

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

HUGO MANUEL PAZ MORALES

POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO DA IL-28B RS12979860 E IL-28B  
RS8099917 E INFECÇÃO DO CITOMEGALOVÍRUS EM PACIENTES SUBMETIDOS  
A TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS

CURITIBA

2018

HUGO MANUEL PAZ MORALES

POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO DA IL-28B RS12979860 E IL- 28B  
RS8099917 E INFECÇÃO DO CITOMEGALOVÍRUS EM PACIENTES SUBMETIDOS  
A TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS

Dissertação apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Mestre em Medicina Interna e  
Ciências da Saúde, no Curso de Pós-Graduação  
em Medicina Interna e Ciências da Saúde, Setor de  
Ciências da Saúde, da Universidade Federal do  
Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Sonia Mara Raboni

CURITIBA

2018

M828 Morales, Hugo Manuel Paz

Polimorfismo de nucleotídeo único da il-28b rs12979860 e il-28b rs8099917 e infecção do citomegalovírus em pacientes submetidos a transplante de células-tronco hematopoéticas [recurso eletrônico] / Hugo Manuel Paz Morales – Curitiba, 2018.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.  
Orientadora: Profa. Dra. Sonia Mara Raboni

1. Polimorfismo de nucleotídeo único. 2. Citomegalovírus.  
3. Transplante de células-tronco hematopoéticas. I. Raboni, Sonia Mara. II. Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

NLM: QU 477



## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós- Graduação em MEDICINA INTERNA E CIÊNCIAS DA SAÚDE, da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **HUGO MANUEL PAZ MORALES**, intitulada: **"POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO DA IL-28B RS12979860 E IL28B RS8099917 E INFECÇÃO DO CITOMEGALOVÍRUS EM PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS"**, sob orientação da Prof. Dra. SÔNIA MARA RABONI, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de Mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 11 de setembro de 2018.

Assinatura Eletrônica

11/09/2018 12:00:00.0

SÔNIA MARA RABONI

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

11/09/2018 12:00:00.0

SÍLVIA FIGUEIREDO COSTA

Avaliador Externo (FM/USP)

Assinatura Eletrônica

11/09/2018 12:00:00.0

CARMEM MARIA SALES BONFIM

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

À Luisa, companheira e norte, por quem nutro admiração e amor infintos  
à Cecília, música da minha vida, quem me cedeu as noites de Alice para  
escrever este conto de fadas  
à Alexandra Elbakyan e Aaron Swartz,  
pelo sonho do conhecimento livre.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Profa Dra Sonia Raboni pelas palavras assertivas e exemplo de probidade e retidão

Ao Serviço de Transplante de Medula Óssea do CHC-UFPR, na pessoa do Dr. Ricardo Pasquini, Dr Samir Nabhan e Dra Carmem Bonfim, meu agradecimento pela oportunidade de aprender diariamente e poder compartilhar desse fascinante mundo do TMO.

Aos meus novos amigos do Serviço de Infectologia. Em especial aos parceiros de ambulatório Jean Lemes e Maria Crisitina Assef: obrigado pela compreensão e ajuda nessa reta final.

A todos do laboratório de Virologia por sempre me receberem de portas abertas, principalmente Meri Nogueira e Luine Vidal.

À equipe de enfermagem do Serviço de Transplante de Medula Óssea do CHC-UFPR, especialmente as Enfermeiras Terezinha Keiko Kojo, Mariana Nunes e Adriana Cavilha. Este trabalho seria impossível sem vocês.

À Valéria Avanzi, Jucélia dos Santos pelo caminho anteriormente trilhado e a mão amiga sempre quando solicitado.

À Thays Fischer, pela coragem de participar deste estudo.

À Valéria Knapp da secretaria da Pós-Graduação. Obrigado pela paciência

Aos meus pais Roxana e Hugo, por tudo. Mas principalmente pelo carinho e amor incondicionais, pelo exemplo e pela coragem de se lançar no mundo.

À minha irmã Daniela, por me lembrar de jamais perder a ternura.

“One day Alice came to a fork in the road and saw a Cheshire cat in a tree. ‘Which road do I take?’ she asked. ‘Where do you want to go?’ was his response. ‘I don’t know,’ Alice answered. ‘Then,’ said the cat, ‘it doesn’t matter.’”

(CHARLES DODGSON)

## RESUMO

**Introdução:** A infecção pelo Citomegalovírus (CMV) após o Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas (TCTH) ocorre em até 80% dos pacientes e impacta em aumento de mortalidade não relacionada a recidiva. A principal estratégia para redução do risco de doença pelo CMV é a terapia preemptiva, que consiste no monitoramento periódico e início precoce de antiviral. Apesar de eficaz, esta estratégia possui efeitos tóxicos e aumento nos custos. Estudos recentes sugerem que Polimorfismos de Nucleotídeo Único (PNU) da IL-28B modulam a infecção do CMV, o que poderia orientar o uso racional da terapia preemptiva. **Objetivos:** Identificar os genótipos dos PNU da IL-28B rs12979860 e IL-28B rs8099917 em pacientes submetidos à TCTH e associação com infecção do CMV. **Métodos:** Estudo analítico, observacional, longitudinal, prospectivo, não intervencionista. Foram avaliados os PNU descritos e correlacionados com a incidência de infecção e cinética viral do CMV e com a incidência de outras virais além de fúngicas e bacterianas. Os dados foram coletados do prontuário do paciente. **Resultados:** Os genótipos C/T (49,6%) da IL-28B rs12979860 e o T/T (76,7%) da IL-28B rs8099917 foram os mais comuns. Não houve diferença significativa entre os grupos que tiveram infecção ou não do CMV quanto aos polimorfismos ou às variáveis estudadas. Os genótipos contendo alelos menores tanto da IL-28B rs12979860 quanto da IL-28B rs8099917 apresentaram uma menor progressão ao pico de antigenemia ( $p < 0,05$ ). O genótipo de alelo maior do receptor da IL-28B rs8099917 foi relacionado a menor incidência de infecção fúngica invasiva. **Conclusão:** O achado de uma menor progressão ao pico sugere que o alelo menor pode conferir uma melhor resposta imunológica após a infecção pelo CMV. Pode haver impacto, também, nas infecções fúngicas nesse contexto. Mais trabalhos são necessários para confirmar esses achados.

**Palavras-chave:** Polimorfismo de Nucleotídeo Único. IL-28B. IFNL. Infecção do CMV. TCTH. Doença pelo CMV.



## ABSTRACT

**Introduction:** Cytomegalovirus Infection after Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT) occurs in 60-80% of patients and impacts in higher non-relapse-mortality. The main strategy for CMV disease prevention is preemptive therapy, which consists of periodic monitoring and early initiation of antiviral therapy. Although effective, this strategy has toxic effects and increased costs. Recent studies suggest that IL-28B Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) modulate CMV infection, which could guide the rational use of preemptive therapy. **Objectives:** To identify the IL-28B SNP rs12979860 and IL-28B rs8099917 genotypes in patients undergoing HSCT and study their association with CMV infection. **Methods:** Analytical, observational, longitudinal, prospective, noninterventional study. To describe the SNU genotypes and correlated with CMV's infection incidence viral kinetics and with other viral infections incidence besides bacterial and fungal infections. Data were collected from patient's chart. **Results:** The IL-28B rs12979860 C/T(49.6%) and IL-28B rs8099917 T/T (76.7%) genotypes were the most common. There was no significant difference between groups with and without CMV infection regarding the SNP or variables studied. Genotypes containing minor alleles of both IL-28B rs12979869 and IL-28B rs8099917 showed a slower progression to the antigenemia peak ( $p < 0.05$ ). Recipient IL-28B rs8099917 genotype containing major alleles was related to lower incidence of invasive fungal infection. **Conclusion:** The finding of a smaller progression to the peak suggests that the minor allele may confer a better immune response after CMV infection in HSCT subjects. There may also be impact on fungal infections. More studies are needed to confirm these findings.

**Keywords:** Single Nucleotide Polymorphisms. IL-28B. IFNL. CMV infection. HSCT. CMV disease.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – CRONOLOGIA DAS INFECÇÕES OPORTUNISTAS APÓS O TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS ...	22
FIGURA 2 – IDENTIFICAÇÃO GRÁFICA DOS GENÓTIPOS .....	41

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – EXEMPLIFICAÇÃO DE MÉTRICAS PARA A AVALIAÇÃO DA DINÂMICA DA INFECÇÃO DO CITOMEGALOVÍRUS APÓS O TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS ...	36
GRÁFICO 2 – DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO DA IL-28B .....	46
GRÁFICO 3 – DISTRIBUIÇÃO DO POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO DA IL-28B RS12979860 E RS8099917 DE AMOSTRAS COLETADAS PREVIAMENTE À INFUSÃO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS (PRÉ) E APÓS A PEGA MEDULAR (PÓS) .	47
GRÁFICO 4 – DISTRIBUIÇÃO TEMPORAL DA PRIMEIRA INFECÇÃO DO CITOMEGALOVÍRUS APÓS O TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS .....	48
GRÁFICO 5 – DISTRIBUIÇÃO DO VALOR MÉDIO DO RESULTADO DA PESQUISA DE ANTIGENEMIA ATRAVÉS DOS DIAS APÓS O TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS.....	49
GRÁFICO 6 – ANÁLISE DA DINÂMICA VIRAL DO CITOMEGALOVÍRUS DURANTE OS PRIMEIROS 100 DIAS APÓS O TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS DE ACORDO COM O POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO DA IL-28B.....	52
GRÁFICO 7 – DISTRIBUIÇÃO DO DIA DA PRIMEIRA INFECÇÃO DO CITOMEGALOVÍRUS APÓS O TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS DE ACORDO COM O GENÓTIPO DA IL-28B .....	53
GRÁFICO 8 – MEDIANA DO VALOR DA PRIMEIRA ANTIGENEMIA (LOG10) DISTRIBUÍDOS ENTRE OS DIFERENTES GENÓTIPOS DA IL-28B .....	53
GRÁFICO 9 – DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO TOTAL DE DIAS DE ANTIGENEMIA POSITIVA APÓS O TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS DE ACORDO COM OS DIFERENTES GENÓTIPOS DA IL-28B .....	54
GRÁFICO 10 – DISTRIBUIÇÃO DO VALOR DE PICO DE ANTIGENEMIA E OS GENÓTIPOS DA IL-28B .....	54

GRÁFICO 11 – DISTRIBUIÇÃO DO VALOR DE PROGRESSÃO AO PICO DE ANTIGENEMIA NA INFECÇÃO DO CITOMEGALOVÍRUS APÓS O TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS ENTRE OS GENÓTIPOS DA IL-28B .....	55
GRÁFICO 12 – CURVA DE KAPLAN-MEIER PARA AVALIAÇÃO DO TEMPO APÓS O TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS E INFECÇÃO DO CITOMEGALOVÍRUS ENTRE OS DIFERENTES GENÓTIPOS DA IL-28B .....	56
GRÁFICO 13 – DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO TOTAL DE DIAS DE TRATAMENTO COM GANCICLOVIR E USO DE TIMOGLOBULINA.....	57

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – DEFINIÇÕES DE INFECÇÃO DO CITOMEGALOVÍRUS .....	37
QUADRO 2 – DEFINIÇÕES DE DOENÇA PELO CITOMEGALOVÍRUS.....	37
QUADRO 3 – SEQUÊNCIAS AMPLIFICADAS E DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA PARA OS POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO RS12979860 E RS8099917 .....	40
QUADRO 4 – CRITÉRIOS PARA DETERMINAÇÃO DOS GENÓTIPOS .....	41
QUADRO 5 – DESCRIÇÃO DOS CASOS DE INFECÇÃO DO CITOMEGALOVÍRUS E MÁ FUNÇÃO DO ENXERTO.....	49

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ASSOCIAÇÕES ENTRE VARIADOS POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO E INFECÇÃO DO CITOMEGALOVÍRUS APÓS TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS ALOGÊNICO .....	30
TABELA 2 – ASSOCIAÇÕES ENTRE O POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO DA IL-28B E.....	32
TABELA 3 – PERFIL DEMOGRÁFICO E CLÍNICO DOS PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS ALOGÊNICO (N=70).....	44
TABELA 4 – DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DOS POLIMORFISMOS DO NUCLEOTÍDEO ÚNICO DA IL-28B PRÉ E PÓS PEGA MEDULAR.....	47
TABELA 5 – DISTRIBUIÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES QUE APRESENTARAM OU NÃO INFECÇÃO DO CMV ATÉ O D+100 APÓS O TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS.....	50
TABELA 6 – AVALIAÇÃO UNIVARIADA DAS CURVAS DE TEMPO ATÉ A PRIMEIRA INFECÇÃO DO CITOMEGALOVÍRUS APÓS O TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS ENTRE DIFERENTES VARIÁVEIS .....	55
TABELA 7 – INFECÇÃO FÚNGICA INVASIVA E RELAÇÃO COM OS POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO DA IL-28B RS8099917 DO RECEPTOR.....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP	– Doador Aparentado
ARNm	– Ácido Ribonucléico Mensageiro
ATG	– Timoglobulina
CAA	– Células Apresentadoras de Antígeno
CD	– Célula Dendrítica
Células NK	– Células Natural Killers
CEP	– Comitê de Ética em Pesquisa
CHC – UFPR	– Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
CMV	– Citomegalovírus
CTH	– Células-Tronco Hematopoiéticas
D+100	– Centésimo dia após o transplante de célula-tronco hemtopoiética
DC-SIGN	– Dendritic Cell-specific ICAM-grabbing non-integrin
DECH	– Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro
EBV	– Vírus Epstein-Barr
EEUU	– Estados Unidos da América do Norte
EGFR	– Epidermal Growth Factor Receptor
ELISpot	– Enzyme-Linked Immunosorbent Spot
<i>ELISA</i>	– Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assays
HCMV	– Citomegalovirus Humano
HEPA	– High Efficiency Particulate Arrestance
HIV	– Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	– Complexo Antígeno Leucocitário Humano
ICS	– Intracellular Cytokine Staining
IFN	– Interferon
IFNA	– Interferon-alfa
IFNG	– Interferon-gama
IFNL	– Interferon-lambda
IIQ	– Intervalos Interquartis
IL-28B	– Interleucina 28
ISG	– Interferon-Stimulated Gene
ITPA	– Inosina-trifosfatase

MHC	– Complexo Maior de Histocompatibilidade
NAP	– Não Aparentado
NK	– Natural Killer
NMDP	– National Marrow Donor Program
PBS	– Phosphate buffered saline
PCR	– Reação em Cadeia da Polimerase
PNU	– Polimorfismos de Nucleotídeo Único
pp65	– Antígeno Fosfoproteína
qPCR	– Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
RIC	– Condicionamento de Intensidade Reduzida
RRP	– Receptores de Reconhecimento de Padrão/patógeno
SFB	– Soro Fetal Bovino
TCLE	– Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCTH	– Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas
TLR	– Toll Like Receptor
TMO	– Transplante de Medula Óssea
VHC	– Vírus da Hepatite C
VVZ	– Vírus da Varicella-Zoster



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
2.1	GERAL .....	18
2.2	ESPECÍFICOS .....	18
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>19</b>
3.1	TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS.....	19
3.2	CITOMEGALOVÍRUS HUMANO.....	22
3.2.1	Citomegalovírus na população imunocompetente.....	22
3.2.2	Citomegalovírus no Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas .....	24
3.2.3	Polimorfismos de nucleotídeo único e infecção do Citomegalovírus .....	27
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>34</b>
4.1	CASUÍSTICA.....	34
4.1.1	Tipo de estudo.....	34
4.1.2	População do estudo.....	34
4.1.3	Critérios de inclusão e exclusão .....	34
4.1.4	Tratamento suportivo.....	35
4.2	MÉTODOS .....	35
4.2.1	Local onde foi realizada da pesquisa.....	35
4.2.2	Grupos vulneráveis – identificar se a pesquisa envolve grupos vulneráveis e justificar a necessidade da participação na pesquisa .....	35
4.3	DEFINIÇÕES .....	36
4.3.1	Avaliação da dinâmica da infecção do Citomegalovírus.....	36
4.3.2	Definições de infecção e doença pelo Citomegalovírus .....	36
4.3.3	Outras definições.....	37
4.4	MÉTODOS LABORATORIAIS .....	38
4.4.1	Obtenção do concentrado de leucócitos ( <i>Buffy Coat</i> ) e coleta do plasma.....	38
4.4.2	Extração do DNA genômico .....	39
4.4.3	Genotipagem dos PNU IL-28B rs12979860 e rs8099917 .....	39
4.4.4	Reação em cadeia da polimerase para detecção de Citomegalovírus .....	41
4.4.5	Pesquisa de antigenemia pp65 para detecção de Citomegalovírus .....	42
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	42
4.6	FINANCIAMENTO.....	43

<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>66</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>67</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas (TCTH) é uma terapia curativa para uma gama de doenças hematológicas e não-hematológicas. Esse procedimento consiste na transferência de Células Tronco Hematopoiéticas (CTH) inseridas perifericamente com a finalidade de repovoar as linhagens sanguíneas em um paciente com falência medular. Devido à imunossupressão secundária à toxicidade do condicionamento e inerentes às doenças de base, as infecções ainda são muito prevalentes e responsáveis por cerca de 20% da mortalidade após o TCTH (SCHUSTER et al., 2017).

O Citomegalovírus (CMV) é um dos principais patógenos nesse contexto, atingindo taxas de infecção de até 80% quando não há uso de profilaxia. Essa infecção viral pode impactar negativamente a sobrevida dos pacientes submetidos a TCTH através de efeitos diretos com lesão em órgão-alvo (pneumonite, encefalite por exemplo) ou por meio de efeitos indiretos, aumentando a taxa de doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) ou de outras infecções (LJUNGMAN; HAKKI; BOECKH, 2011). A principal estratégia empregada para redução do risco de doença do CMV é a terapia preemptiva, composta pelo monitoramento periódico de infecção mediante pesquisa de antigenemia *pp65* ou da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e, se detectado, início precoce de antiviral. O uso da terapia preemptiva reduziu drasticamente as taxas de doença pelo CMV (BOECKH et al., 2003) porém a maior utilização de doadores alternativos nos últimos anos acarretou em incremento nas taxas de infecção do CMV e consequente maior uso preemptivo de ganciclovir. Isto se traduziu em aumento de toxicidade, especialmente medular, e de custos (ROBIN et al., 2017). Interessantemente, uma parcela dos pacientes com infecção consegue clarear a viremia de modo espontâneo e não desenvolve doença pelo CMV (TAN; WAGGONER; PINSKY, 2015). A capacidade de clareamento espontâneo do CMV parece estar relacionada com uma eficaz expansão de células T CD4+ e CD8+ CMV-específicas além de maior produção de Inteferon-gama (IFNG) (CIAURRIZ et al., 2017).

Polimorfismos de Nucleotídeo Único (PNU) envolvidos na ativação ou regulação das respostas imune inata e adaptativa podem ter impacto sobre a suscetibilidade e evolução clínica de infecções virais (NETEA; WIJMENGA; O'NEILL, 2012). O PNU da IL-28B, por exemplo, possui influência no clareamento espontâneo

e na resposta ao tratamento com IFN-alfa (IFNA) e ribavirina (CARIANI et al., 2016). Recentes estudos sugerem uma influência desse PNU na infecção e na dinâmica viral do CMV após o transplante de órgão sólido e de células tronco hematopoiética (BRAVO et al., 2014; EGLI et al., 2014a; MANUEL et al., 2015). A identificação de um genótipo protetor ou facilitador da infecção do CVM após TCTH alogênico pode permitir um uso racional tanto de exames laboratoriais utilizados no monitoramento quanto dos antivirais com consequente diminuição de custos e toxicidade.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Identificar os genótipos dos PNU da IL-28B rs12979860 e IL-28B rs8099917 em pacientes submetidos à TCTH e sua associação com a infecção do CMV.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- a) Detectar a incidência de infecção do CMV nos pacientes submetidos a TCTH;
- b) Descrever a dinâmica da infecção do CMV nos primeiros 100 dias após o TCTH e correlacionar com os genótipos estudados;
- c) Correlacionar a incidência de infecções bacterianas, fúngicas, virais e da DECH com os genótipos obtidos da IL-28B.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS

O TCTH forneceu um dos mais notáveis avanços médicos, sendo pioneiro no campo da biologia das células-tronco. Usualmente utilizado com a finalidade de regenerar a hematopoiese em paciente com câncer que recebeu doses letais de regime de quimioterapia e/ou radioterapia, o TCTH ultrapassou os limites da hematologia e da oncologia, estabelecendo-se como terapia para uma gama de desordens, tais como para correção de defeitos e displasias de células hematopoiéticas hereditárias ou adquiridas e doenças autoimunes (BLUME; THOMAS, 2016). Existem mais de 1500 centros transplantadores em 75 países no mundo e acredita-se que já foram realizados mais de 1.000.000 de TCTH (PETER GALE et al., 2016).

O TCTH fundamenta-se no princípio de que as CTH infundidas periféricamente têm a capacidade de migrar, identificar e se enxertar nos nichos de CTH localizados dentro do microambiente da medula óssea. Uma vez enxertadas nesse microambiente, elas se proliferam e se diferenciam com a finalidade repovoar as linhagens do sangue (BLUME; THOMAS, 2016). As CTH doadoras podem ser coletadas de um outro (TCTH alogênico) ou do mesmo indivíduo (TCTH autólogo) e derivadas da medula óssea, sangue periférico ou sangue de cordão umbilical. Ainda quanto ao tipo de doador, o TCTH pode ser aparentado (AP) ou não aparentado (NAP). Os primeiros TCTH alogênicos bem-sucedidos foram realizados em 1968 em 3 crianças com imunodeficiência congênita. Nos três casos, as CTH foram coletadas da medula óssea dos respectivos irmãos compatíveis para o complexo antígeno leucocitário humano (HLA) (BLUME; THOMAS, 2016). Em outubro de 1979, o Serviço de Transplante de Medula Óssea do Complexo Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC - UFPR) foi o primeiro da América Latina a realizar um TCTH. Esse mesmo serviço foi pioneiro nacional a utilizar células de cordão umbilical em 1992 e a ser referenciado pelo *National Marrow Donor Program* (NMDP) – órgão de cadastro mundial de doadores de medula – e por utilizar medula óssea de doadores não aparentados em 1995 (VOLTARELLI, 2010)

O TCTH alogênico bem-sucedido deve superar duas barreiras imunológicas:

1) Doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH): quando células T maduras

do doador reconhecem tecidos receptores como “não-próprios” e causam lesão tecidual através de mecanismos citolíticos diretos e indiretamente por meio da liberação de citocinas e ativação de outras células, como macrófagos e 2) Rejeição: quando o sistema imune do receptor é exageradamente estimulado ou suprimido de modo insuficiente (VOLTARELLI, 2010). Quando o equilíbrio é alcançado, há o desenvolvimento de tolerância, esta definida como a presença de reatividade imunológica sem rejeição ou DECH manifesta na ausência de medicamentos imunossupressores (ZENG; STROBER, 2016). Para tal, arquitetou-se uma estratégia alicerçada em três etapas: 1) Regime de condicionamento intensivo com o objetivo de erradicar o tumor e “criar espaço” dentro dos nichos da medula óssea. Isto foi conseguido aplicando doses letais de irradiação e/ou quimioterapia (por exemplo, com uso da irradiação total do corpo e/ou ciclofosfamida); 2) Resgate da mieloablação através da infusão de CTH doadoras. 3) Depleção de células T ou a imunossupressão pós-enxertia: usada para controlar DECH e estabelecer tolerância de longo prazo para enxerto-hospedeiro (NEGRIN; RITZ, 2016).

O conceito de que o regime de condicionamento deve ser obrigatoriamente de alta intensidade foi questionado no início da década de 1980. Estudos chamaram a atenção para os efeitos do enxerto contra o tumor, evidenciado pela melhor sobrevida livre de recidiva em pacientes com DECH aguda ou crônica (FRY; WILLASCH; BADER, 2010). O conceito de “criar espaço” também foi progressivamente substituído por uma visão mais holística dos mecanismos envolvidos no enxerto de células alogênicas. Entende-se que as células do doador e do receptor coabitam e que pequenas agressões recíprocas são saudáveis e favorecem uma lenta e progressiva quimera completa (VOLTARELLI, 2010).

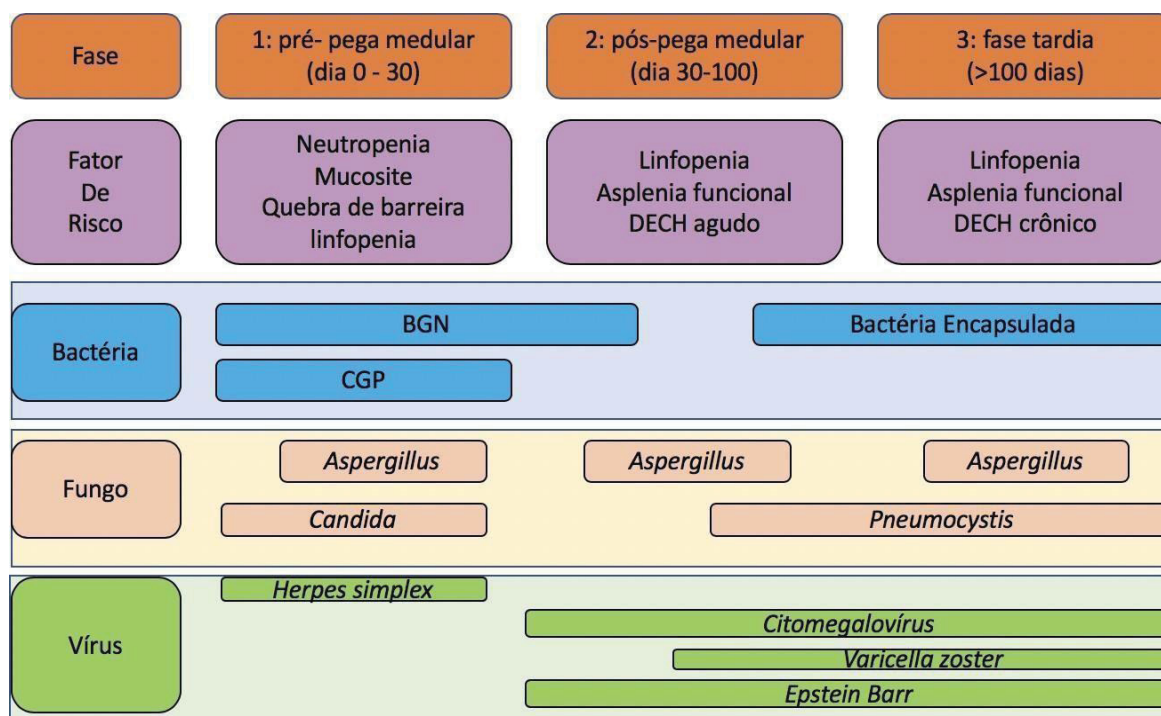
Deste modo, a seleção do doador interfere diretamente nas estratégias de imunoprofilaxia da DECH e no prognóstico do TCTH. O HLA é um complexo genético que codifica o complexo maior de histocompatibilidade (MHC) e é fundamental para o reconhecimento de moléculas não próprias pelo sistema imune adaptativo. Esse complexo é o principal critério para a seleção do doador, com impacto na sobrevida dos pacientes e alto risco de morte se incompatibilidades HLA estiverem presentes entre o receptor e doador no TCTH (FÜRST et al., 2013).

A recuperação da imunidade celular ampla e funcional após o TCTH é lenta. A causa para isso é multifatorial: toxicidade tímica pelos tratamentos prévios, condicionamento com quimioterapia de alta dose e depleção *in vivo* ou *ex vivo* de

linfócitos T são alguns das principais causas da vagarosa reexpansão. Esses fatores predispõem o hospedeiro a uma variedade de infecções e o espectro destas infecções após o HCT parece correlacionar-se com a cinética da recuperação imunológica, como demonstrado na Figura 2. Até o dia 30 após o TCTH, a neutropenia profunda e a mucosite relacionada ao regime de condicionamento predispõem os pacientes principalmente à infecções bacterianas de origem gastrointestinal ou relacionadas a dispositivos (p ex. cateter venoso central) (TOMBLYN et al., 2009). A reativação do CMV, vírus Epstein-Barr (EBV) e infecções por *Pneumocystis jirovecii* geralmente ocorrem do momento da pega medular até o d+100 ou posterior se presentes a DECH ou a imunossupressão prolongada. A reativação do vírus varicela-zoster (VVZ) geralmente ocorre após o dia 100 - refletindo a imaturidade funcional dos linfócitos T. Durante o mesmo período, infecções secundárias à bactérias encapsuladas (como *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae*) também são comuns devido a imunidade humoral deficiente e opsonização prejudicada. Riscos de infecções fúngicas invasivas, vírus respiratórios comunitários e infecções parasitárias são distribuídos uniformemente por até 2 anos pós-transplante (MEHTA; REZVANI, 2016).



FIGURA 1 – CRONOLOGIA DAS INFECÇÕES OPORTUNISTAS APÓS O TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS



FONTE: Adaptado de Tomblyn et al. (2009).

Nota: CGP= Cocos Gram Positivos, BGN= Bacilo Gram Negativo, DECH= Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro.

## 3.2 CITOMEGALOVÍRUS HUMANO

### 3.2.1 Citomegalovírus na população imunocompetente

O CMV humano é um patógeno restrito ao ser humano e pertence à família *Herpesviridae*, subfamília *Betaherpesvirinae*. Também conhecido como herpesvírus humano 5, é o agente de uma infecção de distribuição global, embora existam diferenças na soroprevalência entre os países. Assim como os outros herpesvírus, a prevalência da infecção do CMV em uma certa população é determinada pelos fatores idade, socioeconômico e a etnia; sendo que quanto maior for a idade do paciente e pior o perfil socioeconômico, maior será a soroprevalência. Por outro lado, estudos observacionais demonstram que a incidência diminui lentamente de acordo com o passar do ano civil (STYCZYNSKI, 2018). No Brasil, por exemplo, a soroprevalência entre as mulheres em idade fértil ultrapassa os 90%, enquanto que nos EEUU não chega a 60%. (MANICKLAL et al., 2013).

A infecção primária é caracterizada por um período de replicação viral e

consequente disseminação no sangue, leite materno, urina, saliva e secreções genitais. Segundo Mezger et al. (2008), a capacidade do CMV de reconhecer e infiltrar uma ampla gama de células, incluindo células dendríticas (CD), monócitos, macrófagos, células endoteliais, células epiteliais, miócitos e fibroblastos demonstra a capacidade que o CMV tem de utilizar diferentes tipos de receptores. Os receptores de reconhecimento de patógenos (RRP) associados ao CMV compreendem o receptor de crescimento epidérmico (EGFR), integrinas e lectina tipo C (especialmente DC-SIGN) e os receptores *Toll-like* (TLR) (FEIRE; KOSS; COMPTON, 2004; MEZGER et al., 2008; WANG et al., 2003). O TLR-2, por exemplo, desencadeia a produção de citocinas inflamatórias quando ativado por vírions do CMV (MEZGER et al., 2008). Apesar da grande replicação inicial, a primoinfecção é assintomática em pacientes imunocompetentes, exceto por possíveis episódios de febre, hepatite ou síndrome semelhante à mononucleose. Na população gestante, em contrapartida, a infecção pode ser trágica atingindo taxas de até 40% de transmissão neonatal. Com a diminuição de casos de rubéola secundária às campanhas de vacinação, o CMV é a causa não-genética mais comum da perda auditiva infantil e causa significativa de atraso no desenvolvimento neurológico (MANICKLAL et al., 2013). À infecção aguda, segue-se a estruturação de resposta imunológica adaptativa mediada por fatores humorais e celulares e progressão do vírus para período de latência. A importância da imunidade humoral não é clara, podendo não ser central, porém estudos demonstram que altos títulos de anticorpos contra o CMV tiveram um papel protetor contra a transmissão neonatal do vírus. A imunidade celular, por sua vez, apresenta um corpo sólido de evidências. Em indivíduos saudáveis, os linfócitos CD8<sup>+</sup> e, principalmente, os CD4<sup>+</sup> são fundamentais no controle da infecção. Este fato pode ser demonstrado na alta incidência de infecção e doença pelo CMV nas situações clínicas que a linfopenia CD4<sup>+</sup> está presente, tais como infecção pelo HIV, receptores de transplante renal e durante o uso de alemtuzumab (anticorpo monoclonal anti-CD52) (BLYTH et al., 2016). Outro indicador da importância da imunidade celular é a constatação de que até 10% de células CD8<sup>+</sup> circulantes em indivíduos soropositivos são específicos para CMV, número desproporcional em relação à quantidade de patógenos outros que a imunidade deve se ocupar (SYLWESTER et al., 2005).

### 3.2.2 Citomegalovírus no Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas

A infecção e a doença pelo CMV são preocupações globais na população transplantada. Sabe-se, por exemplo, que pacientes com sorologia prévia ao TCTH positiva para CMV apresentam mortalidade superior em relação aos pacientes com sorologia negativa, especialmente no cenário de transplantes com incompatibilidade de HLA, doador não aparentado (NAP) ou doador haploidêntico. Corroborando com esses achados, a reativação de CMV antes do D+100 é associada a um aumento de mortalidade não relacionada com a doença de base, como foi visto em dados de 9.469 pacientes submetidos a TCTH entre 2003 e 2010, recentemente publicado pelo *Center for International Blood and Marrow Transplant Research* (TEIRA et al., 2016). Os mecanismos pelos quais o CMV pode impactar negativamente na sobrevivência dos pacientes podem ser divididos em duas categorias: 1) Secundários a efeitos diretos: doenças causadas diretamente pelo CMV, como pneumonite, colite, hepatite, supressão medular e encefalite. A mortalidade em pacientes com pneumonite por CMV, por exemplo, pode chegar a 60%. 2) Secundários a efeitos indiretos: aumento na taxa de DECH, aumento na incidência de outras infecções virais e fúngicas, efeitos colaterais dos medicamentos, entre outras (LJUNGMAN; HAKKI; BOECKH, 2011).

A correlação estreita entre CMV e a DECH é bem estabelecida. No entanto, não está claro se a imunossupressão decorrente da DECH é que predispõe à infecção pelo CMV ou se este vírus é que favorece a DECH por induzir alterações diversas da imunidade celular. A inversão da relação de linfócitos T CD4+/CD8+ e a alteração da ativação das células T CD8+ e *natural killer* (NK) ocasionam aumento na produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias e aumento na expressão de marcadores de superfície. Esse estado inflamatório leva a maior reconhecimento de antígenos “não próprios” pelas células apresentadoras de antígeno (CAA) e linfócitos citotóxicos, o que favorece a ocorrência de DECH (HUMAR et al., 1999).

Assim, o CMV continua a ser uma das principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos, especialmente após TCTH. Como discutido previamente, em indivíduos imunocompetentes a infecção latente pelo CMV está sob o controle devido ao sistema imune adaptativo protagonizado pelos linfócitos T. Na ausência ou atraso na recuperação destas células específicas para CMV, há uma importante predisposição à recorrência e à doença pelo CMV (STYCZYNSKI, 2018). No TCTH, a taxa de infecção do CMV é influenciada por vários fatores de risco,

incluindo aqueles relacionados ao doador, ao receptor, à fonte de células-tronco, ao condicionamento do transplante, ao tratamento imunossupressor e à recuperação imune após TCTH (DZIEDZIC; SADOWSKA-KRAWCZENKO; STYCZYNSKI, 2017).

O papel de cada fator de risco foi revisado em dois recentes artigos publicados, resumidos abaixo (DZIEDZIC; SADOWSKA-KRAWCZENKO; STYCZYNSKI, 2017; STYCZYNSKI, 2018):

- a) Tipo de Doador: A recorrência ocorreu em 44,6% dos receptores de transplante com doador não-aparentado ou com incompatibilidade de HLA em comparação com 33,8% de doador aparentado ( $p < 0,0001$ );
- b) Status Sorológico prévio: Maior prevalência (35,8%) de recorrência de CMV ocorreu em pacientes com status sorológico D-/R+ (doador negativo/receptor positivo) em comparação com D+/R+ (doador positivo/receptor positivo) (32,1%). Situações com ambos doadores e receptores com sorologia prévia negativa para CMV apresentaram em média 3,1% de recorrência ( $p < 0,0001$ );
- c) Fonte de Células Tronco Hematopoiéticas: No único estudo que comparou o impacto de três fontes de células-tronco na reativação do CMV, não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes;
- d) Condicionamento: O risco de infecção do CMV foi maior após condicionamento mieloablativo do que com intensidade reduzida (RIC). O uso de irradiação corporal total foi considerado fator de risco para reativação do CMV (NICHOLS et al., 2001);
- e) Tipo de Imunossupressor: Um efeito protetor do uso do sirolimus na profilaxia da DECH foi demonstrado em um único estudo. O efeito protetor do sirolimus possivelmente ocorre devido à inibição das vias de sinalização celular que são desencadeadas durante a infecção por CMV para a síntese de proteínas virais. Cogita-se, ainda, em inibição direta da cinética da replicação do CMV;
- f) Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro: A revisão da literatura realizada por Styczynski (2018) demonstra que a reativação de CMV ocorreu em 60,1% dos pacientes (885/1472) com DECH aguda e 32,1% dos pacientes (892/2780) sem DECH aguda (OR 3,19; IC95% 2,80–3,64;  $p < 0,0001$ ). DECH aguda ou crônica é fator de risco para recorrência e doença por CMV em praticamente todos os estudos, tanto para reativação precoce quanto

tardia, independentemente da terapia utilizada e do tipo de doador.

Após revisão da literatura, foram encontrados três principais fatores de risco para infecção do CMV após TCTH: 1) Status sorológico D-/R+, 2) DECH aguda ou crônica e 3) Doador de CTH Não Aparentado ou com Incompatibilidade de HLA. Os fatores de risco menores para a recorrência do CMV incluíram: status sorológico D+/R+, idade, condicionamento mieloablativo e linfopenia <900 células/ $\mu$ l ao dia +100. Dois fatores de proteção foram sugeridos: o uso do sirolimus na profilaxia da DECH e o uso de profilaxia antiviral reduziram a incidência de doença pelo CMV (DZIEDZIC; SADOWSKA-KRAWCZENKO; STYCZYNSKI, 2017).

São duas as estratégias para redução do risco de doença pelo CMV: 1) tratamento profilático e 2) terapia preemptiva. O tratamento profilático é aquele no qual todos os pacientes recebem profilaxia antiviral durante os primeiros dias após o TCTH. O tratamento profilático é estudado há mais de 25 anos com conclusões heterogêneas. Uma recente revisão sistemática e metanálise avaliou quase 4.000 pacientes que foram submetidos a TCTH e receberam ou não diversas profilaxias antivirais. Os principais achados dessa revisão foram que a profilaxia antiviral reduziu as taxas de recorrência do CMV, sendo o letermovir a droga de escolha devido a menores taxas de efeitos colaterais. Contudo, não houve redução de mortalidade em um acompanhamento médio de 180 dias (GAGELMANN et al., 2018). A terapia preemptiva é a estratégia na qual se realiza uma triagem periódica da infecção do CMV. A maioria dos centros realiza a triagem 1-2x/semana desde a pega medular até o D+100 após o TCTH, podendo estender esse período se houver DECH ou uso de imunossupressores. O método preconizado inicialmente para esse fim é a pesquisa de antigenemia para CMV, contudo a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) vem se popularizando progressivamente. A antigenemia se baseia na quantificação do número de células que expressam o antígeno fosfoproteína (*pp65*) do vírus e possui como limitante o fato de necessitar de número mínimo de leucócitos em sangue periférico e de ser examinador dependente (LUGERT et al., 2009). A qPCR apresentou-se como uma solução aos problemas da antigenemia, contudo ainda há uma importante variabilidade entre os resultados de diferentes laboratórios (PREIKSAITIS et al., 2016). Apesar dessas dificuldades, a estratégia preemptiva é a mais utilizada devido a sua menor toxicidade em comparação com a profilaxia. O emprego da terapia preemptiva diminuiu a incidência de doença pelo CMV precoce de 25-30% para menos de 5% (BOECKH et al., 2003).

O valor ótimo de antigenemia ou número de cópias ou UI/mL de CMV para iniciar a terapia preemptiva ainda não é consensual. A técnica de detecção, frequência de monitoramento e o ponto de corte para introdução da terapia preemptiva tem uma ampla variação entre os centros transplantadores. Como reportado, deve-se atentar para os valores de viremia relatados haja vista que a carga viral também varia de acordo com a amostra coletada (sangue total ou plasma) e a plataforma específica utilizada (PREIKSAITIS et al., 2016). Historicamente, os centros dos E.E.U.U. têm uma tendência a utilizar pontos de corte mais baixos enquanto que os europeus aguardam níveis de viremia mais elevados. Recentes trabalhos demonstram que o início tardio da terapia preemptiva pode impactar negativamente na resolução da viremia e até mesmo na mortalidade (CAMARGO et al., 2018; GREEN et al., 2016; TAN; WAGGONER; PINSKY, 2015).

Esse contexto se conclui em um dilema terapêutico. Optando por um ponto de corte mais baixo, incorre-se no risco de exposição desnecessária aos antivirais com potencial toxicidade medular e renal além de aumento nos custos. Recentemente, foi demonstrado que dois episódios de infecção do CMV aumenta o custo total do TCTH alogênico em 30% (ROBIN et al., 2017). Outro estudo aponta que, em comparação com grupo controle, o grupo que apresentou infecção do CMV após TCTH apresentou um incremento de USD 58.000 a USD 74.000 no custo total por paciente ao final de 6 meses de observação (JAIN et al., 2015). Por outro lado, sabe-se que o tempo de duplicação da carga viral em pacientes de alto risco (recebendo ATG ou corticoide) pode chegar a ser tão breve quanto 48 horas. Em recente trabalho de um centro americano foi demonstrada a relação da carga viral igual ou superior a 150 UI/mL com diminuição de 80% na probabilidade de clareamento espontâneo do CMV, independente de uso de ATG, estado imunológico e doença de base. Além disso, adiar o início da terapia para valores superiores a 350 UI/mL foi relacionado com alentecimento na cinética da queda viral, falha terapêutica e aumento na mortalidade não relacionada com recidiva da doença de base (CAMARGO; KOMANDURI, 2017).

### 3.2.3 Polimorfismos de nucleotídeo único e infecção do Citomegalovírus

Diante dos efeitos colaterais da terapia antiviral e do potencial impacto negativo de postergar a terapia preemptiva, faz-se fundamental entender o porquê de alguns pacientes apresentarem resolução espontânea da viremia sem impactos diretos e

indiretos enquanto outros evoluem com rápida replicação viral. É bem estabelecido que a reconstituição da imunidade específica contra o CMV é o fator mais importante para o controle da replicação viral e estabelecimento de uma proteção de longa duração. Como demonstrado previamente, a ausência de sorologia prévia do doador contra o CMV é um dos principais fatores de risco para infecção e doença pelo CMV (BOECKH et al., 2003). Essa pior evolução pode ser explicada pela ausência de células T CMV-específicas no repertório imunológico do doador. Frente à lenta recuperação imunológica celular após o TCTH, os linfócitos periféricos do doador são os primeiros a expandir. Sendo o doador *naïve* para CMV, não constará em seu repertório células T CMV-específicas, incrementando o risco de infecção e doença pelo CMV (CIAURRIZ et al., 2017). Corroborando com esses achados, investigadores chineses avaliaram prospectivamente a aplicação terapêutica de células T CMV-específicas derivadas do doador em 32 pacientes com viremias refratárias e persistentes após TCTH haploidêntico. Foram avaliados outros 32 pacientes sem reativação do CMV como grupo controle. Observou-se uma menor quantidade de células T CD8<sup>+</sup> IFN-gama (IFNG)<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> IFNG<sup>-</sup>  $\gamma$ <sup>+</sup> T específicas para CMV nos pacientes refratários ao tratamento em comparação ao grupo controle. Após a transferência com células T adotadas, seguiu-se uma expansão *in vivo* de células T CMV-específicas e resolução da viremia na maioria dos pacientes (PEI et al., 2017).

As citocinas produzidas pelas células T em geral e as células T CD8<sup>+</sup> em particular desempenham um papel fundamental no controle da replicação viral, sendo o IFNG uma das citocinas reguladoras mais importantes produzidas nesse contexto. Em pacientes transplantados (especialmente em transplante renal), demonstrou-se um efeito protetor do IFNG contra a replicação do CMV (MANUEL et al., 2013) sugerindo que essa citocina pudesse ser um indicador de melhor resposta imunológica baseada em células T CMV-específicas. Um grupo alemão concluiu que é possível identificar pacientes com alto ou intermediário risco de complicações relacionadas ao CMV através de monitoramento do IFN (QuantiFERON-CMV) e que essa ferramenta poderia ser incorporada na prática clínica como auxílio na decisão terapêuticas de iniciar ou não a terapia preemptiva. Foi proposto um ponto de corte de 8,9 UI/ml como um valor preditivo para o reestabelecimento da imunidade celular contra o CMV (KRAWCZYK et al., 2018). Os interferons (IFN) são assim denominados, pois foram descritos inicialmente como proteínas que "interferiam" na replicação viral em células mamíferas. Eles são secretados por células infectadas e têm a capacidade

de ativar a resposta imune inata, a qual promove uma maior produção de citocinas e maior atividade de células NK e CAA (KOPITAR-JERALA, 2017). Essas citocinas foram descritas na década de 60 e, até recentemente, era amplamente aceito que somente os IFN do tipo I desempenhavam um papel de relevância como mediadores e reguladores da resposta imune. No entanto, um grupo de proteínas funcionalmente semelhantes aos IFN tipo I foi descoberto em 2002 (KOTENKO, 2011). Essas proteínas foram denominadas como IFN tipo III ou IFN-lambda (IFNL) e é composta por 4 citocinas: IL-29 (IFNL-1), IL-28A (IFNL-2), IL-28B (IFNL-3) e uma quarta altamente divergente das demais (IFNL-4). Como os demais IFN, são produzidas por células estimuladas com vírus ou secundária ao estímulo de receptores presentes principalmente por hepatócitos, células epiteliais e por células do sistema imunológico (DOLGANIUC et al., 2012). As citocinas da classe IFNL compartilham padrões de expressão semelhantes aos IFN tipo I e acionam cascatas de transdução de sinal comuns e conjuntos de genes estimulados. Apesar da semelhança, os IFNA e IFNL estimulam receptores específicos distintos. Os IFNL sinalizam através de um complexo heterodimérico receptor IFNL composto por uma única cadeia IFNLR1 e a cadeia IL-10R2 que também é a segunda subunidade dos complexos receptores para IL-10, IL-22 e IL-26 (KOTENKO; DURBIN, 2017).

Há crescentes evidências sugerindo que genes de PNU envolvidos na ativação ou regulação das respostas imune inata e adaptativa podem ter impacto sobre a suscetibilidade e evolução clínica de infecções virais (NETEA; WIJMENGA; O'NEILL, 2012). Por exemplo, o genótipo C/C do PNU do gene da IL-28B rs12979860 tem sido relacionado a níveis mais elevados de IFNG no soro não estimulado de pacientes com artropatia associada ao HTLV. São constantes, também, os achados desse mesmo genótipo com maiores chances de clareamento viral espontâneo ou secundário ao tratamento em pacientes com infecção crônica pelo vírus da hepatite C (AGUADO et al., 2018). Especificamente no contexto do TCTH, foram encontrados 14 estudos que analisaram a relação de variados PNU com a infecção do CMV no cenário de TCTH alogênico através de busca de termos "*Cytomegalovirus*", "*Single Nucleotide Polymorphisms*", "*Stem Cell Transplantation*" e "*Bone Marrow Transplantation*" no banco de pesquisa PubMed. Os artigos estão dispostos na Tabela 1. Os PNU que tiveram impacto nas taxas de infecção do CMV após o TCTH podem ser divididos naqueles que codificam RRP (CARVALHO et al., 2009; LOEFFLER; STEFFENS; ARLT, 2006; MEZGER et al., 2008); que alteram a produção de IFN ou modulam a



imunidade inata (BRAVO et al., 2014; (BRAVO et al., 2014; CAI et al., 2012; EGLI et al., 2014; JASKULA et al., 2009; WU et al., 2013) e aqueles que modulam a imunidade celular (KIELSEN et al., 2018; PIAO et al., 2016; SAADI et al., 2013).

TABELA 1 – ASSOCIAÇÕES ENTRE VARIADOS POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO E INFECÇÃO DO CITOMEGALOVÍRUS APÓS TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS ALOGÊNICAS

<b>Autor</b>	<b>N</b>	<b>Impacto principal na infecção/reativação do CMV</b>	<b>Possível Explicação</b> (continua)
Loeffler, Steffens, Arlt (2006)	154	PNU da CCR5, MCP1, e IL10 modulam a reativação de CMV	Regulam a capacidade de evasão do CMV
Mezger et al. (2008)	194	PNU da DC-SIGN, TLR8 e SDC2 aumentam a taxa de infecção/reativação e doença	Possível facilitadores de entrada viral na célula
Carvalho et al. (2009)	221	Alelo T-1237C (TLR9): aumento na taxa de infecção/reativação do CMV	Diminui a detecção viral necessária para a ativação da resposta imune antiviral
Jaskula et al. (2009)	92	(IFNG 3/3): maior incidência de reativação/ infecção de CMV	Possível associação com produção inadequada de IFN
Cai et al. (2012)	80	IFN- $\gamma$ + 874 A/A: maior reativação/infecção pelo CMV	Possível associação com produção inadequada de IFN
Wu et al. (2013)	138	Genótipo AA do KIR: maior reativação/infecção pelo CMV	Maior ação de Células Natural Killer
Saadi et al. (2013)	72	Genótipos de alelos menores do CTLA4 e CD28: maior incidência de reativação/infecção pelo CMV	CTLA4 é um receptor protéico encontrado na superfície das células T e está relacionado com a depleção do sistema imune
<b>Autor</b>	<b>N</b>	<b>Impacto principal na infecção/reativação do CMV</b>	<b>Possível Explicação</b> (conclusão)
Bravo et al. (2014)	151	Genótipo TT da IL-28B rs12979860: menor duração da primeira reativação, tendência a menor infecção/reativação	Genótipo TT produz menos IFNL3 com consequente menor circulação de células T regulatórias
Xiao et al. (2014)	138	Genótipo TLR9 1635 C/T rs352140: menor incidência de infecção/reativação	Maior detecção viral
Corrales et al. (2015)	102	Doador CCR5 com genótipo A/A: episódios de CMV com maiores cargas virais	A expressão subótima de CCR5 em células T CMV-específicas resultaria em uma

			diminuição da migração, facilitando a disseminação e replicação viral
Piao et al. (2016)	171	Genótipo CC FOXP3 rs3761548 de doadores: maior incidência de CMV	Ativação de células Treg e depleção de células T
Wu et al. (2016)	7	TCR Beta Variable 11 pode ter relação com reativação de CMV	Sem acesso ao artigo
Corrales et al. (2017)	142	Doador com genótipo IL-28B T/T : ativação de células CMV-específicas. Menor necessidade de terapia preemptiva	Organiza uma robusta resposta de célula T CMV específica
Zhao et al. (2017)	180	Pareamento de doador e receptor de genótipo do KIR: menor taxa de infecção e doença pelo CMV	NK mais eficaz e maior produção de IFNG
Kielsen et al. (2018)	460	Genótipo TT IL-7Ra rs6897932 do doador maior infecção/reactivação pelo CMV	Alteração nos níveis de IL-7R solúvel e ligado a membranas o que levaria a uma sinalização mais forte do IL-7

FONTE: O autor (2018).

Nota: CCR5, MCP1, IL-10, DC-SIGN, TLR8, SDC2, TLR9, KIR, CTLA4, CD28, FOXP3, TCR, Treg.

A relação entre PNU da IL-28B e infecção do CMV foi avaliado em poucos estudos com discrepantes conclusões (TABELA 2). A maioria desses trabalhos encontrou que a presença do genótipo de alelo menor do gene da IL-28B rs1297960 foi associado à redução da replicação do CMV após o transplante e menor necessidade de início de terapia preemptiva (BRAVO et al., 2014; CORRALES et al., 2017; EGLI et al., 2014b; FERNÁNDEZ-RUIZ et al., 2015). Os resultados de Manuel et al. (2015), em contrapartida, sugerem que o genótipo de alelo maior do gene IL-28B rs1297960 é o que confere proteção após o transplante renal. Essa mesma tendência a proteção pelo genótipo de alelo maior foi encontrada em recente trabalho que analisou pacientes submetidos a TCTH autólogo (ANNIBALI et al., 2018) e em pacientes com HIV/Aids com retinite por CMV (BIBERT et al., 2014). Nos casos de TCTH alogênico, o impacto do genótipo do doador parece ser mais importante do que o do próprio paciente, uma vez que o IFNL é principalmente produzido em resposta a estímulos definidos por macrófagos e por células dendríticas, que são de origem do doador (KOTENKO, 2011). O gene da IL-28 codifica a interleucina-28 também conhecida como IFNL.

TABELA 2 – ASSOCIAÇÕES ENTRE O POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO DA IL-28B E INFECÇÃO DO CITOMEGALOVÍRUS

<b>Autor</b>	<b>População Estudada (n)</b>	<b>Principal Achado</b>	<b>Possível Explicação</b>
Manuel et al. (2014)	840 - TOS	Genótipo de alelo menor TT/-G rs368234815: fator de risco para a infecção por CM	Insuficiente expressão do IFNL3 que tem ação antiviral
Egli et al. (2014)	38 - TOS	Genótipo de alelos menores (T) rs12979860: melhor controle da replicação viral do CMV após a infecção inicial	Regulação da expressão da ISG e na iniciação de células T durante a infecção aguda
Bravo et al. (2014)	151 - TCTH Alogênico	Genótipo de alelo menor T/T do doador rs12979860: menores duração e incidência de infecção de CMV	Menor produção de IFNL3 e menor circulação de células T regulatórias
Bibert et al. (2014)	1134 - HIV	Genótipo de alelo menor TT/-G rs368234815: fator de risco para a retinite por CMV	Insuficiente expressão do IFNL3 que tem ação antiviral
Fernández-Ruiz et al. (2015)	315 - Transplante Renal	Genótipo de alelo menor T/T do doador rs12979860: menores duração e incidência de infecção de CM	Menor produção de IFNL3 e menor circulação de células T regulatórias
Corrales et al. (2017)	142 - TCTH Alogênico	Genótipo de alelo menor T/T do doador rs12979860: maior expansão de células CD8+CMV-específicas. Menor necessidade de terapia preemptiva	Capacidade de mediar uma robusta resposta de célula T CMV-específica
Aguado et al. (2018)	184 - TOS	Genótipo de alelo maior C/C IL28B foi associado a uma tendência a níveis mais elevados de IFNG	Ausência de impacto na imunidade celular
<b>Autor</b>	<b>População Estudada (n)</b>	<b>Principal Achado</b>	<b>Possível Explicação</b>
Annibali et al. (2018)	99 – TCTH Autólogo	Genótipo de alelo menor rs12979860 T/T: tendência a maior taxa de reativação	Insuficiente expressão do IFNL3 que tem ação antiviral

FONTE: O autor (2018).

Nota: TOS=Transplante de Órgão Sólido, IFNL=Interferon Lambda, ISG=Interferon-Stimulated Gene

A identificação de um genótipo protetor ou facilitador da infecção/reativação do CVM após TCTH alogênico permitiria um uso racional tanto de exames laboratoriais

utilizados no monitoramento quanto dos antivirais. O que resultaria em diminuição de custos e toxicidade ao paciente.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 CASUÍSTICA

#### 4.1.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo analítico, observacional, longitudinal, com coleta prospectiva de dados, não intervencionista.

#### 4.1.2 População do estudo

Foram avaliados os pacientes submetidos a TCTH no CHC-UFPR. Como protocolo institucional, todos os pacientes submetidos a TCTH alogênico são monitorados semanalmente para recorrência da infecção por CMV desde a pega medular até o D+100 após transplante ou por tempo indefinido enquanto houver sinais de DECH ou uso de imunossupressores. Este monitoramento é feito por meio da realização dos testes de antigenemia *pp65* e/ou PCR em tempo real quantitativo, sendo a metodologia definida a critério médico e disponibilidade do insumo. Esta pesquisa foi realizada com uma alíquota de sangue total retirada da amostra encaminhada para o monitoramento do CMV. Portanto, os pacientes não foram submetidos a novas coletas.

#### 4.1.3 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos na pesquisa pacientes de todas as faixas etárias submetidos a TCTH e que aceitaram participar da pesquisa por meio de assinatura no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Foram excluídos pacientes com TCTH prévio. Para a coleta de dados foi realizada revisão dos prontuários dos pacientes atendidos no serviço de Transplante de Medula Óssea (TMO) (CHC-UFPR). As variantes retiradas dessa seleção foram: número de identificação; sexo; idade; doença base; status da doença, tipo de condicionamento e profilaxia para DECH, sorologia para CMV (doador e receptor); resultado da antigenemia ou qPCR para CMV até o D+100; presença de DECH agudo e crônico, uso de corticoide, infecções fúngicas, bacterianas e virais além do tratamento de CMV, evolução clínica e desfecho no

D+100.

#### 4.1.4 Tratamento suportivo

Todos os pacientes possuíam cateteres venosos centrais e ficaram em quarto de leito único com filtro *high-efficiency particulate absorber* (HEPA). O protocolo institucional prevê a utilização de aciclovir na dose de 250mg/m<sup>2</sup> de 8/8h para profilaxia antiviral contra vírus, além de fluconazol ou voriconazol para profilaxia antifúngica e trimetoprim-sulfametoxazol para profilaxia contra *Pneumocystis jirovecii*. Para profilaxia antimicrobiana é utilizado o levofloxacino durante o período de neutropenia. Antibioticoterapia empírica de amplo espectro com Cefepima é iniciada no primeiro sinal de febre durante o período pré-pegas medular.

O protocolo vigente contra a doença pelo CMV é a terapia preemptiva. Durante o período de monitoramento até o D+100, a detecção de 1 célula na pesquisa de antigenemia ou amplificação superior a 500 UI/ml na PCR já é suficiente para deflagrar o início da terapia preemptiva. Esta terapia consiste em uso de ganciclovir 5mg/kg de 12/12h até a evidência de duas pesquisas consecutivas negativas.

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Local onde foi realizada da pesquisa

A pesquisa foi realizada no serviço de TMO do CHC da UFPR. Este serviço é reconhecido nacional e internacionalmente como centro de excelência nos transplantes de medula óssea. Com 39 anos de atividade ininterrupta, realizou quase 2 mil transplantes desde 1979. Os testes adicionais foram realizados no laboratório de virologia do CHC da UFPR.

### 4.2.2 Grupos vulneráveis – identificar se a pesquisa envolve grupos vulneráveis e justificar a necessidade da participação na pesquisa

A pesquisa envolve participantes de todas as faixas etárias, entretanto, só participarão da pesquisa após concordância e assinatura o TCLE ou do termo de assentimento, conforme recomendado pelo Comitê de Ética e em Pesquisa (CEP) da

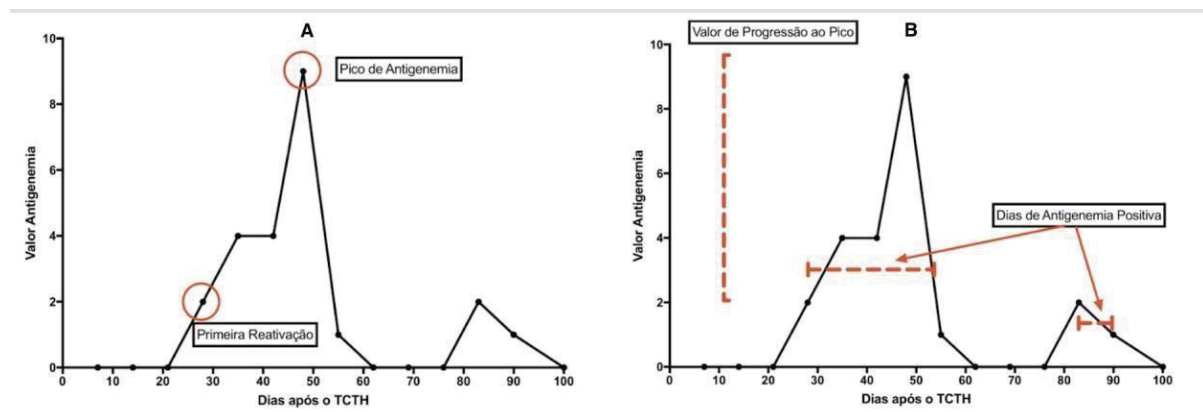
instituição.

### 4.3 DEFINIÇÕES

#### 4.3.1 Avaliação da dinâmica da infecção do Citomegalovírus

Com a finalidade de entender a dinâmica da infecção do CMV após os 100 primeiros dias após o TCTH, foram avaliadas as variáveis: primeira reativação, pico de antigenemia, valor de progressão ao pico, dias de antigenemia positiva e número de reativações descritas detalhadamente no Gráfico 1. Além dessas variáveis, foram avaliados o número de tratamentos realizados e a necessidade de terapia preemptiva em contexto de antigenemia positiva.

GRÁFICO 1 – EXEMPLIFICAÇÃO DE MÉTRICAS PARA A AVALIAÇÃO DA DINÂMICA DA INFECÇÃO DO CITOMEGALOVÍRUS APÓS O TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS



FONTE: O autor (2018).

Nota: A - Demonstração do Pico de Antigenemia e da data da Primeira Reativação. B - Demonstração do valor de progressão ao pico, dias de antigenemia e número de reativações.

#### 4.3.2 Definições de infecção e doença pelo Citomegalovírus

As definições utilizadas para infecção e doença pelo CMV foram embasadas em recente publicação normativa (LJUNGMAN et al., 2017) que estão resumidas nos Quadros 1 e 2.

QUADRO 1 – DEFINIÇÕES DE INFECÇÃO DO CITOMEGALOVÍRUS

<b>Categoria</b>	<b>Definição</b>
Infecção por CMV	Isolamento ou detecção de proteínas virais (antígeno) ou ácido nucléico em qualquer fluido corporal ou amostra de tecido
Infecção Primária pelo CMV	Definido como a primeira detecção de infecção pelo CMV em um indivíduo que não tinha evidência de exposição ao CMV antes do TCTH
Recorrência da Infecção pelo CMV	Nova infecção pelo CMV em um paciente com evidência prévia de infecção pelo CMV <b>E</b> que não teve o vírus detectado nas últimas 4 semanas de vigilância ativa. Infecção Recorrente pode resultar da reativação do vírus latente (endógeno) ou reinfeção por outro sorotipo (exógeno)
Replicação do CMV	Usado para indicar multiplicação viral. Utilizado de modo intercambiável com Infecção por CMV

FONTE: Adaptado de Ljungman et al. (2017).

QUADRO 2 – DEFINIÇÕES DE DOENÇA PELO CITOMEGALOVÍRUS

	<b>Provável</b>	<b>Comprovada</b>
Pneumonia por CMV	Detecção de CMV por isolamento viral, cultura rápida de lavado broncoalveolar (LBA) ou a quantificação de DNA de CMV em LBA (> 200–500 UI/mL) combinado com sintomas clínicos e/ou sinais de pneumonia.	Sintomas clínicos e/ou sinais de pneumonia combinados com CMV documentado em tecido pulmonar
Doença gastrointestinal de CMV	Sintomas gastrointestinais e CMV documentado em tecido mas se lesões macroscópicas	Sintomas gastrointestinais com lesões macroscópicas da mucosa e CMV documentado em tecido
Hepatite pelo CMV	Uma categoria de doença provável não deve ser usada	Testes de função hepática anormais, além de CMV documentado em tecido e ausência de outra causa documentada de hepatite.
Retinite por CMV	Uma categoria de doença provável não deve ser usada.	Sinais oftalmológicos típicos julgados por um oftalmologista experiente
Encefalite por CMV e Ventriculite	Sintomas do sistema nervoso central (SNC) mais a detecção de CMV no líquido cefalorraquidiano	Sintomas SNC mais a detecção de CMV no tecido do SNC

Fonte: Adaptado de Ljungman et al. (2017).

#### 4.3.3 Outras definições

- a) DECH: foram utilizadas as definições de DECH aguda ou crônica de acordo com o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas do Ministério da Saúde



(BRASIL, 2016);

- b) Pega Neutrófila: definida como contagem de neutrófilos superior a 500 cél/mm<sup>3</sup> por 3 dias consecutivos. O primeiro dia foi considerado como o dia da pega;
- c) Infecção fúngica invasiva de acordo com critérios previamente definidos (DE PAUW et al., 2008);
- d) Infecção bacteriana: infecções com repercussões sistêmicas e identificação de patógeno em cultura de sangue, tecido, urina, líquido cefalorraquidiano ou outros tecidos estéreis;
- e) Infecção viral: presença de sintomas locais ou sistêmicos mais identificação de vírus por amplificação de material genético (PCR);
- f) Uso de corticoide: definido como dose igual ou maior do que 1mg/kg/dia de prednisona ou equivalente;
- g) Compatibilidade de HLA: A compatibilidade do HLA foi avaliada com base na tipificação dos antígenos do complexo maior de histocompatibilidade pertencentes às classes I e II, dos *loci* A, B, C, DR e DQ. Os antígenos da classe I – A, B e C, foram avaliados através do Método Sorológico, que é um método de linfotoxicidade dependente de complemento e que requer a incubação dos linfócitos de um indivíduo com um conjunto de anticorpos anti- HLA. O antígeno de classe II, DR e DQ, foi avaliado através do Método Molecular e por PCR.

#### 4.4 MÉTODOS LABORATORIAIS

##### 4.4.1 Obtenção do concentrado de leucócitos (*Buffy Coat*) e coleta do plasma

A técnica de obtenção do concentrado de leucócitos consiste em separá-los do sangue total para que a extração de DNA seja mais efetiva. A técnica utilizada foi a separação por gradiente de densidade utilizando o reagente *Ficoll-Paque PLUS* (GE Healthcare Life Sciences) conforme instruções do fabricante. Em um tubo cônico de 15 mL foram adicionados 3 mL do reagente *Ficoll-Paque PLUS* e lentamente igual ou maior volume de sangue total de cada amostra encaminhada para monitoramento do HCMV. Esse material foi centrifugado a 540 x g por 30 minutos, a porção contendo o concentrado de leucócitos foi recuperada e transferida para outro tubo cônico.

Foram adicionados 6 mL de solução salina fosfatada tamponada (PBS) com homogeneização por aspiração delicada. O material foi centrifugado a 380 x g por 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado, o sedimento contendo as células foi novamente recuperado e ressuscitado com 6 mL de PBS, procedendo-se nova centrifugação a 380 x g por 10 minutos. O concentrado de células obtido foi ressuscitado em 1 mL de PBS e aliqotado para contagem do número de leucócitos em contador hematológico automatizado e, quando necessário, o número de células foi corrigido para uma obtenção de concentrado de 10<sup>6</sup> cels/mL. Após a contagem a amostra foi centrifugada a 380 x g por 10 minutos, 900 µL de sobrenadante foi aspirado e desprezado e o concentrado de células foi ressuscitado em 900 µL de Soro Fetal Bovino (SFB) e armazenada a -80°C para posterior extração do DNA genômico.

Foi realizada a separação de uma alíquota de 500 µL de amostra de plasma de cada paciente, bem como em todos os casos de reativações do CMV e armazenadas à -80°C para análises posteriores.

#### 4.4.2 Extração do DNA genômico

A extração do DNA genômico foi realizada a partir de 200µL do concentrado de leucócitos de cada amostra, com a utilização do kit comercial *PureLink Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen, Carlsbad, CA) seguindo as especificações do fabricante. Primeiramente foram adicionados à amostra os reagentes proteinase K, RNase A e outro reagente de lise/ligação. A amostra lisada foi adicionada na coluna de sílica, centrifugada e sequencialmente lavada com a utilização de dois tampões de lavagem. O DNA purificado foi recuperado após centrifugação, pela adição de 100 µL de tampão de eluição. Estas amostras extraídas foram quantificadas utilizando espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (NanoDrop®).e armazenadas à -20°C até a realização dos testes de biologia molecular.

#### 4.4.3 Genotipagem dos PNU IL-28B rs12979860 e rs8099917

Para a genotipagem dos PNU da IL-28B rs12979860 e rs8099917 foi utilizado o ensaio validado *TaqMan® SNP* (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA) para discriminação alélica, seguindo as especificações do fabricante e utilizando o

protocolo padrão para as reações. Os ensaios TaqMan® *genotyping* para os respectivos PNU em estudo incluem dois iniciadores (*primers forward* e *reverse*) para a amplificação das regiões de interesse e duas sondas para detecção de polimorfismos específicos no DNA genômico. As sondas MGB (*minor groove binder*) possuem um corante repórter fluorescente na extremidade 5' (VIC™ para detecção do alelo1; ou FAM™ para detecção do alelo 2), e um *quencher* não fluorescente (NFQ) na terminação 3' da sonda.

A avaliação de cada PNU da IL-28B foi realizada para cada amostra com uma reação contendo 0,5 µL de TaqMan® *SNP Genotyping Assay* (40X) (mix de sondas alelo-específicas e iniciadores que flanqueiam a região contendo o PNU avaliado); 2,0 µL de DNA extraído (20 ng de DNA); 4,0 µL de TaqMan® master mix e 3,5 µL de água ultrapura em volume final de 10 µL por amostra. Em seguida, as amostras foram distribuídas em uma placa de bioplástico selada que foi inserida no equipamento ViiA™ 7 *Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) com ciclagem no início da reação de 60°C por 30 segundos, 95°C por 10 minutos, seguido por 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos. As sequências amplificadas estão discriminadas no quadro 3.

QUADRO 3 – SEQUÊNCIAS AMPLIFICADAS E DISCRIMINAÇÃO ALÉLICA PARA OS POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO RS12979860 E RS8099917

PNU	Contexto da Sequência Amplificada	PNU alelo	VIC™ -alelo	FAM™ -alelo
rs12979860	GCG[C/T]GAACCAGGGTTGAATTGCACTCCGC	C/T	C	T
	CAAT[G/T]TCACCCAAATTGGAACCATGCTGTA	G/T	G	T

FONTE: [www.thermofisher.com/order/genome-database/details/genotyping](http://www.thermofisher.com/order/genome-database/details/genotyping)

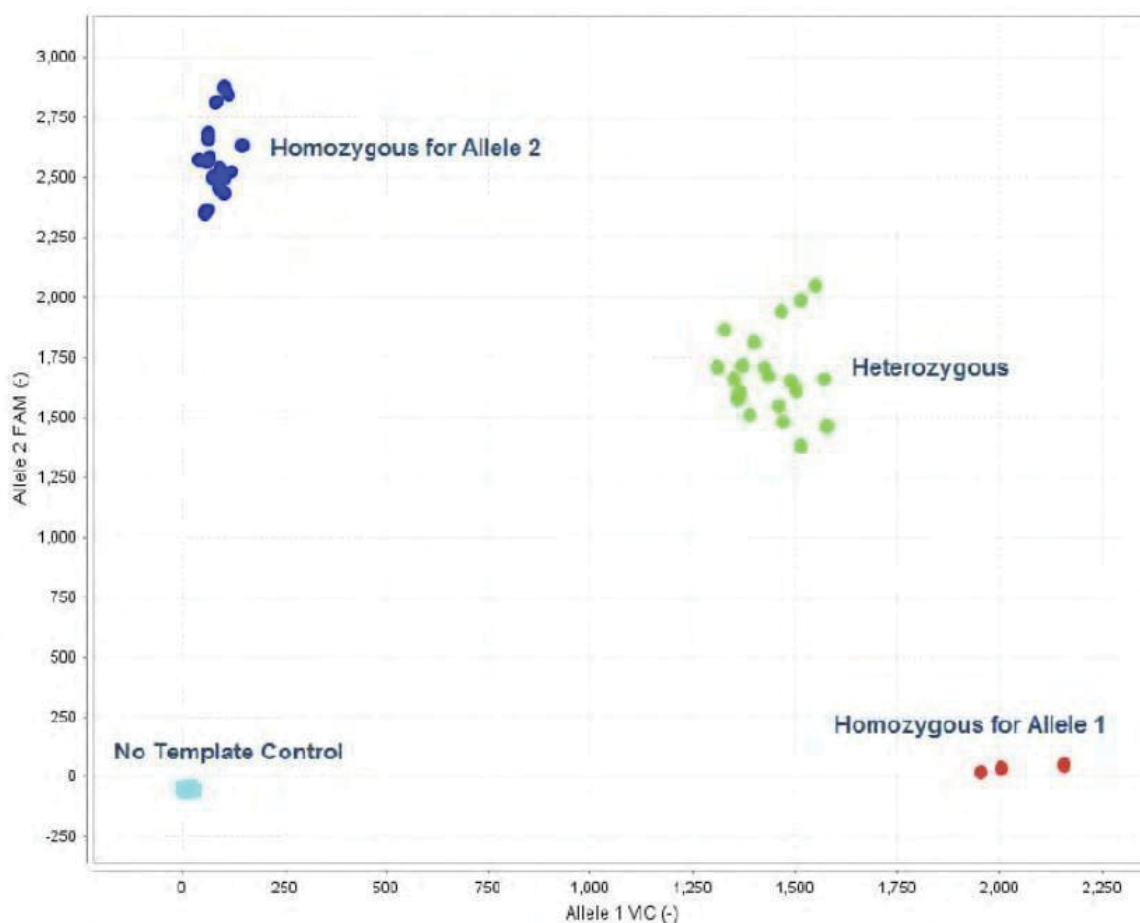
As amostras foram individualmente analisadas de acordo com as características de amplificação apresentadas no gráfico de discriminação alélica da ferramenta ViiA™ 7 Software v1.2.4 (Applied Biosystems) e pelos resultados no software TaqMan Genotyper Software, Version 1.4.0, utilizando a análise por autocalling (algoritmos internos da plataforma), conforme indicação do fabricante. Os critérios de avaliação dos genótipos são informados no Quadro 4 e Figura 2.

QUADRO 4 – CRITÉRIOS PARA DETERMINAÇÃO DOS GENÓTIPOS

Amostra testada	Gráfico de Discriminação Alélica
Alelo 1 (homozigoto), marcado com VIC™	Ponto no canto inferior direito do gráfico
Alelo 2 (homozigoto), marcado com FAM™	Ponto no canto superior esquerdo do gráfico
Alelos 1 e 2 (heterozigoto)	Aproximadamente entre os clusters de alelos 1 e 2
Indeterminado	Ponto em outra região que não descrita acima

FONTE: TaqMan® SNP Genotyping Assays – Manual do Usuário USER

FIGURA 2 – IDENTIFICAÇÃO GRÁFICA DOS GENÓTIPOS



FONTE: TaqMan® SNP Genotyping Assays - Manual do Usuário

#### 4.4.4 Reação em cadeia da polimerase para detecção de Citomegalovírus

A qPCR foi realizada utilizando as recomendações do fabricante XGEN MASTER CMV em combinação com o kit de extração QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) e Mini Spin Plus (BIOPUR) a depender da disponibilidade.

#### 4.4.5 Pesquisa de antigenemia pp65 para detecção de Citomegalovírus

A pesquisa de antigenemia é um método imunocitoquímico que permite a identificação da fosfoproteína estrutural pp65 em leucócitos do sangue periférico, utilizando anticorpos monoclonais marcados com peroxidase. O núcleo dos leucócitos, quando positivo, cora de vermelho, podendo ser observado ao microscópio óptico. A técnica utilizada seguiu as recomendações do fabricante (CMV Brite™ Turbo Kit). Em resumo, realiza-se a lise direta do eritrócito do sangue periférico. Após a lise, os leucócitos são citocentrifugado em um slide, fixo e permeabilizado para permitir subsequente detecção do antígeno pp65. A presença de pp65 é detectada pelo C10 / C11 coquetel de anticorpo e visualizado por meio de um marcador secundário específico marcado com FIT anticorpo. Os leucócitos positivos para o antígeno de CMV exibem um amarelo-verde homogêneo coloração nuclear *polylobate* quando observada usando um microscópio de fluorescência. O número de células positivas para o antígeno de CMV é contado por coloração em duplicado (HO et al., 1998).

#### 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis foram analisadas por meio de estatística descritiva e analítica. Na análise das variáveis quantitativas foram obtidas as frequências absolutas e relativas, além de calcular os valores de mediana com seus intervalos interquartis (IIQ) e médias com desvios-padrão. Os dados foram compilados utilizando-se o software JMP versão 5.2.1 e analisados por meio dos softwares GraphPad Prism versão 5.03 e IBM SPSS Statistics versão 20.0. Teste de qui-quadrado ou teste de Fisher foram utilizados para analisar as diferenças entre os grupos, enquanto o teste de Mann-Whitney foi empregado para as variáveis contínuas, quando apropriado. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliado através de qui-quadrado. Para comparação de duas ou mais classificações de uma variável, em relação a variáveis quantitativas, foi considerado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Para avaliação da associação entre variáveis quantitativas foi estimado o coeficiente de correlação de Spearman. A avaliação da condição de normalidade das variáveis foi realizada considerando-se o teste de Jarque-Bera. Foi adotado intervalo de confiança de 95% e nível de significância para os valores de  $p < 0,05$ .

A análise de curva de infecção do CMV foi realizada com a curva de Kaplan-

Meier. Para cada uma das variáveis demográficas, clínicas e de polimorfismos, testou-se a hipótese nula de que as curvas de tempo até a reativação são iguais para todas as classificações da variável versus a hipótese alternativa de curvas diferentes. Para esta análise os casos que foram acompanhados até 100 dias e sem ter tido reativação foram considerados “censuras” e o tempo de seguimento foi de 100 dias.

#### 4.6 FINANCIAMENTO

O presente estudo constitui uma extensão do projeto intitulado “Avaliação de polimorfismos de nucleotídeo único dos genes da interleucina IL28B e da inosina-trifosfatase (ITPA) e correlação com resposta ao tratamento da hepatite C em pacientes coinfectados HIV/HCV”, CAAE: 34716414.9.0000.0096, no qual foi selecionado na Chamada de Projetos Universal– MCTI/CNPq N° 14/2014 – Faixa A.

## 5 RESULTADOS

Foram avaliados 83 pacientes submetidos a TCTH desde 24/6/2016 a 10/7/2018, sendo que 13 pacientes foram excluídos da análise (6 pela não tipagem do polimorfismo pela técnica de PCR, 2 por óbito antes dos 30 dias, 3 por falha primária de enxertia e 2 por já ter realizado TCTH alogênico previamente). Durante o período descrito, foram realizados 176 transplantes alogênicos. Os dados demográficos e clínicos podem ser observados na Tabela 3.

TABELA 3 – PERFIL DEMOGRÁFICO E CLÍNICO DOS PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS ALOGÊNICO (n=70)

	Pacientes	Porcentagem (continua)
Número total	70	100%
Idade, anos (mediana, max/min)	14	(0 - 67)
Adultos (mediana, max/min)	32	31 (23,3 - 43,8)
Pediatria (mediana, max/min)	38	7(3,5 - 10)
Sexo		
Masculino	38	54,3%
Doença de Base		
Leucemia Aguda	25	35,7%
Anemia Aplásica	23	32,9%
Imunodeficiências	15	21,4%
Linfoma	3	4,3%
Síndrome Mielodisplásica	3	4,3%
Disceratose Congênita	1	1,4%
Atividade da Doença Neoplásica	28	
Atividade	3/28	10,7%
DRM+	5/28	17,9%
DRM-	20/28	71,4%
Fonte de Células-Tronco		
Medula	60	85,7%
Sangue Periférico	9	12,9%
Cordão Umbilical	1	1,4%
Tipo de Doador		
Aparentado	16	22,9%
Não Aparentado	34	48,6%
Haploidêntico	20	28,5%
Compatibilidade de HLA		

TABELA 3 – PERFIL DEMOGRÁFICO E CLÍNICO DOS PACIENTES SUBMETIDOS A TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS ALOGÊNICO (n=70)

	Pacientes	Porcentagem (conclusão)
Compatível	22	31,4%
Não Compatível	28	40%
Haploidêntico	20	28,6%
Tipo de Condicionamento		
Mieloablativo	39	55,7%
RIC	30	42,9%
Não-mieloablativo	1	1,4%
Imunoprofilaxia		
ciclosporina + metrotexato	48	68,6%
ciclosporina + corticoide	1	1,4%
ciclosporina + sirolimus	1	1,4%
micofenolato + ciclosporina + ciclofosfamida pós	20	28,6%
Uso de Timoglobulina		
Sim	27	38,57%
CMV Sorostatus		
D+/R+	47	67,1%
D+/R-	5	7,2%
D-/R+	15	21,4%
D-/R-	3	4,3%

FONTE: O autor (2018).

Nota: Perfil demográfico e clínico dos pacientes submetidos a TCH. DRM+=Doença Residual Mínima Positiva, DRM-= Doença Residual Mínima Negativa, RIC= Condicionamento de Intensidade Reduzida, D+/R+= doador positivo/ receptor positivo, D+/R-= doador positivo, receptor negativo, D-/R+= doador negativo/ receptor positivo, D-/R-= doador negativo/ receptor negativo.

As doenças de base mais comuns foram as Leucemias Agudas (35,7%) com distribuição de 14 casos de Leucemia Mieloide Aguda e 11 casos de Leucemia Linfoblástica Aguda, seguido por Anemia Aplásica (30,3%), Imunodeficiências (21,4%), Síndrome Mielodisplásica (4,3%), Linfoma (4,3%) e um caso de Disceratose Congênita. A maioria dos pacientes recebeu um condicionamento mieloablativo (55,7%), sendo que 27 (38,6%) do total recebeu timoglobulina durante o regime de condicionamento. O doador NAP foi o mais comum, com 48,6% da amostra estudada, seguido pelo Haploidêntico (28,6%), totalizando 54 (77,1%) de TCTH com doadores alternativos.

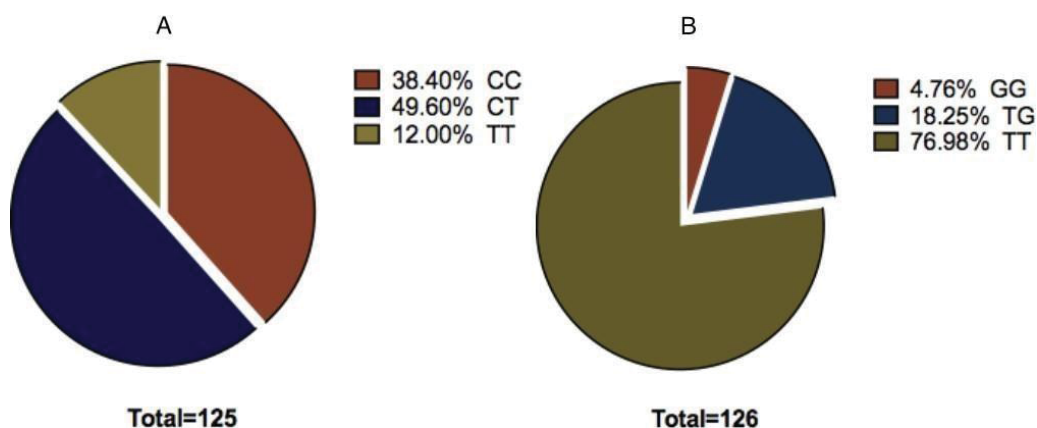
Quanto à distribuição do estado sorológico prévio do CMV, 47/70 (67,1%) dos pacientes possuíam perfil D+/R+ e 15 (21,4%) tinham o perfil D-/R+. Logo, 52/79



(74,3%) dos doadores possuíam sorologia prévia reagente contra o CMV enquanto que quase 90% (62/70) dos receptores eram sororreagentes para o CMV. Somente 3 pares de doadores e receptores não possuíam evidência sorológica de contato prévio com o CMV.

Quanto aos PNU, foram avaliados um total de 125 amostras para o gene da IL-28B rs12972860. Destes, metade (49,6%) tinham alelos em heterozigose C/T, seguido por 38,4% (48/125) que eram homozigotos em C/C e 12% (15/125) em T/T. O PNU do gene IL-28B rs8099917 foi avaliado em 126 amostras. A apresentação mais comum foi a de homozigose em T/T (77%), seguido por heterozigose G/T (18,3%). O perfil G/G foi encontrado em menos de 5% da amostra avaliada (GRÁFICO 2). A análise das frequências genotípicas e dos alelos dos polimorfismos investigados demonstraram que ambos grupos respeitavam o equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p < 0,05$ ).

GRÁFICO 2 – DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DO POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO DA IL-28B



FONTE: O autor (2018).

Nota: A - PNU da IL-28B rs12972860 B- PNU da IL-28B rs8099917

A distribuição dos PNU do gene da IL-28B entre os receptores e doadores pode ser observada na Gráfico 2. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o polimorfismo coletado antes da infusão das células tronco (Pré) e o coletado após a pega medular (Pós), como pode ser avaliado na Tabela 4 e no Gráfico 3 a seguir.

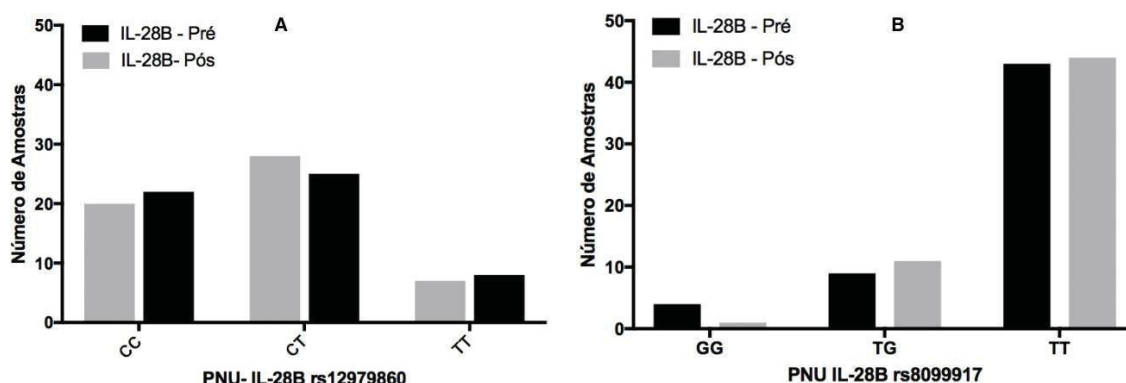
TABELA 4 – DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS DOS POLIMORFISMOS DO NUCLEOTÍDEO ÚNICO DA IL-28B PRÉ E PÓS PEGA MEDULAR

	Pacientes	Porcentagem
Polimorfismo do IL-28B rs12979860 (D - Pós)	70	
C/T	37	52,9%
C/C	26	37,1%
T/T	7	10%
Polimorfismo do IL-28B rs12979860 (R - Pré)	55	
C/T	25	45,5%
C/C	22	40%
T/T	9	16,4%
Polimorfismo do IL-28B rs 8099917 (D - Pós)	70	
G/T	14	20%
G/G	2	2,9%
T/T	54	77,1%
Polimorfismo do IL-28B rs 8099917(R - Pré)	56	
G/T	9	16,1%
G/G	4	7,1%
T/T	43	76,8%

FONTE: O autor (2018).

Nota: R=Receptor, Pré=Pré Pega Medular, D=Doador, Pós=Pós Pega Medular

GRÁFICO 3 – DISTRIBUIÇÃO DO POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO DA IL-28B RS12979860 E RS8099917 DE AMOSTRAS COLETADAS PREVIAMENTE À INFUSÃO DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS (PRÉ) E APÓS A PEGA MEDULAR (PÓS)



FONTE: O autor (2018).

Nota: A - PNU da IL-28B rs12979860 (n=125) B- PNU da IL-28B rs8099917 (n=126)

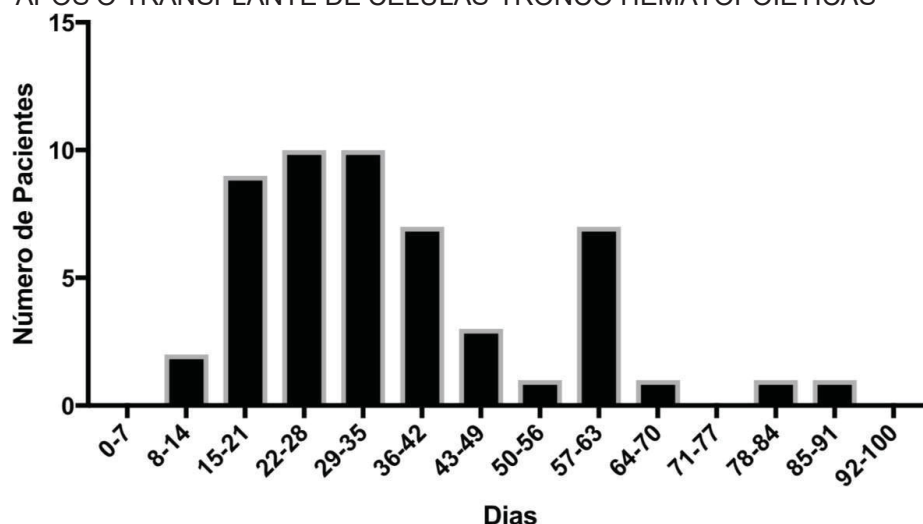
Em análise univariada, a distribuição do PNU não obteve diferença significativa entre os sexos, categoria de doenças, compatibilidade de HLA e tipo de condicionamento ( $p > 0,05$ ).

Foram registrados 685 exames de antígenoemia *pp65* com a finalidade de avaliar a infecção do CMV durante os 100 primeiros dias após o TCTH da amostra

estudada. Foi encontrada uma média de 10 exames por paciente.

A reativação de CMV em até 100 dias ocorreu em 56/70 (80%) pacientes. A mediana de dias entre o TCTH e a infecção foi de 36,5 dias (Intervalo de Interquartis: 27-49), sendo que a primeira infecção mais precoce foi detectada no décimo segundo dia após o TCTH em um paciente com Síndrome de Wiskott-Aldrich enquanto que a primeira infecção que ocorreu mais tardiamente datou no nonagésimo primeiro dia após um TMO NAP por Anemia Aplástica Severa. O valor médio da primeira infecção foi de 9,48 células reagentes/ 200.000 leucócitos (DP=38,62) e a mediana de 2 células reagentes/ 200.000 leucócitos (Intervalo de Interquartis=1-4). No Gráfico 4, podemos avaliar a distribuição temporal da primeira infecção do CMV após o TCTH. Nenhum paciente apresentou doença pelo CMV.

GRÁFICO 4 – DISTRIBUIÇÃO TEMPORAL DA PRIMEIRA INFECÇÃO DO CITOMEGALOVÍRUS APÓS O TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS



FONTE: O autor (2018).

Nota: Pesquisa de antigenemia com detecção de células reagentes/200.000 leucócitos.

Apesar de não serem classificados como doença, faz-se necessário ressaltar que dois pacientes apresentaram má função do enxerto após a infecção do CMV e introdução de terapia preemptiva com necessidade de um segundo TCTH alogênico. Ambos pacientes eram pediátricos com reativação precoce do CMV e compartilhavam o mesmo genótipo do PNU rs12979860 e o sorostatus de pior prognóstico. Segue uma breve descrição dos casos no Quadro 5.

QUADRO 5 – DESCRIÇÃO DOS CASOS DE INFECÇÃO DO CITOMEGALOVÍRUS E MÁ FUNÇÃO DO ENXERTO

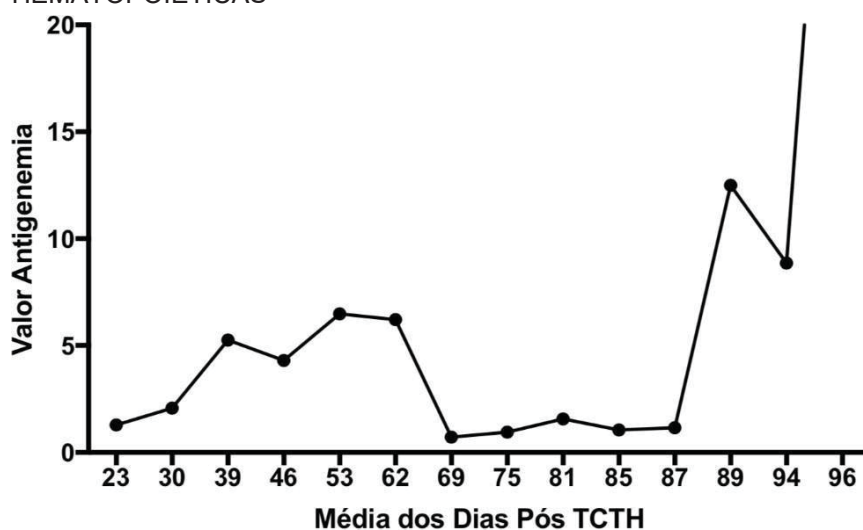
Variáveis	Paciente 1	Paciente 2
Sexo	Feminino	Masculino
Idade	13	8
Doença de Base	Disceratose Congênita	AAS
Data da Primeira Infecção (dias após TCTH)	19	24
Sorostatus do CMV	D-/R+	D-/R+
Genótipo da IL-28B rs12979860	C/T	C/T
Genótipo da IL-28B rs8099917	T/G	T/T

FONTE: O autor (2018).

Nota: AAS= Anemia Aplástica Severa.

A curva de antigenemia nos primeiros 100 dias após o TCTH foi avaliada através da mensuração da média das antigenemia distribuídas pela média do dia em que foi realizado o exame. Ou seja, os dias nos quais houve a pesquisa de antigenemia foram sequenciados de 1 a 15 para cada paciente em ordem cronológica em relação ao dia do TCTH (D1, D2, D3...). Seguiu-se à realização do valor médio do dia após o TCTH a cada momento observado. O valor encontrado serviu como eixo X e o valor médio de antigenemia foi concatenado a cada observação. O Gráfico 5 demonstra a curva de antigenemia com base nessa avaliação.

GRÁFICO 5 – DISTRIBUIÇÃO DO VALOR MÉDIO DO RESULTADO DA PESQUISA DE ANTIGENEMIA ATRAVÉS DOS DIAS APÓS O TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS



FONTE: O autor (2018).

Nota: Pesquisa de antigenemia com detecção de células reagentes/200.000 leucócitos.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre o tipo de doador ou de

receptor, doença, o uso de corticoide, o uso de timoglobulina (ATG) e ambos polimorfismos da IL-28B estudados para a infecção do CMV aos 100 dias de observação como pode ser visualizado na Tabela 5. Não foram realizadas análises estatísticas nas variáveis que continham subgrupos menores do que 5 elementos.

TABELA 5 – DISTRIBUIÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES QUE APRESENTARAM OU NÃO INFECÇÃO DO CMV ATÉ O D+100 APÓS O TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS

	Não (n=14)	Sim (n=56)	p (continua)
Idade (mediana - IQR)	11,5 (6,3-29,3)	14 (7-30,3)	0,760
Sexo			0,757
Feminino	6 (18,8%)	26 (81,2%)	
Masculino	8 (21%)	30 (79%)	
Doença de Base			0,912
Leucemia Aguda	4 (16%)	21(84%)	
Anemia Aplásica	4 (17,3%)	19 (82,7%)	
ID	3 (20%)	12 (80%)	
Linfoma	1	2	
SMD	1	2	
DC	1	0	
Atividade da Doença Neoplásica	28		---
Atividade	0	3	
DRM+	0	5	
DRM-	4 (20%)	16 (80%)	
Fonte de Células-Tronco			---
Medula	11 (18,3%)	49 (81,7%)	
Sangue Periférico	2	7	
Cordão Umbilical	1	0	
Tipo de Doador			0,15**
Aparentado	5 (31,3%)	11 (68,7%)	
Não Aparentado	4 (11,8%)	30 (88,2%)	
Haploidêntico	5 (25%)	15 (75%)	
Compatibilidade HLA			0,48
Compatível	5 (22,7%)	17 (77,3%)	
Não-Compatível	4 (16,7%)	24 (85,7%)	
Haploidêntico	5 (25%)	15 (75%)	
Condicionamento*			
Condicionamento Intensidade Reduzida	7 (23,3%)	23 (76,7%)	

TABELA 5 – DISTRIBUIÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS PACIENTES QUE

APRESENTARAM OU NÃO INFECÇÃO DO CMV ATÉ O D+100 APÓS O TRASNPANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS

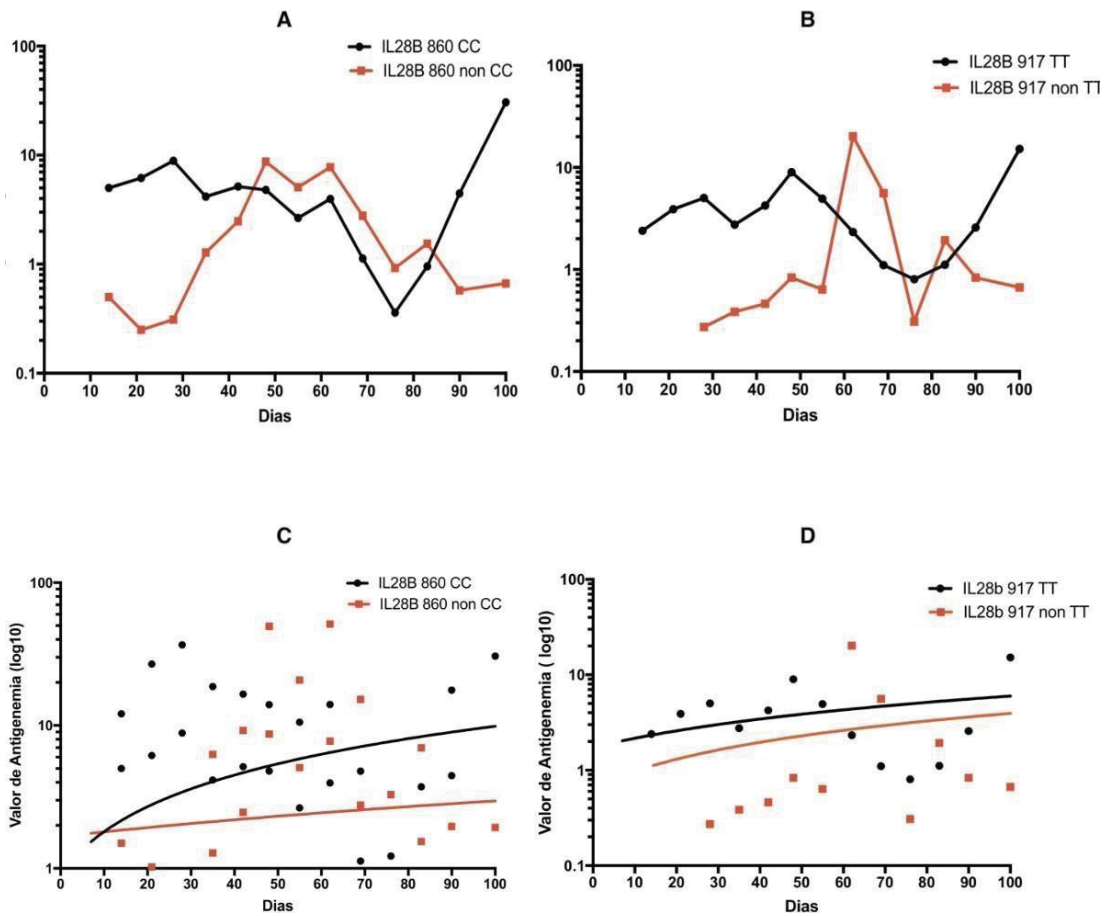
	Não (n=14)	Sim (n=56)	p (conclusão)
Mieloablativo	6 (15,4%)	33 (84,6%)	
Uso de ATG			0,927
Não	7 (20%)	23 (80%)	
Sim	8 (20%)	32 (80%)	
CMV Serostatus			0,70
*D+/R+	8 (17%)	39 (83%)	
D+/R-	1	4	
*D-/R+	2 (13,4%)	13 (86,7%)	
D-/R-	3	0	

FONTE: O autor (2018).

Nota: DRM+=Doença Residual Mínima Positiva, DRM-= Doença Residual Mínima Negativa, RIC= Condicionamento de Intensidade Reduzida, D+/R+= doador positivo/ receptor positivo, D+/R-= doador positivo, receptor negativo, D-/R+= doador negativo/ receptor positivo, D-/R-= doador negativo/ receptor negativo. \* Um paciente realizou condicionamento Não- mieloablativo e não teve reativação/infecção pelo CMV. \*\* comparado Aparentado com doadores alternativos (NAP e Haploidêntico).

A dinâmica viral foi avaliada de acordo com as variáveis descritas no Material e Métodos e exemplificada no Gráfico 1. Primeiramente, foi analisada a cinética viral através do valor da antigenemia ao longo do período observado. Não houve diferença entre os diferentes polimorfismos ( $p>0,05$ ) como se pode observar no Gráfico 6.

GRÁFICO 6 – ANÁLISE DA DINÂMICA VIRAL DO CITOMEGALOVÍRUS DURANTE OS PRIMEIROS 100 DIAS APÓS O TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS DE ACORDO COM O POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO DA IL-28B

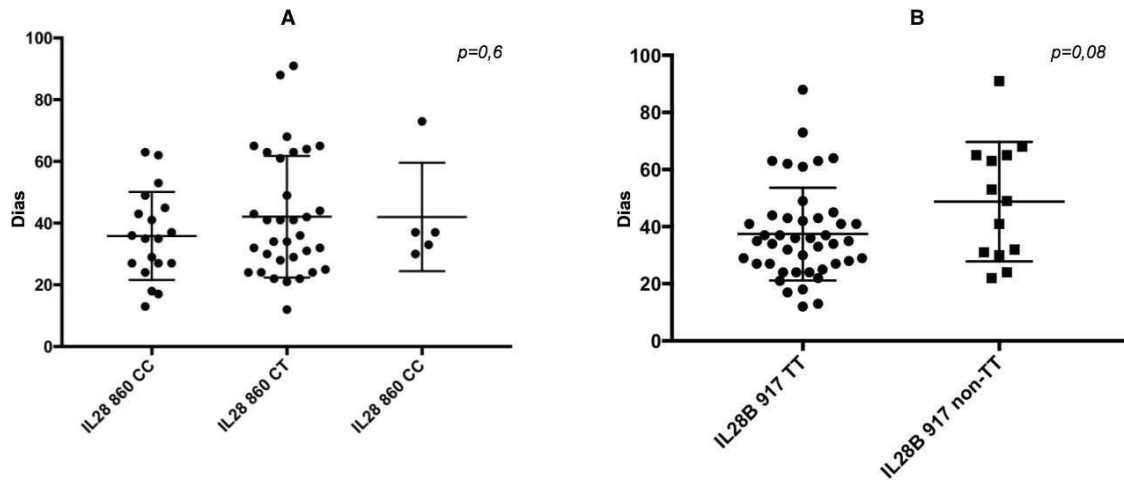


FONTE: O autor (2018).

Nota: Gráfico 6A: distribuição do valor absoluto das antigenemias. Comparação entre genótipos do IL-28B rs12979860. Gráfico 6B: distribuição do valor absoluto das antigenemias. Comparação entre genótipos do IL-28B rs8099917. Gráfico 6C: distribuição do valor em log(10) das antigenemias. Comparação entre genótipos do IL-28B rs12979860. Gráfico 6D: distribuição do valor em log(10) das antigenemias. Comparação entre genótipos do IL-28B rs8099917. Todas as relações obtiveram  $p > 0,05$ .

Tampouco encontraram-se diferenças estatisticamente significantes do tempo decorrido entre a infusão de células hematopoiéticas e o dia da primeira infecção do CMV como demonstrada no Gráfico 7. Chamamos a atenção para uma tendência a primeira infecção mais precoce do genótipo de alelo maior (T/T) do PNU rs8099917 (mediana de 35 dias [27-43] em comparação com de 48 dias [30-60,5] dos genótipos contendo de alelos menores).

GRÁFICO 7 – DISTRIBUIÇÃO DO DIA DA PRIMEIRA INFECÇÃO DO CITOMEGALOVÍRUS APÓS O TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS DE ACORDO COM O GENÓTIPO DA IL-28B

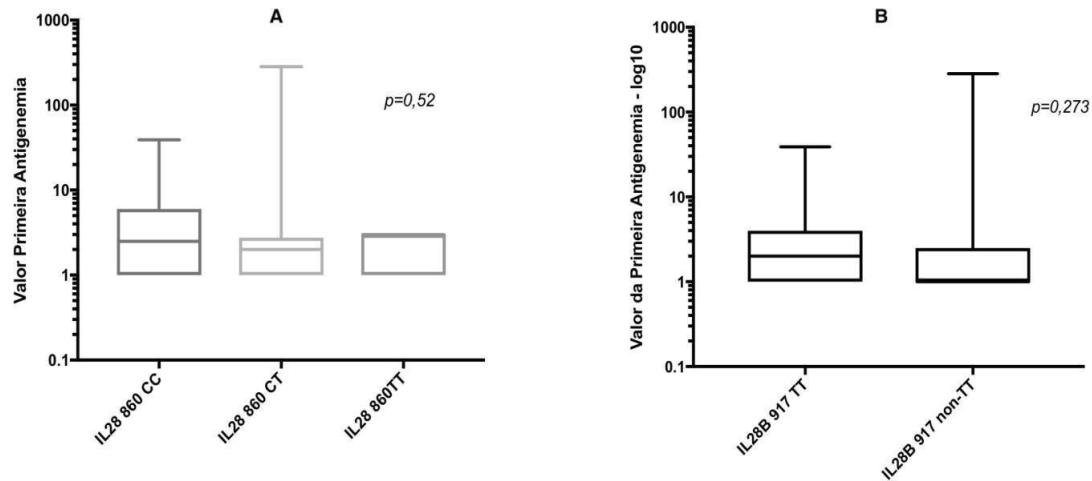


FONTE: O autor (2018).

Nota: A - PNU da IL-28B rs192979860 B- PNU da IL-28B rs8099917.

O valor da primeira antigenemia não obteve diferença estatisticamente entre os genótipos como demonstrado no Gráfico 8.

GRÁFICO 8 – MEDIANA DO VALOR DA PRIMEIRA ANTIGENEMIA (LOG10) DISTRIBUÍDOS ENTRE OS DIFERENTES GENÓTIPOS DA IL-28B



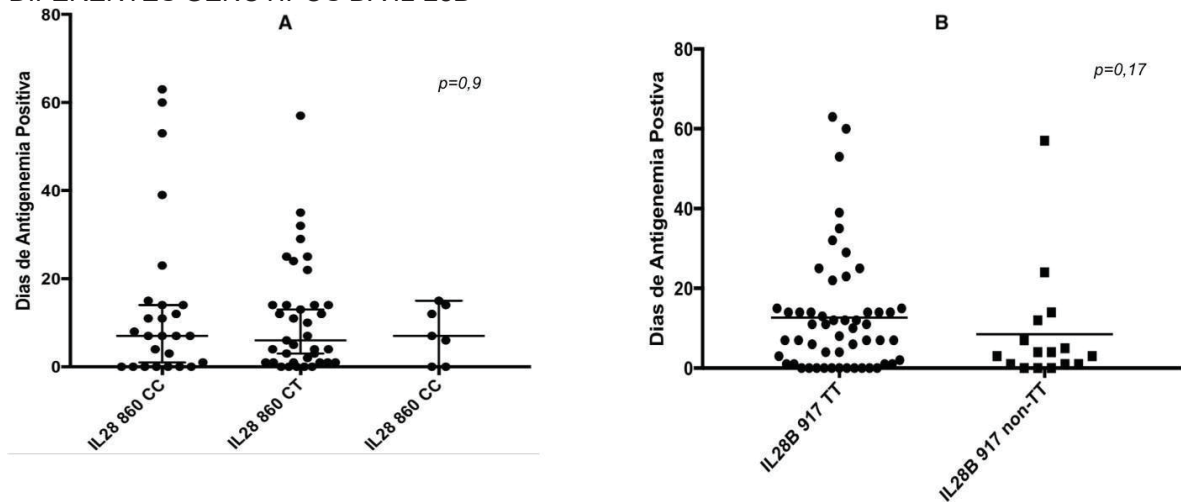
FONTE: O autor (2018).

Nota: A - PNU da IL-28B rs192979860 B- PNU da IL-28B rs8099917.

O Gráfico 9 demonstra a distribuição de dias com antigenemia positiva conforme exemplificado previamente no Gráfico 1. Foi encontrada uma maior quantidade de dias com antigenemia positiva nos pacientes com genótipo de alelo maior do PNU da IL28B rs 8099917 (mediana=9 dias [1-14,5] comparado com 3,5 dias [1-10,8]). Contudo, esse achado não teve significância estatística.



GRÁFICO 9 – DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO TOTAL DE DIAS DE ANTIGENEMIA POSITIVA APÓS O TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS DE ACORDO COM OS DIFERENTES GENÓTIPOS DA IL-28B

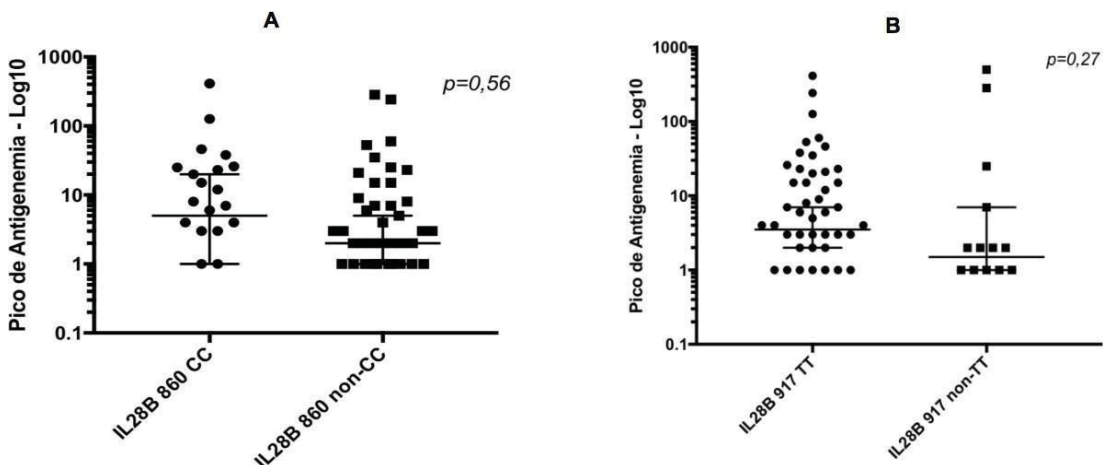


FONTE: O autor (2018).

Nota: A - PNU da IL-28B rs192979860 B- PNU da IL-28B rs8099917.

O valor de pico não obteve diferença estatística entre os genótipos como se pode verificar no gráfico 10.

GRÁFICO 10 – DISTRIBUIÇÃO DO VALOR DE PICO DE ANTIGENEMIA E OS GENÓTIPOS DA IL-28B

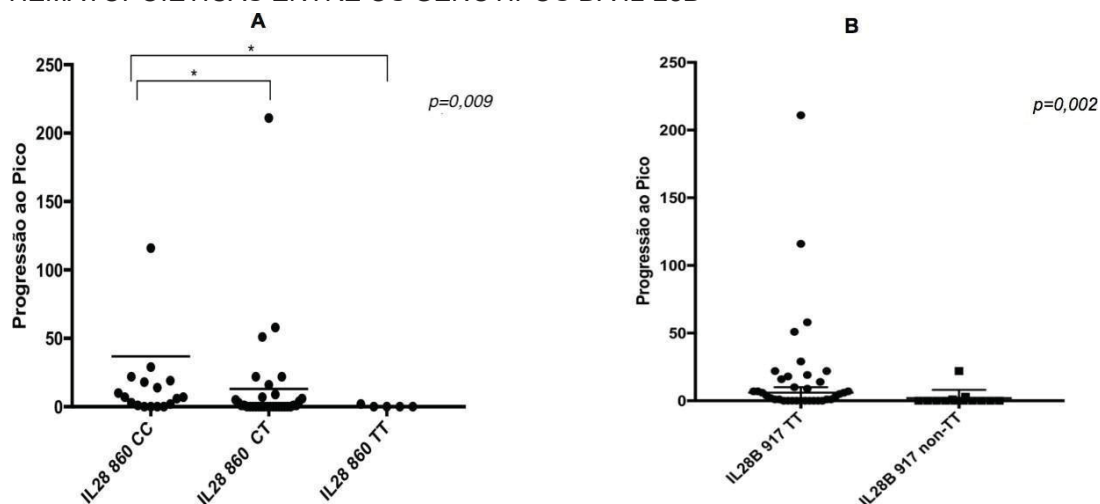


FONTE: O autor (2018).

Nota: A - PNU da IL-28B rs12979860. Valores agregados dos genótipos C/T e T/T. B- PNU da IL-28B rs8099917.

Os genótipos homozigóticos de alelo maior tanto do PNU rs12979860 quanto do rs8099917 apresentaram uma maior progressão ao pico em comparação aos pares. Essa diferença atingiu significância estatística para a análise de ambos polimorfismos ( $p < 0,05$ ) conforme o Gráfico 11 abaixo. Foi realizada a análise da progressão ao pico com teste de Mann-Whitney também para o uso de corticoide e de timoglobulina sem atingir significância estatística ( $p > 0,5$ ).

GRÁFICO 11 – DISTRIBUIÇÃO DO VALOR DE PROGRESSÃO AO PICO DE ANTIGENEMIA NA INFECÇÃO DO CITOMEGALOVÍRUS APÓS O TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS ENTRE OS GENÓTIPOS DA IL-28B



FONTE: O autor (2018).

Nota: A - PNU da IL-28B rs12979860. O asterisco indica as diferenças significantes B- PNU da IL-28B rs809917.

Foi realizada a avaliação univariada das variáveis com relação à curva de tempo de infecção/reativação do CMV após o TCTH (TABELA 6). Como não foram encontradas variáveis competidoras, optou-se por realizar a análise por curva de Kaplan-Meier. Não houve diferença entre os diferentes genótipos do PNU da IL-28B como demonstrado no Gráfico 12.

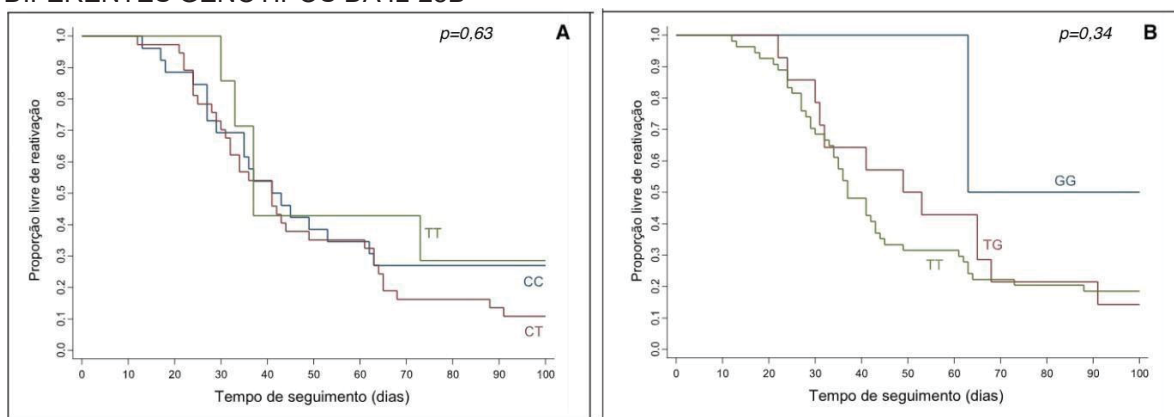
TABELA 6 – AVALIAÇÃO UNIVARIADA DAS CURVAS DE TEMPO ATÉ A PRIMEIRA INFECÇÃO DO CITOMEGALOVÍRUS APÓS O TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS ENTRE DIFERENTES VARIÁVEIS

Variável	p
Idade	0,67
Dias até a pega neutrofilica	0,09
Doença de Base	0,90
Sexo	0,39
Fonte de Células	0,65
Doador	0,92
Sorostatus do CMV	0,70
Imunoprofilaxia	0,46
Uso de Timoglobulina	0,62
Incompatibilidade de HLA	0,99
Uso de Corticoide	0,74
IL-28B rs12979860	0,63
IL-28B rs809917	0,34

FONTE: O autor (2018).

Nota: Modelo de Regressão de Cox (idade e dias até a pega); teste de Log-rank (variáveis categóricas);  $p < 0,05$ .

GRÁFICO 12 – CURVA DE KAPLAN-MEIER PARA AVALIAÇÃO DO TEMPO APÓS O TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS E INFECÇÃO DO CITOMEGALOVÍRUS ENTRE OS DIFERENTES GENÓTIPOS DA IL-28B

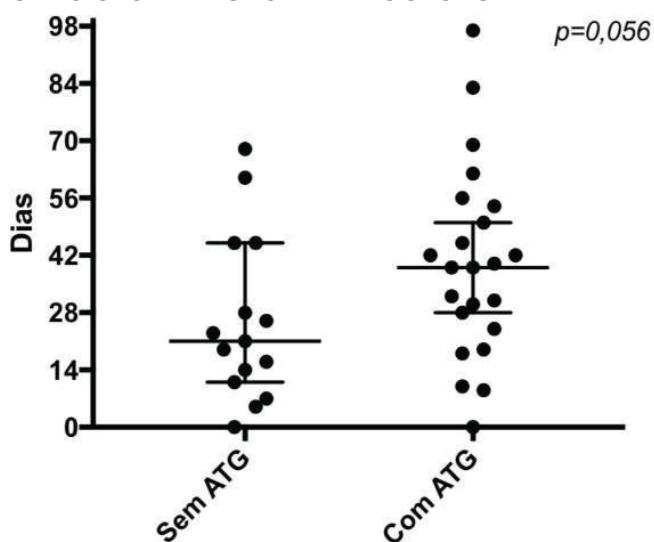


FONTE: O autor (2018).

Nota: A - PNU da IL-28B rs12979869 B - PNU da IL-28B rs8099917.

Dos 56 pacientes que apresentaram reativação do CMV, 12 (21,4%) não receberam tratamento preemptivo. Os demais 44 pacientes receberam 1 (80,4% - 36/44), 2 (4,4%-8/44) ou até 3 (2,2%-1/44) tratamentos, totalizando 1.277 dias de tratamento com ganciclovir. Um paciente usou 12 dias de ganciclovir devido a PCR=50,1 cópias/mL. Segundo os critérios estabelecidos, não foi considerado como infecção/reativação. A média de dias de tratamento por paciente que recebeu ganciclovir foi de 28 dias (DP=20,8) enquanto que a mediana foi de 21 dias (IQR=13-35,5). Não houve diferenças significativas na quantidade de dias de tratamento ou entre o número de tratamentos recebidos entre os PNU estudados. O uso de corticoide e o uso de doador haploidêntico estiveram relacionados positivamente com um maior número de tratamentos. Esse achado obteve significância estatística ( $p < 0,05$ ). O uso de timoglobulina também apresentou uma forte relação com a quantidade de dias de tratamento como pode ser visualizado no Gráfico 13 com  $p = 0,05$ .

GRÁFICO 13 – DISTRIBUIÇÃO DO NÚMERO TOTAL DE DIAS DE TRATAMENTO COM GANCICLOVIR E USO DE TIMOGLOBULINA



FONTE: O autor (2018).  
Nota: ATG=timoglobulina.

A análise da subpopulação que não recebeu tratamento preemptivo apesar de evidência de reativação/infecção pelo CMV não demonstrou diferenças entre os genótipos dos polimorfismos estudados. No entanto, o uso de corticoide ( $p=0,03$ ) o uso de doador haploidêntico ( $p=0,01$ ) estiveram negativamente associados ao não tratamento nos casos de reativação. A idade também esteve relacionada, sendo que os pacientes mais velhos apresentaram uma tendência a não tratar quando houvesse evidência de reativação/infecção pelo CMV em relação a pacientes mais jovens. No entanto, essa diferença não obteve significância estatística ( $p=0,07$ ).

Foram realizadas também análises univariadas comparando os genótipos de ambos polimorfismos estudados tanto do doador quanto do receptor para os desfechos: DECH agudo, DECH crônico, infecções fúngicas, infecções bacterianas e outras infecções virais. Nenhum desses desfechos apresentaram diferenças na distribuição dos genótipos. Curiosamente, a pega medular ocorreu mais precocemente no genótipo de alelo maior da IL-28B rs8099917 (mediana 17 dias [14-22] x 22 dias [17-24,5]). Esse achado foi estatisticamente significativo ( $p<0,05$ ). Outro achado interessante foi que o genótipo de alelo maior do receptor do IL-28B rs8099917 foi relacionado a uma menor incidência de infecção fúngica invasiva no período observado ( $p=0,01$ ) como demonstrado na Tabela 7.

TABELA 7 – INFECÇÃO FÚNGICA INVASIVA E RELAÇÃO COM OS POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO DA IL-28B RS8099917 DO RECEPTOR

<b>Infecção Fúngica Invasiva</b>	<b>Alelo Maior (n=43)</b>	<b>Alelos Menores (n=12)</b>	<b>p</b>
Aspergilose Possível*	2 (4,7%)	2 (16,7%)	
Aspergilose Provável*	0	2 (16,7%)	
Candidemia	1 (2,3%)	0	
<b>TOTAL</b>	<b>3 (7%)</b>	<b>4 (33,4%)</b>	<b>0,01</b>

FONTE: O autor (2018).

Nota:\*Seguindo critérios descritos por De Pauw et al. (2008).

## 6 DISCUSSÃO

O TCTH é uma opção terapêutica eficaz e bem estabelecida para distúrbios não somente de ordem hemato-oncológica, mas também para doenças reumatológicas e imunodeficiências. Excluídas as recidivas da doença de base, as infecções representam a mais importante causa de óbito durante o primeiro ano após o transplante (SCHUSTER et al., 2017). A doença pelo CMV carrega uma alta taxa de letalidade, alcançando 60% de óbito nos casos de pneumonite. Além disso, a simples evidência de reativação desse vírus predispõe a outras infecções virais, fúngicas, bacterianas e está associada a maiores taxas de DECH e óbito não relacionado à recidiva da doença de base (LJUNGMAN; HAKKI; BOECKH, 2011). A terapia preemptiva - realizada na evidência de infecção - é a estratégia mais adotada e mudou a prática clínica ao diminuir a incidência de doença e consequente mortalidade. Essa terapia, no entanto, está associada a um incremento na toxicidade, custo e tempo de internação (BOECKH et al., 2003). Além disso, consequente ao aumento no uso de doadores alternativos, complexidade do TCTH e uso de técnicas de detecção viral cada vez mais sensíveis, uma maior parcela de pacientes recebe terapia preemptiva nos primeiros 100 dias após o TCTH. Diante a esse fato, recentes séries de casos sugerem que nem todos os pacientes necessitam da terapia preemptiva. Nestes, a própria reorganização da imunidade pode ser suficiente para debelar a infecção do CMV (CAMARGO et al., 2018). Se fosse possível prever quais são esses pacientes capazes de controlar a infecção viral sem a necessidade do uso de terapia preemptiva, seria possível realizar o uso racional de ganciclovir e reduzir a taxa de efeitos colaterais, risco de resistência viral e custos diretamente atribuídos a essa prática. Deste modo, o atual ensaio se propôs a estudar um determinado PNU e a relação com a infecção do CMV em pacientes submetidos a TCTH alogênico durante os primeiros 100 dias após o transplante.

A amostra estudada foi composta por 70 pacientes não consecutivos submetidos a TCTH alogênico. Houve um predomínio da população pediátrica sobre a adulta e, seguindo a tendência dos demais centros transplantadores, a doença de base mais comum foi a leucemia aguda (D'SOUZA; FRETAM, [s.d.]). Este centro destaca-se pela quantidade de pacientes com imunodeficiências, sabidamente uma população de risco para a infecção do CMV (RIVERS; GASPAR, 2015). Outra característica marcante é que quase 80% dos TCTH possuíam doadores alternativos

e foi registrada uma alta taxa de uso de condicionamento mieloablativo. Esses fatores somados à quase universal taxa de sororreatividade prévia (90%) dos receptores pode justificar a alta incidência (80%) de reativação/infecção pelo CMV encontrada no presente estudo. Esta ocorreu mais frequentemente nos pacientes submetidos a TCTH de doadores NAP com 88,2% (30/34) seguidos por doadores haploidênticos com 75% (15/20) e aparentados com 68,7% (11/16) embora essa diferença não atingiu significância estatística. Ao comparar com dados prévios deste mesmo centro, nota-se tendência a maior incidência de infecção. Em análise de 252 pacientes pediátricos transplantados de doadores NAP realizada no CHC-UFPR entre os anos 1995 e 2009, foi registrada a taxa de infecção do CMV de 65,1% (MARINHO, 2013). Apesar da alta taxa de infecção no estudo atual, não houve relato de doença pelo CMV segundo critérios definidos recentemente (LJUNGMAN et al., 2017). Isso pode ter ocorrido pelo tempo de observação do estudo, uma vez que a mediana para a doença pelo CMV é de 104 dias ou mesmo pela baixa incidência de doença após a introdução da terapia preemptiva (STYCZYNSKI, 2018).

O protocolo institucional orienta a pesquisa de antigenemia de *pp65* para a detecção de infecção pelo CMV desde o período da pega medular e, a partir de então, semanalmente até o D+100. Cada paciente observado realizou, em média, 10 exames sugerindo uma adequada adesão ao protocolo. Como mencionado previamente, houve uma alta incidência de infecção do CMV após o TCTH. Apesar de alguns fatores de risco já estabelecidos - tais como tipo de doador, status sorológico prévio e doença do enxerto contra o hospedeiro - não se conseguiu identificar nenhuma variável clínica ou de polimorfismos estudados relacionados diretamente com a taxa de infecção. Isso pode ser secundário ao tamanho da amostra.

A distribuição e frequência dos alelos do genótipo da IL-28B rs12979860 e IL-28B rs8099917 encontrada neste estudo foi comparável às frequências relatadas em trabalhos nacionais e da América Latina (RIZZO et al., 2016). De um modo geral, a prevalência do genótipo C/C da IL-28B rs12979860 gira ao redor de 35% em nossa população. Essa prevalência é similar nos EEUU e Europa, porém contrasta fortemente com aquela encontrada na África e na Ásia, onde a homozigose do alelo menor (T/T) é majoritária e pode atingir a prevalência de 85% (ASAHINA et al., 2012). A distribuição dos alelos encontrada respeitou o equilíbrio de Hardy-Weinberg.

O genótipo de homozigose do alelo menor T/T do PNU do gene IL-28B rs12979860 teve associação estatisticamente significativa com um menor valor de

progressão ao pico da antigenemia. Isso foi verdadeiro também para o genótipo de alelo menor (T/G ou G/G) para o PNU da IL-28B rs8099917, também atingindo significância estatística. Convergindo com esse achado, a presença do alelo maior no PNU (rs8099917) esteve associado a uma tendência de maior valor de pico de células de antigenemia reagentes/200.000 leucócitos (T/T=3,5 [1-16,25] x não-T/T=1,5 [1-5,75]), maior valor da primeira antigenemia (T/T=2 [1-4] x não-T/T=1 [1-2,5]), a uma reativação mais precoce após o TCTH (T/T=35 dias [27-43] x não-T/T=48 dias [30-60,5]), além de uma tendência a um maior número de dias de antigenemia positiva (T/T=9 dias [1-14,5] x não-T/T=3,5 dias [1-10,75]). Já o genótipo de homozigose do alelo maior (C/C) do gene da IL-28B rs12979860 apresentou uma tendência a um maior pico de antigenemia (C/C=20 [1-23,5] x não-C/C=5 [1-8,75]). A convergência de resultados se deve muito provavelmente a um forte desequilíbrio de ligação entre os dois PNU (DUGGAL et al., 2013).

Os diferentes artigos que investigaram a relação entre os PNU da IL28B e IFNL3/4 e a infecção do CMV chegaram a conclusões discrepantes. A maioria dos trabalhos sugere que a presença de alelo menor nos PNU da IL-28B apresenta um papel protetor da infecção do CMV, cursando com menores valores de carga viral, menor incidência de infecção, menor necessidade de terapia preemptiva e tendência a menor número de reativações e a uma expansão de células T CD8+ CMV-específicas mais eficaz (BRAVO et al., 2014; CORRALES et al., 2017; EGLI et al., 2014a; FERNÁNDEZ-RUIZ et al., 2015). Em contrapartida, uma Coorte suíça de pacientes submetidos a transplante de órgão sólido (TOS) e um recente trabalho italiano em pacientes submetidos a TCTH autólogo chegaram à conclusão de que o alelo maior estaria associado a maior proteção (MANUEL, 2015; ANNIBALI et al, 2018). Essas diferenças podem ser explicadas pelo uso de diferentes populações dos estudos, fatores de risco, método de detecção viral e tamanho amostral.

Os resultados encontrados no presente estudo favorecem a teoria de que o alelo menor do PNU da IL-28B rs12979860 pode conferir proteção contra o CMV em pacientes submetidos a TCTH. O papel do IFNL no contexto da replicação do CMV e sua interação com outros IFN ainda não é totalmente compreendido. Estudos in vitro revelam que, em fibroblastos, o genótipo de alelo menor da IL-28B rs12979860 esteve associado à redução da replicação do CMV. Esses fibroblastos mostraram uma menor expressão de ácido ribonucleico mensageiro (ARNm) de IL-28B durante a infecção do CMV. Curiosamente, isso foi associado com maior expressão de IFNA e de Genes



Estimulados por Interferon (ISG) antiviral. Os mesmos autores também demonstraram que o tratamento com IL-28B reverteu esses efeitos, suprimindo o IFNA e ISG antivirais e que o bloqueio dos receptores da IL-28B esteve associado ao aumento de ISG e consequente controle da replicação viral (EGLI et al., 2014a).

A influência da IL-28B vai além da imunidade inata. Um outro possível mecanismo para a proteção do genótipo de alelo menor é uma expansão mais eficaz de linfócitos T CMV específicos. Foi demonstrado que o IFNL direciona as CD para um fenótipo com aumento de expressão de moléculas regulatórias negativas. Deste modo, as CD expostas ao IFNL apresentaram menor capacidade de estimular a proliferação das células T pelas vias do PD-1/PD-L1 com influência de desequilíbrio de citocinas, especialmente baixa produção de IL-2 e IL-12 e/ou alta produção de IL-10. Além disso, as CD sensibilizadas por IFNL promoveram a expansão de efetivas células T regulatórias (DOLGANIUC et al., 2012).

Há indícios também que o IFNL-3 é um regulador chave da proliferação de células B específicas do vírus influenza e da produção de anticorpos. O mecanismo exato de como o equilíbrio Th1/Th2 e a ativação das células B é modulado pelo IFNL e como isso afeta o resultado de doenças infecciosas deve ser objeto de mais estudos no futuro (EGLI et al., 2014b) .

Os achados deste estudo contrastam com o corpo de evidência sobre infecção crônica pelo vírus da hepatite C (VHC). Nesse contexto, a presença do genótipo de alelo maior do PNU da IL-28B rs12979860 é preditora de clareamento espontâneo e resposta favorável ao tratamento com IFN-a e ribavirina (DUGGAL et al., 2013). Em ensaios *in vitro* e modelos animais, o IFNL exibe potente atividade antiviral contra o VHC, mas também contra outros vírus tais como CMV, *Vírus Sincicial Respiratório*, *Norovírus*, *Vírus da Influenza* e HIV; tornando menos provável a ação antiviral *per se* como discriminativa de ambos desfechos. Além disso, o real papel antiviral direto da IFNL em seres humanos é de difícil avaliação (SYEDBASHA; EGLI, 2017). Por se tratar de infecção crônica, os pacientes com hepatite C podem se beneficiar de menor produção de citocinas pró-inflamatórias secundário ao IFNL, resultando em menor evolução com fibrose hepática nos detentores de genótipo de alelo maior da IL-28B rs12979860 (DOLGANIUC et al., 2012). Egli et al. (2014a) levantaram duas hipóteses plausíveis para justificar a assimetria da resposta das infecções virais 1) os pacientes com infecção crônica pelo VHC apresentam maiores níveis de ISG e IFN-a basais por um tempo prolongado, o que poderia gerar quase-espécies resistentes ao interferon

e/ou; 2) a presença de um *setpoint* de ISG mais alto dificultaria uma indução mais efetiva de IFN- $\alpha$ .

Apesar de a progressão ao pico de antigenemia não ser uma variável previamente avaliada, o achado de menor progressão no genótipo de alelo menor do IFNL-3 tem plausibilidade biológica. A expressão de IFNL sérico e no ARNm hepático é aumentada em pacientes com infecção crônica pelo VHC, porém não naqueles com hepatopatia crônica de causa outra ou resposta viral sustentada do VHC. De modo coerente, a produção de receptor de IFNL é aumentada em pacientes com infecção crônica pelo VHC em comparação a controles. Esses achados sugerem que a cinética do IFNL é dependente da infecção, estando o impacto do polimorfismo diretamente relacionado com a detecção do antígeno (DOLGANIUC et al., 2012). Em estudos com o CMV, também foi evidenciadas maiores influências do PNU da IL28-B naqueles pacientes com viremia documentada ou com terapia preemptiva (CORRALES et al., 2017). Pacientes em uso de profilaxia universal e consequente inibição da viremia apresentam menor interferência do polimorfismo estudado (MANUEL et al., 2015). Sendo assim, ao experimentar uma infecção do CMV, os pacientes com genótipo de alelo menor da IL-28B rs12979860 podem ser capazes de arquitetar uma resposta imune mais eficaz, com maiores produção de IFNG e expansão de células T CMV-específicas e menores níveis de IFNL e linfócitos regulatórios.

Surpreendentemente, o genótipo de alelo maior (T/T) da IL-28B rs8099917 esteve relacionado com a pega medular mais precoce de modo significativo (mediana de dias T/T=18 x não-T/T=22,  $p<0,05$ ). (CAI et al., 2012) ao estudar polimorfismos no gene IFNG+874, relacionou o genótipo A/A com uma pega medular mais precoce. O achado do atual estudo pode ser ao acaso pela baixa representatividade de genótipo de alelo menor do rs809917. Porém, se confirmado em estudos posteriores, um possível mecanismo é o estado anti-inflamatório criado pela IL-28-B atuando como facilitador de pega medular.

O conhecimento da produção de IFNG pode auxiliar na melhor compreensão do impacto da imunidade inata na infecção do CMV. Os ensaios mais utilizados para quantificar a imunidade celular específica ao CMV incluem o *Enzyme-Linked Immunosorbent Spot* (ELISpot), a citometria de fluxo com *Intracellular Cytokine Staining* (ICS), e *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assays* (ELISA) como o teste Quantiferon-CMV. Este último sendo o mais utilizado pela facilidade técnica (PAOURI et al., 2018). Ainda são poucos os trabalhos que se propuseram a estudar a dinâmica

da resposta imunológica do CMV após o TCTH. Apesar de amostras pequenas e heterogêneas, há convergência nos resultados ao sugerir o papel da mensuração do IFNG na identificação de uma eficaz resposta imunológica celular (ABATE et al., 2012; BAE et al., 2018; KRAWCZYK et al., 2018; YONG et al., 2017).

Alguns autores, contudo, argumentam que a avaliação única da produção de IFNG fornece informação escassa, sendo a análise da resposta T polifuncional a melhor preditora de proteção contra o CMV (SNYDER et al., 2016).

Alguns fatores de risco já estabelecidos tiveram impacto de modo significativo na dinâmica das infecções do CMV após o TCTH neste estudo, principalmente o uso de timoglobulina, o uso de corticoide e o tipo de doador (STYCZYNSKI, 2018). O uso de timoglobulina e de corticóide influenciaram negativamente a duração do tratamento preemptivo. O tipo de doador influenciou o número de tratamentos preemptivos realizados, especialmente ao se comparar o doador haploidêntico com aparentado compatível.

Quase 20% dos pacientes que reativaram não utilizaram terapia preemptiva, e nenhum destes pacientes evoluiu com doença durante os 100 dias observados. Ao avaliar esse subgrupo observa-se que a idade, o uso de corticoide, uso de timoglobulina e o tipo de doador influenciaram fortemente na decisão de iniciar ou não a terapia preemptiva. Pacientes mais novos, com uso de corticoide, timoglobulina e de doador haploidêntico obtiveram uma maior probabilidade de receber terapia preemptiva na evidência de infecção do CMV. Não houve diferença de PNU da IL-28B entre os grupos que realizaram e que não realizaram a terapia. Tampouco houve diferença significativa entre a mediana do valor de antigenemia do grupo que tinha evidência e tratou do grupo com evidência de infecção que não tratou.

Como os polimorfismos podem estar relacionados a outras doenças, realizou-se a análise univariada dos diferentes genótipos para os PNU estudados do doador e do receptor quando disponível para desfechos de infecção fúngica, viral e bacteriana além de presença ou não de DECH aguda e crônica. A única associação com significância estatística foi de infecção fúngica com o PNU da IL-28B do receptor, havendo uma maior incidência em pacientes detentores do genótipo de alelo maior da IL-28B rs8099917. Alguns PNU associados com infecção fúngica já foram descritos, tais como os polimorfismos de Receptor *Toll-Like* (TLR) e da Pentraxina-3 (CARVALHO et al., 2009; CUNHA et al., 2014). Contudo esse achado pode ser somente resultado da assimetria do tamanho dos grupos.

O estudo atual apresenta algumas limitações:

1. Relativo baixo número e heterogeneidade dos pacientes incluídos. Em trabalhos abordando pacientes submetidos a TCTH esse é um viés recorrente. O ideal seria aumentar a amostra em um único centro, porém demoraria muito tempo para agregar uma amostra adequada. Outra opção é o trabalho multicêntrico, contudo entre as instituições há diferentes protocolos de terapia preemptiva e métodos de detecção de infecção viral, fato gerador de vieses;
2. Não foram realizados estudos da expansão de linfócitos T CD4+/CD8+ em resposta à replicação viral nos diferentes PNU;
3. Não foi possível avaliar a produção de IFN e sua relação com desfecho clínico em diferentes polimorfismos;
4. Pouco tempo de observação, haja vista que a maioria dos casos de doença pelo CMV ocorrem após os 100 dias após o TCTH.

Como proposta de continuidade do trabalho, objetivamos estender o tempo de observação destes pacientes para 365 dias após o TCTH e realizar novo estudo de correlação entre os genótipos e a reativação/infecção e doença pelo CMV, além de estudo específico para as outras doenças infecciosas. Também pretendemos estudar a produção de IFN-gama e construir um fluxograma para o uso racional de terapia preemptiva e realizar análise farmacoeconômica.

## 7 CONCLUSÃO

1. A frequência dos alelos encontrada respeitou o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os genótipos C/T (49,6%) da IL-28B rs12979860 e o T/T (76,7%) da IL-28B rs8099917 foram os mais comuns;
2. A incidência de infecção do CMV no presente estudo foi de 80% (56/70), sendo mais frequente em TCTH de doador alternativo (NAP=88,2% e Haploidêntico=75%) em relação ao doador aparentado e compatível (68,7%); não foram constatados casos de doença pelo CMV;
3. Não houve diferença significativa entre os grupos que reativaram ou não o CMV quanto aos polimorfismos ou às variáveis estudadas;
4. Os genótipos contendo alelos menores tanto da IL-28B rs12979869 quanto da IL-28B rs8099917 apresentaram uma menor progressão ao pico de antigenemia ( $p < 0,05$ ). Esse achado sugere que o alelo menor pode conferir uma melhor resposta imunológica após a infecção do CMV;
5. O genótipo de alelo maior do Receptor do IL-28B rs8099917 foi relacionado a uma menor incidência de infecção fúngica invasiva;
6. Não houve diferença na incidência de outras infecções fúngicas, virais ou bacterianas ou DECH entre os diferentes PNU da IL-28B.

## REFERÊNCIAS

- ABATE, D. et al. Diagnostic utility of human cytomegalovirus-specific T-cell response monitoring in predicting viremia in pediatric allogeneic stem-cell transplant patients. **Transplantation**, v. 93, n. 5, p. 536-542, 2012.
- AGUADO, R. et al. Lack of evidence of association between IFNG and IL28B polymorphisms and QuantiFERON-CMV test results in seropositive transplant patients. **Human Immunology**, v. 79, n. 6, p. 499-505, 2018.
- ANNIBALI, O. et al. Impact of IFN lambda 3/4 single nucleotide polymorphisms on the cytomegalovirus reactivation in autologous stem cell transplant patients. **PLoS One**, v. 13, n. 7, p. 1-11, 2018.
- ASAHINA, Y. et al. Association of gene expression involving innate immunity and genetic variation in interleukin 28B with antiviral response. **Hepatology**, v. 55, n. 1, p. 20-29, 2012.
- BAE, S. et al. The detailed kinetics of cytomegalovirus-specific T cell responses after hematopoietic stem cell transplantation: 1 year follow-up data. **Immune Network**, v. 18, n. 2, p. 1-9, 2018.
- BIBERT, S. et al. The IFNL3/4  $\Delta$ g variant increases susceptibility to cytomegalovirus retinitis among HIV-infected patients. **Aids**, v. 28, n. 13, p. 1885-1889, 2014.
- BLUME, K. G.; THOMAS, E. D. A history of allogeneic and autologous hematopoietic cell transplantation. In: THOMAS' Hematopoietic Cell Transplantation. [S.l. : s.n.], 2016. p. 1-11.
- BLYTH, E. et al. CMV-specific immune reconstitution following allogeneic stem cell transplantation. **Virulence**, v. 7, n. 8, p. 967-980, 2016.
- BOECKH, M. et al. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: current status, known challenges, and future strategies. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 9, n. 9, p. 543-558, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas imunossupressão pós transplante de medula óssea, 2016**. Disponível em: [http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2016/Relatorio\\_PCDDT\\_DoencaFalciforme\\_CP\\_2016\\_v2.pdf](http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2016/Relatorio_PCDDT_DoencaFalciforme_CP_2016_v2.pdf).
- BRAVO, D. et al. Effect of the IL28B Rs12979860 C/T polymorphism on the incidence and features of active cytomegalovirus infection in allogeneic stem cell transplant patients. **Journal of Medical Virology**, v. 86, n. 5, p. 838-844, 2014.
- CAI, X. et al. Effect of donor and recipient IFN- $\gamma$  gene +874 single nucleotide polymorphism on the efficacy of HLA allogeneic contracted cell donor allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with hematologic malignancies. **Chinese Journal of Hematology**, 2012.

CAMARGO, A. J. F. et al. Impact of cytomegalovirus (CMV) viral load on probability of spontaneous clearance and response to pre-emptive therapy in allogeneic stem cell transplant recipients. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 24, n. 4, p. 806-814, 2018.

CAMARGO, J. F.; KOMANDURI, K. V. Emerging concepts in cytomegalovirus infection following hematopoietic stem cell transplantation. **Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy**, v. 10, n. 4, p. 233-238, dez. 2017.

CARIANI, E. et al. Interleukin 28B polymorphisms as predictors of sustained virological response in chronic hepatitis C: systematic review and meta-analysis. **The Pharmacogenomics Journal**, v. 16, n. 1, p. 18-29, fev. 2016.

CARVALHO, A. et al. Polymorphisms in Toll-like receptor genes and susceptibility to infections in allogeneic stem cell transplantation. **Experimental Hematology**, v. 37, n. 9, p. 1022-1029, 2009.

CIAURRIZ, M. et al. Functional specific-T-cell expansion after first cytomegalovirus reactivation predicts viremia control in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. **Transplant Infectious Disease**, v. 12, n. 10, p. 3218-3221, 2017.

CORRALES, I. et al. IL28B genetic variation and cytomegalovirus-specific T-cell immunity in allogeneic stem cell transplant recipients. **Journal of Medical Virology**, v. 89, n. 4, p. 685-695, 2017.

CUNHA, C. et al. Genetic PTX3 deficiency and aspergillosis in stem-cell transplantation. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 5, p. 421-432, 2014.

DE PAUW, B. et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive. **Clinical Infectious Disease**, v. 46, n. 12, p. 1813-1821, 2008.

DOLGANIUC, A. et al. Type III interferons, IL-28 and IL-29, are increased in chronic HCV infection and induce myeloid dendritic cell-mediated FoxP3+ regulatory T Cells. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. 1-10, 2012.

DUGGAL, P. et al. Genome wide association study of spontaneous resolution of hepatitis C virus infection. **Annals of Internal Medicine**, v. 158, n. 4, p. 235-245, 2013.

DZIEDZIC, M.; SADOWSKA-KRAWCZENKO, I.; STYCZYNSKI, J. Risk factors for cytomegalovirus infection after allogeneic hematopoietic cell transplantation in malignancies: proposal for classification. **Anticancer Research**, v. 6556, p. 6551-6556, 2017.

D'SOUZA, A.; FRETHERAM, C. **Current Uses and Outcomes of Hematopoietic Cell Transplantation (HCT): CIBMTR Summary Slides, 2017 Available at:**

**<http://www.cibmtr.org>**. Disponível em:

<<https://www.cibmtr.org/ReferenceCenter/SlidesReports/SummarySlides/pages/inde>

x.aspx>. Acesso em: 19 ago. 2018.

EGLI, A. et al. Immunomodulatory function of interleukin 28B during primary infection with cytomegalovirus. **Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. 5, p. 717-727, 2014a.

EGLI, A. et al. IL-28B is a Key regulator of B-and T-Cell vaccine responses against influenza. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 12, 2014b.

FERNÁNDEZ-RUIZ, M. et al. Association between individual and combined SNPs in genes related to innate immunity and incidence of CMV infection in seropositive kidney transplant Recipients. **American Journal of Transplantation**, v. 15, n. 5, p. 1323-1335, 2015.

FREIRE, A. L.; KOSS, H.; COMPTON, T. Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 43, p. 15470–5, 2004

FRY, T. J.; WILLASCH, A.; BADER, P. The graft-versus-tumor effect in pediatric malignancy. **Pediatric Clinics of North America**, v. 57, n. 1, p. 67-81, 2010.

FÜRST, D. et al. High-resolution HLA matching in hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective collaborative analysis. **Blood**, v. 122, n. 18, p. 3220-3229, 2013.

GAGELMANN, N. et al. Comparative efficacy and safety of different antiviral agents for cytomegalovirus prophylaxis in allogeneic hematopoietic cell transplantation: a systematic review and meta-analysis. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 24, n. 10, p. 2101-2109, 2018.

GREEN, M. L. et al. Cytomegalovirus viral load and mortality after haemopoietic stem cell transplantation in the era of pre-emptive therapy: a retrospective cohort study. **The Lancet Haematology**, v. 3, n. 3, p. e119-e127, 2016.

HO, S. K. N. et al. Rapid cytomegalovirus pp65 antigenemia assay by direct erythrocyte lysis and immunofluorescence staining. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 638-640, 1998.

HUMAR, A. et al. Elevated serum cytokines are associated with cytomegalovirus infection and disease in bone marrow transplant recipients. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 179, n. 2, p. 484-488, 1999.

JAIN, N. A. et al. The clinical and financial burden of preemptive management of cmv disease after allogenic stem cell transplantation - implications for preventative treatment approaches. **Cytotherapy**, v. 16, n. 7, p. 927-933, 2015.

JASKULA, E. et al. Interferon gamma 13-CA-Repeat homozygous genotype and a low proportion of CD4+lymphocytes are independent risk factors for cytomegalovirus reactivation with a high number of copies in hematopoietic stem cell transplantation



recipients. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 15, n. 10, p. 1296-1305, 2009.

KIELESEN, K. et al. Donor genotype in the Interleukin-7 receptor  $\alpha$ -chain predicts risk of graft-versus-host disease and cytomegalovirus infection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1-12, 2018.

KOPITAR-JERALA, N. The role of interferons in inflammation and inflammasome activation. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 873, 2017.

KOTENKO, S. V. IFN- $\lambda$ s. **Current Opinion in Immunology**, v. 23, n. 1, p. 1-23, 2011.

KOTENKO, S. V.; DURBIN, J. E. Contribution of type III interferons to antiviral immunity: location, location, location. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 18, p. 7295-7303, 2017.

KRAWCZYK, A. et al. Assessing the risk of CMV reactivation and reconstitution of antiviral immune response post bone marrow transplantation by the QuantiFERON-CMV-assay and real time PCR. **Journal of Clinical Virology**, v. 99-100, p. 61-66, 2018.

LJUNGMAN, P. et al. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant patients for use in clinical trials. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, n. 1, p. 87-91, 2017.

LJUNGMAN, P.; HAKKI, M.; BOECKH, M. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 25, n. 1, p. 1-18, 2011.

LOEFFLER, J.; STEFFENS, M.; ARLT, E. Genes encoding chemokine receptor 5, interleukin-10, and monocyte chemoattractant protein 1 contribute to cytomegalovirus reactivation and disease after allogeneic. **Journal of clinical**, v. 44, n. 5, p. 1847-1850, 2006.

LUGERT, R. et al. Comparison between pp65 antigenemia assay and quantitative real-time polymerase chain reaction for detection of active cytomegalovirus infection in routine diagnostics. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 65, n. 2, p. 192-195, 2009.

LUO, X.-H.; CHANG, Y.-J.; HUANG, X.-J. Improving cytomegalovirus-specific T Cell reconstitution after haploidentical stem cell Transplantation. **Journal of Immunology Research**, v. 2014, p. 1-12, 2014. Não está citado no texto

MANICKLAL, S. et al. The "Silent" global burden of congenital cytomegalovirus. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 86-102, 2013.

MANUEL, O. et al. Assessment of cytomegalovirus-specific cell-mediated immunity for the prediction of cytomegalovirus disease in high-risk solid-organ transplant recipients: a multicenter cohort study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 6, p.

817-824, 2013.

MANUEL, O. et al. Influence of IFNL3/4 polymorphisms on the incidence of cytomegalovirus infection after solid-organ transplantation. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 6, p. 906-914, 2015.

MARINHO, D. H. **Complicações precoces do transplante de célula**. [S.l. : s.n.], 2013.

MEHTA, R. S.; REZVANI, K. Immune reconstitution post allogeneic transplant and the impact of immune recovery on the risk of infection. **Virulence**, v. 7, n. 8, p. 901-916, 2016.

MEZGER, M. et al. Investigation of promoter variations in dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) (CD209) and their relevance for human cytomegalovirus reactivation and disease after allogeneic stem-cell transplantation. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 3, p. 228-234, 2008.

NEGRIN, R. S.; RITZ, J. Immune Regulation in Hematopoietic Cell Transplantation. In: THOMAS' Hematopoietic Cell Transplantation. 5th ed. [S.l.: s.n.], 2016. v. 1-2.

NETEA, M. G.; WIJMENGA, C.; O'NEILL, L. A. J. Genetic variation in Toll-like receptors and disease susceptibility. **Nature Immunology**, v. 13, n. 6, p. 535-542, 2012.

NICHOLS, W. G. et al. Rising pp65 antigenemia during preemptive anticytomegalovirus therapy after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Risk factors, correlation with DNA load, and outcomes. **Blood**, 2001.

PAOURI, B. et al. Quantiferon-Cytomegalovirus assay: a potentially useful tool in the evaluation of CMV-specific CD8+ T-cell reconstitution in pediatric hematopoietic stem cell transplant patients. **Pediatric Transplantation**, v. 22, n. 5, p. e13220, 2018.

PEI, X. et al. Cytomegalovirus-specific T-Cell transfer for refractory cytomegalovirus infection after haploidentical stem cell transplantation: the quantitative and qualitative immune recovery for cytomegalovirus. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. 8, p. 945-956, 2017.

PETER GALE, R. et al. Haematopoietic cell transplants in Latin America. **Bone Marrow Transplantation**, v. 15, n. 4, p. 942-953, 2016.

PIAO, Z. et al. Effect of FOXP3 polymorphism on the clinical outcomes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in pediatric acute leukemia patients. **International Immunopharmacology**, v. 31, p. 132-139, 2016.

PREIKSAITIS, J. K. et al. Are we there yet? Impact of the first international standard for cytomegalovirus DNA on the harmonization of results reported on plasma samples. **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 5, p. 583-589, 2016.

RIVERS, L.; GASPAR, H. B. Severe combined immune deficiency recent: recent developments and guidance on clinical management. **Archives of Disease in Childhood**, v. 100, n. 7, p. 667-672, 2015.

RIZZO, S. et al. Prevalence of IFNL3 gene polymorphism among blood donors and its relation to genomic profile of ancestry in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, p. 619-622, 2016.

ROBIN, C. et al. Economic burden of preemptive treatment of CMV infection after allogeneic stem cell transplantation: a retrospective study of 208 consecutive patients. **Biomedical Centre**, p. 1-8, 2017.

SAADI, M. I. et al. Association of the costimulatory molecule gene polymorphisms and active cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell transplant patients. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 10, p. 5833-5842, 2013.

SCHUSTER, M. G. et al. Infections in hematopoietic cell transplant recipients: Results from the organ transplant infection project, a multicenter, prospective, cohort study. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 4, n. 2, p. 1-7, 2017.

SNYDER, L. D. et al. Polyfunctional T-cell signatures to predict protection from cytomegalovirus after lung transplantation. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 193, n. 1, p. 78-85, 2016.

STYCZYNSKI, J. Who Is the patient at risk of CMV recurrence: a review of the current scientific evidence with a focus on hematopoietic cell transplantation. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2018.

SYEDBASHA, M.; EGLI, A. Interferon lambda: modulating immunity in infectious diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 119, 2017.

SYLWESTER, A. W. et al. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4 and CD8 T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 5, p. 673-685, 2005.

TAN, S. K.; WAGGONER, J. J.; PINSKY, B. A. Cytomegalovirus load at treatment initiation is predictive of time to resolution of viremia and duration of therapy in hematopoietic cell transplant recipients. **Journal of Clinical Virology**, v. 69, p. 179-183, 2015.

TEIRA, P. et al. Early cytomegalovirus reactivation remains associated with increased transplant-related mortality in the current era: a CIBMTR analysis. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2427-2439, 2016.

TOMBLYN, M. et al. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplant recipients: a global perspective recommendations. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 15, n. 10, p. 1143-1238, 2009.

WANG, X. et al. Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. **Nature**, v. 424, p. 456, 24 jul. 2003.

WU, X.-J. et al. [The association of killer cell immunoglobulin like receptor gene polymorphism with cytomegalovirus infection after hematopoietic stem cell transplantation]. **Zhonghua nei ke za zhi**, v. 52, n. 2, p. 161–5, fev. 2013.

XIAO, H. W. et al. Donor TLR9 gene tagSNPs influence susceptibility to aGVHD and CMV reactivation in the allo-HSCT setting without polymorphisms in the TLR4 and NOD2 genes. **Bone Marrow Transplantation**, v. 49, n. 2, p. 241-247, 2014.

YONG, M. K. et al. Identifying cytomegalovirus complications using the quantiferon-CMV assay after allogeneic hematopoietic stem cell mtransplantation. **Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. 11, p. 1684-1694, 2017.

ZENG, D.; STROBER, S. Mechanisms of tolerance. In: THOMAS' Hematopoietic Cell Transplantation. [S.l.: s.n.], 2016. p. 136-145.

ZHAO, X. Y. et al. Recipient-donor KIR ligand matching prevents CMV reactivation post-haploidentical T cell-replete transplantation. **British Journal of Haematology**, v. 177, n. 5, p. 766-781, 2017.