocitopenia, perda de peso, mielossupressão e mal estar (MYLONAKIS, KALLAS, FISHMAN, 2002; RAZONABLE, 2008; 2010; GORDON, 2013).

Em receptores de medula óssea, a infecção pode levar a quadros de pneumonia com elevada taxa de mortalidade, mas se o órgão transplantado for sólido como: o fígado pode ocorrer hepatite; se for rim, a infecção cursa com elevação da creatinina sérica, febre, leucopenia com linfócitos atípicos, trombocitopenia, hepatomegalia, mialgias e artralguas (TAYLOR, 2003; POUR-REZA-GHOLI *et al.*, 2005). Os efeitos indiretos da infecção viral estão relacionados à imunomodulação da resposta imune no paciente, levando a rejeição do enxerto e a instalação de infecções secundárias oportunistas (FREEMAN, 2009).

As infecções pelo HCMV geralmente ocorrem nos primeiros 3 meses pós-transplante, mas é possível ocorrer mais precocemente (PANNUTI *et al.*, 1987; CAMARGO *et al.*, 1996) por esta razão, a terapia profilática ou preemptiva com antivirais como ganciclovir intravenoso e valganciclovir oral (SINGH, 2001; LEGENDRE; PASCUAL, 2008) têm sido adotada para controlar as infecções por HCMV nesse período na tentativa de diminuir a morbimortalidade dos pacientes de alto risco (D+ R-) assim como a rejeição do enxerto (MULLER *et al.*, 2006; KIM; KIM, 2011). Na ausência de terapias profiláticas, estima-se que 30 a 75% dos receptores de órgãos desenvolvem infecções por HCMV (LEGENDRE; PASCUAL, 2008).

Para melhor compreensão, na terapia profilática há administração de antivirais em todos os pacientes sob o risco de infecção viral durante o período de três meses pós-transplante a fim de evitar a infecção ou recorrência viral por HCMV; enquanto que na terapia preemptiva os pacientes ficam sob o monitoramento de desenvolverem infecção viral após o transplante, sendo avaliados laboratorialmente por método sensível e quantitativo, geralmente, antigenemia com o objetivo de controlar a replicação e a evolução da doença (SINGH, 2005).

O manejo terapêutico dos antivirais deve ser bem controlado, pois o uso prolongado da terapia ou uso intermitente ou ainda, doses subterapêuticas do antiviral podem levar à resistência aos medicamentos comumente utilizados na rotina de infecção por HCMV (ERICE *et al.*, 1989; DREW, 2000). Apesar dessa possibilidade, alguns estudos experimentais têm sido realizados para avaliar a melhor resposta aos antivirais na ocorrência de resistência medicamentosa. Um estudo utilizando doses combinadas de forcarnet e ganciclovir mostrou bons resultados em pacientes transplantados de medula óssea, mesmo na presença de resistência ao ganciclovir (MYLONAKIS, KALLAS, FISHMAN, 2002).

Outro problema associado à infecção por HCMV no pós-transplante e pós-tratamento profilático é a infecção tardia, que pode ocorrer entre 3 e 6 meses após o implante do órgão. Essa problemática tem aumentado a morbimortalidade dos pacientes, pois sua evolução pode estar associada à resistência aos antivirais principalmente ao ganciclovir (SINGH, 2005). Algumas medidas têm sido adotadas para melhorar a resposta do paciente contra a infecção tardia pelo HCMV, como por exemplo: a administração de medicamentos associados (MYLONAKIS, KALLAS, FISHMAN, 2002; MONTEJO *et al.*, 2009); estimular a resposta imune de células-T específicas (LEGENDRE; PASCUAL, 2008) ou ainda estender o tempo da terapia por até 24 semanas (DOYLE *et al.*, 2006). Este último procedimento tem alcançado bom êxito no primeiro ano de transplante com considerável redução da infecção viral.

2.3.4 Infecção por HCMV em pacientes com câncer

A prevalência de anticorpos anti-HCMV em pacientes com câncer é a mesma estimada para a população em geral (70-80%) (NICHOLS; PRICE; BOECKH, 2002; HAN, 2007). Contudo a presença de anticorpos perenes como IgG anti-HCMV nesse grupo de pacientes pode ser considerado fator de risco para futuras reinfecções principalmente, por reativação viral (HAN, 2007) o que torna o vírus um grave problema em saúde pública.

A família *Herpesviridae* tem reconhecido potencial oncogênico devido a alguns membros como EBV e HHV-8 serem causadores de tumores. O HCMV embora pertença à mesma família, por muitos anos não foi considerado agente causal de neoplasias malignas, estando relacionado a um importante papel nos

mecanismos de oncomodulação para progressão de tumores (MICHAELIS; DOERR; CINATI JR, 2009; DZIURZYNSKI *et al.*, 2012). Nesse processo, a presença de alguns estímulos como alterações na via de sinalização, distúrbios no controle transcricional celular e de proteínas supressoras de tumores, favorecem um ambiente propício para que o HCMV potencialize a malignização das células tumorais (oncomodulação). Soma-se a isso o fato de que algumas proteínas virais codificadas pelo vírus são capazes de interferir nos processos normais da célula (SILVA MCC *et al.*, 2011), como a proteína UL97 kinase ciclina-dependente que controla a progressão do ciclo celular, atua na fosforilação e inativação do produto gene Rb (pRb), o qual é imunossupressor do tumor retinoblastoma (MICHAELIS; DOERR; CINATI JR, 2009; HUME *et al.*, 2008).

A quimioterapia é um processo terapêutico intensivo utilizado no tratamento de pacientes com neoplasia que também causa grave imunossupressão com declínio acentuado de células T, principalmente de linfócitos TCD4+. O uso de compostos análogos nucleosídeos na quimioterapia torna o paciente vulnerável às inúmeras infecções (NGUYEN *et al.*, 2001). Esse processo terapêutico propicia a ativação de agentes virais que permanecem latentes no organismo, como o citomegalovírus, desencadeando no paciente, manifestações clínicas graves como: pneumonite, colite, retinite e outros (GUIMARÃES *et al.*, 1997; MARIGUELA *et al.*, 2008; CARAN *et al.*, 2000, YADEGARYNIA *et al.*, 2009). A pneumonia por HCMV é uma das complicações mais graves em pacientes com leucemia, quando são submetidos a terapias imunossupressivas, apresentando considerável taxa de mortalidade (NGUYEN *et al.*, 2001; YADEGARYNIA *et al.*, 2009).

Alguns estudos demonstraram a presença de genoma viral ou produtos de genes virais em determinados tipos de tumores, em especial tumores cerebrais

(COBBS *et al.*, 2002; HARKINS *et al.*, 2002; MITCHELL *et al.*, 2007; SCHEURER *et al.*, 2008, BHATTACHARJEE; RENZETTE; KOWALIK, 2012) que poderiam sugerir a possibilidade do vírus estar envolvido na oncogênese dos tumores. De acordo com Soderberg-Naucler e Johnsen (2012) as proteínas do HCMV estariam envolvidas tanto no mecanismo oncomodulatório quanto no mecanismo oncogênico.

O HCMV codifica proteínas que interagindo com outras proteínas celulares importantes como a p53, Rb e as ciclinas são capazes de inibir a apoptose, induzir resistência aos medicamentos utilizados na quimioterapia, ativar a expressão de COX-2, causar danos no DNA e inibir os mecanismos de reparo de DNA levando a instabilidade cromossômica e expressão da atividade da telomerase (HARKINS *et al.*, 2002; SÖDERBERG-NAUCLÉR; JOHNSEN, 2012).

Outros fatores virais importantes como a permanência do vírus no organismo em estado de latência e a capacidade de evasão ao sistema imune para manutenção e proliferação da célula hospedeira, são mecanismos utilizados pelo HCMV que contribuem para o processo de malignização da célula infectada (DALTON-GRIFFIN; KELLAN, 2009).

Características próprias do vírus somado a estímulos externos, tem levado alguns pesquisadores a comprovarem o envolvimento do HCMV na gênese de alguns tumores malignos como de glândulas salivares (MELNICK *et al.*, 2012) e colorretal (HARKINS *et al.*, 2002) devido a presença de proteínas virais nos mecanismos oncomodulatório e oncogênico dos tumores (JOHNSEN; BARYAWNO; SÖDERBERG-NAUCLÉR, 2011).

Em tumores cerebrais tem sido comprovado através de experimentos, a replicação do HCMV em células nervosas tumorais, sendo atribuída, ao vírus, a possibilidade de exercer pressão seletiva sobre a formação de certos clones

celulares no processo de oncomodulação, mas não a possibilidade do agente estar relacionado à gênese de tumores em células nervosas (SABATIER *et al.*, 2005; MICHAELIS *et al.*, 2012). É importante ressaltar que algumas estratégias terapêuticas têm sido avaliadas a fim de minimizar a progressão de tumores pelo vírus em células nervosas, tal como a associação de valganciclovir na quimioterapia ou na radioterapia de tumores cerebrais (SÖDERBERG-NAUCLÉR; JOHNSEN, 2012).

2.4 TRATAMENTO

A terapia geralmente envolve várias opções como: a terapia combinada de antivirais, a introdução de imunoglobulinas e a redução da imunossupressão (BALISTRERI, 2010). A escolha da droga a ser utilizada no tratamento depende da gravidade, do local da doença, da resistência ao medicamento, do grau de imunossupressão, e se a doença refere-se a primoinfecção ou reativação viral. Os antivirais mais comumente utilizados no tratamento intensivo contra o citomegalovírus são: ganciclovir, forcartet e cidofovir (BALFOUR 1999).

O ganciclovir foi o primeiro medicamento licenciado para o tratamento da citomegalovirose e tem sido o medicamento preferencial para o tratamento desta infecção em pacientes com imunodepressão. Ele encontra-se em uma forma inativa, necessitando ser fosforilado para uma forma trifosfato por ação de kinases tanto viral quanto celular para ser ativo contra a infecção (ERICE, 1999; GILBERT; BOIVIN, 2005). Nessa forma, esse medicamento compete pelo sítio de ligação na enzima DNA polimerase com os dNTPS que deverão ser incorporados na nova cadeia de

DNA viral durante o processo de replicação, mas são impedidos pelo medicamento na forma ativa.

Esse medicamento tem sido utilizado tanto na terapia profilática quanto no tratamento preemptivo de pacientes transplantados renais, pois entre 30-75% dos pacientes sem a terapia preventiva ou profilática, desenvolverão a infecção por HCMV (AKHTER, 2014).

O ganciclovir pode ser administrado na profilaxia geral por via intravenosa ou oral contra o HCMV. Seu mecanismo de ação nas infecções virais ocorre por meio da inibição da síntese de DNA do vírus, sendo que sua forma ativa é a fosforilada. A fosforilação deste medicamento ocorre no interior da célula infectada pelo HCMV por meio de uma proteína Kinase viral pUL97, a qual converte o ganciclovir inativo para a forma monofosfato e posteriormente, por ação das kinases celulares convertem em ganciclovir na forma di e trifosfato (GCV-TP) tornando-o um potente inibidor da DNA polimerase viral (GILBERT; BOIVIN, 2005).

A estrutura do ganciclovir trifosfato (GCV-TP) é similar ao da guanina (SCHLEISS, 2004), sendo que este medicamento compete com os desoxiguanosídeos trifosfato pelo sítio de ligação dos dNTPs na DNA polimerase (DNA pol) do HCMV (figura 6). Uma vez que este medicamento esteja ligado ao sítio da enzima polimerase ele irá inibir a incorporação dos nucleotídeos na cadeia de DNA impedindo o alongamento da cadeia e conseqüentemente a replicação do vírus (ERICE, 1999; GILBERT; BOIVIN, 2005; RAMANAN; RAZONABLE, 2013).

Segundo Göhring; Hamprecht; Jahn (2015), o gene UL97 codifica outras proteínas que participam da fosforilação da enzima fosfotransferase. Este gene é composto de subdomínios conservados com funções específicas. O domínio I é responsável pela ligação do ATP na cadeia de DNA, enquanto que os domínios II,

III, VIB e VII estão relacionados à transferência de fosfatos e o subdomínio IX, a ligação da enzima em seu substrato.

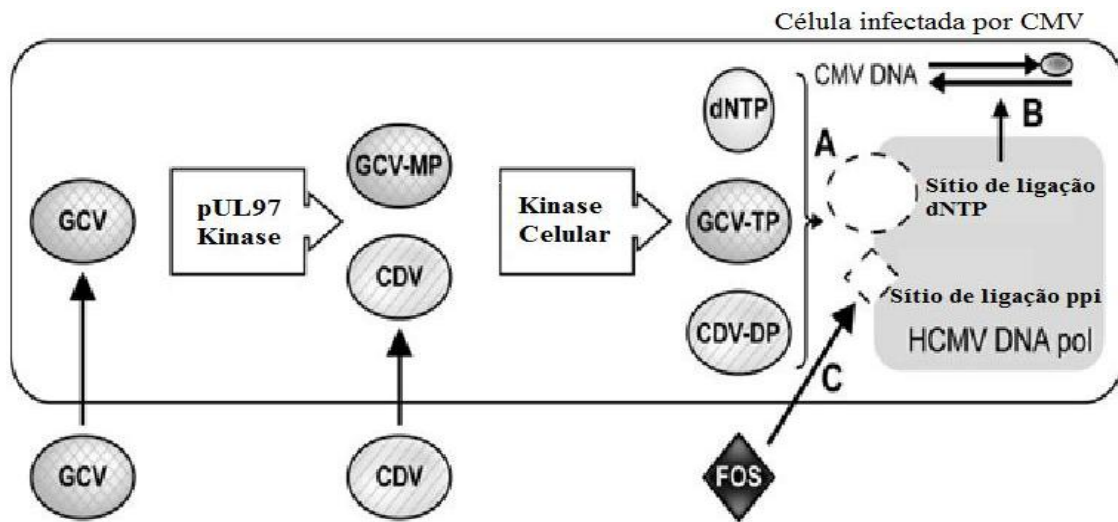


Figura 6. Mecanismo de ação dos antivirais para tratamento da infecção por HCMV. Nesta figura nota-se o processo de fosforilação do ganciclovir monofosfato pela enzima pUL97 kinase em ganciclovir trifosfato.

Fonte: Gilbert; Boivin (2005)

O cidofovir é uma droga análoga ao ganciclovir, necessita ser fosforilado para uma forma difosfato pela kinase viral. Essa droga tem ação semelhante ao ganciclovir, porém é menos tolerável pelo paciente devido sua nefrotoxicidade (GILBERT; BOIVIN, 2005; LURAIN; CHOU, 2010).

O valganciclovir, uma pró-droga derivada do ganciclovir que é ativada no intestino e no fígado para se converter a esse medicamento. Esse medicamento tem sido utilizado como alternativa na terapia de tratamento por apresentar o mesmo mecanismo de ação do ganciclovir e maior biodisponibilidade (BALISTERI, 2010). Tem sido útil no tratamento de infecções virais em pacientes transplantados renais com manifestação clínica relacionadas ao pâncreas e em quadros de retinite em pacientes vivendo com HIV/aids (AKHTER, 2014). De acordo com Ramanan; Reasonable (2013) os medicamentos preferencialmente utilizados são: ganciclovir e o

valganciclovir. O quadro 2 apresenta a forma de administração dos medicamentos mais utilizados no tratamento da citomegalovirose.

Devido à toxicidade e a emergência de cepas resistentes aos antivirais comumente utilizados no tratamento, foram introduzidos outros medicamentos menos tóxicos e com outros alvos de ação, utilizados como opção para o tratamento.

Esses medicamentos podem ser utilizados de forma isolada ou associados ao ganciclovir quando este apresenta baixa atividade ou quando há resistência a ele, nesse caso são adotados medicamentos alternativos com outros mecanismos de ação como: Maribavir, artesunato, leflunomide, sirolimus, letermovir e outros (LURAIN; CHOU, 2010; VERGHESE; SCHLEISS, 2013).

Quadro 2. Principais medicamentos utilizados no tratamento da infecção por HCMV

Antivirais	Doses	Indicações	Toxicidade
Ganciclovir	10-12 mg/kg/dia	Retinite; infecção ativa; infecção congênita; doenças órgão específicas na imunodepressão e no comprometimento do SNC	Supressão da medula óssea; leucopenia
Foscarnet	90 mg/kg/12/12hs por 14-21 dias, após 90mg/kg/dia	Retinites por HCMV na aids; doenças órgão específicas na imunodepressão; resistência ou intolerância a hematoxicidade ao ganciclovir	Toxicidade renal e medular; não recomendado na gravidez
Cidofovir	5mg/kg1x/semana, seguido de 2x semana/15 dias	Retinites por HCMV na aids; doenças órgão específicas na imunodepressão; resistência ou intolerância a hematoxicidade ao ganciclovir	Toxicidade renal (droga seus metabólitos)
Valganciclovir	900 mg via oral 2x/dia	Tratamento e profilaxia em pacientes que receberam transplante de rins e doenças órgão específicas na imunodepressão; retinite na aids	Toxicidade medular (supressão e leucopenia)

Fonte: Schleiss (2004); Ramanan; Razonable (2013)

O maribavir, é um benzidasole L-ribosídeo, com baixa toxicidade celular na apresentação oral, é benéfico no tratamento de pacientes infectados com cepas resistentes a mais de um medicamento (resistência cruzada). Este medicamento impede a saída do nucleocapsídeo viral do núcleo e a replicação do DNA viral inibindo a ligação da kinase viral no sítio de ligação de adenosina trifosfato (ATP) (GILBERT; BOIVIN, 2005; LURAIN; CHOU, 2010; HAKKI; CHOU, 2011). Esse medicamento tem ação exclusiva sobre o HCMV e Epstein-Barr (AKHTER, 2014).

Conforme o maribavir, o artesunato administrado oralmente também tem baixa toxicidade sendo uma opção para o tratamento de pacientes com resistência ao ganciclovir. O leflunomide também apresenta baixa toxicidade, mas seu uso deve ser combinado com outros antivirais, pois tem 50% de atividade anti-HCMV (PAGE *et al.*, 2013). Esse medicamento apesar de ser um agente imunossupressor suspeita-se agir na síntese das pirimidinas e na atividade da enzima kinase interferindo na montagem do capsídeo viral (SCHLEISS, 2004).

O sirolimus é um agente imunossupressor, com atividade antiviral indireta, por ter sido relacionado à redução da carga viral na infecção por HCMV em pacientes receptores de órgãos sólidos e de medula óssea na condição de resistência aos antivirais. Embora não seja conhecido seu mecanismo de ação, acredita-se que esteja relacionado à inibição da proliferação das células infectadas pela ativação da via de sinalização (LURAIN; CHOU, 2010).

O letermovir é um medicamento mais recente, não nucleosídeo, de baixa toxicidade celular, boa tolerância, utilizada para conter a infecção viral em uma fase tardia da replicação. É considerado um dos mais potentes inibidores anti-HCMV. Tem sido demonstrado que o mecanismo de ação ocorre por inibição da replicação na subunidade terminase no gene UL 56, sendo bastante útil em casos clínicos de

cepas resistentes simultaneamente a diversos antivirais comumente utilizados contra a citomegalovirose (GOLDNER *et al.*, 2011; VERGHESE; SCHLEISS, 2013).

Outra opção para o tratamento profilático, também considerada eficaz, mas deve ser usada com cautela, é o uso de imunoglobulinas preparadas com elevados títulos de anticorpos anti-HCMV. Essa terapia deve ser combinada com antivirais, e objetiva a neutralização da infectividade do vírus por intermédio do mecanismo de ação das imunoglobulinas contra as glicoproteínas do envelope viral. Deve ser administrada da seguinte forma: 100-150 mg/kg no pós-transplante e repetido 2-4 semanas por 4 meses (SCHLEISS, 2004).

2.5 DIVERSIDADE GENÉTICA DO VÍRUS

A diversidade genética do vírus tem sido estudada com base nos polimorfismos dos tamanhos dos fragmentos de restrição (*restriction fragment length polymorphisms* - RFLP) ou por análise de sequências nucleotídicas através da técnica do sequenciamento. Ambas as análises permitem a caracterização genotípica e fenotípica do HCMV, assim como estudos de resistência aos antivirais através da detecção de mutações específicas. Através da presença de mutações, também é possível realizar as relações filogenéticas entre as cepas virais circulantes, possibilitando descrever homologia gênica e proteica além das diferenças genéticas entre as diversas cepas.

2.5.1 Resistência aos antivirais

A resistência aos antivirais comumente utilizados no tratamento da citomegalovirose é consequência de mutações ocorridas nos genes UL97 e UL54

que participam da replicação viral. Nesse caso, a resistência ao ganciclovir depende da região e do gene onde ocorreu a mutação. Também é possível que a presença de mutações esteja associada à recombinação natural de sequências comum entre linhagens virais que infectaram o mesmo organismo, como observado por Chou *et al.* (1999).

Outros fatores considerados emergentes por Lurain; Chou (2010) e que devem ser avaliados para o aparecimento de resistência, é o uso prolongado do antiviral; contínua replicação do HCMV resultante da insuficiência na resposta ao medicamento utilizado e a baixa imunidade do hospedeiro.

As mutações podem ocorrer por substituições nucleotídicas com alteração ou não de aminoácidos, por adição de nucleotídeos, por deleções formando um produto proteico defeituoso, sem atividade ou com atividade reduzida (WOLF *et al.*, 1995; CHOU *et al.*, 1999; BOIVIN *et al.*, 2005).

Análises moleculares em ambos os genes UL97 e UL54, tem permitido a detecção de mutações importantes que levam o paciente a não responder positivamente ao tratamento com ganciclovir. As principais mutações ao ganciclovir estão localizadas em maior número em regiões conservadas no gene UL97 (GILBERT; BESTMAN-SMITH; BOIVIN, 2002), mas podem ocorrer simultaneamente no gene UL54. Em função disso, vários estudos têm sido realizados para avaliar a presença de mutações em ambos os genes conjuntamente (SMITH *et al.*, 1997). A figura 7 apresenta a localização das mutações nos diferentes domínios da fosfotransferase no gene UL97 (**A**) e da polimerase no gene UL54 (**B**) (BOECKH; PER LJUNGMAN, 2009).

As mutações também podem levar a resistência cruzada aos medicamentos utilizados na terapia antiviral como foi observado por Tatarowicz *et al.* (1992). Esses

autores observaram resistência simultânea por cepas mutantes do HCMV, P8 suscetível ao ganciclovir e D16 resistente ao ganciclovir e ao foscarnet, devido a presença de mutações localizadas em regiões altamente conservadas no gene UL54.

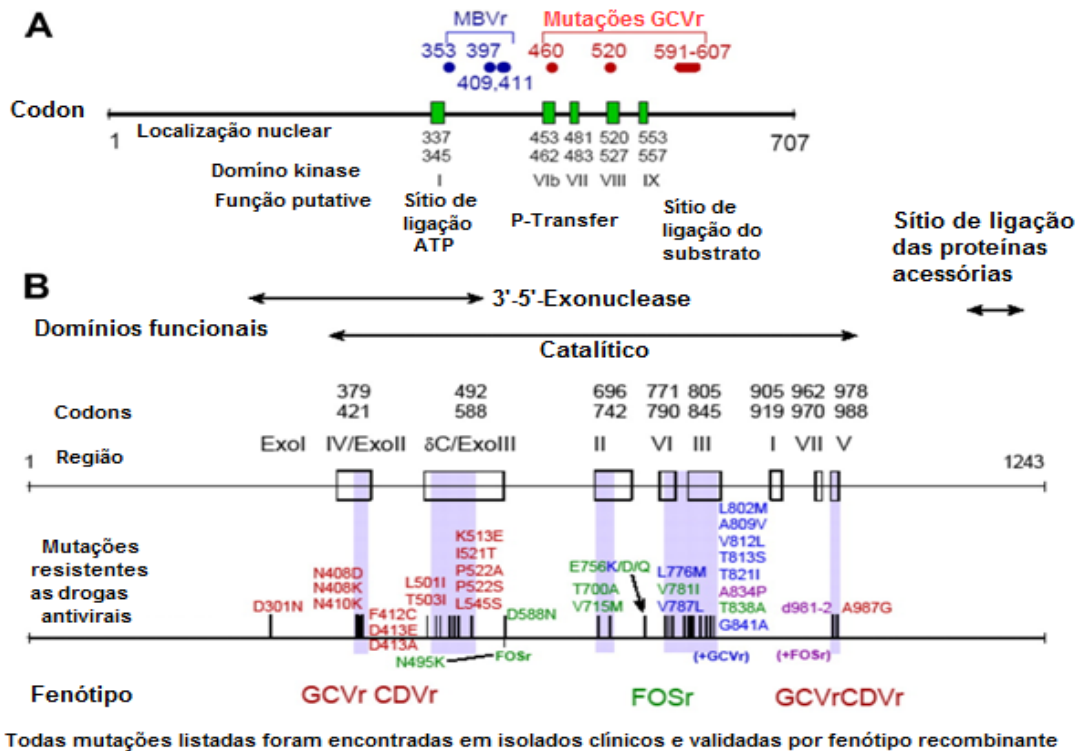


Figura 7. Apresentação das mutações de resistência em ambos os gene UL97 e UL54. Adaptado de Boeckh; Ljungman (2009)

A presença de mutações somente no gene UL97 confere resistência unicamente ao ganciclovir, mas se a mutação estiver presente no gene da DNA polimerase UL54, o prejuízo será maior, pois a presença de mutações nesse gene pode levar à tríplice resistência aos medicamentos ganciclovir, foscarnet e cidofovir, simultaneamente (CHOU, 2008; GILBERT; BESTMAN-SMITH; BOIVIN, 2002).

Boivin *et al.* (2005) detectaram 29 mutações no gene UL54 na ausência de mutações no gene UL97, sendo que entre as mutações naturalmente encontradas em múltiplos sítios do gene UL54, foram detectadas uma deleção de 4pb e vinte e sete em regiões conservadas, mas apenas duas delas poderiam estar ou não relacionadas à resistência ao ganciclovir.

O gene UL97 possui 2.124 pares de bases (pb), é o gene que codifica a proteína fosfotransferase pUL97. Esta enzima é responsável pela fosforilação do ganciclovir na forma monofosfato em trifosfato (LITTLER *et al.*, 1992; LURAIN *et al.*, 2001; LURAIN; CHOU, 2010). A ocorrência de mutações nesse gene afeta o processo de fosforilação do ganciclovir através da perda da síntese do trifosfato ganciclovir, que é a forma ativa desse medicamento (ERICE, 1999), enquanto que o gene UL54 da DNA polimerase codifica proteínas responsáveis pela replicação viral, como a DNA polimerase (MOCARSKI, 1996).

As mutações mais frequentes que alteram a atividade da fosfotransferase estão localizadas nos códonos 460, 520, 590 e 607 do gene UL97 (ERICE *et al.*, 1997; CHOU *et al.*, 1999; CHOU *et al.*, 2002; BOIVIN *et al.*, 2005; DREW, 2010), sendo as mais comuns as mutações 460 localizada na região **VI** e as mutações 592, 594 e 595 na região **IX** (figura 8).

Wolf *et al.* (1995) detectaram mutações silenciosas com mudanças nucleotídicas em amostras de pacientes com aids de **T**→ **C** nas posições 972, 1509, 1794 e substituições **C**→ **T** nas posições 1167,1368, 1509, 1575,1657, 1737, 2064 e 2106. Essas mutações não alteravam o desempenho da atividade da fosfotransferase devido não haver mudança no aminoácido, sendo que elas estavam presentes em cerca de 90% dos isolados clínicos de pacientes com mais de 3 meses de terapia antiviral. Nesse mesmo estudo, também foram descritas outras

mutações no domínio catalítico **XI** com mudanças no aminoácido na posição 595 de Leu → Fen e de Leu → Ser e na posição 665 de Val → Ile, comprometendo a atividade do ganciclovir.

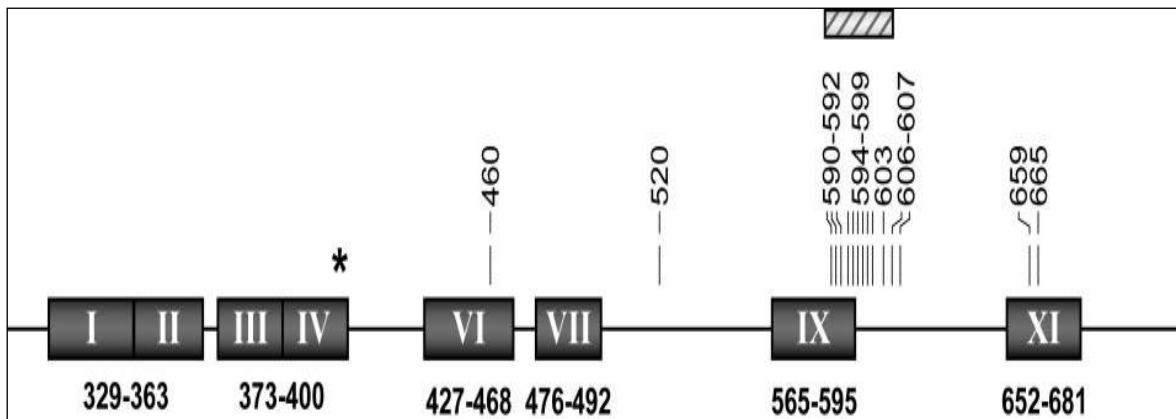


Figura 8. Regiões conservadas do gene UL97 representadas em algarismos romanos. Os números logo abaixo indicam as posições dos códons e as numerações arábicas acima das regiões preenchidas em cinza, representam as mutações que conferem resistência ao ganciclovir. Adaptado de Gilbert; Bestman; Boivin (2005)

Erice *et al.* (1997) através da análise de restrição descreveram as mutações no códon 460 (Met → Val), 520 (His → Glu), 594 (Ala → Val) e 595 (Leu → Ser ou Fen), sendo que há perda do sítio de restrição nos códons 460 e 594 com mudanças nos aminoácidos. Ao contrário dos códons 520 e 595, onde a mutação cria sítios de restrição.

Boivin *et al.* (1996) amplificaram um segmento de 2096 pb do gene UL97 em pacientes com imunodepressão em tratamento com ganciclovir, sendo identificadas por sequenciamento três mutações M460V, A594V e L595S que teriam sido encontradas em materiais diferentes (sangue e urina) de um mesmo paciente,

sugerindo infecção por mais de uma cepa com genótipos diferentes. De acordo com esses autores, a ocorrência de mutações no gene UL97 nos códons 460, 594 e 595 leva à resistência ao ganciclovir por cepas virais do HCMV.

De acordo com Gilbert; Bestman-Smith; Boivin (2002), as mutações observadas no gene UL97 ocorrem em regiões conservadas. Esses autores descreveram diversas mutações em diferentes códons em regiões variadas. Na região **VI** onde foram descritas três mutações nos codons 460 (Met →Lis, Val e Ile); região **VII – IX** uma mutação no codon 520 (His → Glu), na região **IX**, 13 mutações nos códons 590 (Arg →Tre), 591 (Arg →Val, Acp), 592 (Cis →Gli, Fen), 594 (Ala → Ter, Val, Gli, Pro), 595 (Leu → Ser, Fen, Trip,Tre), região **IX-XI**, 12 mutações nos códons 596 (Glu →Gli, Acp), 597 (Asp →Iso), 598 (Gli →Ser, Val) 599 (Lis →Tre, Met), 603 (Cis → Trip, Tir), 606 (Arg → Acp), 607 (Cis →Tir, Fen), na região **XI** 2 mutações nos codons 659 (Ter →Iso), 665 (Val → Iso). Também foram descritas deleções nas regiões **IX-XI** nos códons 590-593, 590-600, 590-603, 591-594, 591-607, 595, 595-603, 600, 600-601.

Outro dado importante refere-se à resistência ao maribavir devido à ocorrência de mutações do domínio I que corresponde ao sítio de ligação de ATP no gene UL97 e mutação no gene UL27 (figura 7) (HAKKI; CHOU 2011). Boeckh; Per Ljungman (2009), descreveram mutações nos códons 353, 397, 409 e 411 nesse domínio que podem ocasionar resistência aos antivirais ao maribavir.

Outro fato importante a ser considerado quanto à presença de mutações, é a ocorrência de resistência aos medicamentos em pacientes que não foram tratados com antivirais. Segundo Lurain; Chou (2010) isso é possível em decorrência de polimorfismos existente em sequências dos genes UL97 e/ou UL54 nas diferentes linhagens virais.

No Brasil, alguns estudos têm sido realizados a fim de identificar cepas resistentes ao ganciclovir. Carraro e Granato (2004) amplificaram a mesma região estudada por Boivin e colaboradores (1996) do gene UL97 em transplantados renais, sem terapia antiviral prévia, não sendo observadas mutações de resistência em nenhuma das 60 amostras estudadas. Posteriormente, Nogueira *et al.* (2006) descreveram algumas das mutações observadas por Boivin *et al.* (1996) no gene UL97, em amostras de pacientes transplantados renais sob tratamento com ganciclovir intravenoso. A mutação mais frequentemente encontrada foi a 595 (55,6%) de Lis → Ser. Outras mutações também foram detectadas conjuntamente, mas em menor frequência nos codons 595 (Lis → Fen), 594 (Ala → Val) (11,1%) e 595 (Lis → Ser)/594 (Ala → Val) (22,2%). Sendo que a mutação no códon 595 (**L595S**) presente no gene UL97 leva à resistência ao ganciclovir.

2.5.1.1. Caracterização genotípica do HCMV

A caracterização genotípica tem sido frequentemente baseada na análise por RFLP das glicoproteínas do envelope viral, principalmente das glicoproteínas gB e gH, as quais estão relacionadas à resposta humoral e celular do organismo infectado pelo vírus. Soma-se a isso o fato de que essas proteínas são importantes para estudos de epidemiologia molecular e podem ser utilizadas como biomarcadores de infecções secundárias para diferenciação entre reativação ou reinfecção por cepas endógenas ou exógenas, principalmente, quando há necessidade de monitoramento de infecção viral em pacientes com imunodepressão ou de infecções materno-fetal em regiões de elevada endemicidade (SPANNO *et al.*, 2007).

Alguns estudos relacionam a presença de determinados genótipos gB com a virulência ou patogenicidade do HCMV (FRIES *et al.*, 1994; MEYER-KONIG *et al.*, 1998), entretanto, essa relação parece ser algo discutível, pois vários aspectos devem ser considerados para que essa associação possa ser criteriosamente estabelecida (VILAS BOAS *et al.*, 2003; SPANO *et al.*, 2007).

Com base nas análises por RFLP e sequenciamento de regiões da gB foram descritos quatro genótipos principais do HCMV em amostras de pacientes com diferentes diagnósticos clínicos, denominados gB1, gB2, gB3 e gB4 (CHOU & DENNISON, 1991; MEYER-KÖNIG *et al.*, 1998, SILVA *et al.*, 2011). Entre os quatro genótipos gB, o gB1 parece estar mais frequentemente associado com pacientes com imunodeficiência (FRIES *et al.*, 1994).

Outra forma de caracterização genotípica é a expressão de genes do tegumento associados à terapia antiviral, a qual tem sido realizada para definir geneticamente e fenotipicamente cepas resistentes ou não ao ganciclovir, cidofovir e foscarnet, utilizados no tratamento da infecção viral, de forma isolada ou conjuntamente.

É importante ressaltar que a presença de genótipos que expressam fenótipos de resistência aos antivirais pode contribuir para a evolução clínica desfavorável da doença, pois sem resposta satisfatória aos antivirais, a doença pelo HCMV progride para um estágio mais grave que pode culminar com o óbito do paciente, por não responder positivamente ao medicamento utilizado (GÖHRING; HAMPRECHT; JAHN, 2015).

Por meio das técnicas de RFLP e sequenciamento da metade da região codificante C-terminal do gene UL97, tem sido possível identificar os genótipos de cepas resistentes ou sensíveis ao ganciclovir (LURAIN *et al.*, 2001).

Boivin *et al.* (1997) em um estudo longitudinal de terapia de manutenção com ganciclovir detectaram um genótipo de resistência importante e frequente em pacientes sem resposta ao ganciclovir, presente no códon 594 após 173 dias de uso desse medicamento em leucócitos polimorfos mononucleares de sangue periférico e em plasma de um paciente portador do HIV com retinite.

Utilizando o método de isolamento viral em células e posterior análise de sequenciamento, Chou *et al.* (1995) encontraram cepas que expressavam fenótipos de resistência ao ganciclovir em 10 isolados clínicos. Eles verificaram que esses isolados continham mutações de resistência ao ganciclovir nos códons 460 (genótipo M460V), 594 (genótipo A594V) e 595 (genótipos L595S/L595F), e na comparação com os isolados não resistentes ao medicamento, apresentava mudanças na sequência dos aminoácidos.

Lurain *et al.* (2001) detectaram mutações de resistência e compararam os segmentos mutantes com o de outras cepas virais por métodos filogenéticos. Baseados nas mudanças nucleotídicas que leva a mudança na resposta ao medicamento ganciclovir, foram determinados os fenótipos virais resistentes ou não resistentes de acordo com a presença de mutações que podem ocorrer tanto no gene da fosfotransferase (UL97) quanto no gene da DNA polimerase (UL54).

As mutações observadas por Chou *et al.* (2002) nos códons 460 e 607 determinavam genótipos tais como M460V/ M460I; C592G, A594V e L595S, os quais alteravam a atividade enzimática da fosfotransferase. No mesmo ano, esses investigadores observaram que a ocorrência de mutações nos códons 460, 594 e 4954 que cria os genótipos M460V e M460I; A594V e L595S, respectivamente, são mais comuns na ocorrência de resistência aos antivirais. Por outro lado, a ocorrência frequente do genótipo viral C592G somado a outros genótipos presentes no gene

UL97, conferem baixos níveis de resistência ao ganciclovir que podem estar associados às baixas doses desse medicamento.

Gilbert; Bestman-Smith; Boivin (2002) detectaram diversas mutações no gene UL97 em regiões conservadas onde foram descritos genótipos variados. Na região **VI** foram descritos os genótipos M460L, M460V e M460I; na região **VII – IX** o genótipo H520Q; região **IX** os genótipos A590T, A591V, A591D, C592G, C592F, A594T, A594V, A594G, A594P, L595S, L595F, L595W, L595T, entre as regiões **IX-XI**, encontraram maior diversidade genotípica, representada pelos genótipos E596G, E596D, N597I, G598S, G598V, K599T, K599M, C603W, C603Y, A606D, C607Y, C607F e na região **XI**, os genótipos T659I, V665I.

No Brasil, poucos trabalhos têm sido divulgados ou realizados para descrever os genótipos de resistência das cepas do HCMV. Nogueira *et al.* (2006) descreveram genótipos mutantes encontrados em pacientes transplantados renais, onde o genótipo mais frequente foi o L595S (55,6%) além dos genótipos L595S/A594V (22,2%) e L595F/A594V (11,1%). O genótipo L595S foi considerado pelos autores como o mais importante, pois cepas com este genótipo certamente expressam fenótipo de resistência ao ganciclovir.

3 JUSTIFICATIVA

Há décadas, os dados epidemiológicos de várias regiões demonstram que a infecção pelo HCMV é frequente em comunidades de baixo nível socioeconômico, principalmente, de países em desenvolvimento como o Brasil. Em 1996, Pannuti descreveu índices de anticorpos em países sulamericanos tão elevados quanto em países africanos, estimando que mais de 80% da população possuía anticorpos anti-HCMV.

Dentro do contexto epidemiológico do vírus, destaca-se a ocorrência de infecções recorrentes e reinfecções causadas pelo HCMV com elevada morbidade e mortalidade registradas em pacientes com imunodeficiência como transplantados, pacientes com câncer em tratamento de quimioterapia, portadores de LES e indivíduos soropositivos para o HIV. A ocorrência desse tipo de infecção deve-se ao mecanismo de latência com reativação desse agente na imunodeficiência grave. Nesse caso, o diagnóstico clínicolaboratorial é mais difícil, principalmente, na ausência de manifestações clínicas, necessitando de métodos mais específicos e sensíveis do que os convencionais normalmente utilizados.

Os métodos moleculares são úteis para diagnosticar precocemente esse tipo de infecção, além de sua aplicabilidade em diversas pesquisas sobre o citomegalovírus. Análises por RFLP e sequenciamento têm sido utilizadas para caracterizar genótipos e descrever mutações que conferem resistência aos antivirais utilizados no tratamento da citomegalovirose, sendo que essa resistência pode levar ao aumento da morbimortalidade em pacientes com imunodeficiência. Esses fatores ressaltam a importância da realização da pesquisa sobre a diversidade genética do

HCMV e de mutações que conferem resistência ao ganciclovir, medicamento utilizado na terapia de tratamento da citomegalia na rede pública.

Com esse trabalho, espera-se contribuir com a saúde pública de nosso Estado, apresentando dados importantes que possam subsidiar a introdução de medicamentos alternativos para o tratamento da citomegalia em pacientes com imunodeficiência e para o fortalecimento do conhecimento científico na Região Amazônica.

4 OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Descrever a diversidade genética do CMV por meio da detecção de mutações que conferem resistência viral ao ganciclovir em pacientes imunodeficientes da cidade de Belém.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Identificar as principais mutações (ou genótipos) no domínio catalítico do gene da fosfotransferase pUL97 nos subgrupos de pacientes com imunodepressão.
- b) Verificar a prevalência de anticorpos anti-HCMV e descrever o perfil soroepidemiológico dos indivíduos estudados.
- c) Verificar os índices de infecção viral por dois métodos laboratoriais a fim de estabelecer qual é o mais indicado para o diagnóstico viral da citomegalovirose nas imunodeficiências.
- d) Verificar a relação entre a carga viral do HCMV e a presença de manifestações clínicas nos pacientes.

5 CASUÍSTICA E MÉTODOS

5.1. ASPECTOS ÉTICOS

Os participantes do estudo foram esclarecidos sobre o conteúdo e os objetivos do projeto, em seguida assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido - TCLE (anexo) informando a sua participação, conforme normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos, sendo assegurada a privacidade das informações e o anonimato dos sujeitos da pesquisa.

As precauções de ordem ética seguiram as recomendações da Resolução nº 466/2012 da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Brasil, 2000).

O projeto foi registrado no SISNEP (CAAE-5618.0.000.072-09) aprovado no Comitê de Ética do Instituto Evandro Chagas (anexo).

5.2. CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

Foi realizado entre os anos 2010-2015 um estudo observacional transversal com amostragem não probabilística por conveniência, a partir da busca ativa em três Hospitais da rede pública que concentram o maior número de indivíduos imunodeficientes com diagnóstico confirmado de HIV, pacientes com neoplasia em tratamento com quimioterapia, pacientes com LES e transplantados de órgãos com suspeitas de infecções oportunistas.

5.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Participaram do estudo pacientes de todas as faixas etárias e de ambos os sexos, pessoas vivendo com HIV/aids, pacientes transplantados, pacientes portadores de LES e pacientes com câncer em tratamento com quimioterapia em hospitais da rede pública.

Como critério clínico, foram incluídos os pacientes internados com suspeita de infecção com pelo menos um dos seguintes sinais: febre, fraqueza, mialgias e diarreia ou ainda por indicação do médico assistente. Os pacientes com câncer deveriam estar em tratamento de quimioterapia por no mínimo um mês de tratamento, sintomático ou assintomático.

Não foram incluídos pacientes do atendimento ambulatorial, pacientes portadores de necessidades especiais, indígenas, recém-nascidos, os que se recusaram a participar do estudo e pacientes sem HIV/aids, LES, câncer ou sem órgão transplantando. Adotou-se como critério de exclusão laboratorial para as análises moleculares, as amostras de pacientes com sorologia negativa para o (s) anticorpo (s) IgG e/ou IgM para o HCMV, mas foram consideradas para as análises soroepidemiológicas.

5.4. TAMANHO AMOSTRAL

O tamanho amostral foi calculado utilizando o subprograma STATCALC do programa EPI-Info, versão 7.0, sendo considerada a frequência anual de 75% anticorpos para o HCMV em indivíduos de Belém e áreas afins com base em resultados de dados sorológicos obtidos no Laboratório de Virologia da Seção de

Meio Ambiente do Instituto Evandro Chagas-SAMAM/IEC (fonte: Banco de dados da SAMAM/IEC/AN, 2010).

5.5. OBTENÇÃO DA AMOSTRA

As amostras de sangue foram colhidas entre o período de 2010-2012, após assinatura do TCLE e preenchimento de um questionário clinicoepidemiológico contendo dados necessários para realização do estudo. A colheita de sangue foi realizada por punção endovenosa com seringas e agulhas descartáveis, estéreis, sendo obtido o volume total de 10 ml fracionado em duas alíquotas, uma de 7 ml depositados em tubos sem anticoagulante para pesquisa de anticorpos IgG e IgM, e outra de 3 ml com anticoagulante para as análises moleculares.

Foram utilizadas fichas epidemiológicas contendo dados de identificação pessoal, dados clínicos atuais e informações socioeconômicas (anexo), sendo a ficha específica para cada grupo de pacientes. As informações de ordem geral (não clínicas) foram obtidas por meio de informações fornecidas pelos pacientes ou responsáveis legais, sendo que os dados clínicos foram coletados a partir de prontuários do paciente e pelo profissional médico que fazia o acompanhamento do mesmo.

5.6. TÉCNICAS LABORATORIAIS

5.6.1 Sorologia

5.6.1.1. Ensaio Imunoenzimático ELISA

As amostras de sangue colhidas sem anticoagulante foram destinadas às análises sorológicas pelo método imunoenzimático ELISA, utilizando-se *Kits* do Laboratório DiaSorin (Itália) para determinação quantitativa do anticorpo IgG e qualitativa do anticorpo IgM anti-HCMV.

A reação foi feita em microplacas sensibilizadas com anticorpos anti-HCMV de rato. Os soros testados foram diluídos 1:101 em tampão diluente fornecido no *kit*, sendo adicionados 100 µL dos soros controles nos primeiros poços e a partir do 5º poço da placa, as amostras testes. Seguiu-se as etapas de incubação a 37°C/60 min, lavagem com tampão PBS e aspiração dos conteúdos dos poços. Na sequência foram adicionados 100 µL do conjugado enzimático (anticorpo IgG monoclonal de rato conjugado com uma peroxidase) seguido das etapas de incubação, lavagem e aspiração. Posteriormente, adicionou-se 200 µL do substrato cromogênio com formação de um complexo colorido cuja intensidade da cor foi interrompida com a adição de solução de ácido sulfúrico 0,4N.

A determinação dos resultados da pesquisa de anticorpos IgG e IgM foi feita pela comparação dos valores de absorvância das amostras testadas, medida em aparelho espectrofotômetro com comprimento de onda 450/ 630nm ou 405/630nm, em relação ao valor de absorvância do controle *cut-off* ($0,200 \leq COC \leq 0,800$), que é o ponto de corte do teste. As amostras que apresentaram absorvância igual ou

maior que 10% do valor do *cut-off* foram consideradas positivas para a presença do anticorpo pesquisado.

5.6.1.2 Teste *Enzyme Linked Fluorescent Assay* - ELFA

O teste ELFA baseia-se em uma reação imunológica que associa o método imunoenzimático com detecção final em fluorescência.

Foram utilizados Kits do fabricante BIOMÉRIEUX e a reação efetuada em equipamento VIDAS[®] do mesmo fabricante. O *kit* é composto de barretes e cones, sendo que os barretes contêm 10 poços, dos quais um é para amostra e outros para os reagentes que já estão contidos nos barretes cobertos por uma folha de alumínio selado e etiquetado. A etiqueta tem código de barras com informações relativas ao tipo de teste realizado, lote e data de validade, sendo essas informações lidas pelo equipamento no momento do teste. Os barretes e os cones são individuais para cada amostra (Figura 9).

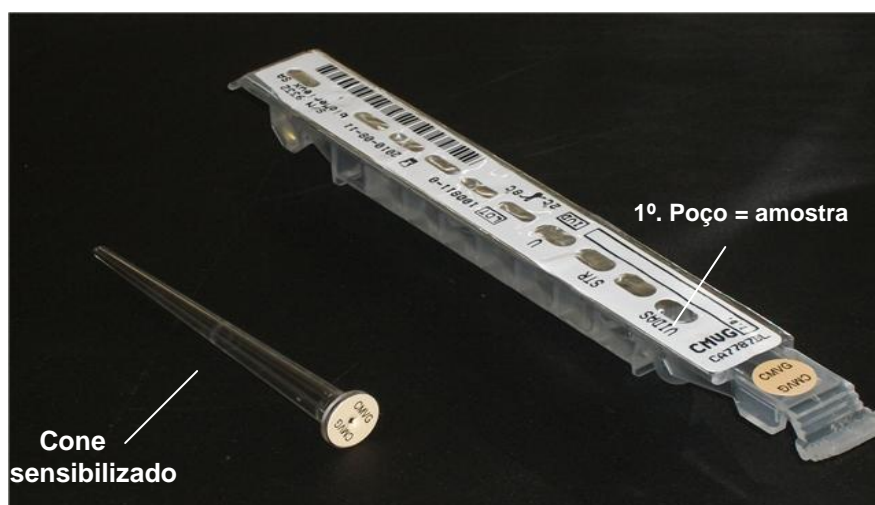


Figura 9. Cone e Barrete do Kit VIDAS para pesquisa de anticorpos

Fonte: BIOMÉRIEUX

Os cones correspondem à fase sólida onde ocorre a reação do teste, eles são sensibilizados com antígeno de HCMV purificado e identificados pelo código HCMVG ou HCMVM e também funcionam como substrato de pipetagem para a reação imunológica.

O 1º poço do barrete apresenta uma parte perfurada para facilitar a introdução de 150 µL da amostra teste. Os poços intermediários contêm os reagentes prontos para uso com a seguinte composição: 2º poço diluente de soro, 3º o tampão de pré-lavagem, 4º, 5º, 7º e 8º o tampão de lavagem, 6º o conjugado (composto por anticorpo monoclonal anti-IgG humanas de rato marcado com fosfatase alcalina + azida sódica 1 g/l), o 9º poço vazio para eliminar os resíduos da reação e o último poço é uma cubeta que permite a leitura em fluorimetria.

As amostras testes foram adicionadas no primeiro poço de cada barrete e introduzidas no equipamento VIDAS®. Diversos procedimentos de pipetagem de amostras, reagentes e lavagens ocorrem de forma automática no interior do equipamento. O resultado final é impresso em uma impressora acoplada no próprio equipamento e expresso quantitativa e qualitativamente.

5.6.2. Técnicas moleculares

5.6.2.1. Extração do DNA viral

A extração do DNA viral no sangue foi realizada pelo método da sílica utilizando *kits* comerciais de extração e purificação de DNA do laboratório *GE® Healthcare*, conforme as instruções do fabricante.

Em tubo de microcentrífuga de 1,5 mL foram depositados 300 µL de sangue total com EDTA, 400 µL da solução de lise e 20 µL de proteinase K. Essa mistura foi

incubada por 10 min a temperatura ambiente e após esse período, a mistura foi depositada em coluna de purificação e centrifugada a 11.000 rpm/1 min. Posteriormente, a coluna contendo o material retido foi transferida para outro microtubo limpo e estéril e adicionados 500 µL de tampão de lise, seguido de centrifugação nas condições anteriores. O filtrado foi descartado e à coluna acrescentava-se 500 µL de solução de lavagem seguida de centrifugação. Novamente a coluna foi transferida para outro microtubo limpo, sendo adicionados, no centro da coluna, 100 µL de tampão de eluição de DNA, previamente aquecido a 70°C. Em seguida realizou-se outra etapa de incubação à temperatura ambiente e centrifugação.

O material genômico extraído foi quantificado em Espectrofotômetro *Nanodrop 2000 Thermo Scientific* e conservado em freezer -20°C para o processamento das etapas de amplificação, detecção e sequenciamento.

5.6.2.2. Carga viral do HCMV

A qPCR teve como objetivo a detecção do DNA e a quantificação da carga viral do HCMV nas amostras que apresentaram anticorpos IgG e/ou IgM na sorologia.

A Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real foi efetuada utilizando kit do fabricante Nanogen® composto de placas de reação, selos ópticos, tubos Ampliprobe (sondas marcadas com fluoróforos FAM e VIC), tubos Amplimix (mistura de primers), tubos Amplimaster (mistura de reagentes da PCR+ fluoróforo ROX para referência passiva + enzima Taq DNA polimerase) e tubos de Amplistandard que contém soluções plasmidiais do gene MIEA em concentrações conhecidas para

quantificação (10^5 , 10^4 , 10^3 e 10^2 cópias / $5\mu\text{l}$) e frascos contendo plasmídio com gene da β -globina humana para controle interno.

O gene da β -globina humana também foi utilizado para avaliar a qualidade da extração e da reação de amplificação. Para o controle da reação da placa foi utilizado o ponto 10^5 do standard com “cycle Threshold” (cT) 25 e R2 (desvio padrão) variando entre 0,99 e 1,00.

A reação amplificou uma região do gene HCMV UL123 (MIEA) do EXON 4 e foi realizada em placa contendo a mistura de reagentes: 100 μL de Amplimix e 100 μL de Probe no tubo do Amplimaster. Essa mistura foi distribuída em volume de 20 μL no fundo dos poços da placa teste. No primeiro poço adicionou-se 5 μL de água de PCR e do 2º ao 5º poço 5 μL de cada um dos quatro Standards: 10^5 10^4 10^3 10^2 . A partir do 6º poço, adicionou-se 5 μL da amostra a ser testada. A reação foi efetuada em equipamento *7500 Real Time PCR System* do fabricante *Applied Biosystem®* (figuras 10 e 11).

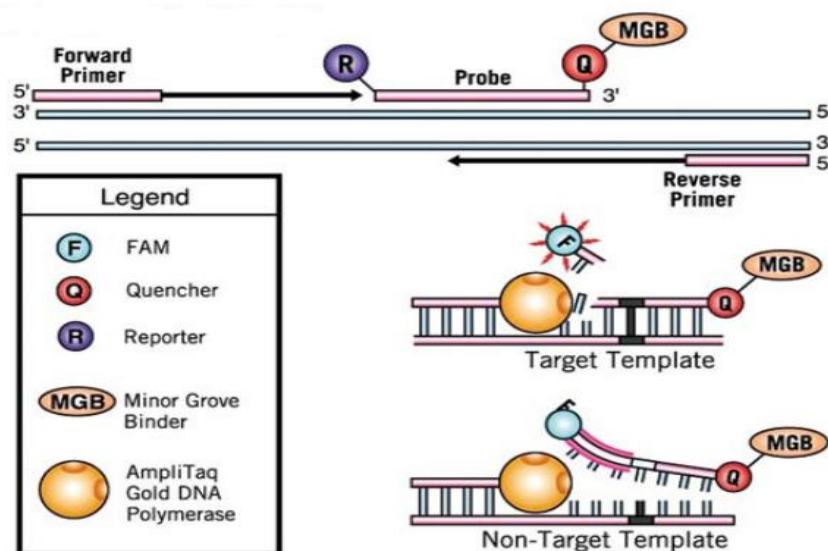


Figura 10. Esquema de reação da qPCR. Fonte: Manual Biometrix



Figura 11. Equipamento 7500 Real Time PCR da Applied Biosystem®

Calculou-se os valores referenciais de 1.332 a 66.66 milhões de cópia de DNA/mL de sangue de detecção ótima na reação para análise quantitativa da qPCR no sangue. Esses valores foram calculados considerando variáveis como: o volume de sangue utilizado na extração ($300\mu\text{L}=\text{Vc}$), volume do tampão de eluição de ($100\mu\text{L}=\text{Ve}$) e o volume de DNA utilizados na qPCR ($5\mu\text{L}=\text{Va}$).

O valor de 66,66 (Nc) é o fator de conversão utilizado para transformar cópias/reação em cópias/mL de sangue. Multiplicando esse fator por 20 ($66,66 \times 20$ cópias/reação) obtém-se o valor referencial mínimo de cópias/mL que é de 1.332 cópias/mL. Ressalta-se que o valor 20 correspondente ao mínimo de cópias do genoma viral detectável na reação pelo equipamento. O resultado final da quantificação genômica na reação (quantity) é obtido em valores absolutos de cópias de DNA viral por mL de sangue de acordo com a seguinte fórmula:

$$Nc = \frac{Ve}{Vc \times Va \times Ee} \times \text{Quantity} = \text{C\u00f3pias/mL}$$

Ve: Volume total do produto da extra\u00e7\u00e3o

Vc: Quantidade de amostra usada na extra\u00e7\u00e3o em mL

Va: Volume de extra\u00e7\u00e3o de DNA na rea\u00e7\u00e3o

Ee: Efici\u00eancia da extra\u00e7\u00e3o (100%)

Nc: Resultado final obtido na rea\u00e7\u00e3o (Genoma de CMV presente na amostra)

Quantity = Resultado da rea\u00e7\u00e3o em gEq (Genomas equivalentes) que multiplicado pelo valor do Nc obt\u00e9m-se o resultado final em c\u00f3pias/mL. (NC = 66,66 X Quantity = C\u00f3pias/mL).

5.6.2.3. Detec\u00e7\u00e3o de muta\u00e7\u00f5es que conferem resist\u00eancia aos antivirais

Para detectar poss\u00edveis muta\u00e7\u00f5es que conferem resist\u00eancia ao ganciclovir no gene codificador da enzima fosfotransferase (GILBERT; BESTMAN SMITH; BOIVIN, 2002) foi efetuada a t\u00e9cnica de pirosequenciamento desenvolvida no Centro de Inova\u00e7\u00f5es Tecnol\u00f3gicas do Instituto Evandro Chagas (CIT/IEC) e an\u00e1lises em programas espec\u00edficos de bioinform\u00e1tica para an\u00e1lise nucleot\u00eddica e aminoac\u00eddica de um segmento que abrange as regi\u00f5es alvo **VI**, **VII-IX** e **XI**. Para a execu\u00e7\u00e3o do sequenciamento, foram realizadas duas rea\u00e7\u00f5es de PCR, uma para amplificar um fragmento de 2096 pb e outras por Nested-PCR para obten\u00e7\u00e3o de outros fragmentos de menor tamanho. Essas rea\u00e7\u00f5es foram realizadas para obten\u00e7\u00e3o e amplia\u00e7\u00e3o da biblioteca gen\u00f4mica.

5.6.2.4. Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

Nesta reação amplificou-se o segmento de 2096 pb, entre os códons 418-708, utilizando-se o par de iniciadores CPT0 (*forward*) e CPT02096 (*reverse*) (quadro 3). Os volumes dos reagentes utilizados na reação foram os seguintes: 5,0 µL de tampão PCR 10X concentrado, 43,6 µL de água pura para PCR, 0,6 mM de MgCl₂, 0,3 mM dNTPs, 0,1 pmol de cada iniciador, 0,8 U Taq DNA polimerase, 1% de DMSO e 5µL de DNA extraído para um volume final de 20µL. As condições de reação estão apresentadas no quadro 3.

Quadro 3. Condições de reação para amplificação dos segmentos do gene UL97 para o sequenciamento

Iniciadores 1ª. reação	Pré-Desnaturação	Ligação dos iniciadores	Alongamento	Extensão e refrigeração	No. de Ciclos
CPT0 CPT02096	95°C 4' 95°C 45"	55°C 30"	72°C 1'30"	72°C 7' 4°C	35
1º.Nested-PCR					
CT1088 CT1619	95°C 4' 95°C 30"	55°C 30"	72°C 1'	72°C 10' 4°C	35
2º.Nested-PCR					
CT1713 CT1830M	95°C 4' 95°C 30"	55°C 30"	72°C 1'	72°C 10' 4°C	35

Fonte: Boivin *et al.* (1996); Chou *et al.* (1995).

5.6.2.5. Reação de *Nested* PCR

Foram realizadas duas reações de *Nested* PCR objetivando a confirmação da amplificação do produto da primeira PCR em decorrência do elevado tamanho do produto, o qual não possuía mobilidade suficiente para ser visualizado em gel de agarose.

A primeira reação de *Nested* utilizou o par CT1088 (*forward*) e CT1619 (*reverse*) que amplificou um fragmento de 531 pb, e a segunda utilizou o par CT1713 (*forward*) e CT1830M (*reverse*) que amplificou outro segmento de menor tamanho com 117 pb (quadro 4). Em cada reação foram utilizados os reagentes nos seguintes volumes e concentrações: 5,0 µL de tampão PCR 10X, 43,15 µL de água pura para PCR, 0,6 mM de MgCl₂, 0,75 mM dNTPs, 0,1 pmol de cada iniciador, 0,2 U Taq DNA polimerase, 1% de DMSO e 1µL do produto da primeira PCR. O volume final das reações foi de 50 µL e as condições de temperaturas e número de ciclos estão também apresentados no quadro 3.

Quadro 4. Sequências dos iniciadores da reação de PCR do sequenciamento genômico parcial do gene UL97

Iniciadores	Sequencias (5' → 3')
CPT0	ACGGTGCTCACGGTCTGGAT
CPT0 2096	TGAGCAGACAGGCGTCGAAGCAGTGCCTGAGCTTGCCGTTCTT
CPT1088	ACG GTG CTC ACG GTC TGG AT
CPT 1619	AAA CGC GCG TGC GGG TCG CAGA
CPT1713	CGGTCTGGACGAGGTGCGCAT
CPT1830M	AATGAGCAGACAGGCGTCGAAGCAGTCGTGAGCTTGCGTTCTT

Fonte: Boivin *et al.* (1996)

5.6.2.6. Eletroforese

Devido o elevado tamanho do produto obtido na reação de PCR, foram submetidos à corrida eletroforética somente os produtos da reação de *Nested*.

Foi realizada eletroforese horizontal em gel de agarose 1% preparado com uma solução de tampão borato EDTA (TBE) 1x solidificado à temperatura ambiente. Foi preparado uma mistura de 10 µL de amostra teste amplificada e 3 µL de solução corante.

A aplicação da amostra ocorreu na seguinte ordem: no 1º poço o marcador de peso molecular 100 pb, no 2º poço uma amostra de DNA amplificado da cepa padrão de laboratório AD-169 do HCMV e a partir do 3º poço aplicou-se os produtos da PCR. Iniciou-se a eletroforese colocando o gel em solução de TBE 1% submetido à diferença de potencial elétrico onde as amostras migraram de um polo negativo para outro positivo em uma voltagem de 80 V. Após um tempo de observação, o gel era submerso em uma solução corante contendo 500 mL de tampão TBE 1x e 10 µL de solução de brometo de etídio por 15 min, suficiente para que os fragmentos amplificados das amostras fossem visualizados em luz ultravioleta. O gel era visualizado em sistema de fotodocumentação Vilber Lourmert® à luz ultravioleta, comprimento de onda de 320nm. Após essa etapa, os produtos foram submetidos à etapa de purificação.

5.6.2.7. Purificação dos produtos de PCR para o sequenciamento

A purificação dos produtos da PCR foi feita com a finalidade de retirar inibidores da reação, excesso de oligonucleotídeos, enzimas e outras impurezas provenientes da PCR.

Foram utilizados kits comerciais do fabricante Qiagen e a técnica foi efetuada nas seguintes condições: em um microtubo com volume de 1,5 mL, limpo livre de Dnase e Rnase foram adicionados 5 volumes de tampão de captura (PB) para 1

volume de produto de PCR. Posteriormente, essa mistura foi transferida para uma coluna de purificação que acompanha o kit, adaptada a um tubo coletor com volume para 2 mL, seguindo-se a centrifugação a 1.300 rpm, 30-60 segundos. O sobrenadante foi descartado e a coluna foi colocada de volta no mesmo tubo e a esta foram adicionados 0,75 mL de tampão de lavagem (PE) seguido de centrifugação por 30-60 seg/13.000rpm. O fluxo foi descartado e a coluna colocada de volta no mesmo tubo coletor. A coluna foi transferida para outro microtubo com volume de 1,5 mL para a etapa de eluição do material, sendo adicionados 30 µL de tampão EB (tampão de eluição) no centro da membrana da coluna, e centrifugada por 1 min. Posteriormente o produto purificado foi quantificado em aparelho L-Quant da Loccus Biotecnologia.

5.6.2.8. Reação de pirosequenciamento

A biblioteca genômica inicialmente foi formada com a amplificação prévia do segmento alvo de DNA contendo 2096 pb do gene UL97 por PCR convencional realizada no Laboratório de Biologia Molecular da SAMAM. Posteriormente, ampliou-se por emulsão (emPCR) (MARGULIES *et al.*, 2005) utilizando kits do fabricante Roche no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Inovações Tecnológicas do Instituto Evandro Chagas-CIT/IEC.

A reação por emulsão foi efetuada misturando os produtos da reação de Nested PCR com as enzimas e esferas de captura embebidas em solução chamada MOCK e os reagentes da reação de PCR (água, tampão e enzima). Esses reagentes foram injetados no interior de pequenos *containers* cilíndricos contendo óleo sintético. Essa mistura e a agitação vigorosa produzem a emulsão (pequenas gotas

ao redor das esferas). Cada gotícula deveria conter um fragmento de DNA isoladamente amplificado por PCR, produzindo milhões de cópias imobilizadas nas esferas de captura. Ao final da reação de PCR, as esferas que não tinham fragmentos de cDNA foram eliminadas, e aquelas que apresentaram cDNA amplificado foram retidas e utilizadas para a etapa de processamento e leitura do sinal de sequenciamento (MARGULIES *et al.*, 2005).

As esferas de captura contendo o DNA amplificado foram adicionadas aos orifícios da placa denominada *PicoTiterPlate*. A placa foi inserida no sequenciador *GS Junior 454*, sendo que cada amostra recebeu um *barcode* diferente. Os nucleotídeos (A, C, T, G) migraram em uma ordem fixada sobre os orifícios da placa, entrando em contato com as esferas de captura com os DNAs amplificados. A adição de um ou mais nucleotídeos complementares ao DNA alvo resultou em sinal de quimioluminescência que foi capturado pela câmera CCD do sequenciador.

Após a técnica do sequenciamento do segmento de 2096 pb, foi possível obter um análise ótima de um segmento correspondente a 741 pb de cada amostra analisada. Os segmentos correspondentes as 82 amostras foram alinhados e comparados com o de outras sequências de HCMV, depositada no GeneBank, tomando-se por base a sequência depositada por Boutollean; Burrel e Agut (2009), registro HQ158787 (França). A comparação de sequências ocorreu entre as posições nucleotídicas 1087 – 1828, com 94,5% de identidade com a cepa do alinhamento e 98% de identidade com a cepa AD169 (acesso no. X17403).

5.6.2.9. Análise computacional e montagem dos genomas obtidos por pirosequenciamento

Para montagem das sequências obtidas pelo sistema de pirosequenciamento, foi empregado o programa Newbler como algoritmo de montagem. Dentro deste sistema utilizou-se o módulo *GS De Novo Assembler*, aplicando os parâmetros de comprimento de sobreposição mínima de 40 e identidade de sobreposição mínima de 80% (<http://www.454.com/products-solutions/analysis-tools/gS-de-novo-assembler.asp>). Este programa busca sobrepor as leituras geradas pelo GS FLX 454 baseado nos parâmetros estabelecidos anteriormente, gerando os *contigs*, ou seja, o montador Newbler consiste de uma série de módulos: o *Overlapper*, que localiza e cria sobreposições entre leituras; o *Unitigger*, que constrói *contigs* maiores de sobreposição de sequência de leituras, e o *Multialigner*, que gera chamadas de consenso e pontuações de qualidade para as bases de cada *contig* (MARGULIES *et al.*, 2005).

O genoma final obtido foi visualizado pelo programa Geneious v.7.1.8. (Biomatters, Nova Zelândia, <http://www.geneious.com>) e inspecionado por um bioinformata, bem como por um especialista no organismo e posteriormente confrontado com sequências disponíveis no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para comparação e identificação, empregando-se o programa BLASTX (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>).

5.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar o método laboratorial adequado para o diagnóstico viral da citomegalovirose nas imunodeficiências, utilizou-se o *Screening Test* (Teste do Crivo) do Programa Graph Pad, versão 5.0. Este teste avalia o nível de sensibilidade e especificidade de um método (método sorológico) em relação a outro método considerado padrão ouro (método molecular - qPCR).

Para análise entre a relação da carga viral e a presença de manifestações clínicas foi utilizado o Teste G de Williams com correção de Yates, do programa Graph Pad, versão 5.0.

6. RESULTADOS

6.1 DADOS SÓCIOECONÔMICOS

No período de 2010-2015, participaram do estudo 672 pacientes, assim distribuídos: 243 indivíduos vivendo com HIV/aids, internados no Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB); 257 pacientes portadores de neoplasias em tratamento com quimioterapia; 112 transplantados renais do Hospital Ophir Loyola e 60 portadores de LES internados para tratamento no Hospital Jean Bittar.

De acordo com as respostas obtidas nas fichas epidemiológicas, os dados socioeconômicos dos participantes do estudo foram resumidos na tabela 1. A maior contribuição no estudo foi do sexo feminino; quanto ao estado civil, houve maior participação dos indivíduos solteiros.

A faixa etária dos voluntários da pesquisa variou de 1 a 89 anos de idade. Entre os pacientes transplantados, a faixa etária foi de 4 - 66 anos; para os pacientes portadores de neoplasias variou de 1-79 anos; para portadores do HIV foi de 4 – 70 anos e pacientes com LES a faixa etária foi de 13 - 89.

O nível de escolaridade mais frequente foram o fundamental e o médio, e a renda familiar predominante compreendia entre 1 e 2 salários mínimos.

Não foi possível obter dados sobre estado civil, escolaridade e renda familiar do grupo de transplantados, pois foi utilizada uma ficha padrão pré-existente na rotina de atendimento de pacientes transplantados no ambulatório da SAMAM.

Tabela 1. Aspectos socioeconômicos identificados nas fichas epidemiológicas dos 672 pacientes com imunodeficiência, Belém-Pará.

Dados Pessoais e de Identificação	Total (n=672)	Frequência (%)
1. Sexo		
Masculino	386	57,74
Feminino	286	42,26
2. Faixa etária (anos)		
< 20	131	19,49
21 – 30	122	18,16
31 - 40	153	22,77
41 – 50	132	19,64
> 50	134	19,94
3. Estado Civil ♣		
Casado	110	19,68
Separado	29	5,19
Solteiro	254	45,44
União Consensual	49	8,77
Viúvo	23	4,11
Não se aplica	94	16,81
4. Escolaridade ♣		
Analfabeto	25	4,47
Pré-escolar	34	6,08
Fundamental	290	51,88
Nível Médio	180	32,20
Nível Superior	30	5,37
5. Renda Familiar ♣		
Não sabe	21	3,76
< 1 salário mínimo	180	32,19
1 a 2 salários mínimos	302	54,03
Mais de 2 salários mínimos	56	10,02

♣ Dados ausentes no banco de Transplantados

Também foi investigado em cada grupo a frequência de exposição aos fatores de risco para ocorrência de infecções oportunistas (Quadro 5). A corticoterapia foi relatada em mais de 50% dos indivíduos portadores de LES e transplantados renais,

e em menos de 50% dos pacientes portadores de neoplasias. Entre os grupos de portadores do HIV, foi comum o uso de drogas ilícitas e a presença de tatuagens, assim como a ocorrência de comorbidades. A transfusão de sangue foi relatada em todos os grupos, sendo mais referida no grupo de neoplásicos.

Quadro 5. Fatores de riscos favoráveis ao desenvolvimento da doença por HCMV entre os grupos de pacientes com imunodeficiência, Belém-Pará.

Fatores de Risco	Neoplasias		Transplantados		*LES		HIV	
	S	N	S	N	S	N	S	N
Quimioterapia	257	0	-	-	-	-	-	-
Corticoterapia	63	194	96	16	49	12	-	-
Linfócitos 100/mm ³	-	-	-	-	-	-	125	116
Relação D+/R-	-	-	0	85	-	-	-	-
Leucopenia	22	41	-	-	-	-	138	103
Tatuagens	-	-	5	107	3	58	89	152
Drogas Ilícitas	-	-	2	110	1	60	86	155
Álcool	-	-	44	68	2	59	-	-
Comorbidades	52	205	6	106	7	54	215	26
*T. sanguínea	157	100	99	13	32	20	84	159

S= Sim; N= Não; *8 pacientes sem informação; T. = transfusão

Quanto à presença de manifestações clínicas, foram observados mais frequentemente sintomas gerais, digestivos, neurológicos, oftalmológicos e renais

(Quadro 6). Os grupos de portadores do HIV e de neoplasias apresentaram maior frequência de indivíduos sintomáticos.

A maior ocorrência de indivíduos sem manifestações clínicas pertencia ao grupo dos transplantados, enquanto que no grupo HIV, não houve registros de indivíduos assintomáticos.

Quadro 6. Manifestações clínicas referidas pelos pacientes com imunodeficiência, Belém-Pará.

Sintomas	Transplantados	Neoplasias	Portadores de HIV	Portadores de LES	TOTAL
Gerais	23	210	219	35	487
Digestivos	26	183	163	24	396
Neurológicos	1	162	159	36	358
Oftalmológicos	0	133	59	26	218
Renais	2	9	1	17	29
Outros	15	52	53	18	138
Assintomáticos	59	6	0	3	68

6.2. RESULTADOS LABORATORIAIS

6.2.1. Resultados das análises sorológicas

Os resultados laboratoriais obtidos pelo método sorológico para o HCMV demonstrou que 96,1% (n=661) dos voluntários apresentavam anticorpos anti-HCMV da classe das IgG, indicando doença pregressa ou contato prévio, enquanto que

apenas 2,4% (n=16) apresentaram anticorpos de fase aguda (IgM) sugestivo de infecção recente, e 1,3% (n=9) não haviam entrado em contato com o vírus.

A tabela 2, apresenta o perfil sorológico de cada grupo, sendo mais frequente o perfil de infecção pregressa IgG+IgM- (96%) em todos os grupos. O perfil de infecção aguda representado por IgG+IgM+ foi observado em baixa frequência, menor que 5%, enquanto que o perfil IgG-IgM- estava presente na maioria dos grupos em baixa frequência, exceto nos portadores de LES, onde era ausente.

Tabela 2. Comparação dos perfis sorológicos entre os grupos de pacientes com imunodeficiência, Belém-Pará

Grupos	N	*Perfis sorológicos anti- HCMV		
		IgG+IgM- N (%)	IgG+IgM+ N (%)	IgG-IgM- N (%)
Transplantados	112	107 (95.5)	4 (3.6)	1 (0.9)
Neoplasias	257	245 (95.3)	4 (1.6)	8 (3.1)
Portadores de HIV	243	235 (96,7)	5 (2.1)	1 (0.4)
Portadores de LES	60	57 (95.1)	3 (4.8)	0 (0.0)
Total	672	644 (95,83%)	16 (2,39%)	9 (1,34%)

*Não foram considerados os perfis com anticorpos indeterminados

O quadro 7 apresenta a distribuição e frequência dos anticorpos anti-HCMV em relação ao sexo, nos diferentes grupos. Os anticorpos IgG+ em pessoas do sexo feminino pertencentes aos grupos portadores do HIV e de LES, ocorreram na mesma proporção (1:1).

Quadro 7. Distribuição de anticorpos anti-HCMV nos grupos estudados de acordo com o sexo, Belém-Pará.

Anticorpos	Transplantados		Portadores HIV		LES		Neoplasia	
	Fem (N)	Mas (N)	Fem (N)	Mas (N)	Fem (N)	Mas (N)	Fem (N)	Mas (N)
IgG+	41	71	51	189	51	09	137	112
IgG-	00	00	00	01	00	00	04	04
IgM+	02	02	02	03	03	00	03	01
IgM-	39	68	49	187	48	09	138	115

Fem= Feminino
Mas= Masculino

O anticorpo IgG não estava presente nos indivíduos transplantados e nos portadores de LES, em ambos os sexos, e em um indivíduo do sexo masculino no grupo de portadores do HIV. O anticorpo IgM estava presente, em baixa frequência em ambos os sexos, na maioria dos grupos, exceto no sexo masculino nos portadores de LES.

Ao relacionarmos os resultados da pesquisa de anticorpos nas diferentes faixas etárias, foi evidenciado que os anticorpos classe IgG foram mais baixos nas faixas etárias menores de 20 anos, estando em 100% das amostras da faixa etária de 21-30 anos. Por outro lado, a presença de anticorpos de infecção aguda (IgM) ocorreu em menores proporções no grupo < 20 anos e > 50 anos (quadro 8).

Quanto aos dados referentes às técnicas moleculares por qPCR, a amplificação das amostras em tempo real ocorreu a partir do 18º ciclo com o máximo de amplificação no 30º ciclo, como demonstra a figura 12. Esta figura apresenta a curva de detecção do DNA viral das amostras dos voluntários da pesquisa.

Quadro 8. Distribuição de anticorpos de acordo com a faixa etária

Grupos	Anticorpos anti - HCMV					
	IgG+ (N)	IgG- (N)	IgM- (N)	IgM+ (N)	IgG (Indeterminados)	IgM (Indeterminados)
> 10	58	04	61	01	00	00
10 – 20	66	02	68	00	00	00
21 – 30	120	00	116	04	02	02
31 - 40	152	01	147	06	00	00
41 – 50	130	01	127	04	01	01
> 50	134	01	133	01	00	01
Total	660	9	652	16	03	04

*1 IgM indeterminada em transplantados

** 2 IgG indeterminadas e 2 IgM indeterminadas em portadores do HIV

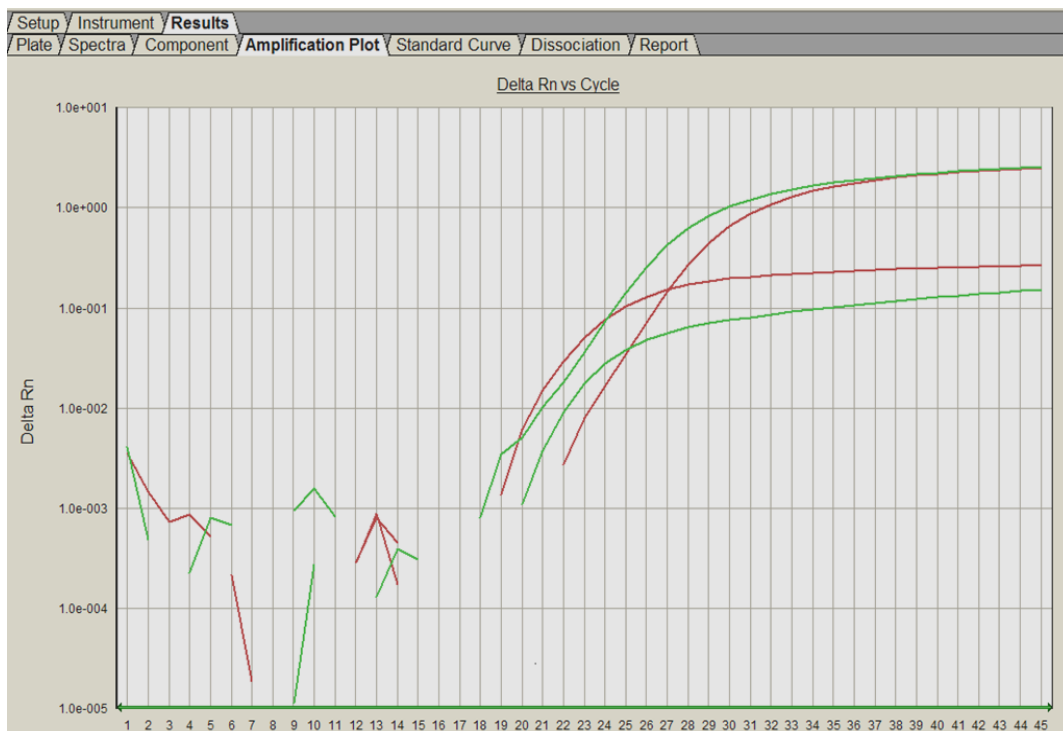


Figura 12. Curva de amplificação em tempo real das amostras analisadas

As duas linhas superiores, verde e vermelha, estão representando uma amostra e um controle β -globina (DNA-CPE) de um portador do HIV, enquanto as linhas inferiores representa amostra de outro paciente portador do HIV e seu controle interno correspondente.

De acordo com os resultados da análise de amplificação do genoma viral, foi detectado qualitativamente DNA do HCMV em 31% (n= 210/672) das amostras. Desse total, 16% (n= 34/210) possuíam carga viral entre o valor mínimo e máximo do ponto de corte da técnica (1,332 – 66,66 cópias/mL) e 34% (n= 72/210) estavam com carga viral acima do limite máximo de detecção (>66,66 cópias/mL). Aproximadamente, 50% (n= 104/210) estavam abaixo do limite de detecção do teste (<1,332 cópias/ml), logo eles não foram considerados doentes sob o ponto de vista laboratorial, nessa análise.

Na análise intragrupo, foi detectado DNA viral em 33% (n=37) das amostras dos pacientes transplantados, sendo que 51,4% (n=19) dos indivíduos desse grupo estavam com infecção ativa por HCMV, pois a carga viral estava acima do valor referencial mínimo (1,332 cópias/mL). Entre as 37 amostras positivas, 13% (n= 5) dos indivíduos apresentaram carga viral na faixa de detecção do *kit* (1,332–66,66 cópias/mL), outros 38% (n=14) apresentavam carga viral acima do valor referencial máximo (Tabela 3), e 49% (n=18) abaixo do limite de detecção. A variação da carga viral nesse grupo variou entre 1,30 a 1823121,00 cópias/mL, com média de 102127,98 cópias /mL.

No grupo de pacientes portadores de neoplasias, 92% (n=237) eram negativos e 8% (n= 20) dos indivíduos apresentaram DNA viral, entre os quais, 95% (n=19) apresentaram carga viral abaixo do valor mínimo referencial e 5% (n=1)

acima desse limite, sugestivo de infecção viral. O valor mínimo da carga viral foi de 1,36 e o máximo de 1357,00 cópias/mL, com média de 416,68 cópias/mL.

Entre os portadores do HIV, aproximadamente 60% (n=140) foram positivos na técnica de detecção do genoma do HCMV, sendo que 33% (n=81/140) eram sugestivos de infecção viral ativa. Do total de indivíduos com suspeita de infecção, 23% apresentaram carga viral acima do valor máximo (>66,66 cópias/mL) de corte calculado no estudo, 10,3% possuíam carga viral na faixa de detecção do teste (1,332 - 66,66 cópias/mL) e 24,3% abaixo do limite mínimo de detecção viral (<1,332 cópias/mL). A frequência de indivíduos negativos foi de 42,4% (Tabela 3).

A carga viral total dos voluntários portadores do HIV ficou compreendida entre 14,0 e 4764538,00 cópias/mL, com média de 107479,48 cópias/mL.

Tabela 3. Comparação dos valores da carga viral entre os diferentes grupos de pacientes com imunodeficiência de Belém-Pará.

Grupos	Carga Viral				
	< 1332	1332 – 66,66	>66,66	Neg	Total
Transplantados	18(16%)	5 (4,5%)	14(12,5%)	75(67%)	112
Neoplasias	19(7,4%)	1(0,4%)	0 (0,0%)	237 (92,2%)	257
Portadores de HIV	59(24,3%)	25(10,3%)	56(23%)	103(42,4%)	243
Portadores de LES	8(13,3%)	3(5,0%)	2(3,3%)	47(78,3%)	60
Total	101 (15%)	34 (5%)	72(11%)	463 (69%)	671

No grupo de pacientes com LES, 78,3% eram negativos para detecção do genoma, e entre os positivos, 3,3% apresentavam carga viral elevada, superior ao

valor máximo (66,66 cópias/mL) de referência da reação de qPCR, sendo que 5% estavam dentro do limite de detecção. O valor mínimo da carga viral nesse grupo foi de 55,20 cópias/mL e o máximo de 23149,00 cópias/mL, sendo o valor médio da carga viral de 3438,17 cópias/mL.

Avaliando-se os índices de positividade relacionados à infecção ativa pelo HCMV, percebeu-se que por meio do método sorológico 2,4% (n=16) dos indivíduos estavam com infecção pelo HCMV, enquanto que pelo método molecular, este índice correspondia a 16% (n=106) dos indivíduos investigados, como demonstrado na tabela 4.

Tabela 4. Comparação dos resultados qualitativos de infecção ativa por ambos os métodos laboratoriais nos grupos estudados.

Grupos	HCMV		
	N	IgM+ N (%)	qPCR+ N (%)
Transplantados	112	4 (3,6)	19 (17,0)
Neoplasias	257	4 (1,6)	1 (0,4)
Portadores de HIV	243	5 (2,1)	80 (33,0)
Portadores de LES	60	3 (5,0)	5 (11,7)
Total	672 (100%)	16 (2,4%)	106(16,0%)

Com base nas diferenças de positividade no diagnóstico de infecção por HCMV, avaliou-se o nível de sensibilidade e especificidade do método sorológico em relação ao método molecular utilizando-o como padrão ouro, conforme *Screening Test* (Teste do Crivo) apresentado na tabela 5.

Tabela 5. Análise de sensibilidade e especificidade do método sorológico com método molecular no *Screening Test* (Teste do Crivo)

IgM	qPCR		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	6 (5,7%)	10 (2%)	16 (2,5%)
Negativo	100 (94,3%)	556 (98%)	656 (97,5%)
Total	106	566	672

Sensibilidade da Sorologia: 5,71%
 Especificidade da Sorologia: 98,06%
 Prevalência da Infecção por HCMV: 15,63%

Na análise de comparação dos dados clínicos com os dados laboratoriais, percebe-se que os indivíduos que apresentaram sintomas gerais, digestivos e neurológicos, apresentaram infecção aguda por HCMV em ambos os métodos laboratoriais (quadro 9). Entre os pacientes sintomáticos, o maior número de indivíduos com elevada carga viral acima do valor de referência (>66,66 cópias/ml) no estudo apresentavam sintomas gerais, neurológicos e oftalmológicos. Entre os indivíduos assintomáticos notou-se quatro indivíduos que apresentaram anticorpos IgM sugestivo de infecção aguda, e um que apresentava carga viral acima do valor máximo de referência da qPCR. Na relação entre as manifestações clínicas e a carga viral, não houve significância estatística de acordo com o teste empregado (Teste G de Williams com correção de Yates).

Do total de amostras positivas no método sorológico, 2% foram consideradas falso-positivas quando comparadas com os resultados do teste molecular (padrão

ouro), e entre os negativos na sorologia, 94,3% amostras foram positivas no método molecular.

Os dados obtidos da tabela 5 demonstraram elevada especificidade e baixa sensibilidade do método sorológico em relação ao método molecular.

Quadro 9. Comparação entre os dados clínicos e laboratoriais qualitativos e quantitativos dos pacientes com imunodeficiência, Belém-Pará.

Manifestações clínicas	Sorologia		qPCR		Carga Viral		
	IgM-	IgM+	Neg	Pos	< 1332	1332 a 6666	> 66,66
Gerais	476	11	317	174	78	33	63
Digestivos	389	7	259	137	64	24	49
Neurológicos	350	8	241	117	59	19	39
Oftalmológicos	210	2	167	45	26	7	12
Renais	28	1	2	7	4	1	2
Assintomáticos	134	4	126	12	11	3	1
Outros	66	2	61	7	5	0	2

Quanto aos dados relacionados à mortalidade dos pacientes no decorrer do estudo, obteve-se informações de que 50 indivíduos tiveram evolução fatal do quadro clínico. Destes, 49 eram portadores do HIV e um transplantado renal. Entre os portadores do HIV que faleceram 12 pacientes possuía carga viral abaixo do limite mínimo de detecção (<1,332 cópias/mL), seis apresentaram carga viral compreendida entre os valores de 1,332 e 66,66 cópias/mL e 16 pacientes acima do limite máximo de carga viral. O outro paciente que também faleceu e pertencia ao

grupo de transplantados, apresentava o perfil sorológico de IgG-IgM- e havia recebido um órgão (rim) de um doador com IgG+IgM- para o HCMV, segundo informações do profissional médico que o acompanhava.

Este paciente apresentou quadro inicial de astenia, epigastralgia e linfopenia, com regressão após terapia antiviral com ganciclovir. Após o período de remissão do quadro inicial, passou a fazer o monitoramento laboratorial por qPCR para controle da infecção, havendo algumas recidivas virais e agravamento do quadro por desenvolver hipoplasia medular e infecções secundárias bacterianas que culminou com o óbito do paciente. A carga viral deste paciente durante o estudo variou de 2731,7 a 1448939,07 cópias com média de 70437,26 cópias/mL. Quanto aos demais pacientes que faleceram, a maioria apresentava mais de três manifestações clínicas, simultaneamente, independente do perfil sorológico e molecular (quadro 11).

Tabela 6. Comparação dos valores da carga viral do HCMV de acordo com a presença de manifestações clínicas referida pelos pacientes com imunodeficiência de Belém-Pará.

Grupos	Carga Viral		Total
	1,332-66,66	> 66,66	
Presença de sintomas	31 (30,4%)	71 (69,6%)	102
Ausência de sintomas	03 (75,0%)	01 (25,0%)	04
Total	34	72	106

Teste G = 1,6203; $p = 0,2031$

Quadro 10. Comparação entre a presença de manifestações clínicas e os dados laboratoriais dos 50 pacientes que faleceram.

Manifestações clínicas	Sorologia		Carga Viral		
	IgM-	IgM+	< 1332	1332 a 66,66	>66,66
Gerais	44	1	11	6	14
Gástricos	34	0	10	3	12
Neurológicos	29	0	6	5	10
Oftalmológicos	10	0	3	1	3
Assintomáticos	1	0	0	0	1
Outros	31	0	7	5	8

6.2.2. Resultados das Análises Moleculares

Das 671 amostras colhidas para o estudo, 129 foram selecionadas para análise de sequências, segundo dois critérios: quantificação das amostras ≥ 100 ng de DNA e carga viral acima do ponto máximo de corte da técnica de qPCR (66,66 cópias/mL de sangue), sendo que do total das amostras encaminhadas, somente 82 tiveram resultados satisfatórios para análise das sequências.

Os resultados da amplificação genômica das amostras destinadas para o sequenciamento estão apresentados nas figuras 13 e 14.

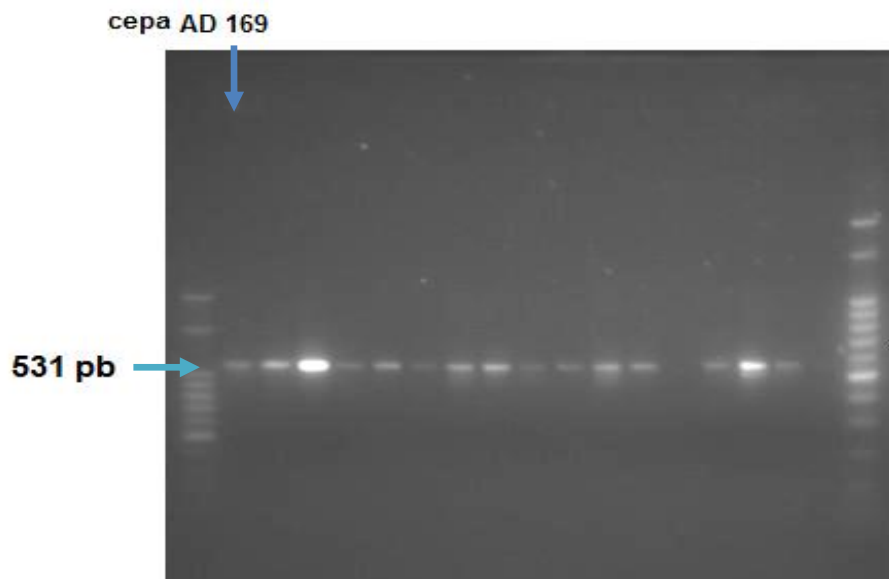


Figura 13. Gel de agarose 1,5% apresentando o produto com 531 pb da 2ª reação de amplificação para o sequenciamento

Legenda: Primeiro e o último poço contém marcador de peso molecular de 50pb e 100pb, respectivamente. O 2º poço contém amostra da cepa AD169 e os demais contém produtos a da 1ª. reação de Nested de PCR.

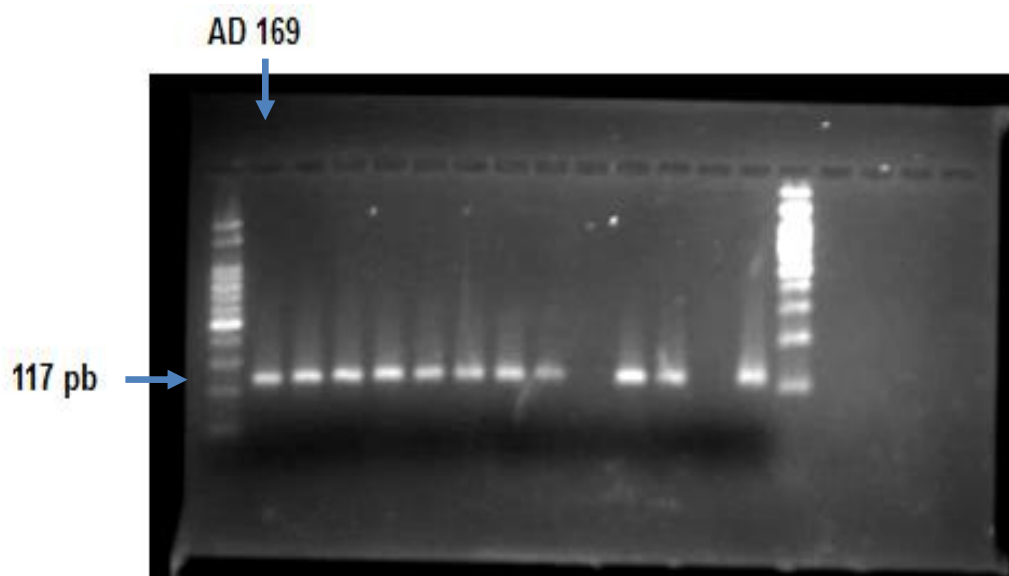


Figura 14. Gel de agarose 1,5% apresentando o produto da 3ª reação de amplificação do produto de 117 pb do gene UL97 da fosfotransferase.

Legenda: O primeiro e o último poço contém marcador de peso molecular de 50 pb e 100pb, respectivamente. O 2º. poço contém amostra da cepa AD169 e os demais, contém produtos amplificados na 2ª. reação de nested PCR.

Ambas as figuras apresentam os géis contendo o resultado da amplificação dos dois segmentos menores 117pb e 531pb. Com base na amplificação desses produtos, obteve-se a confirmação de que o segmento maior de 2096 pb foi obtido com sucesso e que os produtos amplificados poderiam ser encaminhados para análise do sequenciamento

Foram observadas mutações de ponto, denominadas silenciosas, por não haver mudança de aminoácidos, localizadas nas posições nucleotídicas 282, 489 e 571 (C → T), 585 (T → C) e 651 (C → T). Essas mutações estavam presentes nos códons 94, 163, 190, 195 e 217, respectivamente. Ressalta-se que a ocorrência de mutação na posição nucleotídica 489 no códon 163, ocorreu exclusivamente em amostras de portadores do HIV. Também foram observadas mutações (C → T) em amostras de portadores de LES nas posições nucleotídicas 282, 303, 317, 423 e 534, nos códons 94, 101, 105, 141 e 178, respectivamente.

Em amostras de pacientes transplantados, esse tipo de mutação foi comum nas posições nucleotídicas (C → T) 219, 282, 303, 336, 417 (G → A), 423 (C → T), 443 (A → G), 546 (C → T), 571, 585, 651 e 695, nos códons 73, 94, 101, 112, 139, 141, 148, 182, 190, 195, 217 e 232, respectivamente. Entre as mutações silenciosas citadas, pode-se observar que as alterações nucleotídicas entre as bases Citosina (C) e Timina (T) ocorreu em 53,3% das mutações.

Do total de amostras sequenciadas e alinhadas, aproximadamente 10% apresentaram mutações com alterações de aminoácidos, sendo que 20% (n = 2) das mutações ocorreram por transversão (troca de bases purinas (A/G) por pirimidinas (C/T)) e 80% (n=8) por substituição (trocas de purinas por purinas ou pirimidinas por pirimidinas).

No quadro 11 estão descritas as mutações, a localização nos códons e as posições nucleotídicas onde elas ocorreram nas regiões conservadas do gene UL97. Foram detectadas mutações que alteravam a sequência de aminoácidos da fosfotransferase, sendo que as mutações que poderiam alterar a atividade dessa enzima ocorreram entre os códons 377 e 594.

Quadro 11. Mutações nucleotídicas detectadas no gene UL97 com alteração aminoacídicas nas amostras dos pacientes com imunodeficiência, Belém-Pará.

Amostras	Posições nucleotídicas das mutações	Códons	Alterações nucleotídicas	Alterações aminoacídicas
H-73	1501 - 1503	501	GAG → AAG	Glu → Lis
H-100	1129 - 1131	377	GCC → GGC	Ala → Gli
H-100	1131 - 1134	378	GCT → GTT	Ala → Val
H-163	1528 - 1530	510	AAC → AGC	Asp → Ser
H- 263	1624 - 1626	542	GTA → ATA	Val → Ile
H-282	1300 - 1302	434	CGT → CAT	Arg → His
H-282	1576 - 1578	526	ATG → ATT	Met → Ile
T- 48.240	1528 - 1530	510	AAC → AGC	Asp → Ser
T- 53.880	1780 - 1782	594	GCG → GTG	Ala → Val
LES 43	1402 - 1404	434	CCG → CTG	Arg → Fen

H= HIV, T = Transplantado, LES=Lúpus eritematoso sistêmico

Na análise de comparação das sequências obtidas, foi observado que 100% (n=82) das amostras do presente estudo, apresentavam mutação por substituições nucleotídicas com alteração de aminoácidos, em duas posições: uma na posição

1786 – 1788 do códon 596 com alteração de aminoácido na trinca **GAG** → **AAG** do Ac. glutâmico para Lisina (**E596K**), e outra entre as posições 1810 - 1812 do códon 604 com mudança aminoacídica na trinca de **TCC** → **TTC** alterando de Serina para Fenilalanina (**S604F**). Devido à elevada frequência com que essas mutações ocorreram nas amostras da presente análise, comparou-se com outras 30 sequências depositadas no GeneBank, oriundas de vários países da América do Norte como Estados Unidos e Canadá, países da Europa e Ásia como Itália, China e de outros.

No grupo de voluntários portadores do HIV ocorreu a maior frequência (n= 5; 62,5%) de mutações pontuais com alteração de aminoácidos, sendo esse o único grupo onde foram observadas mutações por transversão em duas amostras, H-100 (C → G) e H-282 (G → T).

No grupo de voluntários portadores de lupus, foi observada apenas uma amostra com mutação que alterava o aminoácido, enquanto que no grupo de transplantados duas amostras, T- 48.240 e T- 53.880, apresentaram mutações com trocas de aminoácidos, sendo a amostra T- 53.880 a única a apresentar uma das mutações mais frequentemente descritas por diversos autores em estudos de resistência aos antivirais ao ganciclovir.

As amostras dos pacientes com neoplasia não apresentaram qualidade suficiente para que fosse efetuada análise das sequências, portanto elas foram excluídas dessa análise.

Considerando a ocorrência das alterações nucleotídicas no gene codificador da fosfotransferase com troca de aminoácidos, foram detectadas no presente estudo mutações que identificam 11 genótipos diferentes em decorrência das substituições aminoacídicas, assim sendo: **A377G**, **A378V** (regiões III e IV) **A434F**, **A434H**, (região

VI) **G501L**, **N510S**, **V542I**, **M526I** (região VIII) **A594V**, **E596K** e **S604F** (região IX). É importante ressaltar que os genótipos **E596K** e **S604F** ocorreram em 100% das amostras de imunodeprimidos, incluindo a amostra controle da cepa de laboratório AD169.

Os genótipos **A377G**, **A378V**, **A434H**, **M526I**, **N510S**, **G501L** e **V542I**, estavam presentes em cinco amostras de portadores do HIV e corresponderam a 6,1% do total das amostras sequenciadas; o genótipo **A434F** foi observado em um paciente portador de LES em baixa frequência (1,2%). Os genótipos **N510S** e **A594V** em pacientes transplantados ocorreram em 2,4% das 82 amostras analisadas, sendo que o genótipo **A594V** tem estado associado ao fenótipo de resistência aos antivirais. O genótipo **N510S** estava presente tanto em um portador do HIV quanto em um paciente transplantado.

Com base na presença de mutações nucleotídicas, pode-se observar que as amostras H-100 e H-282 referentes a dois pacientes portadores do HIV, apresentaram maior diversidade genotípica. De acordo com os dados apresentados no quadro 11, pode-se observar que a diversidade genotípica entre os grupos ocorreu na proporção de 7:2:1 na seguinte ordem: portadores do HIV, transplantados e portadores de LES, respectivamente.

Nas amostras H-100 e H-282 foram observados mais de um genótipo, os genótipos **A377G/ A378V** na amostra H-100 e **A434F/ M526I** na amostra H-282. Entre os pacientes que apresentaram alterações de aminoácidos no gene codificador da fosfotransferase, três faleceram e sete apresentaram diversas manifestações clínicas.

O quadro 12 resume os dados sobre a presença de manifestações clínicas, óbito e carga viral, considerando a relação desses fatores com a presença dos genótipos obtidos na análise do sequenciamento.

Quadro 12. Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes, relacionados aos genótipos e a mortalidade, Belém-Pará.

Pacientes com infecção por HCMV				
Registros	Genótipos	Manifestações clínicas	Óbito	Carga Viral
H-73	G501L	SG	S	2592.00
H-100	A377G/ A378V	SG/OFT/N/OUT	S.I.	2114.00
H-163	N510S	SG/OUT	S	20231.00
H- 263	V542I	SG/OFT/N/DG	S.I.	1783.5
H-282	A434H / M526I	SG/DG	S.I.	268704.3
T- 48.240	N510S	SG	S.I.	8196.5
T- 53.880	A594V	ASS	S	56783.6
LES 43	A434F	OUT	S.I.	1001.20

SI= Sem informação; SG=Sintomas gerais; OFT=Oftalmológico; N=Neurológico; DG = Digestivos; ASS=Assintomático; OUT=Outros sintomas.

7. DISCUSSÃO

De acordo com os dados socioeconômicos, pode-se perceber que o perfil epidemiológico do grupo de pacientes com imunodeficiência foi composto em sua maioria por indivíduos de baixa renda e baixo nível de escolaridade, sendo predominante o fundamental.

Para avaliar os índices de infecção viral, foram registrados os principais fatores de risco aos quais os voluntários estavam expostos. Percebeu-se que a corticoterapia estava presente na maioria dos grupos e a presença de comorbidades era comum a todos os grupos.

Devido à variedade de manifestações clínicas relatadas pelos voluntários da pesquisa, e a dificuldade de obter dados consistentes sobre o assunto, agrupou-se essa variável por categoria para melhor compreensão da análise dos resultados. Entre os agravos de natureza geral, foram mais frequentemente relatados quadro de febre (n=276), linfadenomegalia (n=281) e dor abdominal (n=185), presente em todos os grupos estudados.

Chamou atenção os baixos índices de pessoas com distúrbios renais no grupo de transplantados, o que poderia estar relacionado a várias possibilidades: ao sucesso do transplante, ao tratamento efetivo para evitar a rejeição do implante e o bom funcionamento do órgão transplantado. Dentre os distúrbios relatados, os gerais e os gástricos foram mais comuns entre todos os grupos, sendo que em pacientes transplantados os distúrbios neurológicos foram raros e os oftalmológicos ausentes.

De acordo com o perfil sorológico, pode-se observar que a frequência estimada de indivíduos com infecção pregressa (IgG+IgM-) pelo HCMV foi elevada,

superior a 90% em todos os grupos. Esses índices são esperados quando se refere a indivíduos procedentes de países em desenvolvimento e de perfil socioeconômico baixo como os grupos estudados no presente trabalho.

Quando se associa os índices de infecção por HCMV em ambos os sexos, não foram observadas diferenças significativas entre eles. Mas quando se relaciona os índices de infecção com as faixas etárias, percebe-se que os anticorpos de infecção aguda (IgM+) estavam presentes em indivíduos das faixas etárias maiores de 20 e menores de 51 anos. Esses dados podem estar relacionados à forma de transmissão mais comum na fase adulta, que é a sexual, como mencionado por Van Der Meer (1996) e Carraro (2001).

A prevalência de anticorpos IgG+ foi maior na faixa etária de 31 anos. Percebeu-se que à medida que aumentou a faixa etária, houve maior frequência de anticorpos anti-HCMV, diminuindo a partir dos 40 anos de idade. Essa ascendência na prevalência de anticorpos anti-HCMV à medida que aumenta a faixa etária, e um decréscimo a partir das faixas etárias posteriores aos 40 anos também foi descrita por Pannuti (1984) e Nichols; Boeckh (2000), os quais registraram que a prevalência de anticorpos anti-HCMV inicia na infância e aumenta proporcionalmente com a idade adulta, havendo predomínio de anticorpos a partir dos 25 anos.

Quanto à avaliação dos índices de infecção ativa por HCMV, estimado pelo método sorológico, observou-se uma frequência de 2,4% para IgM+, o que não correspondeu aos verdadeiros índices de infecção quando comparados com os resultados obtidos na análise molecular. Nesta análise o índice de infecção correspondeu a 15,63%, ou seja, os índices de infecção viral aguda foram subestimados pela sorologia.

Os índices de infecção viral pelo método molecular foram baseados nos valores da carga viral, com ou sem manifestações clínicas. Portanto, indivíduos com valor de carga viral igual ou superior ao valor mínimo de referência da qPCR (1332 cópias/ml) foram considerados com infecção ativa no estudo. Essa determinação deve-se ao fato de que ainda não há um consenso sobre um valor de referência pré-estabelecido para determinar infecção ativa se não houver o monitoramento do paciente. Segundo Breda *et al.* (2013) 1067,5 cópias/mL pode ser considerado um valor referência para a progressão da infecção ativa para a introdução da terapia antiviral preemptiva em pacientes transplantados de medula óssea.

O método sorológico apresenta algumas vantagens para uso no diagnóstico de rotina, por ser um método mais rápido, de baixo custo e de elevada especificidade (98,06%), mas quando comparado a outros métodos mais sensíveis, especialmente em grupos como imunodeprimidos, tem suas limitações, como observado no presente estudo e registrados por autores como Weirich (1998), Silva *et al.* (2005), Marques *et al.* (2007), Salamano *et al.* (2001); Silva *et al.* (2011). Esses autores observaram diferenças consideráveis no diagnóstico laboratorial entre o método sorológico e outros como isolamento viral, PCR, imunohistoquímica e/ou análise patológica de tecidos.

As diferenças observadas nos diferentes métodos de análise laboratorial estão relacionadas às desvantagens do método sorológico, pois esse método é mais adequado para o diagnóstico de infecções primárias e limitado para reinfecções virais; além desse fator, o método sorológico apresenta baixa sensibilidade (5,71%) e elevada especificidade, como comprovado no presente trabalho por meio do *Screening Test*. Portanto, a sorologia não deve ser o método de escolha para diagnosticar infecção que não seja primoinfecção, como é o caso das infecções

ocasionadas por reativação viral, comum em pacientes portadores de deficiência imunológica. Outro fator que reforça essa conclusão é o fato de que em pacientes com imunodeficiência como portadores de LES, é comum a presença de anticorpos IgM falso reativos, o que poderá causar uma interpretação errônea se o método sorológico for utilizado para o diagnóstico definitivo de infecção, como relatado por Arce-Salinas; Villasenõr-Ovies (2012).

Considerando a associação das manifestações clínicas e carga viral sugestiva de infecção viral, pode-se observar que pacientes com carga viral variando entre 186691,1 e 1823121,0 cópias/ml, apresentavam a tríade febre, leucopenia e diarreia, associados ou não a outras manifestações clínicas. Entre os pacientes assintomáticos, dois pacientes apresentaram carga viral elevada, um tinha 11908,6 cópias/ml e outro, 56783,6 cópias/ml.

Também foi observado entre os pacientes que tiveram evolução clínica para o óbito, que aqueles que apresentaram manifestações clínicas possuíam carga viral ≥ 1332 cópias/mL. Apesar dessas evidências, não houve relação estatisticamente significativa entre a presença de sintomas e os valores da carga viral, de acordo com o teste empregado para análise conjunta dessas variáveis.

De acordo com Rasmussen (1999), alguns indivíduos podem desenvolver manifestações clínicas mesmo com baixa carga viral, enquanto outros desenvolvem elevados índices de viremia sem manifestações clínicas, o que pode ter ocorrido com algum desses indivíduos como foi o caso de um paciente transplantado que evoluiu para o óbito, o qual possuía carga viral de 56783,6 cópias/mL e era assintomático.

Outro aspecto avaliado no presente estudo relaciona-se às análises de sequências do gene codificador da fosfotransferase viral (UL97). Foi observada

importante diversidade genética nas amostras examinadas pelo método de pirosequenciamento. No fragmento amplificado correspondente a 741pb detectou-se diversas mutações silenciosas ou sinônimas, sem repercussão na sequência aminoacídica, assim como outras com alteração na sequência de aminoácidos da enzima.

Wolf *et al.* (1995) também detectaram mutações silenciosas com mudanças nucleotídicas sem variação na trinca dos aminoácidos, em cerca de 90% dos isolados clínicos de pacientes com aids com mais de três meses de terapia antirretroviral, o que não alterou a atividade da fosfotransferase. Nesse caso, o uso de antiretrovirais pode ser um fator que contribua para aumentar a diversidade genética no gene da UL97 do HCMV. Outro fator importante para elevar a diversidade genética é a recombinação entre cepas de HCMV (CHOU *et al.*,1999), o que não foi possível visualizar neste estudo devido a metodologia empregada para sequenciamento de apenas um gene viral.

Entre as mutações nucleotídicas que alteram o aminoácido, duas representadas pelos genótipos **E596K** e **S604F** estavam presentes em 100% (n=82) das amostras sequenciadas, incluindo a amostra da cepa AD169. Na análise de comparação das sequências do presente estudo com outras procedentes de diversos países, essas mutações não foram detectadas em nenhuma das sequências comparadas.

Na década de 1990, um grupo de pesquisadores liderados por Erice descreveu a mutação **E596K** associada à outra adjacente ao códon 604, especificamente, no códon 603 (**C603Y**). Esses autores relataram que as mutações nos códons 596 e 603 poderiam ocasionar resistência aos antivirais, mas haveria necessidade de confirmar essa possibilidade. Com base na hipótese desses autores

e na localização da mutação, acredita-se que a mutação no códon 604, adjacente ao códon 603, também possa contribuir para a ocorrência de resistência ao ganciclovir, portanto, estudos posteriores devem ser conduzidos para esclarecer essa possibilidade.

A mutação no códon 596 descrita por Erice (1999) foi observada em dois genótipos distintos com troca de aminoácidos, uma de ácido glutâmico para glicina (E596G) e outra de ácido glutâmico para ácido aspártico (E596D), ao passo que no presente estudo, a mudança do aminoácido ocorreu de ácido glutâmico para lisina (E596K).

Ressalta-se que, até o momento, tanto a mutação E596K e S604F ainda não foram descritas no Brasil, pois o estudo realizado por Nogueira *et al.* (2006) não relata a existência dessas mutações em amostras de pacientes submetidos ao tratamento com antivirais. A ocorrência dessas mutações na presente análise e ausente em outras, pode ser atribuída ao fato de que poucos estudos relacionados à resistência viral são realizados no Brasil, e por esta razão não foram previamente observadas, o que sugere a realização de estudos mais abrangentes com amostras de diferentes localidades regionais para confirmar essa possibilidade.

Acredita-se que fatores virais e terapêuticos possam explicar a presença das referidas mutações nas amostras examinadas: elas podem ter ocorrido em virtude do uso frequente do ganciclovir para controle de inúmeras infecções recorrentes e podem até se tornar um marcador de cepas circulantes em pacientes com imunodeficiência ou elas derivam de um processo de recombinação genética com outras cepas através de um processo natural quando há infecção no indivíduo por mais de uma cepa, como relatado por Chou *et al.* (1999).

Outro fato evidenciado sobre as mutações **E596K** e **S604F**, foi a presença delas na amostra da cepa AD169, utilizada como controle na presente pesquisa. Acredita-se ter sido produto de contaminação em alguma etapa durante o procedimento técnico do sequenciamento, pois na análise de comparação com outras sequências da cepa AD169 depositadas no gene Bank, não foram observadas as referidas mutações.

Outras mutações com mudança de aminoácidos foram observadas em menor frequência em 8 amostras (9,76%), as quais determinaram 11 genótipos. Foi constatado em amostra de um paciente transplantado renal, o genótipo **A594V**, relacionado à resistência ao ganciclovir. De acordo com vários pesquisadores, esse genótipo está associado a fenótipos de resistência, por alterar a atividade da fosfotransferase, e é considerada uma das mutações mais comuns da região **IX** do gene UL97 (ERICE *et al.*, 1997; CHOU *et al.*, 1995; CHOU *et al.*, 1999; CHOU *et al.*, 2002; BOIVIN *et al.*, 2005; NOGUEIRA *et al.*, 2006; DREW, 2010, LURAIN; CHOU, 2010). Esse genótipo também foi detectado no Brasil por Nogueira *et al.* (2006) em amostras de pacientes transplantados renais procedentes do estado de São Paulo, os quais estavam em tratamento com ganciclovir.

É importante ressaltar que o paciente (**T-53.880**) que apresentou o genótipo **A594V**, apresentava fatores de riscos favoráveis a ocorrência de mutações de resistência, tais como: tratamento com ganciclovir >3 meses e elevada carga viral (M= 70437,26 cópias/ml) necessitando de medicamentos alternativos contra infecção viral por HCMV. De acordo com Lurain; Chou (2010) fatores tais como: a baixa imunidade do hospedeiro, o uso prolongado do antiviral e a contínua replicação do HCMV resultante da insuficiência na resposta ao medicamento, contribuem para a resistência ao ganciclovir.

Além da mutação **A594V**, outras mutações com mudança de aminoácidos também ocorreram na região **IX** e são representadas pelos genótipos: **V542I**, **E596K** e **S604F**. Essa região é crítica, pois corresponde a localização do sítio de ligação da fosfotransferase na cadeia de DNA viral.

As mutações com trocas de aminoácidos foram encontradas em diferentes regiões do gene UL97. As mutações que geraram os genótipos **A377G**, **A378V** estavam localizadas nas regiões **III** e **IV**, os genótipos **A434F**, **A434H**, na região **VI** e os genótipos **G501L**, **N510S**, **V542I**, **M526I** na região **VIII**. A mutação **N510S** observada em outro paciente transplantado renal (**T-48.240**), também foi descrita por Erice (1999), em isolados clínicos resistentes ao ganciclovir, juntamente com uma deleção nos códons 591-594, significando que o conjunto leva à resistência aos antivirais. As outras mutações detectadas no presente estudo, não foram observadas nas bibliografias consultadas. Gilbert; Bestman-Smith; Boivin (2002) detectaram a maior diversidade genotípica com base nas mutações presentes no gene UL97, mas somente o genótipo **A594V** na região **IX**, foi coincidente em ambos os trabalhos.

Acredita-se na possibilidade de que todas as mutações com trocas de aminoácidos detectadas na presente análise possam contribuir para alterar a atividade da enzima fosfotransferase. Essa possibilidade é baseada na localização em que elas ocorreram e na mudança na cadeia de aminoácidos da enzima, pois ambos os fatores conjuntamente, podem levar a um produto proteico diferente do original sem atividade ou com atividade reduzida (WOLF *et al.*, 1995; CHOU *et al.*, 1999 e BOIVIN *et al.*, 2005). Outro fato que reforça essa possibilidade, são as considerações feitas por Erice (1999) de que a ocorrência de mutações no gene UL97 ou em regiões adjacentes podem causar resistência ao ganciclovir, mas

também são necessários estudos relacionados à recombinação de cepas e ao anabolismo desse medicamento para confirmação da resistência antiviral.

A presença das mutações com substituição de aminoácidos nos códons **377**, **378**, **434**, **526**, **510**, **501** e **542** em 5 amostras de portadores do HIV, uma no códon **434** de um portador de LES e outra no códon **510** em um paciente transplantado, podem estar associadas a duas possibilidades: uso intermitente de antivirais devido a recorrência de infecções por HCMV nesse grupo de pacientes ou a recombinação de cepas. Essa última hipótese pode ter acontecido principalmente em duas amostras de pacientes HIV+ do presente estudo, por ter sido detectados mais de um genótipo mutante nas amostras H-100 (A**377**G/A**378**V) e H-282 (A**434**F/ M**526**I). Segundo Boivin *et al.* (1996), a presença de mais de um genótipo na amostra de um mesmo paciente está relacionada a reinfeção por cepa exógena, que ocasionalmente pode ocorrer a recombinação de cepas.

Segundo Lymaye (2002); Rodriguez *et al.* (2007) e Madi; Al-Nakib; Pacsa, (2011), a emergência de genótipos de resistência em indivíduos com imunodeficiência ocorre devido o uso de antiviral em doses inadequadas por períodos prolongados, recombinação de cepas selvagens com mutantes, elevada carga viral, uso de imunossupressores e a baixa resposta imune do paciente.

Além dos fatores supracitados, acredita-se que o caráter oportunista (em decorrência da latência e reativação viral) do HCMV, também seja um fator que pode contribuir para o aparecimento de resistência aos antivirais em portadores de imunodeficiência crônica, pois à medida que ocorrem maior número de infecções e reativações, obrigatoriamente torna-se necessário o uso de medicamentos para controlar a infecção.

Outro fato que chamou atenção foi à relação entre o histórico clínico laboratorial e dados de mortalidade dos pacientes com a presença de genótipos que poderiam causar resistência aos antivirais. A presença de mutações ou genótipos de resistência que alteram aminoácidos, a baixa imunidade e as reativações virais associados à frequente terapia antiviral, podem ser um mau prognóstico para a evolução clínica do paciente. Acredita-se ainda, que toda troca de aminoácidos no gene UL97 pode gerar um produto diferente do original por modificar a estrutura aminoacídica da cadeia peptídica da fosfoproteína, e conseqüentemente a atividade da enzima.

8. CONCLUSÕES

- Os resultados de prevalência de anticorpos para o HCMV e o perfil epidemiológico do grupo de pacientes imunodeficientes, foram equivalentes aos observados em populações de países em desenvolvimento, sendo demonstrado que a prevalência de anticorpos aumenta na medida em que aumenta a faixa etária e decresce a partir dos 40 anos.
- A maior frequência de infecção por HCMV no grupo estudado foi ocasionado por reativação viral após análise técnica pelo método molecular da qPCR.

- Devido à baixa sensibilidade (5,71%) do método sorológico, conclui-se que este não deve ser o método de escolha para o diagnóstico de infecções por HCMV em portadores de deficiência imunológica.

- Não foi observada significância estatística entre a presença de manifestações clínicas e valores da carga viral quando aplicado o teste G de Williams, portanto essas variáveis não estão relacionadas entre si.

- Na análise de comparação das sequências foi detectada a mutação **A594V** no presente estudo o que sugere a circulação de cepas mutantes na cidade de Belém com uma das principais mutações que confere resistência ao ganciclovir.

- As mutações **E596K** e **S604F** foram detectadas em todas as amostras do estudo sendo registradas pela primeira vez no Brasil.

- Duas hipóteses sugerem o aparecimento das mutações **E596K** e **S604F**: foram originadas com o uso frequente dos antivirais em pacientes imunodeficientes ou elas são produtos da recombinação gênica de cepas.

- Houve importante diversidade genética nas amostras examinadas devido à detecção de mutações no gene UL97 com alteração de aminoácidos na cadeia da fosfotransferase pUL97 que podem alterar a atividade da enzima e levar a resistência antiviral.

9. REFERÊNCIAS

AHUMADA-RUIZ, S.; TAYLOR-CASTILLO, L.; VISONÁ, K.; LUFTIG, R. B.; HERRERO-URIBE, L. Determination of human Cytomegalovirus genetic diversity in different patient populations in Costa Rica. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 2, p. 87-92, 2004.

AKHTER, K. Cytomegalovirus treatment & management, **Medscape Drugs, Diseases & Procedures**, abril n. 7, 2014. Disponível em: <http://emedicine.medscape.com/article/215702-treatment>. Acesso em: 13/05/2015.

ALMEIDA, L. N. B.; AZEVEDO, R. S.; AMAKU, M.; MASSAD, E. Cytomegalovirus seroepidemiology in an urban community of São Paulo, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 35, n. 2, p. 1-12, 2001.

AQUINO, H. V.; FIGUEIREDO, L. High prevalence of renal transplant recipients infected with more than one cytomegalovirus glycoprotein B genotype. **Journal of Medical Virology**, v. 61, p. 138-142, 2000.

ARCE-SALINAS, C. A.; VILLASENOR-OVIES, P. Infections and systemic lupus erythematosus. In: ALMOALILIN, H. (ed.) **Systemic Lupus Erythematosus**. Rijeka (Croácia): InTech, 2012. 554 p. Disponível em: <www.intechopen.com/download/pdf/33019>. Acesso em 22/02/2013.

ARIES, S. P.; SCHAAF, B. HIV and pulmonary diseases. **HIV MEDICINE**, 2007, p. 639-644. Disponível em: <www.hivmedicine.com/hivmedicine2007.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2012.

ARNEZ, M. A. C.; AZEVEDO, M. N. L.; BICA, B. E. R. G. Reactive haemophagocytic syndrome in a systemic LES erythematosus patient-case report. **Revista Brasileira Reumatologia**, v. 52, n. 5, p. 790-795, 2012.

BALFOUR, H. Antiviral Drugs. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 16, p. 1255-1268, 1999.

BALISTRERI, W.F. Como tratar uma infecção por citomegalovírus resistente ao ganciclovir. **Sociedade Brasileira de Infectologia – SBI**, p. 1-3, 2010. Disponível em: http://www.infectologia.org.br/default.asp?site_Acao=mostrapagina&paginaId=134&... Acesso em 06/09/2012.

BOECKH, M.; LJUNGMAN, P. How we treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients. **Blood**, 113 (23), p. 5711-5719, 2009.

BHATTACHARJEE, B.; RENZETTE, N.; KOWALIK, F. T. Genetic analysis of cytomegalovirus in malignant gliomas. **Journal of Virology**, v. 86, p. 6815-6824, 2012.

BIRNBAUN, G.; LYNCH, J.I.; MARGILETH, A. M.; LONERGAN, W. M. SEVER, J. L. Cytomegalovirus infections in newborn infants. **The Journal of Pediatrics**, v. 75, n. 5, p. 789-795, 1969.

BOEHME, K. W.; COMPTON, T. Virus entry and activation of innate immunity. In: REDDEHASE, M. J. **Cytomegaloviruses Molecular Biology and immunology**. Caister Academic Press: Mainz, 2006. p. 111 -130.

BOEHME. K. W.; GUERRERO, M.; COMPTON, T. Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells. **The Journal of Immunology**, v. 177, p. 7094-7102, 2006.

BOIVIN, G.; CHOU, S.; QUIRK, M. R.; ERICE, A.; JORDAN, M. C.; Detection of ganciclovir resistance mutations and quantitation of cytomegalovirus (HCMV) DNA in leucocytes of patients with fatal disseminated HCMV Disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 173, p. 523-528, 1996.

BOIVIN, G.; GILBERT, C., MORISSETTE, M., HANDFIELD, J., GOYETTE, N., BERGERON, M. G. A case of ganciclovir-resistance cytomegalovirus (CMV) retinitis in a patient with AIDS: longitudinal molecular analysis of the CMV viral load and viral mutations in blood compartments. **AIDS**, v. 11, p.867-873, 1997.

BOIVIN, G.; GOYETTE, N.; GILBERT, C.; COVINGTON, E. Analysis of Cytomegalovirus DNA polymerase (UL54) mutations in Solid organ transplant patients receiving valganciclovir or ganciclovir prophylaxis. **Journal Medical Virology**, v. 77, p. 425-429, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Normas para pesquisa envolvendo seres humanos: Resolução CNS 196/1996. **Brasília/MS**, 87 p., 2000.

BREDA, G.; ALMEIDA, B.; CARSTENSEN, S.; BONFIM, C.M.; NOGUEIRA, M.B.; VIDAL, L.R.; ALMEIDA, S. M.; RABONI, S. M. Human cytomegalovirus detection by real-time PCR and pp65-antigen test in hematopoietic stem cell transplant recipients: a challenge in low and middle-income countries. **Pathogens and Global Health**, vol. 107, n. 6, 2013.

BRITT, W. J.; BOPPANA, S. Human cytomegalovirus virion proteins. **Human Immunology**, v. 65, p. 395-402, 2004.

BRITT, W. J; ALFORD, C. A. Cytomegalovirus. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**, 3. ed. New York: Lippincott-Raven, 1996. cap. 77, v. 2, p. 2493-2523.

BROWNE, H. M. The role of glycoprotein h in herpesvirus membrane fusion. **Protein & Peptide Letters**, v. 16, n. 7, p. 760-65, 2009.

CARAN, E.; PETRILLI, A.; BORDIN, J.; FILHO, A.; TOMIYAMA, H.; PUCCA, L. Prevalence of cytomegalovirus in a pediatric oncology unit. **Acta Oncológica Brasileira**, v. 20, n. 3, p. 114-117, 2000.

CAMARGO, L.F.A.; GRANATO, C.F.H.; TOMYIAMA, H.T.; COBO, E.; AJZEN, H.; PESTANA, J.O.M. Infecção pelo citomegalovírus em pacientes submetidos a transplante renal: estudo de 20 casos. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, vol 18, n. 2, p. 130-136, 1996.

CARRARO, E. Caracterização genotípica do citomegalovírus humano em transplantados renais. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias. São Paulo, 2001, p.101.

CARRARO, E.; GRANATO, C. F. H. Genotipagem do cytomegalovirus humano para pesquisa de resistência aos antivirais em transplantados renais. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 40, n. 1, p. 11-14, 2004.

COELHO-CASTELO, A.A.M.; TROMBONE, A.P.F.; ROCHA, C.D.; LORENZI, J.C.C. Resposta imune a doenças infecciosas. **Medicina**, vol 42, n. 2, p. 127-142, 2009. Disponível em: <www.fmrp.usp.br/revista>. Acesso em 22/06/2015.

COSTA, C. H. Infecções pulmonares na aids. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 2, n. 9, pag. 54-60, 2010.

CHEE, M.; RUDOLPH, S-A.; PLACHTER, B.; BARRELL, B.; JAHN, G. Identification of the major capsid protein gene of human Cytomegalovirus. **Journal of Virology**, v. 63, n. 3, p. 1345-1353, 1989.

CHOU, S. Acquisition of donors strains of Cytomegalovirus by renal-transplant recipients. **The New England Journal of Medicine**. v. 314, n. 22, p. 1418-23, 1986.
CHOU, S. Contrasting drug resistance phenotypes resulting from Cytomegalovirus DNA polymerase mutations at the same exonuclease locus. **Journal of Clinical Virology**, v. 43, p. 107-109, 2008.

CHOU, S. Molecular of epidemiology of envelope glycoprotein H of human Cytomegalovirus. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 166, p. 604-607, 1992.

CHOU, S.; DENNISON, K. M. Analysis of interstrain variation in Cytomegalovirus glycoprotein B sequences encoding neutralization-related epitopes. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 163, p. 1229-1234, 1991.

CHOU, S.; ERICE, A.; JORDAN, M. C.; VERCELLOTTI, G. M.; MICHELS, K. R.; TALARICO, C. L.; STANAT, S. C.; BIRON, K. K. Analysis of the UL97 phosphotransferase coding sequence in clinical cytomegalovirus isolates and identification of mutations conferring ganciclovir resistance. **The Journal of Infection Disease**, v. 171, p. 576-583, 1995.

CHOU, S.; LURAIN, N. S.; WEINBERG, A.; CAI, G.-Y.; SHARMA, P.L., CRUMPACKER, C. S. Interstrain variation in the human cytomegalovirus DNA polymerase sequence and its effect on genotypic diagnosis of antiviral drug resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 6, p.1500-1502,1999.

CHOU, S.; WALDEMER, R.; SENTERS, A.; MICHELS, K.; KEMBLE, G.; MINER, R.; DREW, L. Cytomegalovirus μ L97 phosphotransferase mutations that affect susceptibility to ganciclovir. **The Journal Infections Disease**, v. 185, p.162-169, 2002.

COBBS, S. C.; HARKINS, L.; SAMANTA, M.; AL, E. Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma. **Cancer Research**, v. 62, p. 3347-3350, 2002.

COMPTON, T. Receptors and immune sensors: the complex entry path of human cytomegalovirus. **Trends in Cell Biology**, v. 14, n. 1, p. 5-8, 2004.

CONCEIÇÃO, O. J. G.; FOCACCIA, R.; VERONESI, R. Citomegalia. In: VERONESI, R. **Tratado de infectologia**. São Paulo: Atheneu, 1996. Cap. 25.

CUCHACOVICH, R., GEDALIA, A. Pathophysiology and clinical spectrum of infections in systemic lupus erythematosus, **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 35, p. 75-93, 2009.

CUNHA, A. A.; AQUINO, V. H.; MARIGUELA, V.; NOGUEIRA, M. L.; FIGUEIREDO, L. T. M. Evaluation of glicoprotein B genotypes and load of HCMV infecting blood leukocytes on prognosis of aids patients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 53, n. 2, p. 83-88, 2011.

DAL MONTE, P.; LAZZAROTTO, T.; RIPALTI, A.; LANDINI, M. P. Human cytomegalovirus infection: a complex diagnostic problem in which molecular biology has induced a rapid evolution. **Intervirolgy**. v. 39, n. 3, p. 193 - 203, 1996.

DALTON-GRIFFIN, I.; KELLAM, P. Infectious causes of cancer and their detection. **Journal of Biology**, v. 8, p. 67, 2009. Disponível em: <<http://jbiol.com/content/8/7/67>>. Acesso em: 12 jul 2012.

DIMANTAS, M. A., FINAMOR, L. P., EWERT, V., NAKANAMI, C., MUCCIOLI, C. Retinite por citomegalovírus em pacientes pediátricos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana em tratamento com “Highly Active Antiretrovirus Therapy”. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 50, n. 3, p. 320-323, 2004.

DINIZ, E. M. A.; VAZ, F. A. C. Infecção pelo cytomegalovírus. Boa Vista, **Revista do IMIP**, v. 2, n. 2, p. 150-154, 1988.

DOYLE, A. M.; WARBURTON, K. M.; GORAL, S.; BLUMBERG, E.; GROSSMAN, R. A.; BLOOM, R. D. 24 week oral ganciclovir prophylaxis in kidney recipients is associated with reduced symptomatic cytomegalovirus disease compared to a 12-week course. **Transplantation**, v. 81, n. 8, p. 1106-1111, 2006. Disponível em: <<http://graphics.tx.ovid.com.ez3.periodicos.capes.gov.br/ovftpdfs/FPDD>>. Acesso em: 3 mar 2013.

DREW, W. L. Diagnosis of cytomegalovirus infection. **Reviews of Infectious Diseases**, p. 468-476, 1988. Supplement 3.

DREW, W. L. Cytomegalovirus infection in patients with AIDS. **Clinical Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p. 608-615, 1992.

DREW, W.L. Ganciclovir resistance: a matter of time and titre. **Lancet**, v. 356, p. 609-10, 2000.

DREW, L. W. Cytomegalovirus resistance testing: pitfalls and problems for the clinician. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, p. 733-736, 2010.

DZIURZYNSKI, K.; CHANG, M. S.; HEIMBERGER, B. A.; KALEJTA, F. R.; DALLAS, R. S.; SMIT, M.; SOROCEANU, L.; COBBS, S. C. Consensus on the role of human cytomegalovirus in glioblastoma. **Neuro-Oncology**, v. 14, n. 3, p. 246-255, 2012.

EISENBERG, J. R.; ATANASIU, D.; CAIRNS, T.; GALLAGHER, J.; KRUMMENACHER, C.; COHEN, G. Herpes virus fusion and entry: a story with many characters. **Viruses**, v. 4, p. 800-832, 2012.

EISENSTEIN, E. M.; WOLF, D. G. Cytomegalovirus infection in pediatric rheumatic diseases: a review. **Pediatric Rheumatology**, v. 8, p. 17, 2010.

ERICE, A.; CHOU, S.; BIRON, K.; STANAT, S.; BALFOUR, H.; JORDAN, M. Progressive disease due to ganciclovir-resistant cytomegalovirus in immunocompromised patients. **The New England Journal of Medicine**, v. 320, n.5, 1989.

ERICE, A. Resistance of human cytomegalovirus to antiviral drugs, **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 2, p. 286-297, 1999.

ERICE, A.; GIL-RODA, C.; PÉREZ, J. L. Antiviral susceptibilities and analysis of UL-97 and DNA polymerase sequences of clinical cytomegalovirus isolates from immunocompromised patients. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 175, p.1087-1092, 1997.

FARIAS, J. Citomegalia em crianças: primeiros casos registrados no Brasil. **Revista Paulista de Medicina**, v. 50, n. 3, p. 153-160, 1957.

FIELDING, K.; KOBA, A.; GRANT, A.; CHARALAMBOUS, S.; DAY, J.; SPAK, C.; WALD, A.; HUANG, M.; COREY, L.; CHURCHYARD, G. Cytomegalovirus viremia as a risk factor for mortality prior to antiretroviral therapy among HIV- infected gold miners in South Africa. **Plos One**, v. 6, n. 10, 2011.

FIGUEIREDO, L.; ROTHWELL, R.; BILHOTO, M.; VARANDAS, R.; FONSECA, S. Immune recovery uveitis masked as an endogenous endophthalmitis in a patient with active HCMV retinitis. **Case Reports in Ophthalmological Medicine**, n. 462968, 2013.

FRANCIS, N. D.; BOYLSTON, A. H. G.; ROBERTS, J. M.; PARKIN, A. J. Cytomegalovirus infection in gastrointestinal tracts of patients infected with HIV-1 or AIDS. **Journal of Clinical Pathology**, v. 42, p. 1055-1064, 1989.

FREEMAN, B .R. JR. The Indirect effects of cytomegalovirus infection, **American Journal of Transplantation**, v. 9, p. 2453-2458, 2009.

FREEMAN, R. J. The indirect effects of cytomegalovirus infection. **American Journal of Transplantation**, v. 9, p. 2453-2458, 2009.

FRIES, B. C.; CHOU, S.; BOECKH, M.; TOROK-STORB, B. Frequency distribution of Cytomegalovirus envelope glycoprotein genotypes in bone marrow transplant recipients. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 169, p. 769-774, 1994.

GANDHI, M.; KHANNA, R. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. **The Lancet Infect Diseases**, v. 4, p. 725-738, 2004.

GARCIA, A. G. P. Causas infecciosas das anomalias congênitas, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 76, n. 3, p. 307-328, 1981.

GAYTANT, M. A.; ROURS, I .J. G.; STEEGERS , E. A. P.; GALAMA, J. M. D.; SEMMEKROT, B. A. Congenital Cytomegalovirus infection after recurrent infection:

case reports and review of the literature. **European Journal of Pediatrics**, v. 162, p. 248-253, 2003.

BREDA, G., ALMEIDA, B., CARSTENSEN, S., BONFIM, C.M., NOGUEIRA, M.B., VIDAL, L.R., ALMEIDA, S.M., RABONI, S.M. Human cytomegalovirus detection by real-time PCR and pp65-antigen test in hematopoietic stem cell transplant recipients: a challenge in low and middle-income countries. **Pathogens and Global Health**, v. 107, n. 6, p. 312-319, 2013.

GILBERT M.J.; RIDDELL SR, PLACHTER B, GREENBERG PD. Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate early gene product. **Nature**, n. 383, p. 720-722, 1996.

GILBERT, C.; BESTMAN-SMITH, J.; BOIVIN, G. Resistance of herpesviruses to antiviral drugs: clinical impacts and molecular mechanisms, **Drug Resistance Updates**. v. 5, p. 88-114, 2002.

GILBERT, C.; BOIVIN, G. Human cytomegalovirus resistance to antiviral drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 3, p. 873-883, 2005.

GOLDNER, T., HEWLETT, G., ETTISCHER, N., RUEBSAMEN-SCHAEFF, H., ZIMMERMANN, H., LISCHKA, P. The novel anticytomegalovirus compound AIC246 (Letermovir) inhibits human cytomegalovirus replication through a specific antiviral mechanism that involves the viral terminase. **Journal of Virology**, p. 10884-10893, 2011.

GÖHRING, K., HAMPRECHT, K.; JAHN, G. Antiviral drug and multidrug resistance in cytomegalovirus infected SCT patients. **Journal Computacional Andscrutural Biotechnology**, n.13, p.153-159, 2015.

GORDON, E. Treatment of ganciclovir-resistant cytomegalovirus in adult solid organ transplant recipients. Caught between a rock and a hard place? 20 pag., novembro, 2013. Acesso www.Utexas.edu/pharmacy/.../gordon_11/01/2013 pdf. Acesso: 23/05/2014.

GRANATO, C. A problemática da infecção pelo citomegalovírus em pacientes com imunodepressão (Ribeirão Preto). **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 23, pp 130-132, 2001.

GREENBERG, B. S. Infections in the immunocompromised rheumatologic patient. **Critical Care Clinics**, v. 18, p. 931-956, 2002.

GRETCH, D. R.; GEHRZ, R. C.; STINSKI, M. F. Characterization of a human cytomegalovirus glycoprotein complex (gcl), **Journal of General Virology**, v. 69, p. 1205-1215, 1988.

GRIFFITHS, P. D. Cytomegalovirus infection of the central nervous system. **HERPES**, v. 11, 2004. Supplement 2.

GRIFFITHS, P. D. The treatment of cytomegalovirus infection, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p. 243-253, 2002.

GRIFFITHS, P. D.; GRUNDY, J.E. Molecular biology and immunology of cytomegalovirus. **Biochem J.**, v. 241, 313-324, 1987.

GUIMARÃES, K. C.; ANDRADE, C.; OLIVEIRA, V.; CARVALHO, L.; LINHARES, M. High prevalence of seropositivity in children with acute lymphoid leukemia in Recife. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco**, v. 42, n. 1, p. 13-17, 1997.

H Aidar, A.; MUCCIOLI, C.; GUIA, T.; BELORT, R. Intravitreal ganciclovir for cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 64, p. 513-57. 2001.

HAKKI, M.; CHOU, S. The biology of cytomegalovirus drug resistance, **Infectious Diseases**, v. 24, p. 605-611, 2011.

HAMDAN, Z. H.; ABDELBAĞI, I.E.; NASSER, M.N.; ADAM, I. Seroprevalence of cytomegalovirus and rubella among pregnant women in western Sudan. **Virology Journal**, 8: 217, 2011. Disponível: [http:// www.virologyj.com/content/8/1/217](http://www.virologyj.com/content/8/1/217)

HAN, Y. X. Epidemiologic analysis of reactivated cytomegalovirus antigenemia in patients with cancer, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p.1125-1132, 2007.

HANSHAW, J. B. Congenital cytomegalovirus infection: a fifteenyear perspective. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 123, n. 5, p. 555-561, 1971.

HARKINS, L., VOLK, L. A.; SAMANTA, M.; MIKOLAENKO, I.; BRITT, J. W.; BLAND, I. K.; COBBS, S. C. Specific localization of human cytomegalovirus nucleic acids and proteins in human colorectal cancer, **The Lancet**, v. 360, p.1557-1563, 2002.

HUANG, E-S.; ALFORD C. A.; REYNOLDS, D. W.; STAGNO, S.; PASS, R. F. Molecular Epidemiology of Cytomegalovirus infections in women and their infants. **The New England Journal of Medicine**, v. 303, n. 17, p. 958-962 1980.

HUANG, E-S.; KILPATRICK, B. A.; HUANG, Y-T.; PAGANO, J. S. Detection of human Cytomegalovirus and analysis of strain variation. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, 49, p. 29-43, 1976.

HUME, J. A.; [JONATHAN S. F.](#); [JEREMY P. K.](#); [DONALD M. C.](#); [MICHAEL R. C.](#); [ROBERT F. K.](#) Phosphorylation of retinoblastoma protein by viral protein with cyclin-dependent kinase function, **Science**, v. 320, p. 796-800, 2008.

JARVIS, A, M.; NELSON, A, J. Human cytomegalovirus persistence and latency in endothelial cells and macrophages, **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 403-407, 2002.

JOHNSEN, J.; BARYAWNO, N.; NAUCLÉR, C. Is human cytomegalovirus a target in cancer therapy? **Oncotarget**, v. 2, n. 12, p. 1329-1338, 2011.

JUNQUEIRA, J. J. M.; SANCHO, T. M.; SANTOS, V. A. Citomegalovirus: revisão dos aspectos epidemiológicos, clínicos, diagnósticos e de tratamento, **NewsLab**, v. 86, p. 88-104, 2008.

KALEJTA, R. F. Tegument proteins of human cytomegalovirus, **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 72, n. 2, p. 249-65, 2008.

KAYE, J. F.; GOMPELS, A. U.; MINSON, A. Glycoprotein H of human cytomegalovirus (HHCMV) forms a stable complex with the HCMV UL115 gene product. **Journal of General Virology**, v. 73, p. 2693-2698, 1992.

KHAN, N. F., PRASAD, V., KLEIN, D. M. Cytomegalovirus enteritis mimicking crohn's disease in a LES nephritis patient: A case report. **World Gastroenterol**, v. 15, p. 4327-4330, 2009.

KIM, M. J.; KIM, J. S. HCMV infection in HCMV-Seropositive kidney transplant recipient. In: ORTIZ, J. (ed.) **After the Kidney Transplant - The Patients and Their Allograft**. Rijeka (Croácia): InTech, 2011. 386 p. Disponível em:<www.intechopen.com/download/pdf/17946>. Acesso em: 05 de abr. 2013.

KLEMOLA, E.; KAARIAINEN, L. Cytomegalovirus as a possible cause of a disease resembling infectious mononucleosis. **British Medical Journal**, v. 2, p. 1099-1102, 1965.

LANG, D. J.; KUMMER, J. F. Cytomegalovirus in semen: observations in selected populations. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 132, n. 4, p. 272-274, 1975.

LEGENDRE, C.; PASCUAL, M. Improving outcomes for solid-organ transplant recipients at risk from cytomegalovirus infection: late-onset disease and indirect consequences. **Viewpoints**, v. 46, p. 732-740, 2008.

LIMA, D. B.; FERNANDES, O.; GOMES, V. R.; SILVA, E. J.; PINHO, P. R. A.; PAIVA, D. D. Perfil clínico da enterocolite por Citomegalovírus (HCMV) na síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). **Revista Associação Médica Brasileira**, v. 46, p. 1-6, n. 1, 2000.

LYMAYE, A. Ganciclovir-resistant cytomegalovirus in organ transplant recipients. **Clinical Infectious Disease**, v. 35, p. 866-873, 2002.

LINHARES, M. I. S.; ANDRADE, G. P.; COELHO, A. F.; TATENO, S. EIZURU, Y.; MINAMISHIMA, Y. Prevalence of cytomegalovirus antibodies in brazilian women of childbearing age and newborns. **Acta Paediatrica Japonica**, v. 31, n. 5, p. 620-622, 1989.

LITTLER, E.; STUART, A. D.; CHEE, M. S. Human Cytomegalovirus μ L97 open reading frame encodes a protein that phosphorylates the antiviral nucleosídeo analogue ganciclovir. **Nature**, v.358, p. 160-162, 1992.

LOENEN, W.A.M.; BRUGGEMAN, C.A.; WIERTZ, E.J.H.J. Immune evasion by human cytomegalovirus: lessons in immunology and cell biology. **Seminars in IMMUNOLOGY**, v. 13, p. 41-49, 2001.

LOPO, S.; VINAGRE, E.; PALMINHA, P.; PAIXÃO, M. T.; NOGUEIRA, P.; FREITAS, M. G. Seroprevalence to cytomegalovirus in the portuguese population, 2002-2003. **Euro Surveill**, v. 16, n. 25, p. 1-6, 2011.

LORENZI, J.C.C.; COELHO-CASTELO, A.A.M. Resposta imune contra infecções virais. **Scire Salutis**, v. 1, n. 2, p. 36-44, 2011.

LOURENÇO, S.; AMARAL, M.; ALMEIDA, R.; MARCELINO, P.; MARUM, S.; MILHEIRO, M. A.; OLIVEIRA, J.; MOURÃO, L. Pneumocystis and cytomegalovirus pneumonia in HIV patients – Tow clinical cases. **Revista Potuguesa de Pneumologia**, v. 14, n. 1, p. 151-157, 2008.

LURAIN, N. S., WEINBERG, A., CRUMPACKER, C. S., CHOU, S. Sequencing of cytomegalovirus UL97 gene for genotypic antiviral resistance testing. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n.10, p. 2775-2780, 2001.

LURAIN, N.S., CHOU, S. Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 689-712, 2010.

MADI, N.; AL-NAKIB, W.; PACSA, A. Does cytomegalovirus develop resistance following antiviral prophylaxis and treatment in renal transplant patients in Kuwait? **Advances in Virology**, v. 2011, pag. 1- 6, 2011.

MAÑEZ, R. Transmision de la infeccion por citomegalovirus atraves de las transfusiones sanguineas. **Sangre**, v. 38, n. 3, p. 201-204, 1993.

MARIGUELA, V.; CHACHA, S.; CUNHA, A.; TRONCON, L.; ZUCOLOTO, S.; FIGUEIREDO, L. Cytomegalovirus in colorectal cancer and idiopathic ulcerative colitis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 2, p. 83-87, 2008.

MARQUES, O.; AVERBACH, M.; ZANONI, E.; CORRÊA, A. P.; PACCOS, J.; CUTAIT, R. Cytomegaloviral colitis in HIV positive patients: endoscopic findings. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 44, n. 4, p. 315-319, 2007.

MARGULIES, M. et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, v. 437, n. 7057, p. 376–80, 2005.

MATOS, S. B.; MEYER, R.; LIMA, M. F. W. Citomegalovírus: uma revisão da patogenia, epidemiologia e diagnóstico da infecção. **Revista Saúde.com**, v. 7, n. 1, p. 44-57, 2011.

McSHARRY, B.; AVDIC, S.; SLOBEDMAN, B. Human cytomegalovirus encoded homologs of cytokines, chemokines and their receptors: roles in immunomodulation. **Viruses**, v.4, n. 11, p. 2448-2470, 2012. Disponível em: <www.mdpi.com/journal/viruses>. Acesso em: 26 nov. 2013.

MELNICK, M.; SEDGHIZADEH, P. P.; ALLEN, C. M.; JASKOLL, T. Human cytomegalovirus and mucoepidermoid carcinoma of salivary glands: Cell-specific localization of active viral and oncogenic signaling proteins is confirmatory of a causal relationship. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 92, n. 1, p. 118-125, 2012.

MENDRONE, Jr., ALFREDO. Prevalência da infecção pelo citomegalovírus: a importância de estudos locais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n 1 p. 7-8.

MERCORELLI, B.; SINIGALIA, E.; LOREGIAN, A.; PALÚ, G. Human cytomegalovirus DNA replication: antiviral target and drugs. **Reviews in Medical Virology**, v. 18, p. 177-210, 2008.

MEYER-KONIG, U.; HABERLAND, M.; VON LAER D.; HALLER, O.; HUFERT, F. T. Intragenic variability of human Cytomegalovirus glycoprotein B in clinical strain. **The Journal of Infectious Diseases**, v.177, n. 5, 1162-1169, 1998.

MICHAELIS, M.; BARTH, S.; BREITLING, R.; BRUCH, J.; STEINBERGER, D.; ROTHWEILER, F.; HACKMANN, K.; SCHROCK, E.; DOERR, W. H.; GRIFFIN, D, K.; CINATL, J.; JR, C. J. Selection of a highly invasive neuroblastoma cell population through long-term human cytomegalovirus infection. **Oncogenesis**, v. 1 e 10, n. 4, p. 2157-9024, 2012.

MICHAELIS, M.; DOERR, W.H.; Jr, C. J. The story of human cytomegalovirus and cancer: increasing evidence and open questions, **Neoplasia**, v.11, n.1, p. 1-9, 2009.

MILLER, M.S.; HERTEL, L. Onset of human cytomegalovirus replication in fibroblast requires the presence of an intact vimentin cytoskeleton. **Journal of Virology**, v. 83, n. 14, p. 7015-7028, 2009.

MILNE, R.; PATERSON, D.; BOOTH, C. Human cytomegalovirus glycoprotein H/glycoprotein L complex modulates fusion-from-without. **Journal of General Virology**, v.79, p. 855-865, 1998.

MITCHELL, A.D.; XIE, W., SCHMITTLING, R.; LEARN, C.; FRIEDMAN, A.; MCLENDON, E.R.; SAMPSON, H.J. Sensitive detection of human cytomegalovirus in tumors and peripheral blood of patients diagnosed with glioblastoma. **Neuro-Oncology**, v. 10, n. 1, p.10-18, 2007.

MOCARSKI, E. S. Cytomegaloviruses and their replication. FIELDS, B. N.; KNIPE D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**. 3. ed. New York: Lippincott-Raven, 1996. cap. 76, p. 2447-2492.

MONTE, P. D.; LAZZAROTTO, T.; RIPALTI, A.; LANDINI, M. P. Human Cytomegalovirus infection: A complex diagnostic problem in which molecular biology has induced a rapid evolution. **Intervirology**, v. 39, p. 193-203, 1996.

MONTEJO, M.; MONTEJO, E.; CASTACA, M.; VALDIVIESO, A.; FERNANDEZ, J. R.; TESTILLANO, M.; GONZALEZ, J.; BUSTAMENTE, P.; RUIZ, P.; SUAREZ, M. J.; VENTOSO, A.; RUBIO, M. C.; URBINA, J. O. Prophylactic therapy with valgancyclovir in high-risk (cytomegalovirus D+/R-) liver transplant recipients: a single center experience. **Transplantation proceedings**, v.41, n. 6, p. 2189-2191, 2009.

MULLER, L.; SCHLIEP, C.; STORCK, M.; HAMPL, W.; SCHMID, T.; ABENDROTH, D.; MERTENS, T. Severe graft rejection, increased immunosuppression, and active HCMV infection in renal transplantation. **Journal of Medical Virology**, v.78, n. 3, p. 394-399, 2006.

MYLONAKIS, E.; KALLAS, W. M.; FISHMAN, J. A. Combination antiviral therapy for Ganciclovir-Resistant Cytomegalovirus infection in Solid-Organ transplant Recipients, **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 10, p. 1337-1350, 2002.

NADAL, S. R.; MANZIONE, C. R. Immune reconstitution inflammatory syndrome. **Revista Brasileira Coloproctologia**, v. 29, n.1, p. 125-128, 2009.

NAVARRO, D.; PAZ, P.; TUGIZOV, S.; TOPP, K.; LA VAIL, J.; PEREIRA, L. Glicoprotein B of human Cytomegalovirus promotes virion penetration into cells, transmission of infection from cell to cell, and fusion of infected cells. **Virology**, v. 197, n. 1, p. 143-158, 1993.

NEIRUKH, T.; QAISI, A.; SALEH, N.; RMAILEH, A.A.; ZAHRIYEH, E.A.; QUREI, L.; DAJANI, F.; NUSSEIBEH, T.; KHAMASH, S.; BARAGHITHI, S.; AZZEH, M. Seroprevalence of cytomegalovirus among pregnant women and hospitalized children in Palestine. **BMC Infectious Diseases**, 13: 528-534. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471/13/528>. Acesso em: 28/03/2014.

NGUYEN, Q.; ESTEY, E.; RAAD, I.; ROLSTON, K.; KANTARJIAN, H.; JACOBSON, K.; KONOPLEV, S.; GHOSH, S.; LUNA, M. Cytomegalovirus pneumonia in adults with leukemia: an emerging problem. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 4, p. 539-545, 2001.

NICHOLS, G.W.; PRICE, T.; BOECKH, M. Cytomegalovirus infections in cancer patients receiving granulocyte transfusions. **Blood**, v. 99, n. 9, p. 3483-3484, 2002.

NICHOLS, W. G.; BOECKH, M. Recent advances in the therapy and prevention of HCMV infections. **Journal of Clinical Virology**. v.16, n.1, p. 25-40, 2000.

NOGUEIRA, E.; OZAKI, K. S.; TOMIYAMA, H.; GRANATO, C. F. H.; CAMARA, N. O. S.; PACHECO-SILVA, A. The emergence of cytomegalovirus resistance to ganciclovir therapy in kidney transplant recipients. **International Immunopharmacology**, v. 6, n. 13-14, p. 2031-2037, 2006.

OBBERG, B. Antiviral effects of phosphonoformate (PFA, Foscarnet sodium). **Pharmacology Therapeutics**, v. 40, n. 2, p. 213-285, 1989.

OLIVEIRA, A. M.; LEITE, A. D.; SILVA, V. E. A.; ZAGO, S. C. S.; CARNEIRO, L. E. P.; MOLITERNO, R. A. Pesquisa de anticorpos IgG e IgM para citomegalovirus em parturientes e recém-natos do município de presidente prudente e região, estado de São Paulo. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 3, p. 737-741, 2002.

OLIVEIRA, F. L.; BRAGA, A.; CAPUTO, A.; REZENDE-FILHO, J. F.; MONTENEGRO, C. A. B. Infecção pelo citomegalovírus na gestação: uma visão atual, **Femina**, v. 39, n.11, p. 515-519, 2011.

OLIVEIRA, L. H. S.; OLIVEIRA, S. A. Hespesviridae. In: Oliveira, L. H. S. **Virologia Humana**, Rio de Janeiro: Cultura Médica, 1994, cap. 22.

PAGE, A.K.; JAGER, M.M.; IWASENKO, J.M.; SCOTT, G.M.; ALAIN, S.; RAWLINSON, W.D. Clinical aspects of cytomegalovirus antiviral resistance in solid organ transplant recipients, **Clinical Infectious Disease**, v. 56, n. 7, p. 1018 -1029, 2013

PANNUTI, C. Citomegalovirose. In: FOCACCIA, Ricardo; VERONESI, Roberto. **Tratado de Infectologia**, São Paulo: Atheneu, 2009. cap. 11, p. 363-371.

PANNUTI, C. S. Citomegalia In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, 1996. cap. 11, p. 187-194.

PANNUTI, C. S. Infecção por citomegalovírus, **Pediatria** (S. Paulo) v. 6, n. 4-6, p. 144-153, 1984.

PANNUTI, C. S. Infecções virais oportunistas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 28, p. 32-38, 1995. Suplemento 2.

PANNUTI, C. S.; VILAS BOAS, L.; AMATO NETO, V.; ANGELO, M.; SABBAGA, E. Detecção de anticorpos IgM nas infecções primárias e secundárias pelo citomegalovírus em pacientes submetidos a transplante renal. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 29, n.5, p. 317-322, 1987.

PANNUTI, C. S.; VILAS-BOAS, L. S.; ANGELO, M. J. O.; CARVALHO, R. P. S.; SEGRE, C. M. Congenital cytomegalovirus infection. Occurrence in two socioeconomically distinct populations of a developing country. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 27, n. 2, p. 105-107, 1985.

PASS, R. F. Cytomegalovirus Infection. **Pediatrics in Review**, v. 23, n.5, p. 163-170, 2002.

PENFOLD, M.E.; MOCARSKI, E. Formation of cytomegalovirus DNA replication compartments defined by localization of viral proteins and DNA synthesis. **Virology**, v. 239, p. 46-61, 1997

PEREIRA, S. A. L.; RODRIGUES, D. B. R.; CORREIA, D.; REIS, M. A.; TEIXEIRA, V. P. A. Identificação de agentes infecciosos pulmonares em autópsias de pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 6, p. 1-9, 2002.

PIGNATELLI, S.; MONTE, P. D.; ROSSINI, G.; LANDINI, M. P. Genetic polymorphisms among human cytomegalovirus (HCMV) wild-type strains. **Reviews Medical Virology**, v. 14, n. 6, p. 383-410, 2004.

POUR-REZA-GHOLI, F.; LABIBI, A.; FARROKHI, F.; NAFAR, M.; FIROUZAN, A.; EINOLLAHI, B. Signs and symptoms of cytomegalovirus disease in kidney transplant recipients. **Transplantation Proceedings**, v. 37, n. 7, p. 3056-3058. 2005.

RAFAILIDIS, P.; MOURTZOUKOU, E.; VARBOBITIS, I.; FALAGAS, M. Severe cytomegalovirus infection in apparently immunocompetent patients: a systematic review. **Virology Journal**, v. 5, n. 47, 2008.

RAMANAN, P.; RAZONABLE, R. Cytomegalovirus infections in solid organ transplantation: a review. **Infection Chemotherapy**, 45 (3), p. 260- 271, 2013.

RAMOS-CASALS, M.; CUADRADO, M. J.; ALBA, P.; SANNA, G.; BRITO-ZERON, P.; BERTOLACCINI, L.; BABINI, A.; MORENO, A.; D'CRUZ, D.; KHAMASHTA, M. A. Acute viral infections in patients with systemic lupus erythematosus: description of 23 cases and review of the literature. **Medicine**, v. 87, n. 6, p. 311-318, 2008.

RASMUSSEN, L. Immune response to human Cytomegalovirus infection. **Current Topics Microbiology and Immunology**, v.154, p. 221-254, 1990.

RASMUSSEN, L. Molecular pathogenesis of human Cytomegalovirus infection. **Transplant Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 127-134, 1999.

RASMUSSEN, L.; COWAN, C. M. Neutralizing antibody to gB2 human cytomegalovirus does not prevent reactivation in patients with human immunodeficiency virus infection. **Journal of General Virology**, v. 84, p. 1853-1857, 2003.

RAZONABLE, R. Cytomegalovirus infection after liver transplantation: current concepts and challenges. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 31, p. 4849-4860, 2008.

RAZONABLE, R. Direct and indirect effects of cytomegalovirus: can we prevent them? **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. Vol. 28, n. 1, p.1- 5, 2010.

REYNOLDS, D. W.; STAGNO, S.; HOSTY, T. S.; TILLER, M.; ALFORD, C. A. Maternal Cytomegalovirus excretion and perinatal infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 289, n. 1, p. 1-5, 1973.

RODRIGUES, C. E. M.; GADELHA, C. S.; NOBRE, C. A.; CALLADO, M. R. M.; VIEIRA, M. R. A.; VIEIRA, W. P. Cytomegalovirus (HCMV) retinitis after immunosuppressive therapy for leukocytoclastic vasculitis. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 49, n. 1, p. 64-69, 2009.

RODRIGUEZ, J., CASPER, K., SMALLWOOD, G., STIEBER, A., FASOLA, C., LEHNEMAN, J., HEFFRON, T. Resistance to combined ganciclovir and foscarnet therapy in a liver transplant recipient with possible dual-strain cytomegalovirus coinfection. **Liver Transplantation**, v. 13, p. 1396-1400, 2007.

SABATIER, J.; URO-COSTE, I.; POMMEPUY, I.; LABROUSSE, F.; ALLART, S.; TRÉMOULET, M.; DELISLE, M. B.; BROUSSET, P. Detection of human cytomegalovirus genome and gene products in central nervous system tumors. **British journal of Cancer**, v. 92, n. 4, p. 747-750, 2005.

SALAMANO, R.; GERVAZ, E.; MANANA, G.; PENÃ, S.; PANUNCIO, A.; PUPPO, C.; MESA, P.; LEGNANI, C.; SABARIS, A.; AZAMBUJA, C. Encefalitis a citomegalovirus

em um paciente imunocompetente. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 59, n. 4, p. 954-958, 2001.

SANTOS, S. N.; TAYARA, A.; SILVA, S.; BUCHALLA, C.; LAURENTI, R. AIDS in the state of São Paulo. Changes in the profile of the epidemic and prospects for epidemiological surveillance. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 5, n. 3, p. 286-310, 2002.

SATO, E. I. Lúpus eritematoso sistêmico. 2008. cap. 29, p. 651-662. Disponível em: <http://www.fmrp.usp.br/cg/novo/images/pdf/conteudo_disciplinas/lupus_eritematoso.pdf>. Acesso em: 12 jun. 2013.

SCHEURER, E. M.; BONDY, L. M.; ALDAPE, D. K.; ALBRECHT, T.; EL-ZEIN, R. Detection of human cytomegalovirus in different histological types of gliomas. **Acta Neurophatologica**, v.116, n. 1, p.79-86, 2008.

SCHLEISS, M.R., Antiviral therapy of congenital cytomegalovirus infection. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases, Elsevier**, n. 16, p. 50-59, 2004.

SEDDON, J.; BHAGANI, S. Antimicrobial therapy for the treatment of opportunistic infections in HIV/AIDS patients: a critical appraisal. **HIV/AIDS**, v. 3, p. 19-33, 2011.

SEKIGAWA, I.; NAWATA, M.; SETA, N.; YAMADA, M.; LIDA, N.; HASHIMOTO, H. Cytomegalovirus infection in patients with systemic lupus erythematosus. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 20, n. 4, p. 559-564, 2002.

SILVA, D. F. L.; CARMO, E. L.; MEDEIROS, R. F.; ARRUDA, L. M. F.; SILVA, N. F.; PINTO, W. V. M.; SAGICA, F. E. Estudo transversal de TORCS em gestantes e mulheres em idade fértil do Município de Juruti-Pa. Resumo do Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 49. Campo Grande, 6 -10 de agosto de 2013.

SILVA, D. F. L.; MATOS, M. M.; JESUS, M. I.; SANTOS, E. C. O. Diagnóstico molecular de infecção por citomegalovírus: relato de caso. **Revista Paraense de Medicina**, v. 19, n. 2, p.71-76, 2005.

SILVA, D. L.; GOMES, H. R.; MORAES, M. M.; MEDEIROS, R. F.; SANTOS, C. E.; JESUS, I. Perfil sorológico e molecular da infecção pelo citomegalovírus em pacientes transplantados de Belém-Pa. **Caderno Saúde Coletiva**, v. 15, n. 3, p. 369-378, 2007.

SILVA, D. L.; MEDEIROS, R. F.; MORAES, M. M.; SANTO, S. F. Restriction enzyme analysis of the human cytomegalovirus genome in specimens collected from immunodeficient patients in Belém, State of Pará, Brazil. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, p. 551-554, 2011.

SILVA, M. C. C.; FIGUEIREDO, E. G.; CORREA, C.; CABRERA, H. N.; SCHIMDT, M.; TEIXEIRA, M. J. Papel do citomegalovírus humano (HCMV) na oncomodulação de tumores cerebrais. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, v. 22, n. 1, p. 66v-71, 2011.

SINCLAIR, J.; SISSONS, P. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. **Journal of general virology**, v. 87, p.1763-1779, 2006.

SINGH, N. Late-onset cytomegalovirus disease as a significant complication in solid organ transplant recipients receiving antiviral prophylaxis: a call to heed the mounting evidence. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, n. 5, p. 704-708, 2005.

SINGH, N. Preemptive therapy versus universal prophylaxis with ganciclovir for cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. **Clinical Infectious Disease**, v.32, n. 5, p. 742-51, 2001.

SINZGER, C.; JAHN, G. Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis. **Intervirology**, v. 39, n. 5-6, p. 302-319, 1996.

SMITH, I. L.; CHERRINGTON, J. M.; JILES, R. E.; FULLER, M. D.; FREEMAN, W. R.; SPECTOR, S. A. High-level resistance of Cytomegalovirus to ganciclovir is associated with alterations in both the μ L97 and DNA polymerase genes. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 176, n. 1, p. 69-77, 1997.

SODERBERG-NAUCLÉR C., Autoimmunity induced by human cytomegalovirus in patients with systemic lupus erythematosus. **Arthritis Research e Therapy**, v.14, n. 1, p. 101, 2012.

SODERBERG-NAUCLÉR, C.; JOHNSEN, J. I. Cytomegalovirus infection in brain tumors A potential new target for therapy? **Oncoimmunology**, v.1, n. 5, p. 739-740, 2012.

SOUZA, M.A.; PASSOS, A.M.; TREITINGER, A.; SPADA, C. Seroprevalence of cytomegalovirus antibodies in blood donors in southern, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira Tropical**, 43 (4): 359-361, jul-ago,2010.

SPANO, L. C.; FERREIRA, M. S. R.; ALMEIDA, M. S.; NASCIMENTO, J. P.; LEITE, J. P. G. HCMV gB genotypes in cervical secretion and placenta tissues in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 3 p. 424-29, 2007.

SPRINGER, K. L.; WEINBERG, A. Cytomegalovirus infection in the era of HAART: fewer reactivations and more immunity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 582-586, 2004.

STAGNO, S.; PASS, R. F.; DWORSKY, M. E.; HENDERSON, R. E.; MOORE, F. G.; WALTON, P. D., ALFORD, C. A. Congenital cytomegalovirus infection: the relative importance of primary and recurrent maternal infection. **New England Journal of Medicine**, v. 306, n. 16, p. 945-949, 1982.

STAGNO, S.; REYNOLDS D. W.; HUANG, E-S.; THAMES, S. D.; SMITH, R. J.; ALFORD, C. A. Congenital Cytomegalovirus infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 296, n. 22, p. 1254-1258, 1977.

STAGNO, S.; REYNOLDS, D. W.; PASS, R. F.; ALFORD, C. A. Breast milk and the risk of cytomegalovirus infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 302, n. 19, p. 1073-1076, 1980.

STAGNO, S.; WHITLEY, R. J. Herpesvirus infections of pregnancy. Part I: Citomegalovirus and Epstein-Barr virus infections. **The New England Journal of Medicine**, v. 313, n. 20, p. 1270- 1274, 1985.

STARAS, S.A.S.; DOLLARD, S.C.; RADFORD, K.W.; FLANDERS, W.D.; PASS, R.F.; CANNON M.J. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994. **Clinical Infectious Diseases**, 43:1143-1151, 2006.

STARR J. G.; BART, R.D., GOLD, E. Inapparent congenital cytomegalovirus infection clinical and epidemiologic characteristics in early infancy. **The England Journal of Medicine**, v. 282, n. 19, p. 1075-1078, 1970.

TATAROWICZ, W. A.; LURAIN, N. S.; THOMPSON, K. D. A ganciclovir-resistant clinical isolate of human Cytomegalovirus exhibiting cross-resistance to other DNA polymerase inhibitors. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 166, n. 4, p. 904-907, 1992.

TAYLOR, G. H. Cytomegalovirus. **American Family Physician**, v. 67, n. 3, p.519-564, 2003. Disponível em: <www.aafp.org/afp>. Acesso em: 25 jun. 2013.

TAYLOR-WIEDEMAN, J.; SISSONS, P. G. J.; BORYSIEWICZ, K. L.; SINCLAIR, H. J. Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. **Journal of General Virology**, v. 72, p. 2059-2064, 1991.

TERRA, A. P. S.; SILVA-VERGARA, M. L.; GOMES, R. A. S.; SIMPSON, A. J. D.; PEREIRA, C. L. L.; CABALLERO, O. L. Monitoramento de pacientes com AIDS para o desenvolvimento de doença por cytomegalovirus (HCMV) usando-se PCR multiplex. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 6, p. 583-589, 2000.

TOMTISHEN, J. P. Human cytomegalovirus tegument proteins. **Virology Journal**, v. 9, n. 22, p. 1-8, 2012. Disponível em: <<http://www.virologyj.com/content/9/1/22>>. Acesso em: 12 ago. 2013.

VAN DER MEER, J.T., DREWE, W.L., BOWDEN, R.A., GALASSO, G.J., GRIFFITHS, P.D., JABS, D.A. Summary of the international consensus symposium on advances in the diagnosis treatment and prophylaxis and cytomegalovirus infection. **Antiviral Research**, 32(3):119-140, 1996.

VARANI, S.; LANDINI, P. M. Cytomegalovirus-induced immunopathology and its clinical consequences. **Herpesviridae**, v. 2, p. 1-14, 2011. Disponível em: <<http://www.herpesviridae.org/content/2/1/6>>. Acesso em: 09 nov. 2013.

VERGHESE, P. S.; SCHLEISS, M. R. Letemovir treatment of human cytomegalovirus infection antiinfective agent. **Drugs Future**, 38 (5): 291-298, 2013.

VILAS-BOAS, L. S.; SOUZA, V. A. U. F.; OLIVEIRA, A. C. P.; VISO, A. T. R.; NASCIMENTO FILHO, A. M.; NASCIMENTO, M. C.; PANNUTI, C. S. Cytomegalovirus glycoprotein B genotypes and central nervous system disease in AIDS patients. **Journal of Medical Virology**, v. 71, n. 3. p. 404-407, 2003.

WAIB, L. F. Retirada da terapia de manutenção para retinite por citomegalovírus em pacientes com aids e resposta imunológica à terapia antirretroviral altamente eficaz (HAART). 2003, 60 p. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) - **Faculdade de Ciências Médicas**, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2003.

WANG, C.; ZHANG, X.; BIALEK, S.; CANNON, M. Attribution of congenital cytomegalovirus infection to primary versus non-primary maternal infection. **Oxford University Press**, v. 52, n. 2, p. 11-13, 2011.

WEIRICH, J. Infecção congênita pelo Citomegalovírus: estudo realizado na Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará. Resumo de Tese. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 3, p. 325-326, 1998.

WOLF, D.G.; SMITH I.L.; LEE, D.J.; FREEMAN, W.R.; FLORES-AGUILAR M.; SPECTOR, S.A. Mutations in human cytomegalovirus UL97 gene confer clinical resistance to ganciclovir and can be detected directly in patient plasma. **Journal Clinical investigation**. V.95, 257-263, 1995.

WONG, A.; TAN, K. H.; TEE, C. S.; YEO, G. S. H. Seroprevalence of Cytomegalovirus, Toxoplasma and Parvovirus in Pregnancy. **Singapore Medical Journal**, v. 41, n. 4, p. 151-155, 2000.

YADEGARYNIA, D.; ABBASI, F.; HAGHIGHI, M.; FARDKHANI, K.S.; YADEGARYNIA, S. Pneumonitis due to cytomegalovirus in an immunocompromised patient. **Iranian Journal of Clinical Infectious Disease**, v. 4, n. 4, p. 238-240, 2009.

YAMAMOTO, A. Y.; FIGUEIREDO, L. T. M. GONÇALVES, A. L. Cytomegalovirose. **Medicina** (Ribeirão Preto) v. 26, n. 4, p. 588-592. 1993.

A p ê n d i c e A – Parecer de aprovação do trabalho pelo Comitê de Ética do Instituto Evandro Chagas



Parecer de Aprovação nº 006/2010
Protocolo CEP/IEC - Nº 033/09
CAAE: 5618.0.000.072-09

Ananindeua/PA, 05 de março de 2010.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM HUMANOS- CEP

Projeto: **“Citomegalovírus: diversidade genética e aplicações na pesquisa de resistência a antivirais em pacientes imunodeficientes.”**

Pesquisador Responsável: DOROTÉA DE FÁTIMA LOBATO DA SILVA

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, cientificamos que o projeto em epígrafe foi considerado **aprovado**.
Recomendamos a coordenação que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Este CEP se incumbirá dos procedimentos de acompanhamento preconizados pela Resolução 196/96 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde.

Deverá ser encaminhado relatório anual e, ao final, elaborado um relatório consolidado, incluindo os resultados finais da pesquisa, em um prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da pesquisa.

Atenciosamente,


 MANOEL DO CARMO PEREIRA SOARES
 Coordenador do CEP/IEC

A n e x o A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1. IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

Nome _____

Responsável: _____

PROJETO DE PESQUISA: Diversidade genética do HCMV e aplicações na pesquisa de resistência a antivirais em pacientes com imunodeficiência

2. PRINCIPAIS PESQUISADORES ENVOLVIDOS NO PROJETO: Dorotéia Lobato da Silva (Biomédica, coordenadora -IEC); Enfa. Marluce Matos (Enfermeira, colaboradora-IEC); Dra. Rita Catarina Medeiros (médica Infectologista - HUJBB); Leda Mani França (Farmacêutica-Bioquímica-IEC); Fernanda Sagica (Biomédica-bioestatística-IEC)

3. EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR PARA O VOLUNTÁRIO OU SEU RESPONSÁVEL SOBRE A PESQUISA E SUA IMPORTÂNCIA

O citomegalovírus é um herpes que causa no indivíduo uma doença denominada citomegalia. Na pessoa adulta, a doença se caracteriza por alguns sintomas como febre persistente, dores no corpo, mal estar, fraqueza, ínguas, aumento do fígado e do baço ou o indivíduo pode não apresentar nenhum sintoma. Esse vírus também pode afetar crianças no ventre materno ao atravessar a placenta. Caso isto ocorra no primeiro trimestre de gestação, as consequências podem ser graves para a saúde da criança, a qual pode sofrer problemas de retardo mental, problemas visuais ou doenças cardíacas e/ou hematológicas, pode nascer antes do tempo ou sofrer abortamentos. Após o nascimento, a criança pode se transformar em uma portadora do vírus e transmiti-lo a outras pessoas não protegidas, por um ano ou mais. Esse vírus pode permanecer no organismo por um longo período sem causar a doença, mas se a pessoa apresentar baixa imunidade, o vírus que ficou no organismo pode ocasionar a doença novamente, mesmo que ela tenha anticorpos da primeira infecção.

O estudo constará das seguintes etapas: aplicação de um questionário sobre os dados do paciente e sobre seu estado de saúde, além da coleta de sangue para análise laboratorial. Participarão do estudo indivíduos portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana, portadores de lúpus, pacientes transplantados e recém-nascidos suspeitos de TORCH com respectivas mães. Os menores de idade participarão com o consentimento de seus responsáveis.

O atendimento e a coleta serão realizados nos Hospitais João de Barros Barreto, Hospital Ofir Loyola e Jean Bitar. Os sangues serão colhidos com material descartável, o que não oferece risco algum de contaminação para o paciente, sendo 3 a 5 ml de sangue total de crianças e de 5 a 10 ml de adolescentes e adultos. Os materiais serão encaminhados ao laboratório de virologia e Biologia Molecular da

Seção de Meio Ambiente do Instituto Evandro Chagas para processamento e realização dos exames.

O Instituto Evandro Chagas se compromete em manter sigilo das informações sobre os sujeitos, assim como fornecer aos mesmos os resultados laboratoriais, os quais serão encaminhados para os Hospitais credenciados no Projeto.

Após as explicações sobre o estudo, acredito que serei beneficiado com os resultados das pesquisas realizadas no projeto, porque sei que terei posse dos resultados das análises laboratoriais e acompanhamento médico nos Hospitais conveniados com o estudo, respectivamente. Com a minha participação no projeto, sei que estarei contribuindo para o estudo da resistência aos medicamentos utilizados na terapia antiviral; também sei que poderei desistir a qualquer momento em participar do estudo sem causar prejuízos algum. A pesquisa não tem fins lucrativos, portanto não haverá nenhuma contribuição em dinheiro para os voluntários que quiserem participar do estudo.

Ficou claro que todo material biológico por mim cedido poderá ficar congelado para uso em outras pesquisas futuras. Meu nome e dados pessoais serão mantidos em segredo e os resultados serão somente utilizados com finalidades de pesquisa.

Declaro ter recebido todas as informações necessárias referentes à minha participação no Projeto de pesquisa **“Diversidade genética do HCMV e aplicações na pesquisa de resistência a antivirais em pacientes com imunodeficiência”**, estando também ciente de que na ocorrência de reclamações deverei procurar a equipe do projeto, bem como os integrantes do Comitê de Ética em Pesquisa Humana do Instituto Evandro Chagas (Telefone/fax:091- 3214-2237, no endereço: BR 316 Km 7 Levilândia – Ananindeua)

Após ler esse documento e receber as explicações que desejei da equipe do projeto, e por não haver mais dúvidas, concordo em participar como voluntário do estudo, o que fica confirmado pela minha assinatura abaixo.

COMO TENHO DIFICULDADES (SIM-- NÃO--) DE ENTENDER O ESCRITO ACIMA, ATESTO TAMBÉM QUE A COORDENADORA DO PROJETO (OU UM MEMBRO DA SUA EQUIPE), LEU PAUSADAMENTE ESTE DOCUMENTO E ESCLARECEU AS MINHAS DÚVIDAS, E COMO TEM A MINHA CONCORDÂNCIA PARA PARTICIPAR DO ESTUDO, COLOQUEI ABAIXO A MINHA ASSINATURA (ou IMPRESSÃO DIGITAL).

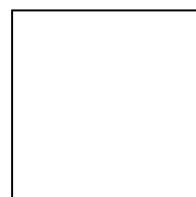
(Local) _____, _____ de _____ de 20__

Assinatura do paciente ou responsável legal (para menores de 18 anos)

Testemunhas:

1. _____

2. _____



A n e x o B - FICHA CLINICO-EPIDEMIOLOGICA - LES

PROJETO: Diversidade genética do HCMV e aplicações na pesquisa de resistência a antivirais em pacientes com imunodeficiência

Registro: _____

Data: ____/____/____

Data do Nascimento: ____/____/____ Idade: _____

Naturalidade: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____

Ocupação: _____

Renda individual: () sem renda () até 1s.m () 1 a 2 s.m () 2 a 3 s.m. () 3 a 5 s.m.

() 5 a 10s.m. () acima de 10s.m.

Escolaridade: () Fundamental () Médio () Superior: incompleto () completo ()

Estado civil: () solteiro () casado () viúvo () separado () união consensual

CID: () B24 () Lupus () CÂ _____ () Transplantado _____

Sintomático: () Sim () Não

Dados Clínicos

Sinais e ou Sintomas: _____

Medicamentos em uso: _____

Antecedentes morbidos pessoais:

Hipertensão: () sim () não. Diabético: () sim () não.

Hipercolesterolemia () sim () não

A n e x o C - QUESTIONÁRIO SUB-PROJETO: PERFIL EPIDEMIOLÓGICO, CLNICOLABORATORIAL DE INFECÇÃO POR CITOMEGALOVÍRUS (HCMV) EM PESSOAS VIVENDO COM HIV/ AIDS.

IDENTIFICAÇÃO

1. Data da entrevista: ___/___/___
2. Local da entrevista: HUIBB () URE DIPE () CASA DIA ()
3. Prontuário nº: _____
4. Telefone para contato: _____
5. Nome: _____
6. Bairro: _____ Cidade: _____:UF: _____
7. Idade: _____
8. Gênero: Masculino () Feminino ()
9. Raça: Branca () Parda () Negra () Amarela () Indígena ()
10. Naturalidade: Belém-Pa () Interior Estado () Outros estados/Países ()
11. Estado Civil: Solteiro () Casado () Viúvo () Separado/Divorciado ()
União estável ()

DADOS SÓCIOECONÔMICOS E CULTURAIS

1. Escolaridade: Analfabeto () Fundamental Completo () Fundamental Incompleto () Médio Completo () Médio Incompleto () Superior Completo () Superior Incompleto ()
2. Renda Familiar mensal (em salários mínimos): menos de 1 () 1 a 2 () 3 a 4 () 5 a 6 () 7 a 10 () 11 a 20 () mais que 20 () Não sabe ()
3. Tipo de Habitação: Área Urbana () Área Rural () Casa () Apartamento ()
Madeira () Alvenaria () Outros ()
4. Banheiro: Interno () Externo ()
5. Destino dado aos dejetos: Esgoto () Fossa biológica () Rio () Buraco na terra ()
6. Origem da água para consumo: Mineral () Encanada () Poço () Filtrada () Fervida () Coadada ()

ANTECEDENTES

1. Data do diagnóstico HIV+: ___/___/___
2. Data do início do tratamento: ___/___/___ Não realiza tratamento: ()
3. Transfusão de sangue e/ou hemoderivados: Sim (), ano:_____ Não ()
4. Tatuagem: Sim () Não ()
5. Presença de Piercing: Sim () Não ()
6. Uso passado ou atual de drogas ilícitas não injetáveis: Sim () Não ()
7. Uso passado ou atual de drogas ilícitas injetáveis: Sim () Não ()
8. Números de parceiros sexuais nos últimos seis meses anteriores à entrevista: nenhum () 1 () 2 () 3 a 5 () mais que cinco () Não se aplica ()
9. Uso de preservativos nas relações sexuais antes da infecção pelo HIV: usa sempre () Quase sempre () Às vezes () Nunca () Não se aplica ()
10. Uso de preservativos nas relações sexuais depois da infecção pelo HIV: usa sempre () Quase sempre () Às vezes () Nunca () Não se aplica ()
11. Já fez exame de fundo de olho: Sim () Não () Não sabe ()

DADOS CLÍNICOS

1. Sintomas Gerais: Febre () Astenia () Sudorese () Linfadenomegalia () Hepatoesplenomegalia () outros () _____
2. Sintomas Oftalmológicos: Conjuntivite (), se sim uni () ou bilateral () Baixa Acuidade Visual (), se sim uni () ou bilateral () Cegueira (), se sim uni () ou bilateral () Outros () _____
3. Sintomas Neurológicos: Cefaleia () Parestesia () Confusão Mental () Letargia () Convulsão () Agitação Psicomotora () Outros () _____
4. Sintomas Gastrointestinais: Diarreia () Dor abdominal () Odinofagia () Disfagia () Úlceras Orofaríngeas () Outros _____
5. Sintomas Respiratórios: Dispneia () Tosse não produtiva () Outros () _____
6. Doenças Oportunistas: ()
 - 1) Nenhuma; 2) Sarcoma de Kaposi; 3) Candidíase oral/ vaginal recorrente; 4) Candidose de esôfago; 5) Candidose de traqueia, brônquios ou pulmões; 6) Tuberculose pulmonar; 7) Tuberculose extrapulmonar/disseminada; 8) Toxoplasmose cerebral; 9) Pneumonia por *Pneumocysti carinii*; 10) Criptococose

extrapulmonar; 11) Criptosporidiose intestinal crônica; 12) Isosporidiose intestinal crônica; 13) Citomegalovirose/ retinite por HCMV; 14) Dermatite seborreica; 15) Diarreia por mais de um mês sem agente etiológico definido; 16) Histoplasmose disseminada; 17) Câncer cervical invasivo; 18) Herpes zoster; 19) Leucoplasia pilosa oral; 20) Herpes simples mucocutâneo por mais de um mês; 21) Leucoencefalopatia multifocal progressiva; 22) Linfoma Não Hodgkin de células B; 23) Linfoma maligno de células grandes ou pequenas; 24) Linfoma maligno imunoblástico; 25) Linfoma primário de cérebro; 26) Micobactéria disseminada; 27) Reativação de Doença de Chagas; 28) Sepses recorrente por *Salmonella*; 29) Outra: _____

DADOS LABORATORIAIS

Data			
Exames			
Hemácias (milhões/mm ³)			
Hb (g/dl)			
Leucócitos (/mm ³)			
Linfócitos (/mm ³)			
Neutrófilos (/mm ³)			
Plaquetas (/mm ³)			
TGO/AST (UI/ml)			
TGP/ALT (UI/ml)			
CV (cópias/mm ³)			
Linfócitos CD4/mm ³			

SEGUIMENTO: Óbito: Não () Sim () data:--/--/---- Causa do óbito: _____

A n e x o D - FICHA - TRANSPLANTADOS

Registro: _____

Data: ____/____/____

1. Dados pessoais:

Nome: _____

Responsável: _____

Data do Nascimento: ____/____/____ Idade: ____ Sexo: M () F ()

Endereço: _____

Bairro: _____ CEP: _____ Fone: _____

Cidade _____ Estado: _____

Ocupação: _____

2. Hábitos pessoais:

Foi fumante? () SIM. Há quanto tempo? _____ () NÃO

Consumiu bebida alcoólica? () SIM. Há quanto tempo? _____ () NÃO

Fez uso de drogas injetáveis? () SIM. Há quanto tempo? _____ () NÃO

Possui tatuagem? () SIM () NÃO

3. Informações complementares:

Realizou transfusão de sangue? () SIM; Quando? _____ () NÃO

Realizou hemodiálise? () SIM; Quando? _____ () NÃO

Está fazendo uso de medicamentos? () SIM () NÃO

Qual (is)? _____

Existe parentesco com o doador? () SIM, qual é o grau? _____ () NÃO

Doenças pregressas: () Hepatite. Qual? _____ () D. Chagas ()

Citomegalia () Outras doenças. Especificar _____

realizou alguma vacina: () Sim Qual (is) _____ Não ()

4. Órgão a receber: _____

Data da realização do transplante: ____/____/____

5. Fonte do transplante

() Órgão de doador vivo

() Órgão de cadáver

5. Perfil sorológico anti-HCMV:

SOROLOGIA	IgG	IgM
Pré-transplante		
Pós-transplante		

6. Resultado do PCR: Positivo () Negativo () Não coletou ()

7. HDA

**A n e x o E - FICHA CLINICOEPIDEMIOLÓGICA – PROJETO HCMV EM
PACIENTES COM CANCER DO HOSPITAL OPHIR LOYOLA**

Data da entrevista: ____/____/____

Registro:_____

IDENTIFICAÇÃO

1. Nome:_____
2. Data de nascimento:____/____/____ Idade:____ Sexo: F M
3. Naturalidade: Belém-Pa () Interior do Estado () Outros estados/Países ()
4. Endereço:_____
5. Telefone:_____ CEP: _____
6. Bairro:_____ Cidade:_____ UF:_____
7. Profissão:_____ Aposentado ()
Benefício ()
8. Estado Civil:
Solteiro () Casado () Viúvo () Separado () União estável ()
9. Tem ajuda de custo para o tratamento?() sim. Origem:_____ () não

DADOS SOCIOECONOMICOS E CULTURAIS

1. Escolaridade: Analfabeto () Fundamental Incompleto () Fundamental Completo ()
Médio Incompleto () Médio Completo () Sup. Incompleto () Sup. Completo ()
2. Renda Familiar Mensal (salários mínimos):Menos de 1 () 1 a 2 () 3 a 4 ()
5 a 6 () 7 a 10 () >10 () Não sabe ()
3. Local de Habitação: Área urbana () Área rural ()
4. Tipo de habitação: Casa () Apartamento () Madeira () Alvenaria ()
Outros ()
5. Banheiro: Interno () Externo ()
6. Destino dos dejetos: Esgoto () Fossa Biológica () Rio ()
Outros:_____
7. Origem da água para consumo: Mineral () Encanada () Poço () Filtrada ()
Fervida () Coada ()

ANTECEDENTES PESSOAIS:

1. Câ _____ Data do diagnóstico: ____/____/____
(mês/ano)
2. Há quanto tempo está realizando quimioterapia? _____
3. Quantas aplicações por mês? _____
4. Qual é esta seção? _____
5. Radioterapia: Sim () Não () Quando foi a última :
____/____(mês/ano)
6. Intervenção cirúrgica para retirada do tumor: Sim () Quando:____/____
Não()
7. Transfusão de sangue e/ou hemoderivados: Sim () Não () Não sabe ()
8. Quando:____/____ (mês/ano)
9. Outras doenças: Hipertensão () Doenças Autoimunes () Doenças
infecciosas persistentes () quais? _____ Outras (): _____
10. Outro Familiar com Câ: Não () Sim () grau de
parentesco: _____
11. Antecedentes familiares: Hipertensão () Doença Autoimune () Doença
Infecciosa Persistente () Outros (): _____ grau de parentesco:

12. Medicamentos em uso: _____

DADOS CLÍNICOS:

1. Sintomas Gerais: Febre () Astenia () Dor () Perda de Peso () Sudorese
() Linfadenomegalia () Outros (): _____
Antes () ou depois () da quimioterapia () ou do diagnóstico ()
2. Sintomas Oftalmológicos: Conjuntivite () Uni () Bilateral () Perda da
Acuidade Visual () Uni () Bilateralmente Cegueira () Uni () Bilateralmente
() Outros: _____ usa óculos () sim () não. desde de
quando ____/____
Antes () ou depois () da quimioterapia () ou do diagnóstico ()
3. Sintomas neurológicos: Cefaleia () Parestesia () Confusão mental ()
Letargia () Convulsão () Agitação psicomotora () Outros (): _____
Antes () ou depois () da quimioterapia () ou do diagnóstico ()
4. Sintomas Gastrintestinais: Diarreia () Dor Abdominal () Odinofagia ()
Disfagia () Úlceras Orofaríngeas () Outros (): _____
Antes () ou depois () da quimioterapia () ou do diagnóstico ()
5. Sintomas Respiratórios: Dispneia () Tosse não produtiva () Outros (): _____
Antes () ou depois () da quimioterapia () ou do diagnóstico ()

6. Doenças oportunistas: () sim () não. Qual _____
Antes () ou depois () da quimioterapia () ou do diagnóstico ()

DADOS LABORATORIAIS DOS ÚLTIMOS EXAMES.

Data do exame: ____ / ____ / ____

	(valores absolutos)	(valores relativos)
Hemácias (milhões/mm ³)		
Hb (g/dL)		
Ht (g/dL)		
Leucócitos (mm ³)		
Linfócitos (mm ³)		
Neutrófilos (mm ³)		
Plaquetas (mm ³)		
células atípicas:		
TGO/AST(UI/mL)		
TGP/ALT(UI/mL)		

Óbito: Não () Sim () Data: ____ / ____ / ____

Causa do Óbito: _____