

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Bioquímica e Imunologia

Stephanie Santos de Almeida

**INFLUÊNCIA DO REPERTÓRIO DE HLAS NO DESFECHO
DA INFECÇÃO POR HCMV EM INDIVÍDUOS
TRANSPLANTADOS**

Belo Horizonte
2023

Stephanie Santos de Almeida

INFLUÊNCIA DO REPERTÓRIO DE HLAS NO DESFECHO DA INFECÇÃO POR HCMV EM INDIVÍDUOS TRANSPLANTADOS

Versão Final

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Helton da Costa Santiago

Co-Orientador: Dr. Cristiano Xavier Lima

Belo Horizonte
2023

- 043 Almeida, Stephanie Santos de.
Influência do repertório de HLAs no desfecho da infecção por HCMV em indivíduos transplantados [manuscrito] / Stephanie Santos de Almeida. – 2023. 92 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientador: Helton da Costa Santiago. Co-Orientador: Dr. Cristiano Xavier Lima.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.
1. Bioquímica e imunologia. 2. Antígenos HLA. 3. Transplante. 4. Citomegalovírus. I. Santiago, Helton da Costa. II. Lima, Cristiano Xavier. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE STEPHANIE SANTOS DE ALMEIDA. Aos dezenove dias do mês de janeiro de 2023 às 13:30 horas, reuniu-se de forma “online” utilizando a plataforma “conferenciaweb”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “Influência do repertório de HLAs no desfecho da infecção por HCMV em indivíduos transplantados”, requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Helton da Costa Santiago, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Maurício Lacerda Nogueira (Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto), aprovada; Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Luiz Cristovão Porto (Universidade do Estado do Rio de Janeiro), aprovada; Dr. Martin Bonamino (INCA), aprovada; Dr. Cristiano Xavier Lima - Coorientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Helton da Costa Santiago - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

☒ (X) APROVADA

☐ () REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 19 de janeiro de 2023.

Dr. Maurício Lacerda Nogueira (FAMERP)

Dra. Liza Figueiredo Felicori Vilela (UFMG)

Dr. Luiz Cristovão Porto (UERJ)

Dr. Martin Bonamino (INCA)

Dr. Cristiano Xavier Lima - Coorientador (UFMG)

Dr. Helton da Costa Santiago - Orientador (UFMG)

AGRADECIMENTO

O primeiro agradecimento com toda certeza a Deus, sem a sua luz, força e proteção nenhum trabalho seria executado. Muito é dividido todos os dias com quem amamos e confiamos, mas tem caminhos, obstáculos, preocupações, dores e desejos que são vistos apenas por Ele. Com certeza ele quem colocou em meu caminho instrumentos de paz e resiliência para que tudo fosse possível e concluído. “Tudo tem seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu.”- Eclesiastes 3.

Preciso agradecer também a minha família, principalmente meus pais Ana Paula e Aparício pelo presente da vida e por sempre trabalharem muito para que nunca me faltasse nada e sempre serem exemplo de determinação e atenção e por me apoiarem desde o início na decisão de qual carreira seguir. Agradeço no mesmo grau de importância a minha avó Dona T, por todo o amor, carinho, cuidado, e por facilitar as coisas para mim na rotina dos meus dias de loucuras em experimentos e estudos incessantes. Aos meus padrinhos pelo apoio de sempre e a todas as pessoas da minha família que sempre torceram e demonstraram entusiasmo por mim vislumbrando a primeira mulher doutora e pesquisadora na família.

Agradeço aos professores Helton e Cristiano, por acreditarem em mim, por todas as correções, conselhos, ensinamentos, pela paciência e por não desistirem de fazer esse projeto crescer e tomar a forma que desejávamos há 4 anos atrás. Vocês são referência para mim e eu nunca vou esquecer todas as lições que aprendi trabalhando e vendo vocês trabalharem também.

Agradeço também a todos os meus amigos que se fizeram presentes durante o desenvolvimento desse trabalho, sempre me incentivaram a continuar e não desistiram de mim mesmo faltando em diversos compromissos principalmente no desenvolvimento da escrita dessa tese. A todos os meus amigos e colegas de trabalho do laboratório IMPAR, em especial Camila, Marcela e Carol por se envolverem tanto no meu projeto e me ajudarem em momentos decisivos e em momentos de caos que acontecem também, mas, a gratidão se estende a todos os outros integrantes em que dividimos momentos felizes e de ajudas na mesma intensidade dentro do laboratório. Agradeço a Eneida por todo o apoio dentro do laboratório e por mostrar com fineza como manter tudo em ordem e também a Fernanda, técnica responsável pelo

citômetro da Faculdade de Farmácia da UFMG, por toda a ajuda e disponibilidade nas leituras das amostras dos pacientes.

Um agradecimento muito especial aos médicos do transplante do Hospital Felício Rocho: Dr. Rafael Lage, Dra. Amanda, Dra. Taynan Vidigal e Dra Ana Carolina e o aluno de medicina, Lucas, por tornarem possível o acesso aos pacientes e o sucesso dos estudos in vitro e retrospectivo que são o coração desse trabalho. Agradeço imensamente a todos os pacientes do transplante que se dispuseram a contribuir com o nosso estudo e se colocaram à disposição para nos ajudar sempre que solicitado.

Agradeço à Universidade Federal de Minas Gerais pela infraestrutura, ao Departamento de Bioquímica e Imunologia pelo corpo docente de qualidade, que contribui muito para nossa formação e ao Hospital Felício Rocho pela colaboração em um estudo tão importante. As colaborações entre as instituições foram muito importantes para o desenvolvimento do trabalho e com certeza foi determinante para a conclusão deste. Obrigada as agências de fomento: FAPEMIG, CAPES e CNPq por tornarem possível o desenvolvimento desse trabalho, mesmo com muitas turbulências ao longo desses anos.

Por último, gostaria de agradecer a todos NÓS que não desistimos da ciência em meio a tanta desvalorização e falta de incentivo. Espero que cada vez mais a ciência no Brasil apareça e consiga mostrar o quanto os pesquisadores brasileiros merecem ser valorizados e ter uma remuneração condizente com a dedicação diária e infinita pela progressão da ciência.

RESUMO

O Citomegalovírus humano (HCMV) é um herpesvírus humano comum e, na maioria das vezes, assintomático na população imunocompetente. Em casos de imunossupressão, como no transplante, a infecção pelo HCMV pode reativar e afetar o desfecho do transplante, causando alterações no quadro clínico dos pacientes. Apesar de ser muito recorrente, não se sabe ao certo porque alguns pacientes transplantados com reativação do HCMV evoluem de forma mais grave que outros, mesmo utilizando os mesmos protocolos e tratamentos. Para entender melhor a resposta imune de indivíduos com diferentes desfechos na infecção, selecionamos pacientes transplantados com reativação de HCMV classificadas em infecção leve (infecção assintomática e menos de 25 dias de internação) ou grave (infecção sintomática e acima de 30 dias de internação). Amostras de sangue foram coletados para análise por citometria de fluxo e estimulados com uma biblioteca de peptídeos específica para linfócitos T CD8 (LTCD8), com epítomos desenhados in silico para as regiões imunodominantes das 5 proteínas mais imunogênicas do HCMV. Os resultados da análise de citometria demonstraram que os pacientes que tiveram infecção grave por HCMV têm maior produção de TNF e expressão aumentada de CD57 pelos linfócitos CD8 (LTCD8) quando comparados ao grupo de infecção leve. Além disso, no decorrer do estudo foi observado que os HLAs utilizados na construção da biblioteca de peptídeos poderiam ser estudados como ferramenta de predição de gravidade. Assim, criamos um score com base no número de interações de alta e intermediária afinidade que cada molécula de HLA realiza com epítomos das 10 proteínas mais imunogênicas do vírus para linfócitos T CD8 (LTCD8). Com os valores de pontuação definidos para cada HLA, foi gerado um valor de pontuação final para o repertório de cada paciente. Para avaliar se o score de HLA dos pacientes transplantados pode estar relacionado ao desfecho clínico, foi realizado um estudo retrospectivo de caso-controle e foram analisados os prontuários de pacientes (n=71) que tiveram infecção leve ou grave por HCMV. Observamos que os pacientes que tiveram infecção grave por HCMV (n=31) apresentaram menores valores de score no repertório de HLAs do que pacientes com infecção leve por HCMV (n=40). Observamos também que o score do repertório de HLA dos pacientes com HCMV correlaciona-se negativamente com a produção de IL-10 e IL-17A por linfócitos T

específicos. O estudo do repertório de HLAs e sua capacidade de apresentação de antígenos predita in silico pode ter valor prognóstico de infecções graves por HCMV após o transplante.

Palavras-chave: HLA, Transplante, HCMV, bioinformatica

ABSTRACT

Human cytomegalovirus (HCMV) is a common human herpesvirus in most cases asymptomatic in the immunocompetent population. In cases of immunosuppression such as in transplantation, HCMV infection can reactivate and affect the outcome of the transplantation, causing changes in the clinical status of patients. Despite being recurrent, it is unknown why some transplanted patients with HCMV reactivation develop the infection severely than other patients even using the same protocols and treatments. To better understand the immune response of individuals with different outcomes in the infection, we selected transplanted patients with HCMV reactivation classified as mild infection (asymptomatic infection and less than 25 days of hospitalization) or severe (symptomatic infection and more than 25 days of hospitalization). Blood samples collected for flow cytometry analysis were stimulated with a specific peptide library for CD8 T lymphocytes (LTCD8) containing epitopes designed in silico with immunodominant regions of the five most immunogenic HCMV proteins. The results of the flow cytometry analysis demonstrated that patients who had severe infection by HCMV presented higher TNF production and increased expression of CD57 by CD8 lymphocytes (LTCD8) when compared to the group with mild infection. Furthermore, during the course of the study we observed that the HLAs used in the construction of the peptide library could be studied as a severity prediction tool. We created a score based on the number of high and intermediate affinity that each HLA molecule performs with CD8 T lymphocytes (LTCD8) epitopes of the 10 most immunogenic proteins of the virus. A score was created for each class I HLA and a value generated for each patient's HLA-I repertoire. To assess whether the HLA score of transplanted patients may be related to clinical outcome, a retrospective case-control study was performed and the medical records of patients (n=71) who had mild or severe HCMV infection were analyzed. We observed that patients with severe HCMV infection (n=31) had lower HLA repertoire scores than patients with mild HCMV infection (n=40). We also observed that the score of the HLA repertoire of patients with HCMV negatively correlate with the production of IL-10 and IL-17A by specific T lymphocytes. Studying the repertoire of HLAs and their ability to present antigens predicted in silico may have prognostic value for severe HCMV infections after transplantation.

Key Words: HLA, Transplant, HCMV, bioinformatics

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Dados de soroprevalência do HCMV no mundo com estudos realizados entre 2003-2015.	18
Figura 2. Estrutura dos Herpesvírus.	23
Figura 3. Visão geral da entrada do HCMV nas células-alvo.	24
Figura 4. Resumo dos mecanismos de evasão imune do HCMV.	27
Figura 5. Resumo da atividade das células do sistema imune na resposta ao HCMV..	29
Figura 6. Marcadores da diferenciação de linfócitos TCD8+ específicos para HCMV (LTCD8/HCMV+)	32
Figura 7. Representação do locus HLA no braço curto do cromossomo 6.....	32
Figura 8. Estrutura da molécula de HLA de classe I.....	34
Figura 9. Estratégia de análise do Painel de Citometria de sangue total.....	43
Figura 10. Avaliação da capacidade da biblioteca de peptídeos do HCMV em estimular as células e induzir produção de citocinas	48
Figura 11. Frequência das citocinas TNF, IFN γ , IL-2, IL-17A, IL-10 e presença de moléculas co-receptoras CD57 e CD107A nos linfócitos T CD8+ dos pacientes transplantados.	52
Figura 12. Análise do MFI das citocinas produzidas pelos linfócitos T CD8+ na subpopulação CD57+ dos pacientes transplantados.....	58
Figura 13. Interação de cada um dos 27 HLAs com a proteína UL48.	61
Figura 14. Interação de cada um dos 27 HLAs com a US32.....	61
Figura 15. Frequência de alguns HLAs presentes nos pacientes..	63

Figura 16. Score de HLA e desfecho clínico da infecção por HCMV em pacientes transplantados.	68
Figura 17. Análise da curva ROC para o score de HLAs dos pacientes transplantados	68
Figura 18. Correlação entre produção das citocinas IL-10 (A) e IL-17A (B) pelos linfócitos T CD8+ e o score de HLA.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Vírus da família Herpesviridae.....	22
Tabela 2. Lista de peptídeos que compõe a biblioteca do HCMV	45
Tabela 3. Informações clínicas dos indivíduos transplantados incluídos no estudo in vitro.	46
Tabela 4. Informações dos participantes do estudo in vitro.....	47
Tabela 5. Análise da frequência dos HLAs presentes no estudo in silico.....	60
Tabela 6. Tabela de informações dos participantes do estudo retrospectivo de caso-controle.	63
Tabela 7. Score dos HLAs elaborado de acordo com o número de interações de intermediária e alta afinidade	65
Tabela 8. Representação da aplicação do score nos pacientes transplantados	67

LISTA DE ABREVIATURAS

ADCC	Citotoxicidade Dependente de Anticorpos
ANN	Rede Neural Artificial
APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
ELISA	Imunoensaio Enzimático
gB	Glicoproteína B
gH	Glicoproteína H
HCMV	Citomegalovírus Humano
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
IEDB	Immuno Epitope Data Base
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina H
IMPAR	Laboratório de Imunoparasitologia
MBL	Lectina Ligadora de Manose
MHC	Complexo Maior da Histocompatibilidade
PSSMs	Matriz de Pontuação Específica de Posição
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
TCR	Receptor de Linfócito T
TLR	Receptor tipo Toll
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
nM	Nanomolar
EBV	Vírus Epstein-Barr
HBV	Vírus da Hepatite B
CDC	Centro de controle e prevenção de doenças dos EUA
D+	Doador de transplante positivo para sorologia de HCMV
D-	Doador de transplante negativo para sorologia de HCMV
R+	Receptor de transplante positivo para sorologia de HCMV
R-	Receptor de transplante negativo para sorologia de HCMV
MIEP	Major immediate-early promotor
MCMV	Citomegalovírus Murino
IE1	Proteína de fase imediata/inicial do HCMV
SUS	Sistema Único de Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Transplante	14
1.2 A infecção por HCMV	17
1.3 Epidemiologia da infecção por HCMV	18
1.4 A infecção por HCMV no contexto do transplante	20
1.5 Mecanismos da infecção por HCMV	22
1.6 Mecanismos de escape da infecção por HCMV	25
1.7 Características da resposta imune ao HCMV	28
1.8 Papel do HLA na infecção por HCMV	33
2. OBJETIVOS	37
2.1 Objetivos Específicos.....	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 Análise por bioinformática e biblioteca de peptídeos	38
3.2 Recrutamento de voluntários, informações clínicas	40
3.4 Coleta e processamento das amostras.....	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	72
6. REFERÊNCIAS.....	75
7. ANEXOS.....	87

1. INTRODUÇÃO

1.1 Transplante

O transplante é o procedimento destinado à substituição de um órgão ou tecido comprometido funcionalmente por outro saudável. No início do século XX já existiam tentativas de transplante de órgãos não vitais, como por exemplo enxertos de pele. Mas, apenas em 1954, o médico cirurgião Joseph Murray realizou com sucesso o primeiro transplante de rim entre gêmeos idênticos e por essa razão, não houve rejeição (BARKER, 2013). Esse feito só foi possível por meio da observação feita pelo Dr. Murray de que os enxertos de pele realizados entre gêmeos idênticos não apresentavam rejeição (COSIMI, 2006). Esses achados estimularam pesquisas que buscaram entender o motivo pelo qual o mesmo sucesso não era observado em transplantes entre indivíduos não idênticos na expectativa de tornar o transplante uma realidade na medicina (Morris, 2004).

Da inquietação quanto ao fato de haver rejeição entre transplantes de pele entre indivíduos não aparentados, Medawar iniciou seus estudos nos mecanismos envolvidos na rejeição (MEDAWAR, 1944). Ao examinar os enxertos histologicamente, ele descobriu que no início, ambos os autoenxertos e aloenxertos cicatrizaram e ficavam vascularizados, mas alguns dias depois, os aloenxertos eram infiltrados com células imunes e rejeitados logo depois (MEDAWAR, 1945). A descoberta desses densos infiltrados de linfócitos no tecido do aloenxerto inaugurou a era da imunologia celular tendo estabelecido sem dúvida, que a rejeição ao enxerto se tratava de um fenômeno imunológico e que algum antígeno específico, que diferia entre os indivíduos, era a causa da rejeição (MALE, 2021).

Apesar dessas descobertas, a dificuldade de se obter êxito em transplantes entre indivíduos não idênticos e não integrantes da mesma família permaneceu por muitos anos (LAMB, 2000). Mas, avanços importantes ocorreram, como a identificação do sistema ABO e, mais tarde, do sistema HLA/MHC. Nesse sentido, três importantes cientistas fizeram história com suas descobertas na área, George D. Snell, Jean Dausset e Baruj Benacerraf. Com estudos em camundongos isogênicos, o geneticista norte-americano George Snell demonstrou que genes distintos dentro de um locus específico chamado de complexo principal de histocompatibilidade (MHC) eram os responsáveis pela rejeição de transplantes (GORER, LYMAN & SNELL, 1948). De forma independente, Baruj Benacerraf também demonstrou que o controle

genético da atividade imunológica associada à rejeição era associado a um complexo de genes de resposta imune denominado à época como IR (Immune Response genes), ou seja, o MHC (BENACERRAF & GERMAIN, 1978). Já o clínico francês, Jean Dausset fez seus estudos em análises familiares e descobriu o HLA (antígeno leucocitário humano), molécula análoga ao H-2, ou MHC, no camundongo. Por suas contribuições à ciência do transplante, em 1980, os Drs. Snell, Dausset e Benacerraf receberam o Prêmio Nobel, “por suas descobertas sobre estruturas geneticamente determinadas na superfície celular que regulam as respostas imunológicas” (COSIMI, 2006).

Vale ressaltar que o trabalho de Benacerraf forneceu as principais pistas para que fosse descoberto que o HLA não estaria apenas envolvido na rejeição a transplantes, mas seria fundamental para própria ativação dos linfócitos por qualquer antígeno. Conforme mais descobertas realizadas adiante por Peter Doherty e Rolf Zinkernagel, o reconhecimento de qualquer tipo de antígeno que é feito pelas células T é restrito ao próprio MHC do indivíduo. Em outras palavras, a ativação das células T é determinada pelo MHC próprio acoplado com o antígeno estranho e expostos na superfície celular (ZINKERNAGEL & DOHERTY, 1979). Devido ao HLA desempenhar um papel importante na regulação da função imunológica, na determinação do próprio e do não-próprio, a tipagem do HLA é de extrema importância, não só para o transplante de órgãos sólidos e de células-tronco hematopoiéticas, como na medicina transfusional como um todo (MADDEN; CHABOT RICHARDS, 2019). A tipificação dos HLAs do doador, aquele que doa um órgão ou tecido no transplante, e do receptor, aquele que recebe, avalia o grau de incompatibilidade entre eles. Isso porque a maioria das rejeições de transplante são mediadas por anticorpos direcionados contra antígenos HLA do doador, expressos na superfície das células do órgão transplantado e que não pertencem ao receptor (GARCES et al, 2017). Com isso, o conhecimento dos tipos de HLA do doador e receptor é necessário para monitorar o desenvolvimento de anticorpos anti-HLAs específicos do doador e rejeição mediada por anticorpos pós-transplante (MADDEN; CHABOT RICHARDS, 2019).

Embora essas descobertas preparassem o caminho para que o transplante se tornasse uma realidade na medicina, o problema da rejeição aos transplantes começou a ser contornado a partir do final da década de 1950 início de 1960, com o desenvolvimento dos imunossupressores (MALE, 2021). Estudos iniciais descreveram o efeito dos corticosteróides e anticorpos contra linfócitos em prolongar

os enxertos, abordagens que ainda estão em uso clínico até hoje. (BILLINGHAM, KROHN, & MEDAWAR, 1951; LEVEY & MEDAWAR, 1967 E MALKOVSKÝ et al., 1986).

Os corticosteroides são anti-inflamatórios e bloqueiam a produção de citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo IL-1 e IL-6, pelas APCs e são usados principalmente para prevenir a rejeição aguda, mas o seu uso possui muitos efeitos colaterais como hipertensão, úlceras, diabetes, cataratas e susceptibilidade a infecções (COSTA, H et al. 2002). Por ter efeitos em células importantes para a resposta do indivíduo de uma maneira geral, geralmente são administrados logo após o transplante para prevenir a rejeição aguda, ou uma rejeição estabelecida (COSTA, H et al. 2002).

A ciclosporina foi o primeiro composto a inibir os linfócitos de forma específica e reversível. Os responsáveis por sua descoberta foram Jean Borel e colaboradores na década de 1970 (GARCIA, et al., 2004). Consiste em um polipeptídeo cíclico derivado de um fungo encontrado na Noruega, seu mecanismo interfere nos eventos dependentes de cálcio que possibilitam a ligação do antígeno ao receptor de linfócito T (TCR) e também impedem a transcrição do gene IL-2 (COSTA, et al. 2002; GARCIA, et al., 2004). Com sua capacidade supressora confirmada, a ciclosporina foi a primeira droga isolada capaz de controlar a rejeição. Cabe ressaltar que, em pacientes transplantados, a monitorização constante da taxa de concentração plasmática das drogas imunossupressoras é imprescindível para que se mantenham níveis adequados para evitar a rejeição e, ao mesmo tempo, abaixo do limite de toxicidade, para que não haja complicações como nefrotoxicidade (VERLEDEN, et al., 2002).

Na década de 1980, o transplante de órgãos sólidos entrou na era da ciclosporina com os primeiros resultados positivos no transplante de coração. Desse período em diante, os imunossupressores começaram a evoluir, apresentando maior especificidade e menores efeitos colaterais. Esses avanços possibilitaram aumento no número de transplantes e, mesmo com novos exames e critérios desenvolvidos para melhorar o procedimento, o risco de rejeição ainda permanece uma realidade para os pacientes transplantados (SCHAFER, 2001).

Em pacientes transplantados, a administração dos imunossupressores diminui as chances de rejeição. No entanto, o tratamento atinge o sistema imunológico como um todo, aumentando a susceptibilidade às infecções, as quais podem diminuir o sucesso do transplante (FISHMAN, 2010). Essas infecções podem ser novas,

adquiridas pós-transplante, ou ainda podem ser reativação de infecções latentes, como no caso das infecções virais causadas pelo citomegalovírus humano (HCMV), vírus Epstein-Barr (EBV), poliomavírus BK, vírus da hepatite B (HBV) e vírus da hepatite C (HCV) (FISHMAN, 2010). Das infecções oportunistas nos transplantados, o HCMV é uma das mais importantes. O HCMV é um adenovírus comumente encontrado em indivíduos de todas as idades, mas pouco conhecido, provavelmente por não causar sintomas graves na população imunocompetente (CANNON, 2010). Entretanto, em indivíduos imunocomprometidos o vírus pode provocar consequências graves (CANNON, 2010).

1.2 A infecção por HCMV

A transmissão do HCMV ocorre pelo contato com fluídos biológicos infectados, ou seja, contato direto ou íntimo, via placenta e em procedimentos como transplante de órgãos ou medula e transfusão de sangue (GRANATO, 2001). A infecção pelo HCMV na população imunocompetente na maioria das vezes não manifesta sintomas, e quando presentes os sintomas são leves, como febre, tosse e fadiga e, em casos raros há presença de sinais como linfadenopatias, síndrome da mononucleose infecciosa e linfocitose periférica (AAPC, 2015). Pode-se classificar a infecção pelo HCMV em três diferentes formas clínicas: infecção, quando é possível detectar o vírus no sangue e não necessariamente acompanhado de sintomas; infecção “recorrente”, quando há episódios de reativação do vírus latente e presença de sintomas leves; e a doença por HCMV em que há detecção do vírus no sangue e em tecidos somado a sinais e sintomas clínicos avançados como febre alta, dor de cabeça, dor muscular, dor de garganta, náuseas, dor abdominal, dificuldade em se alimentar e aparecimento de úlceras no aparelho digestivo (Manandhar, et al., 2019). Em indivíduos imunocomprometidos como grávidas, portadores de HIV e receptores de transplantes, a infecção pode ser ainda mais grave e comprometer o funcionamento de diversos órgãos como fígado, baço, provocar coriorretinite e afetar o sistema nervoso central causando mielite e encefalite (LENG, 2020; GOKÇE, 2020; KAMINSKI, et al. 2016; ROMAN, 2014).

No caso de infecção na gestação, o risco maior é da criança, a infecção congênita por HCMV que contribui para o desenvolvimento de malformações congênitas (GOKÇE, 2020). De acordo com o CMV Resource center do Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA (CDC, 2016), de 1 a cada 5 bebês com

infecção congênita por HCMV ao nascer pode apresentar alguns sintomas como erupção cutânea, icterícia, microcefalia, perda de peso, hepatoesplenomegalia e retinite. Além disso, podem apresentar problemas de saúde a longo prazo, como por exemplo a perda da audição, atraso no desenvolvimento motor, perda de visão e convulsão.

Em indivíduos portadores de HIV, a infecção por HCMV pode se estabelecer de forma grave e causar uma inflamação sistêmica, que facilita a progressão da doença por HIV (ADLAND, et al. 2015). Estudos *in vitro* sugerem que a infecção por HCMV pode favorecer a entrada do HIV em células CD4+, por meio do aumento da presença do CCR5, principal correceptor do HIV e, por isso, contribuir com a disseminação do próprio vírus HIV pelo corpo (JOHNSON, et al. 2014). Além disso, a infecção por HCMV provoca a indução de citocinas pró-inflamatórias como IL-2, IL-6 e TNF- α , que contribuem com a reativação e replicação do HIV latente nas células (OSBORN, et al. 1989).

1.3 Epidemiologia da infecção por HCMV

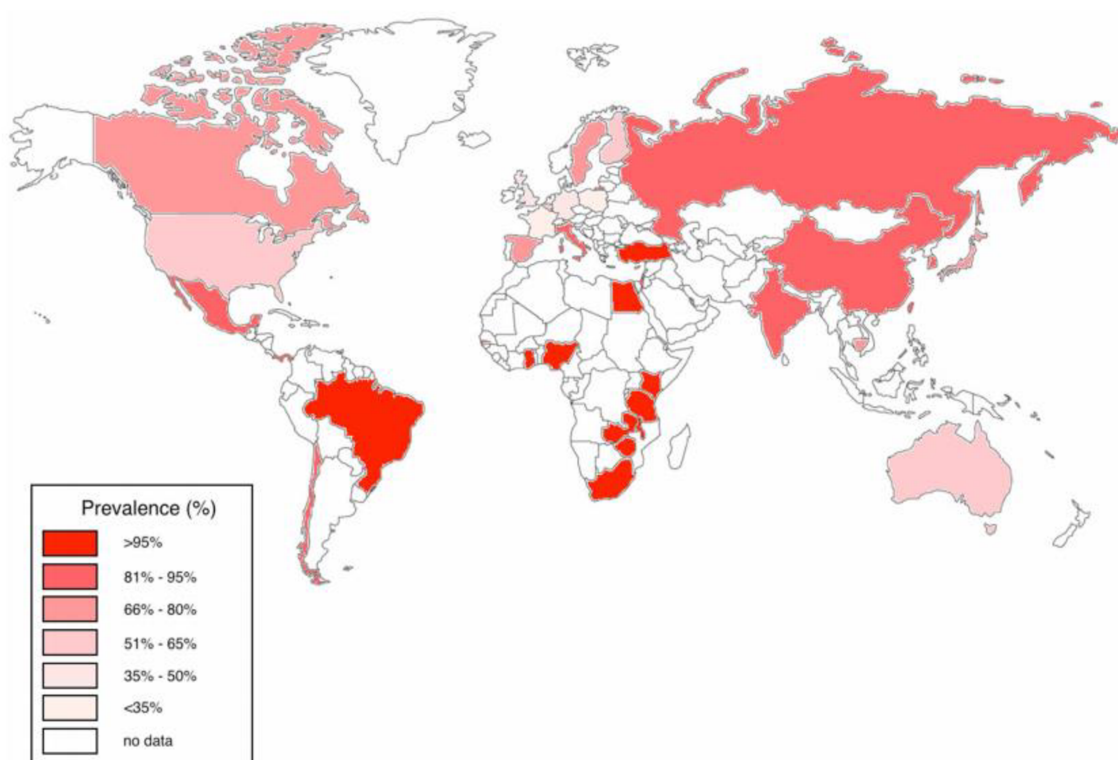


Figura 1. Dados de soroprevalência do HCMV no mundo com estudos realizados entre 2003-2015. (Adland et. al – 2015)

Um estudo realizado em 2015, conduzido por Adland et.al (Figura 1), reúne dados mundiais publicados entre 2005-2015 sobre a soroprevalência do HCMV em adultos entre 16-50 anos em diversos países. Esse estudo demonstrou que nos EUA, Austrália e Europa a soroprevalência do vírus está entre 36-77%, em contrapartida, em países em desenvolvimento, como Brasil e África do Sul, a prevalência se aproxima de 100% nos adultos (ADLAND, et al. 2015).

No continente europeu, um estudo conduzido na Alemanha estimou que a soroprevalência do HCMV na população adulta é em torno de 56,7% (LANCHMANN, et al, 2018). Já os indivíduos entre 70-79 anos apresentaram uma soroprevalência maior (63,7% homens e 77,6% mulheres), quando comparado com adultos entre 18-29 anos (31,8% homens e 44,1% mulheres). Esta soroprevalência encontrada na Alemanha é semelhante a encontrada nas populações de países como a França (ANTONA, et al, 2010) e a Noruega (KORNDEWAL, et al, 2015). No entanto, foi observado uma soroprevalência de 77% nas populações dos países como Portugal (LOPO, et al, 2011), Croácia (VILIBIC-CAVLEK, 2016), e 83% na Suécia (OLSSON, 2017).

Em relação aos indivíduos portadores de HIV, uma coorte conduzida no oeste da África mostrou uma maior prevalência de HCMV em indivíduos positivos para HIV (HIV+), quando comparado com controles HIV negativos (HIV-) (COMPSTON et al.,2009). Foi levantada a possibilidade de que a imunossupressão causada na infecção por HIV seja um fator de risco direto para infecção por HCMV, em estudos realizados por Viljoen e colaboradores em 2015, foi observado que a imunossupressão quando presente nos indivíduos soropositivos favorece a reativação do HCMV (Viljoen, et al., 2015).

Em 2011 nos EUA, o mês de junho foi estabelecido como mês da conscientização do HCMV, com campanhas para grávidas, familiares e profissionais da saúde visando reduzir o número de infecções. Nestas campanhas são abordadas as formas de prevenção a infecção como hábitos de higiene e evitar contato com fluidos biológicos de pessoa contaminadas (CDC, 2011). Semelhante aos EUA, o Reino Unido possui um programa do governo chamado “CMV action” que busca conscientizar a população por meio da apresentação de dados anuais da evolução em tratamentos e medidas de prevenção (CMV action, 2019). No Brasil até o momento não há nenhum projeto de conscientização acerca desta doença.

A maioria dos estudos de soroprevalência do Brasil são direcionados para grupos de imunocomprometidos, como gestantes e transplantados (GARCIA, et al, 2018; SPANO, et al, 2002; SPANO, et al 2004). Um estudo que abrange populações de gestantes e puérperas de 23 estados brasileiros foram compilados e apontaram que grande parte destas mulheres estudadas (>75%) apresentavam sorologia positiva para o HCMV (SERRA, 2009). Um estudo com indivíduos transplantados realizado no Hospital Israelita Albert Einstein, avaliou que em 209 transplantados de rim, apenas 11,5% eram IgG negativos (IgG-) para HCMV antes do transplante. A prevalência de reativação do HCMV no pós-transplante entre estes pacientes foi de 63,4%, e dentro desta porcentagem, 43,7% tiveram infecção com sintomas leves e 52,3% doença grave (sendo 9,3% doença invasiva) (MOURA, et al, 2015). Outro estudo por Kuo, et al. (2010), estudou a sorologia em mais de 20 mil pares de receptores (R) e doadores (D) renais quanto a presença de IgG: D+/R+= 47,7%; D-/R+= 24,1%, D+/R-= 18,2%, D-/R-= 10,3% (KUO, et al. 2010). Apesar de haver trabalhos que descrevem dados epidemiológicos de HCMV no contexto de transplantes, faltam estudos para entender o quanto a infecção por HCMV pode impactar o indivíduo e quais os fatores de risco associados a diferentes apresentações clínicas. Por exemplo, se a reativação do vírus permanece constante, o que determina a evolução leve ou grave, ou se em infecções mais graves as sequelas permanecem, para que se possa avaliar o impacto do vírus na sobrevida do enxerto a longo prazo (MANICKLAL, 2013).

1.4 A infecção por HCMV no contexto do transplante

Em pacientes transplantados, o HCMV é um dos maiores causadores de infecções oportunistas pós-operatórias. Pode causar sintomas locais e sistêmicos e trazer efeitos diretos e indiretos ao enxerto. Os sintomas da infecção podem variar desde os sintomas comuns (febre, tosse e fadiga) até acometer órgãos específicos causando, por exemplo, retinite nos olhos, inchaço do baço, encefalite no sistema nervoso central e oclusão nos alvéolos pulmonares (KAYE, 2021). Embora os sinais mais comuns sejam viremia e neutropenia, apresentações mais preocupantes podem ocorrer como a presença da inflamação nos tecidos e enxerto (colite, retinite), o que pode aumentar a predisposição a outras infecções e a efeitos crônicos como a vasculopatia coronária acelerada, provocando estreitamento do lúmen arterial, consequência do infiltrado de células inflamatórias que levam ao aumento da espessura das artérias (FISHMAN, et al. 2007; RICHARDSON, et al. 1981). Além

disso, alguns estudos destacam que a presença da viremia em pacientes transplantados pode estar relacionada com a diminuição na função do enxerto a longo prazo. Por isso, nesses casos, a monitorização da viremia através do “tratamento preemptivo” é imprescindível. O tratamento preemptivo consiste no monitoramento da carga viral no sangue via reação em cadeia da polimerase (PCR), para que, caso seja detectada a replicação viral, o tratamento com drogas antivirais adequadas possa ser iniciado antes mesmo do início de sintomas (MOURA, 2015).

Na infecção por HCMV, os medicamentos mais utilizados para o tratamento são: o ganciclovir, valganciclovir, foscarnet (muito usado no tratamento de trombose na presença da infecção) e cidofovir. Todos eles são antivirais e inibem a atuação da polimerase no processo de replicação viral (SMITH, 2019). Apesar de disponíveis e utilizados na clínica, esses inibidores apresentam alta toxicidade hematopoiética e baixa biodisponibilidade, o que restringe o uso em grávidas e recém-nascidos com infecção congênita, por isso, o tratamento varia de acordo com a condição clínica de cada paciente (LJUNGMAN, 2011).

Em 2019 o Food and Drug Administration (FDA) aprovou o uso profilático do Letemovir, um inibidor da terminase do HCMV, proteína importante na maturação do DNA do vírus no capsídeo. Porém, mesmo com o tratamento profilático, 38% dos pacientes após o transplante desenvolveram infecção pelo HCMV. Mas, uma boa estratégia tem sido combinar os inibidores da polimerase já existentes, com o Letemovir, no tratamento da infecção (LIGAT, 2018; KANO, 2000).

1.5 Mecanismos da infecção por HCMV

O HCMV pertence à família *Herpesviridae*, onde estão incluídos também os vírus Epstein-Barr, Herpes Simplex e Varicela Zoster (Tabela 1). Como representado na Figura 2, sua estrutura é composta por um envelope e suas proteínas, tegumentos internos e externos e um nucleocapsídeo icosaédrico que protege o material genético do vírus. O genoma do HCMV possui aproximadamente 240 kpb com duas regiões principais ao longo do DNA: os *unique short segments* (US) e *unique long segments* (UL) responsáveis por codificar os genes que dão origem às proteínas do vírus e que são extremamente importantes para sua replicação e sobrevivência ao infectar as células do hospedeiro (MURPHY, et al, 2008).

Tabela 1. Vírus da família Herpesviridae (Adaptado de DEBPRASAD, 2008)

Vírus	Tipo	Subfamília	Células infect.
Herpes simplex -1 (HSV-1)	HHV-1	Alphaherpesviridae	Células epiteliais e neurônios
Herpes simplex -2 (HSV-2)	HHV-2	Alphaherpesviridae	-
Varicela Zoster (VZV)	HHV-3	Alphaherpesviridae	Células, neurônios , monócitos, células dendríticas, linfócitos T e B
Epstein-Barr (EBV)	HHV-4	Gammaherpesviridae	Linfócitos T e B, células dendríticas, células NK e células musculares
Citomegalovírus (CMV)	HHV-5	Betaherpesviridae	Maior parte das células menos linfócitos, eosinófilos, basófilos e neutrófilos
Roseolovírus	HHV-6	Betaherpesviridae	Células T CD4+, neurônios, fibroblastos, células epiteliais, endoteliais e células dendríticas
Herpes vírus associad ao Sarcoma de Kaposi	HHV-7	Gammaherpesviridae	Linfócitos B, células endoteliais e epiteliais, queratinócitos e fibroblastos

O HCMV não possui um tropismo celular específico, há uma grande variabilidade de células que podem ser infectadas, como os fibroblastos, células endoteliais e epiteliais, e células de linhagem mieloide (DUROSE, et al., 2012). De acordo com o tipo celular, o vírus pode adotar formas de entrada distintas principalmente por intermédio dos complexos de glicoproteínas presentes no seu capsídeo viral,

contendo três principais proteínas: a glicoproteína H (gH), glicoproteína L (gL) e a glicoproteína B (gB) (Figuras 2 e 3). Em fibroblastos, o complexo formado por gH/gL utiliza uma outra proteína associada, a glicoproteína O, que facilita a entrada nessas células (WANG, et al. 2005). De modo distinto, para entrada em células epiteliais, endoteliais, células dendríticas e macrófagos, o vírus utiliza as glicoproteínas gH/gL associadas a proteínas das regiões do gene entre UL128-UL131 (gH/gL/UL128/UL130/UL131), formando um complexo pentamérico de entrada nas células (RYCKMAN, 2008). As diferenças no tropismo celular também podem estar relacionadas a essa variabilidade de glicoproteínas que podem ser expressas pelo vírus, por exemplo, uma proteína codificada pela região UL148 do vírus modula a expressão dos complexos glicoproteicos no capsídeo, assim como deleções ou mutações nessa proteína podem favorecer um complexo em relação a outro, e interferir na capacidade de internalização do vírus (VAN DAMME, 2014).

O tropismo celular variado do vírus também abrange os receptores específicos e inespecíficos presentes nas células-alvo. No caso dos receptores inespecíficos, o proteoglicano sulfato de heparan e a anexina II interagem com as glicoproteínas virais gB/gH mediando a entrada do vírus na célula (COMPTON, 1993) (Figura 3). Receptores específicos como CD209 (DC-SIGN - Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) presente nas células dendríticas e macrófagos (HALARY, et al. 2002) e o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), necessário para processos celulares de adesão, migração proliferação e

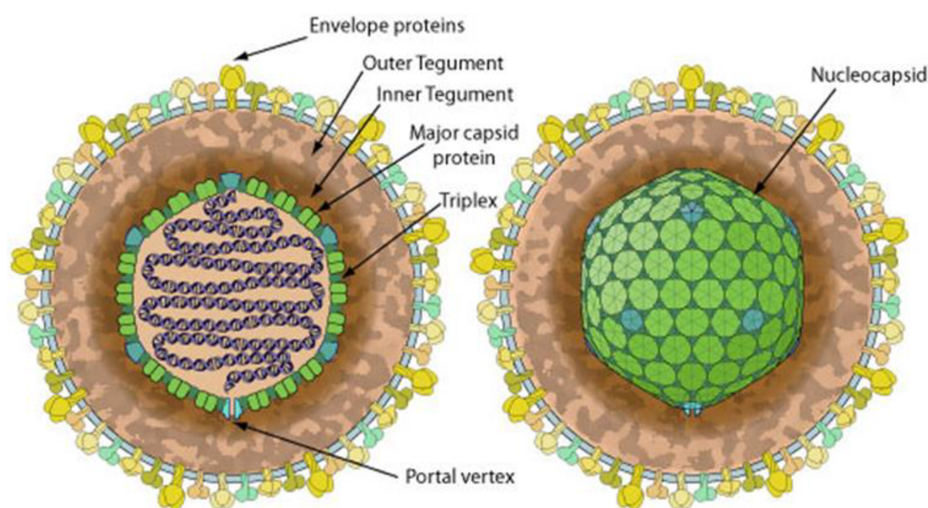


Figura 2. Características estruturais dos Herpesvírus. O HCMV faz parte da família dos herpesvirus. Entre os vírus que constituem essa família é possível observar: o DNA como material genético, presença de envelope de proteínas, camadas de tegumento estrutural e o nucleocapsídeo protegendo o material genético. Adaptado de: Viral Zone, Swiss institute of Bioinformatics, 2017

diferenciação, interagem com a gB do HCMV para a entrada do vírus (WANG, 2003; CHAN, et al. 2009). Outro fator de crescimento importante e envolvido na infecção pelo vírus é o receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas alfa (PDGFR α), que possibilita a entrada do vírus por vias alternativas (Figura 3), que não necessitam da interação com as glicoproteínas e condições de pH adequadas (VANARSDALL, et al. 2012). A metaloprotease CD13 também participa do processo de infecção do HCMV aumentando a interação do vírus com fibroblastos, monócitos CD14⁺ e linfócitos TCD8⁺ (SODEBERG, et al. 1993). Além de receptores de glicoproteínas, o HCMV possui uma proteína codificada pela região US9, que possibilita a disseminação do vírus através do contato célula-célula entre células epiteliais. (MAIDJI, et al., 1998).

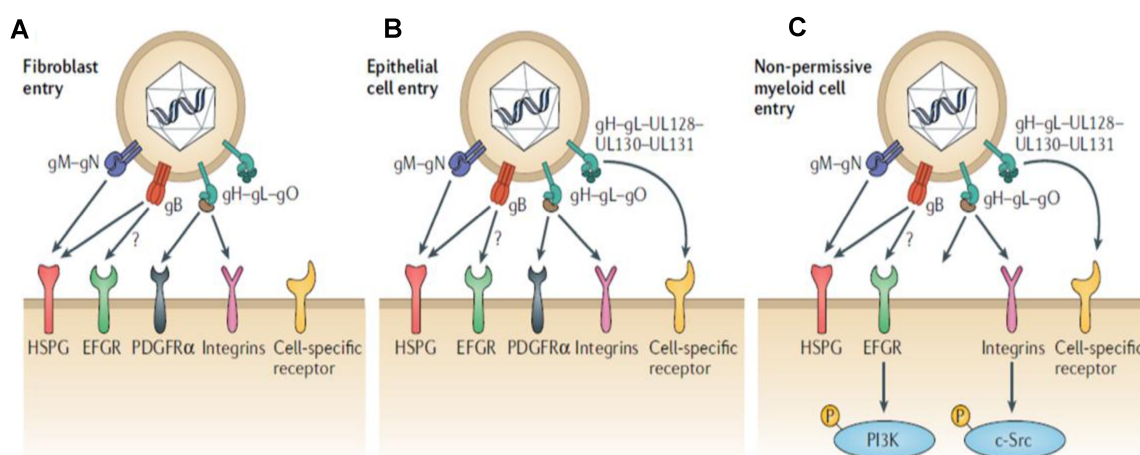


Figura 3. Visão geral da entrada do HCMV nas células-alvo. Complexos das glicoproteínas do HCMV que interagem com os receptores dos fibroblastos (A), células epiteliais (B) e células mielóides (C) de maneiras distintas. Nos fibroblastos as glicoproteínas H, L e O (gH, gL e gO) formam um trímero e se ligam ao fator de crescimento derivado de plaquetas-alfa (PDGFR α) e seus co-receptores. Em células epiteliais gH e gL formam um complexo com 3 outras proteínas UL128, UL130 e UL131 e se ligam a receptores específicos. Em células mielóides a ativação do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) é necessária para o transporte do DNA viral para o núcleo. Adaptado de GRIFFITHS & REEVES, 2021.

O processo de transcrição dos genes do HCMV descritos na literatura baseia-se preferencialmente na infecção em fibroblastos, a regulação do transcriptoma em outras linhagens celulares não são tão conhecidas (KAMINSKI, et al. 2016). Após a entrada do HCMV na célula, ocorre uma cascata de expressão dos genes, divididos entre fases: genes “imediatos”, genes de fase inicial e genes da fase tardia. Os imediatos (IE1 e IE2), atuam como iniciadores da replicação com o auxílio de outras proteínas e componentes do tegumento viral e influenciam no ambiente celular para favorecer a síntese de DNA. Os genes das fases “inicial” e “tardia” são dependentes

da síntese do genoma do vírus, e são responsáveis pela transcrição de genes associados a formação e transporte dos vírions para o citoplasma e continuação da maturação (COLBERG, 1996). A composição dos vírions também depende do tipo de célula infectada pelo HCMV, mas todos conservam a presença das proteínas do capsídeo, tegumento e envelope viral (KAMINSKI, et al. 2016).

Durante esse processo de replicação, o vírus utiliza mecanismos reguladores para modular a transcrição viral, que envolvem tanto fatores celulares quanto virais, através da região “*major immediate-early promoter*” (MIEP) que contém motivos de ligação para fatores de transcrição de ativação (AP-1, NFkB) e repressão (SBP, PDX1) celular (REEVES, et al. 2009). A atividade ou inibição dessa região MIEP é dependente da atividade da cromatina e de modificações em histonas, além de ser controlada por algumas proteínas do tegumento viral (UL82) e a proteína pp65 (UL83), conhecida como imunomoduladora, e que também atua na atividade transcricional do MIEP. Além disso, a replicação ou latência viral depende de fatores de transcrição e modulações estabelecidas pelas células do hospedeiro (MANANDHAR, et al. 2019).

Após a entrada na célula e infecção primária, o vírus pode permanecer em latência nas células endoteliais e células progenitoras mielóides. Na presença de citocinas pró-inflamatórias como TNF e IFN γ , proveniente da resposta inflamatória, como por exemplo uma nova infecção ou lesão tecidual, pode ocorrer a reativação do HCMV latente (SODEBERG, 1997). O mecanismo usado para reativação do HCMV ocorre principalmente pela atividade do fator de transcrição NF-kB e AP-1, que irão promover a transcrição das citocinas TNF e interferon do tipo II e se ligar na região promotora dos locais mais comuns de integração viral (BENEDICT, et al. 2004). O HCMV é classificado como um vírus oportunista, voltando a se replicar e migrar para os sítios de inflamação para prosseguir com a infecção em condições desfavoráveis ao sistema imune (CAPOSIO, et al. 2007).

1.6 Mecanismos de escape da infecção por HCMV

O HCMV dispõe de mecanismos de evasão do sistema imune, por meio de diversas proteínas. Essas proteínas identificam a presença das citocinas TNF e interferon do tipo 1, interferem no mecanismo de resposta imune do hospedeiro bloqueando interações das células de defesa, diminuindo a proliferação dos linfócitos T, impedindo a atividade fagocítica e migração dos macrófagos e mimetizam ação de quimiocinas e citocinas para subverter a resposta imune (Figura 4) (MILLER-

KITTRELL, 2009). A glicoproteína US2 e US11 promove a degradação dos HLAs de classe I (WIERTZ, 1996), e a glicoproteína US6 inibe o transporte de peptídeos no processamento de antígenos, e alguns outros genes reduzem a citotoxicidade da resposta mediada pelas células em condições normais (JONES, 1996).

Além disso, proteínas virais como a IE1, IE86 e pp65 interferem na imunidade mediada por IFN, diminuindo a expressão de fatores de crescimento estimulantes de interferon (ISGFs) (MILLER-KITTRELL, 2009). A resposta inicial do IFN do tipo 1 ao vírus é desencadeada quando a célula detecta a ligação e entrada viral, resultando em uma indução precoce da síntese e secreção de IFN. Em contrapartida, alguns estudos demonstraram diferentes mecanismos pelos quais a proteína UL83 (pp65) inibe a produção de IFN. A sinalização celular STING e o sensor dsDNA/cGAS foi identificado como um importante mecanismo de defesa celular contra as infecções virais. A interação da pp65 com a cGAS interfere no recrutamento de STING e a consequência disso é a inibição da expressão de IFN. A sinalização STING e a expressão de citocinas antivirais também podem ser inibidas através da interação pp65-IFI16 (proteína 16 indutível por IFN γ induzível de STING) que interfere na oligomerização dessa proteína, impedindo sua função (BIOLATTI, et al., 2018; LI, et al, 2013).

Algumas proteínas (vMIA e vICA) também inibem a apoptose intrínseca e extrínseca, e outras são homologas a receptores de quimiocinas, como a UL144, que estimulam um perfil de resposta Th2 e recrutamento de Tregs, favorecendo um perfil mais anti-inflamatório, com maior chance de sobrevivência do vírus (KAMINSKI, 2016).

Um outro mecanismo de evasão promovido pelo vírus é a diminuição da expressão de moléculas co-estimulatórias na superfície da célula através da produção de moléculas anti-inflamatórias, como a hcmvIL-10, uma proteína viral análoga ao IL-10 do hospedeiro. Essa hcmvIL-10 produzida pelo próprio vírus reduz a inflamação e o recrutamento de células do sistema imune inato (CUNNINGHAM, et al., 2010). Por exemplo, nas células dendríticas, a hcmvIL-10 inibe a apresentação de antígenos; nos macrófagos, interfere na via de sinalização intracelular PI3K / AKT / mTOR importante na regulação do ciclo celular e liberação de citocinas (SPENCER, 2007). Ela ainda diminui a expressão dos receptores CD11b/CD11c importantes na atividade fagocítica (GAFA, et al., 2005) e bloqueia a expressão de receptores de quimiocinas importantes na migração celular, como CCR1 e CCR5 (FRASCAROLI, et al., 2009).

A variação gênica e imunomodulação associada aos diferentes tecidos que o HCMV infecta podem ser também controlados pela presença de alguns microRNAs que foram descobertos recentemente, como o HCMV-miR-UL112-3, que diminui a expressão dos TLR2 nos monócitos e fibroblastos, afetando a via de sinalização do NFkB, e alterando a produção das citocinas IL-6, IL-8 e IL-1b (MANANDHAR, et al., 2019).

Portanto, além das interações com o hospedeiro, a efetividade do sistema imunológico do indivíduo é de grande importância na resposta à infecção. A resposta imune contra o HCMV é composta por algumas proteínas celulares intrínsecas chamadas de fatores de restrição, que são capazes de interferir em pontos de replicação viral, atenuando ou bloqueando a possível infecção quando há invasão de patógenos. Esses fatores podem ser considerados parte da resposta imune e na presença de interferon (IFN) são estimulados a responder contra componentes virais presentes na célula (YAN, et al., 2012). Alguns desses fatores caracterizados e associados à resposta contra a infecção pelo HCMV são a proteína 16 indutora de interferon (IFI16) que inibe a replicação do vírus se ligando ao promotor da polimerase (UL54), a proteína inibidora de vírus, associada ao retículo endoplasmático, induzível

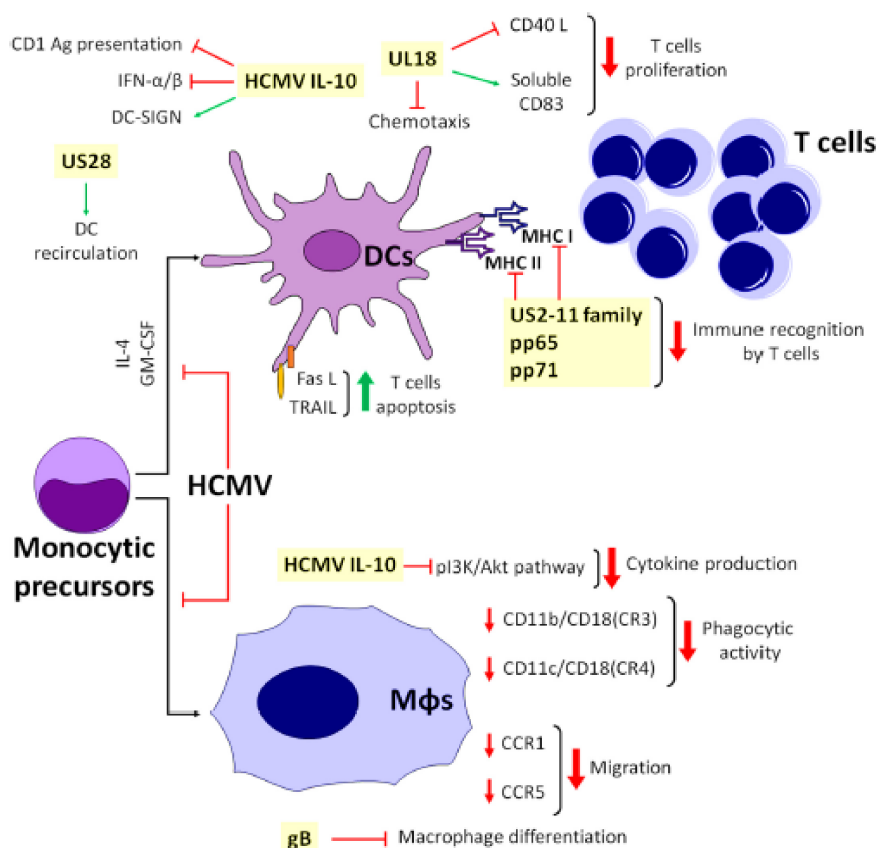


Figura 4. Resumo dos mecanismos de evasão imune do HCMV.
(DELL' OSTE. et al.. 2020)

por interferon (RSAD2 ou Viperin) que atua nas fases mais tardias da replicação viral (BIOLATTI, et al., 2018a; 2016; 2018); a Apolipoproteína B (APOBEC3), importante também na infecção por HIV e que possui um efeito inibitório na replicação viral (PAUTASSO, et al., 2018) e a Galectina 9 (Gal-9), que exerce papel imunomodulador na resposta a outras infecções virais como EBV, MCMV, Influenza, HIV e dengue, atuando como uma lectina antiviral bloqueando a entrada dos vírions em outras células do hospedeiro (MERANI, et al., 2015).

1.7 Características da resposta imune ao HCMV

A entrada e replicação do HCMV nas células alvo permite que ele seja reconhecido por células do sistema imune inato que buscam neutralizá-lo e contribuir com o desenvolvimento da resposta imune adaptativa, através da apresentação de antígeno para os linfócitos (figura 5). Os receptores de reconhecimento padrão tipo Toll 2 (*Toll Like Receptors 2* – TLR2), presentes na superfície das células imune inatas, como as células dendríticas e os macrófagos, são capazes de reconhecer principalmente as glicoproteínas B e H de envelope do HCMV promovendo a fagocitose, autofagia, liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF) e quimiocinas como a CCL2, que favorecem o acúmulo local de células inflamatórias (COMPTON, et al., 2003). Além disso, sensores de DNA citosólico presentes nessas células, como o cGAS, ao detectar a presença DNA viral no citoplasma, interage com a proteína estimuladora de genes de interferon (STING), favorecendo a transcrição de interferon do tipo 1 (IFN-1), via fator de regulação de interferon 3 (IRF3), ativando uma resposta pró-inflamatória com o recrutamento de outras células inatas, como as natural-killer (NKs) (DINER, et al., 2016).

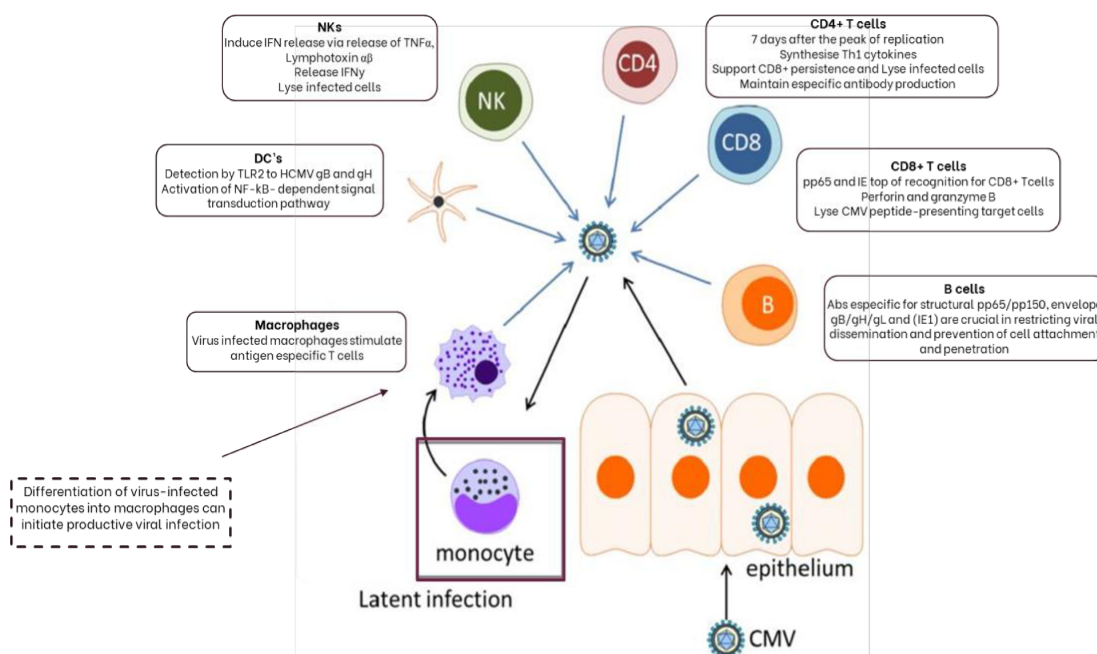


Figura 5. Resumo da atividade das células do sistema imune na resposta ao HCMV (ADLAND, et al., 2015).

As células NK são caracterizadas pela presença dos marcadores CD2, CD16, CD56 e CD57, e ausência dos marcadores CD3 (linfócitos T) e CD19 (células B). Elas são de grande importância na resposta do HCMV devido ao perfil citotóxico que leva à lise de células infectadas e à liberação de citocinas como TNF e IFN γ (IFN do tipo 2), que podem interferir no processo de replicação viral, além de ativar outras células do sistema imune (BROWN, et al. 2008). Entretanto, o papel das células NK no controle do HCMV é controversa. Foi observado em contextos clínicos que a ausência das NKs aumenta a susceptibilidade ao HCMV (BIRON et al; COTTINEAU et al, 2017). Já outro estudo demonstrou que células NKs isoladas do sangue não foram capazes de controlar a replicação *in vitro* do HCMV (CHEN, 2016).

Subsequente à resposta imune inata, há a formação da resposta imune adaptativa. Os linfócitos B produzem anticorpos que neutralizam os vírus interferindo na adesão celular e capacidade de infecção viral. Foram encontrados anticorpos específicos contra diversas proteínas do HCMV, como as proteínas do tegumento viral (pp65 e pp150), gB e gH do envelope, e as proteínas não estruturais IE1 e UL123 (IE-1) (BRITT, et al., 1988). E foi também demonstrado a existência de anticorpos neutralizantes contra o complexo pentamérico (gH/gL/UL128-131), desse modo, tem-se um mecanismo que dificulta, ou neutraliza, a entrada do vírus na célula (WANG; SHENK, 2005^a;2005b).

Os linfócitos T CD8⁺ (LTCD8⁺) são cruciais na resposta contra o vírus. Os linfócitos específicos pra HCMV (LTCD8⁺/HCMV⁺) compõem uma porcentagem significativa do total de LTCD8⁺, e LTCD4⁺, circulantes dos indivíduos soropositivos, estimando-se em até 10% da população da população linfocitária (SYLWESTER, 2005).

Apesar da grande variedade de proteínas do vírus, a maioria dos estudos conduzidos com linfócitos TCD8⁺ são feitos com a pp65 e a UL123 (SYLWESTER, et al., 2005). Os linfócitos específicos para pp65 são detectados pouco depois do desenvolvimento de anticorpos nos pacientes sintomáticos, e o primeiro fenótipo desses linfócitos é de perfil citotóxico caracterizado por CD45RA-CD28-CD27+CCR7- (VAN DE BERG, et al., 2008). O alto potencial citotóxico dos LTCD8⁺ é caracterizado pela expressão de marcadores CD56⁺ e CD57⁺ e pela presença das moléculas efetoras granzima B e perforina (Figura 6). A ausência da expressão de CD45RA significa a troca pela expressão de CD45RO, que é um marcador de memória celular. A diminuição na expressão de CD28 e CD27 indicam um perfil celular que passou por divisões, que pode ser detectado pela expressão de Ki67, mas que continuam produzindo citocinas, o que caracteriza um perfil efetor de LTCD8⁺. Por fim, a ausência da expressão de CCR7 é um indicativo de que essa célula foi ativada e não retornará para os órgãos linfoides (VAN DE BERG, et al., 2008).

Além disso, os LTCD8⁺ possuem fatores de transcrição celular, sendo os mais descritos T-bet, Eomes e Blimp-1. Em LTCD8⁺/HCMV⁺, o T-bet é expresso em altos níveis e Eomes/Blimp-1 em níveis intermediários. Esses fatores de transcrição induzem a produção em grande quantidade de citocinas (IFN γ e TNF- α) e de granzimas B e perforinas (PEARCE et al, 2003; GLIMCHER et al, 2004)). Além disso, o T-bet contribui para manter o estado funcional dos LTCD8⁺, impedindo a exaustão celular e a propagação da infecção por HCMV (HERTOGHS, et al., 2010). A migração de LTCD8⁺ para os sítios de inflamação depende da expressão de receptores de quimiocinas, como o CCR5, e para interação com as células endoteliais os linfócitos expressam o receptor 1 de quimiocina CX3C (CX3CR1) (BUGGERT, et al 2014).

Por meio de estudos, feitos inicialmente com infecção do citomegalovírus em murinos (MCMV), foi observado que o LTCD8⁺/HCMV⁺ tende a aumentar com o passar dos anos, sem a retração de sua população. Esse mecanismo foi denominado “memory inflation” sendo também observado em humanos (KARRER, et al., 2003). Tal fenômeno pode estar relacionado com a reversão do marcador de memória central

(CD45RO) em *naive* (CD45RA) que é observado no HCMV e que não se aplica a todas as infecções virais crônicas como EBV e HIV (DERHOVANESSIAN, et al., 2011; KUIJPERS, et al 2003). No contexto de "memory inflation" é observado um aumento na diversidade do fenótipo dos linfócitos LTCD8/HCMV+ após a resolução da infecção aguda. Os linfócitos T efetores de memória (Tem) ao invés da retração, sofrem expansão em comparação com os demais linfócitos e migram para o sangue e órgãos como fígado e pulmão. Por outro lado, na ausência do fenômeno a presença do Tem é reduzida no baço e em tecidos periféricos até que haja um novo desafio antigênico. (KLENERMAN; OXENIUS, 2016).

A presença de receptores inibitórios como PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3 e CD160, pode modular a diferenciação fenotípica da célula (BLACKBURN, et al., 2009). Por exemplo, durante a fase latente do HCMV, a expressão de PD-1 por LTCD8+ é mais baixa que em outras infecções virais como EBV, HBV, e quando comparado com os receptores inibitórios presentes em linfócitos durante a infecção por HIV, os LTCD8/HCMV+ possuem menor expressão de PD-1, TIM-3 e CD160, o que também pode estar relacionado com a sobrevivência dessas células por mais tempo (HERTOGHS, et al., 2010; SAUCE, et al., 2007; BUGGERT, et al 2014).

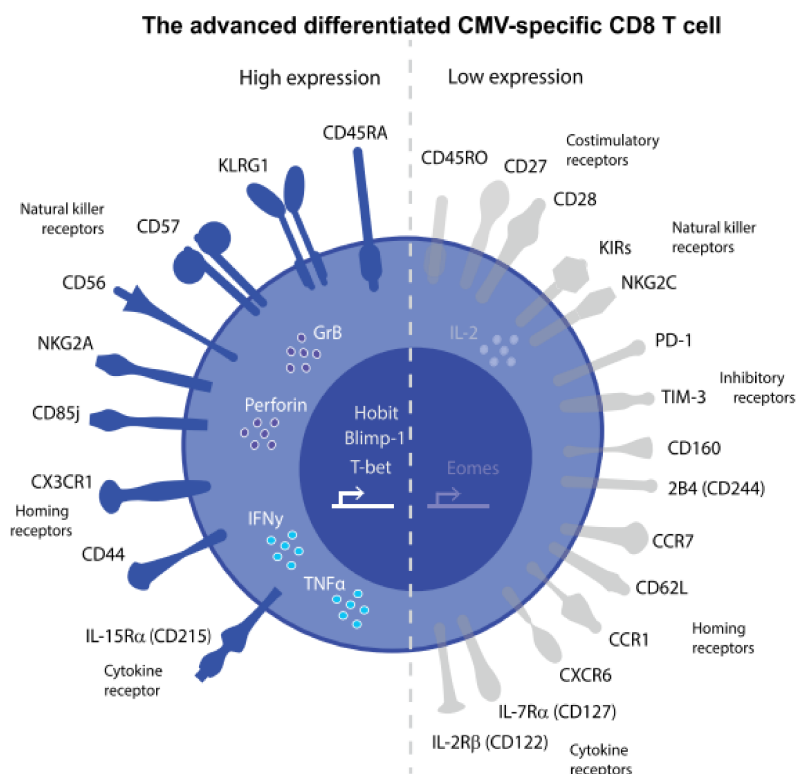


Figura 6. Marcadores da diferenciação de linfócitos TCD8+ específicos para HCMV (LTCD8/HCMV+). Fenótipo de diferenciação avançada específica para LTCD8/CMV+. As células são tipificadas por expressão ou modulação negativa de diferentes receptores de superfície, citocinas, fatores de transcrição, receptores inibitórios e de homing celular. Os receptores de superfície que são expressos, estão representados em azul no lado esquerdo da célula, enquanto receptores de superfície modulados ou não expressos estão representados em cinza no lado direito da célula (VAN DEN BERG SPH, et. al 2019).

Já os linfócitos LTDC4+ específicos para HCMV (LTCD4/HCMV+) não possuem tanta diversidade populacional em comparação com os LTCD8/HCMV+ e não fazem parte do fenômeno de “memory inflation”, mas isso não diminui a importância da presença deles na resolução da infecção (EINSELE, et al., 2002). Essas células respondem às mesmas proteínas virais que o linfócito LTCD8/HCMV+, principalmente a gB, gH e pp65, mas outras já foram identificadas, como a IE-1 (KERN, et al., 2002). No 7º dia, pico da infecção, essas células começam a produzir citocinas como TNF, IFNγ e IL-2. De forma geral, os LTCD4/HCMV+ auxiliam na manutenção e mecanismo efetor dos linfócitos LTCD8/HCMV+ e na produção dos anticorpos (RENTENAAR, et al., 200).

Uma característica interessante dos LTCD4/HCMV+ é a ausência do receptor co-estimulatório CD28, o que geralmente não é visto na maioria dos LTCD4+ (Lim, EY, et al., 2020). A especificidade e característica dos LTCD4+CD28- varia entre os indivíduos, mas é sugerido que a presença desse fenótipo está relacionada a

infecções virais crônicas (APPAY, 2002; TOVAR-SALAZAR, et al., 2010). Esse fenótipo foi encontrado no sangue periférico dos indivíduos positivos para HCMV (FLETCHER, et al., 2005) e foi observado *ex vivo* que os LTCD4/HCMV+CD28-específicos para glicoproteína B tem a capacidade de proliferar, secretar IFN γ e expressar granzima B e, portanto, essas células exercerem atividades citotóxicas (VAN LEEUWEN, et al., 2004;2006).

Como descrito acima, tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa tem suas contribuições para a resolução da infecção por HCMV. E para a ativação adequada dos linfócitos T é necessário que o receptor de linfócito T (TCR) reconheça o antígeno do HCMV apresentado via moléculas do antígeno leucocitário humano (HLA) presente em células apresentadoras de antígenos (DELVES, 2018).

1.8 Papel do HLA na infecção por HCMV

As moléculas do HLA são codificadas pela região mais variável do genoma humano, conhecido como HLA, mas também denominado complexo principal de histocompatibilidade (MHC) em camundongos. O HLA está localizado no braço curto do cromossomo 6 (figura 7), entre as regiões compreendidas por esse complexo estão divididos os HLAs de Classe I que codificam três cadeias pesadas distintas: HLA-A, HLA-B e HLA-C. As moléculas de HLA-I são expressas constitutivamente em todas as células nucleadas presentes no corpo e são responsáveis por expor peptídeos de proteínas que são processadas no interior das células (NATURE, 2009).

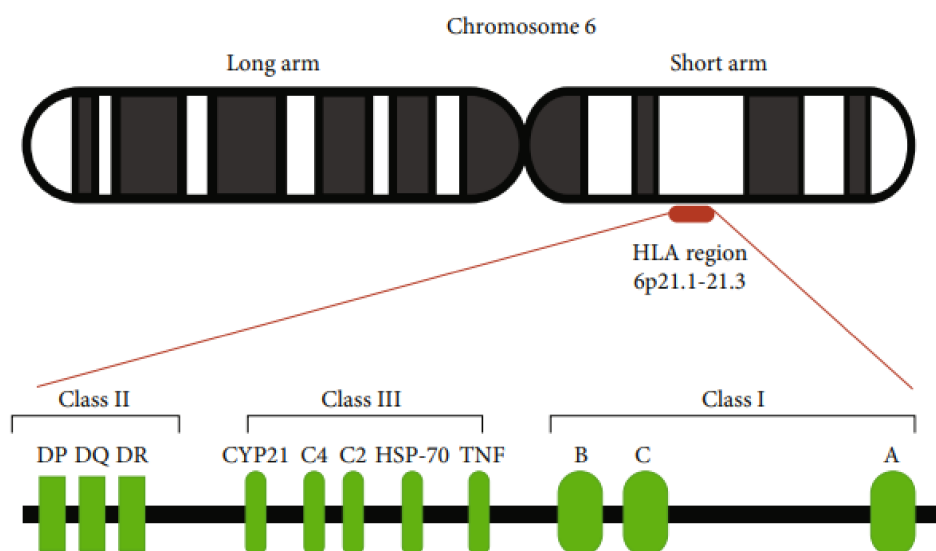


Figura 7. Representação do locus HLA no braço curto do cromossomo 6 (MEDHASI, et al., 2022).

A expressão desses genes é regulada por moléculas trans ativadoras de classe I (CITA) e o fator de transcrição NFkB que em conjunto com vários outros genes também ajustam a função e produção dessas moléculas nas células e tecidos (MEISSNER, et al., 2012). Como a expressão dos HLAs é codominante, cada indivíduo é capaz de expressar os 2 alelos de cada HLAs-A, B e C na superfície celular, de acordo com sua hereditariedade genética. Com isso a diversidade de combinações entre esses alelos é imensa tornando possível uma maior variabilidade de interações com os diversos peptídeos a serem apresentados (MESTER; HOFFMAN, 2011).

O processamento de antígenos para o MHC de classe I se inicia pela ação de complexos enzimáticos intracelulares chamados proteassomos, responsáveis por fragmentar proteína sem citoplasmáticas em peptídeos que posteriormente serão transportados ao retículo endoplasmático pelas proteínas associadas ao processamento (TAP 1 e TAP 2). No retículo endoplasmático o peptídeo se encaixa na fenda de ligação, presente na superfície do HLA que está sendo sintetizado.

A estrutura do HLA de classe I é um heterodímero, similar ao formato de uma taça, que fica ancorada na superfície das células nucleadas, compostas pela cadeia $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$ e a cadeia invariante $\beta 2$ -microglobulina que confere estabilidade à estrutura da molécula para se fixar na membrana celular (Figura 8) (BJORLMAN, et al., 1987). A parte superior do HLA (formada pelos domínios $\alpha 1$ e $\alpha 2$) forma uma fenda

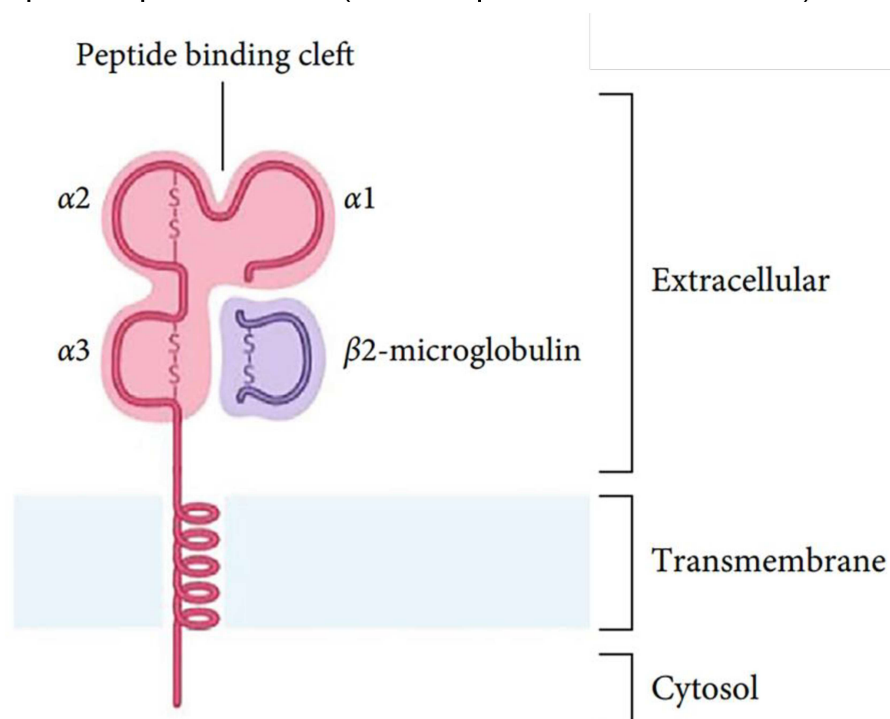


Figura 8. Estrutura da molécula de HLA de classe I (MEDHASI, et al., 2022).

constituída por aminoácidos que criam um padrão em cada alelo, essa fenda é o local de encaixe dos peptídeos próprios e não próprios processados pela célula. O HLA torna-se estável com a presença desse peptídeo. Os peptídeos serão transportados para a membrana celular para apresentação aos linfócitos TCD8+, através da interação com o receptor de linfócitos T (TCR) (EREN; TRAVERS, 2000). Os peptídeos processados precisam se ligar fielmente a poucos aminoácidos da fenda, chamados de resíduos âncora, o que permite grande repertório de apresentação de antígeno (HAMMER, et al., 1994).

Além da importância do HLA na apresentação de antígenos virais, ele tem papel central na rejeição de órgãos transplantados. Devido ao grande polimorfismo dos loci do HLA, que também é etnicamente estratificado, encontrar doadores compatíveis para todos os HLAs é muito difícil, realidade que vem mudando por meio da tipagem do HLA e da criação de bancos de doadores (RUBINSTEIN; HILLYER, 2012).

Em pacientes imunossuprimidos, a infecção por HCMV pode provocar efeitos relacionados ou não ao sistema imune, que podem interferir na integração do enxerto ao paciente. Os efeitos relacionados ao sistema imune são a presença de anticorpos anti-HCMV de uma infecção prévia que podem reagir com antígenos virais expressos na membrana das células do enxerto transplantado. Além disso, citocinas como IFN γ e TNF possuem sabidamente uma função antiviral, promovendo a diferenciação de monócitos em macrófagos com o objetivo de resolver a infecção. Por outro lado, os mecanismos de ativação de monócitos infectados com HCMV na forma latente irão promover a reativação viral (SODEBERG, 1997).

Outros efeitos do HCMC não relacionados ao sistema imune são a ativação de vias angiogênicas, proliferativas e pró-coagulantes. Por exemplo, uma grande quantidade de proteínas estimuladas pelo HCMV em fibroblastos e células endoteliais é capaz de modificar o ambiente extracelular: fatores de crescimento como o TGF- β , citocinas (IL-6, IL-5, IL-1 β e outras) e quimiocinas, proteínas do remodelamento da matriz extracelular como as metaloproteinases (MMPs 1, 2, 3 e outras), catepsinas (B, D, F e outras) e diversos outros fatores de reparo e angiogênese (DUMORTIER, 2008; FOLKMAN, 2003). A indução desses fatores durante uma infecção por HCMV após o transplante promove a permanência do vírus, favorece a proliferação e migração das células para o sítio de infecção, causando acúmulo celular e consequentemente a obstrução dos vasos, prejudicando a sobrevida do enxerto (STREBLOW, et al., 2008).

O desenvolvimento de vacina contra o HCMV ainda é um desafio. Entretanto, devido à possibilidade de resistência medicamentosa às drogas já existentes para tratamento, a vacina seria uma boa alternativa na diminuição da morbimortalidade causada pelo vírus. Porém, protocolos de vacinação são muito limitados para os indivíduos imunocomprometidos, o que dificultaria adotá-los como estratégia profilática (GUY EL HELOU; RAZONABLE, 2019). Os estudos de criação da vacina para o HCMV desenvolvidos até hoje são da construção e modelagem de multiepítopos de alta afinidade através da imunoinformática para reconhecimento por linfócitos TCD4+, TCD8+ e linfócitos B, mas ainda sem um produto efetivo (VARUN CHAUHAN; MINI P SINGH, 2020).

A imunoinformática, que combina imunologia experimental e ciência da computação (TOMAR; DEY, 2018), tem crescido muito nos últimos anos e novas ferramentas fornecem à comunidade científica métodos de investigação nos mais variados campos da ciência. Recentemente, estudos do mecanismo de apresentação e identificação dos epítopos imunogênicos de determinados microrganismos trouxeram para o campo da pesquisa novas possibilidades de estudo das infecções e busca de alvos terapêuticos. Investigar os epítopos do HCMV que são mais reconhecidos pelos linfócitos T pode auxiliar no entendimento da dinâmica entre o sistema imunológico e o vírus e, identificar melhores estratégias de manejo clínico e terapêutico para auxiliar no combate a infecção na forma grave em pacientes imunossuprimidos (SLYKER, et al., 2009).

No contexto de processamento e apresentação de antígenos, há muitos programas e bancos de dados que auxiliam no estudo de cada uma das etapas. Os estudos no desenvolvimento de imunoterapias baseadas em peptídeos utilizam a imunoinformática em diferentes pesquisas contra doenças infecciosas como hepatite C, Herpes Simplex, Zika, Dengue, HIV e outras (CHAUHAN, et al., 2018; CHAUHAN, et al., 2018; ALAM et al., 2016; ALI et al., 2017; PANDEY et al., 2018). Descobrir a afinidade de ligação entre o repertório de HLA's do indivíduo e os peptídeos que serão apresentados ao TCR pode auxiliar por exemplo no desenvolvimento de vacinas cada vez mais precisas e medicamentos mais eficazes.

Atualmente existem várias técnicas computacionais sendo utilizadas, como rede neural artificial (ANN), modelos ocultos de Markov, matrizes de pontuações específicas (PSSMs) e amostragem de Gibbs. O modelo de rede neural artificial (ANN) têm a função de calcular relação entre variáveis e auxilia na resposta à diversas

perguntas biológicas, no entendimento sobre células, moléculas, vias regulatórias e mecanismos de feedback fisiológicos. Diversas são as organizações que utilizam este modelo, como por exemplo o Immuno Epitope Database (IEDB) que conta com ferramentas de análise de epítomos, processamento de antígenos, entre outros (RENGANATHAN, 2009).

JUSTIFICATIVA

O Brasil está entre os países que mais realizam transplantes no mundo, ficando atrás apenas do EUA em números absolutos. Ao mesmo tempo, também apresenta umas das maiores taxas de soroprevalência para HCMV. Até o momento, não é totalmente entendido como o vírus atua no sistema imune e altera a resposta ao transplante. Poucos estudos avaliaram as diferenças na resposta imunológica entre pacientes transplantados que evoluíram com desfecho positivo e negativo à infecção por HCMV. Essas informações são cruciais para criação de imunoterapias mais efetivas contra a infecção por HCMV reduzindo a taxa de complicações infecciosas, principalmente quando a condição doador+/receptor- ocorre. Além disso, a diversidade no repertório de HLAs e sua capacidade de influenciar na resposta imune contra o HCMV, principalmente em indivíduos imunossuprimidos, é pouco explorada. O papel dos HLAs pode ser determinante no desfecho clínico favorável do transplante em contexto de infecção por HCMV e se tornar uma importante ferramenta preditiva no futuro. Neste contexto há carência de ensaios experimentais que avaliem o padrão da resposta imune celular específica ao HCMV e caracterizem o perfil de citocinas que são produzidas em indivíduos imunocompetentes e transplantados, considerando seus respectivos repertórios de HLAs. Investigar e compreender as diferenças entre o padrão de resposta imune do hospedeiro ao HCMV associados a cada repertório de HLAs é uma estratégia inovadora que poderá abrir espaço para desenvolvimento de novas abordagens na profilaxia e tratamento desta infecção.

2. OBJETIVOS

Avaliar a resposta imune específica de células T CD8+ e a influência do repertório de HLA classe I nos desfechos clínicos da infecção pelo HCMV pós-transplante.

2.1 Objetivos Específicos

- Elaborar um critério de separação entre infecção leve e grave baseado no histórico clínico dos pacientes
- Avaliar o fenótipo das células T CD8+ quanto a expressão de CD57 e CD107a e produção de citocinas (IFNg, TNF, IL-2, IL-10 e IL-17A), estimulados pela biblioteca de peptídeos nos pacientes recrutados.
- Avaliar se a produção de citocinas, especialmente IFNg, pode prever a evolução do HCMV pós-transplante.
- Criar um score de HLA baseado nos dados obtidos das interações de baixa, intermediária e alta afinidade de ligação entre diferentes alelos e peptídeos de HCMV.
- Realizar um estudo retrospectivo de caso-controle aplicando o valor do score de HLAs nos pacientes transplantados com histórico de infecção por HCMV e avaliar a capacidade do score em prever o desfecho clínico encontrado.
- Verificar a correlação entre as células T CD8+ produtoras das citocinas IFNg, TNF, IL-2, IL-10 e IL-17A e o score de HLA desenvolvido.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto em questão foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CAAE# 77877417.9.1001.5125) e conduzido no Laboratório de Imunoparasitologia (IMPAR) do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) em colaboração com a Unidade de Transplantes do Hospital Felício Rocho.

3.1 Análise por bioinformática e biblioteca de peptídeos

Para avaliação da resposta imune, uma biblioteca de peptídeos com diferentes regiões de 5 proteínas do HCMV consideradas imunogênicas para linfócitos T CD8+ (Sylwester, et al., 2005). As sequências com afinidade alta e intermediária com mais interações com diferentes HLAs de classe I foram escolhidas para comporem a biblioteca. Como as moléculas de HLA interagem com todos os peptídeos que são apresentados aos linfócitos, escolher os peptídeos que mais interagem com os HLAs

pode favorecer uma maior funcionalidade da biblioteca com peptídeos específicos. Os peptídeos foram sintetizados pela Mimotopes (Mulgrave, Australia), com uma pureza de 70%. Os peptídeos da biblioteca foram reconstituídos em DMSO (20mg/mL) e utilizados na concentração final de 2µg/mL em cada ensaio.

3.1.1 Elaboração de um score para avaliação dos HLAs

Para a composição de uma classificação da capacidade dos HLAs interagirem com o HCMV, foram escolhidas 11 proteínas do vírus: UL48, UL55, UL29, UL32, UL28, UL83 (pp65), UL122, UL123, US3, US29 e US32. A escolha destas proteínas se baseou no potencial imunogênico, conforme descrito por Sylwester, et al. (2005). Para cada proteína foi realizada a busca das sequências peptídicas através do site UniProt, o qual disponibiliza e abrange dados de sequência e anotação de proteínas de diversos organismos.

Para a avaliação dos HLAs, foram incluídos os 27 HLAs mais prevalentes no mundo: HLA-A*01:01, A*02:01, A*02:03, A*02:06, A*03:01, A*11:01, A*23:01, A*24:02, A*26:01, A*30:01, A*30:02, A*31:01, A*32:01, A*33:01, A*68:01, A*68:02, HLA-B*07:02, B*08:01, B*15:01, B*35:01, B*40:01, B*44:02, B*44:03, B*51:01, B*53:01, B*57:01 e B*58:01, e também adicionados os HLAs mais prevalentes na população brasileira e que estavam ausentes na lista de maior prevalência mundial: HLA-A*25:01, HLA-A*29:02, HLA-B*15:03, HLA-B*15:09, HLA-B*18:01, HLA-B*27:05, HLA-B*38:01, HLA-B*40:02, HLA-B*42:01, HLA-B*45:01, HLA-C*03:03, HLA-C*04:01, HLA-C*05:01, HLA-C*06:02, HLA-C*07:01, HLA-C*07:02, HLA-C*08:02, HLA-C*12:03, HLA-C*14:02, HLA-C*15:02.

Foram pesquisadas em artigos ferramentas para predição de afinidade, e a ferramenta escolhida pertence ao Immune Epitope Database (IEDB), do Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas (NIAID/NIH). Esse banco armazena dados com a caracterização de anticorpos e epítomos de linfócitos T em humanos, primatas e outras espécies animais, incluindo epítomos envolvidos em doenças infecciosas, alergia, autoimunidade e transplantes. Além disso, o IEDB também possui ferramentas de predição e análise de epítomos para linfócitos B e T e de outras etapas de processamento e apresentação de antígeno.

A sequência peptídica de cada uma das proteínas do HCMV retiradas do UniProt, foram utilizadas na ferramenta de predição *T Cell Epitopes – MHC I Binding*

Prediction, integrante das ferramentas do IEDB. Essa ferramenta prediz os valores de interação dos peptídeos derivados das proteínas, com moléculas específicas de HLA nas classes I e II, através do mecanismo de rede neural artificial (ANN).

Uma planilha com valores de predição é gerada, e através dela, podemos identificar o valor de IC_{50} para os HLAs em diferentes regiões das proteínas do HCMV. Dessa forma, é possível separar em grupos distintos os HLAs que interagem mais ou menos com as proteínas do vírus, e, as interações são classificadas de acordo com o valor de IC_{50} , alto (0-50nM), intermediário (50-500nM) e baixa afinidade (>500). Os dados de interesse presentes na planilha gerada pela ferramenta do IEDB foram então exportados para o software GraphPad Prism v7, facilitando o agrupamento e visualização dos dados de predição em gráficos.

3.2 Recrutamento de voluntários, informações clínicas

Os voluntários convidados a participar deste Projeto, no ano de 2022, residem na região metropolitana de Belo Horizonte – MG, e assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1), antes de sua inscrição no estudo. O recrutamento de indivíduos saudáveis foi realizado na comunidade. Os voluntários transplantados foram recrutados no Hospital Felício Rocho de Belo Horizonte em momentos de consultas, coletas de exame, internação ou em domicílio.

A classificação clínica da gravidade de infecção dos pacientes foi realizada em consenso do corpo médico de transplantes do hospital Felício Rocho, visto que não existe uma classificação estabelecida para definir desfecho clínico da infecção por HCMV. A mesma comissão de médicos também foi responsável por fornecer acesso os dados dos prontuários dos pacientes como informações pessoais, sorologia e informações do transplante para a aluna. A classificação e os dados foram revisados por profissionais distintos membros da comissão médica do transplante.

Neste trabalho os participantes foram distribuídos em três grupos de acordo com a apresentação clínica: Infecção por HCMV leve (infecção assintomática, e menos de 25 dias de hospitalização), HCMV grave (infecção sintomática e mais de 25 dias de hospitalização) e grupo controle (indivíduos saudáveis, com infecção prévia por HCMV). Os dados laboratoriais e as características clínicas são apresentados na Tabela 2, 3 e 5. Todos os pacientes deste estudo possuem classificação clínica da

infecção por HCMV, idade, gênero, idade na data do transplante, data do transplante e sorologia (IgG) prévia para o HCMV.

Todos os indivíduos transplantados foram submetidos a testes sorológicos para HCMV antes mesmo de realizar o transplante como procedimento preparatório e o status sorológico foi recuperado do prontuário médico. Já os indivíduos do grupo controle foram submetidos ao teste sorológico para detecção de IgM e IgG para comprovação de exposição prévia ao vírus. O kit utilizado foi o CMV IgG/IgM (ECO® Teste), de acordo com as orientações do fabricante.

Os indivíduos transplantados e os indivíduos do grupo controle foram incluídos neste estudo se positivos para contato prévio com HCMV (IgG+). Foram excluídos da pesquisa pacientes com resultado sorológico de IgG indeterminado ou negativo.

3.3 Coleta e processamento das amostras

As amostras de sangue periférico (40-60mL) foram coletadas em tubos a vácuo e heparinizados. No mesmo dia da coleta, plasma e PBMC (células mononucleares do sangue periférico) foram separados por centrifugação utilizando gradiente de Ficoll Hipaque (SIGMA). Após adição de Ficoll-Paque Plus ao sangue, os tubos foram centrifugados a 900 x g por 40 minutos, a 18° C, utilizando a taxa de desaceleração da centrífuga em zero para obtenção das frações. A camada de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), foi coletada com pipeta Pasteur e transferida a um novo tubo estéril com 30 mL de PBS e centrifugada a 400 x g por 10 minutos e foram lavadas mais uma vez a 400 x g. O pellet foi coletado e as células ressuspensas em meio RPMI incompleto.

3.4 Ensaio de citometria de fluxo

Após a separação, as células foram contadas utilizando o corante azul de trypan 0,4%, diluídas com RPMI e distribuídas $1,0 \times 10^6$ de células por cada poço na placa de 96 poços com fundo em “U”, de acordo com as seguintes condições: 1. Sem estímulo, 2. Estímulo com pool de peptídeos da biblioteca do e 3. Presença de estímulo policlonal (anti-CD3/CD28). Após adicionada em cada poço, as amostras foram mantidas na estufa úmida com 5% de CO₂ a 37°C por 24 horas, sendo que nas últimas 12 horas de incubação foram adicionados 1ug/ml de Brefeldina A (BFA) (Biolegend) em cada tubo. Em seguida, os tubos foram centrifugados para seguir com

a marcação extracelular, com painel composto por: CD3 (BV-650), CD4 (APC/Fire 750) e CD8 (BV570) que caracterizam subpopulações de células T; CD107a (BV510) como marcador de granulosidade e o marcador de senescência CD57(BV421).

Para a marcação extracelular, as células foram incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente (TA) no escuro. Após essa etapa, as células foram fixadas, permeabilizadas, lavadas, e seguiu-se com a marcação intracelular: TNF (Ax700); IFN γ (PE-Cy7); IL-2 (APC); IL-17A (PerCP/Cy5.5); IL-10 (PE) e incubação por 45 minutos no escuro a 4°C. Após lavagens e ressuspensão das células em FACS (solução de PBS1x + 1% de soro bovino fetal SBF) prosseguimos para aquisição no equipamento BD LSR-FORTESSA utilizando o software BD FACSDiva, e as análises foram realizadas no software Flow Jo versão 10 (LLC).

3.4.1 Padronização e estratégia de análise

As análises foram realizadas utilizando o Programa FlowJo versão 10 (LLC) e as estratégias de *gate* utilizadas é demonstrada na Figura 9. A estratégia de *gate* utilizada para as análises do painel consiste primeiramente na seleção das populações de linfócitos (SSC-A x FSC-A), *singlets* (FSC-H x FSC-A), que é utilizado para exclusão de grumos celulares, e o *gate* de tempo (SSC-A x *Time*), para exclusão de eventuais interrupções de fluxo durante a aquisição. Em seguida, para obter uma interseção destes três *gates* iniciais (Linfócitos, *Singlet* e *Time*) foi utilizada a ferramenta *Boolean Gate*, opção *Make and Gate*, que deu origem ao *dot plot* utilizado para selecionar a população de linfócitos T (CD3⁺) (Fig.6). A partir do *gate* de células CD3⁺, foram selecionadas as subpopulações de linfócitos T CD4 (CD4⁺CD8⁻) e CD8 (CD4⁻CD8⁺). Em seguida foi determinado os *gates* para as citocinas IFN γ , TNF, IL-2, IL-17A e IL-10.

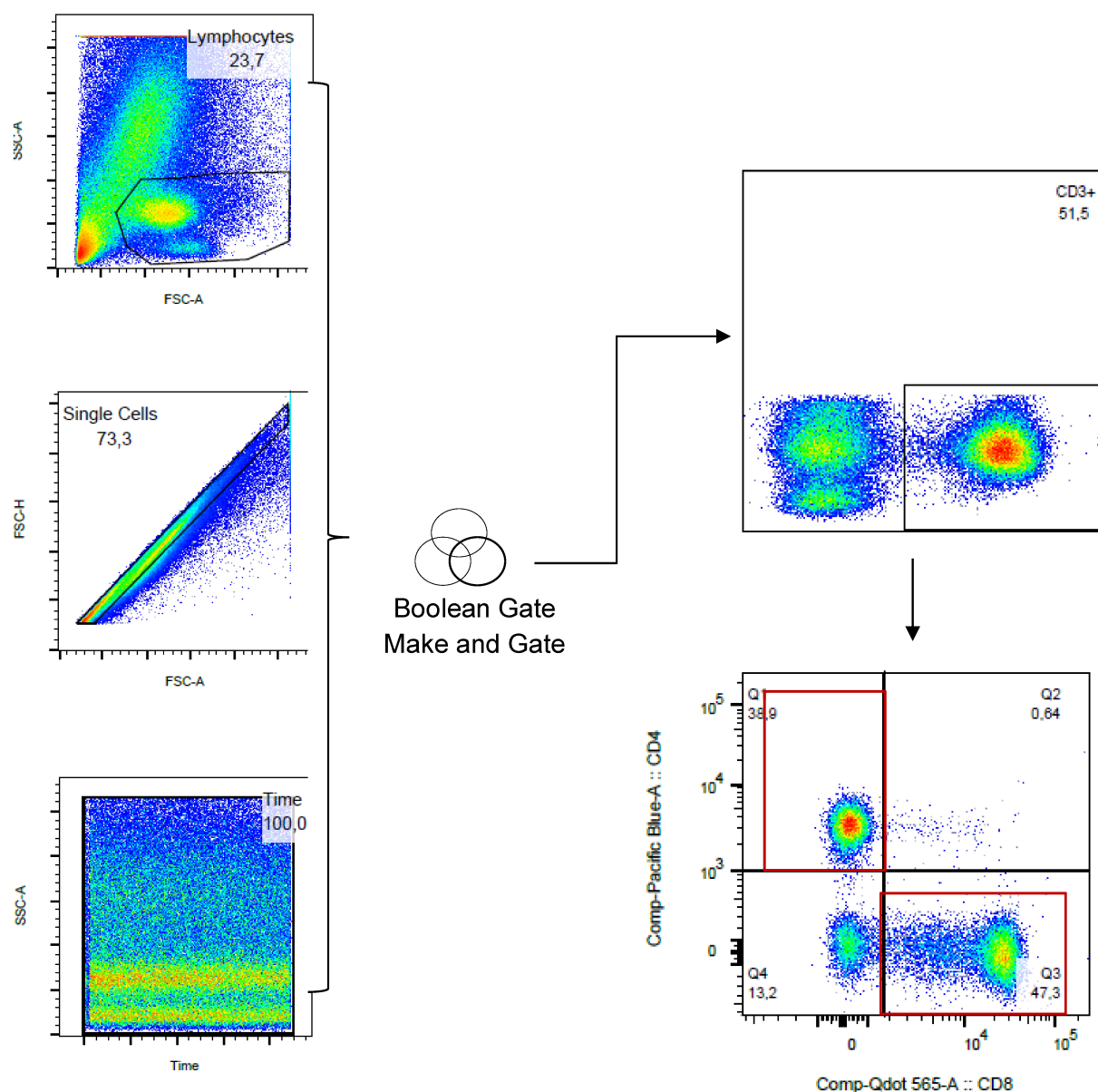


Figura 8. Estratégia de análise do Painel de Citometria de sangue total. Foram selecionadas as populações de linfócitos, singlets e time. Em seguida, foi realizada a interseção desses três gates iniciais, para selecionar a população de células T CD3⁺. Dentro de CD3⁺, foram selecionadas as populações de CD4⁺ (CD4⁺CD8⁻) e CD8⁺ (CD4⁻CD8⁺).

3.4.2 Análises Estatísticas

Os resultados foram analisados utilizando os testes estatísticos: Kruskal-Wallis, Mann-Whitney e Wilcoxon, conforme indicado nas legendas das figuras. O teste de Tukey foi usado como pós-teste para identificação de diferença significativa entre as amostras independentes. As análises foram realizadas através do Software GraphPad Prism 7.04, e valores de p inferiores a 0,05 foram considerados significativos: $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Produção de uma biblioteca de peptídeos de HCMV de alta/intermediária afinidade com diferentes HLAs

A maioria dos trabalhos de HCMV que avaliam a resposta celular são baseados somente na proteína UL83 (pp65) ou na sua junção com outros peptídeos. Para aumentar a diversidade dos possíveis peptídeos envolvidos na ativação das células T, foi realizado uma análise *in silico* das interações realizadas entre os HLAs e as 10 proteínas mais imunogênicas HCMV. Dessas análises, observou-se que, ao longo da sequência de cada proteína, a grande maioria das interações de HLAs são de baixa afinidade. Entretanto, existem alguns locais das proteínas onde os HLAs interagem com alta e intermediária afinidade, sendo essas as regiões mais relevantes para a resposta imune. Baseado nessas regiões, construímos uma biblioteca de peptídeos com as cinco regiões mais relevantes de cada uma das seguintes proteínas: UL32, UL48, UL83 (pp65), UL29 e UL55. Todas essas proteínas apresentaram regiões com maior número de interações de intermediária e alta afinidade com os HLAs. (JUNIOR; DANILO et al., 2010)

Portanto, uma biblioteca contendo 25 peptídeos sintetizados com pureza $>70\%$ foi gerada e utilizada nos ensaios de citometria de fluxo. A sequência dos peptídeos está representada na tabela 2:

Tabela 22. Lista de peptídeos que compõe a biblioteca do HCMV

PROTEÍNA	PEPTÍDEOS
UL32 Latência	1. EKRLHRRTVLFLNELMLWLGYRELRF 2. HDAEIVERALVSAVILAKMSVRETLVTAIGQTE 3. LLIEDFDIYVDSFPQSAHTFLGARSPSL 4. APLPGDMNPANWPRERAWALKNPH 5. GASAALQSRRTGTAAVGSVPKS
UL48 Tegumento	1. AAVYHCEGLHQVLMVLTGFGVQLSPAFYYEALFLYMLDVATVPEAEIAAR 2. MLRRDEQTRLRLINAVLSMFHTLVMLARDESPTFFDA 3. LEQIEKAGTGASEKRFQALRELVYFFRNHEYFFQHMVGRLG 4. LLGKATQQLPYLSAERTVRWMLAFLEEALAQITADPTPHH 5. TVLRLSLQEFVCLIAALYPEIYTVLKYVQMSLPSLTAHLH
PP65 Tegumento	1. CPSQEPMSIYVYALPLKMLNIPS 2. QWKEPDVYYTSAFVFPTKDVAL 3. VEEDLTMTNRPQPFMR 4. TVELRQYDPVAALFFFDIDLLQ 5. WQAGILARNLVPMTVTVQGQNL
UL29 Replicação	1. LCRRSRASARGRYLRSL 2. RDLGLSASMLRRFQR 3. VVRDHKTYRRFSCLRQ 4. EANNFVIGVLEQAHFV 5. LAETLRGFIRQGSFWFRC
UL55 Glicoproteína B	1. HTFKVRVYQKVLTFRRSYAY 2. YFGENADKFFIFPNYTI 3. EDSYHFSSAKMTATF 4. LQFTYDTRLRGYINRAL 5. SNVFDLEEIMREFNSYK

Notas: UL32 Latência: proteína responsável pelos mecanismos de latência do vírus; UL48 e pp65 (também chamada de UL83) Tegumento: proteínas que pertencem ao tegumento viral; UL39 Replicação: proteína importante na replicação viral; UL55 Glicoproteína B: proteína que pertence a glicoproteína B do HCMV.

4.2 Recrutamento dos pacientes para o estudo *in vitro*

Devido a pandemia de Covid-19, os pacientes do estudo foram recrutados apenas no ano de 2022, no Hospital Felício Rocho, localizado em Belo Horizonte/MG. Esses pacientes foram distribuídos em três grupos: com infecção leve por HCMV (infecção assintomática e menos de 25 dias de hospitalização); com infecção grave por HCMV (infecção sintomática e mais de 25 dias de hospitalização); e grupo controle (indivíduos saudáveis, transplantados e não transplantados). Tais critérios foram

elaborados em conjunto com a equipe médica do hospital, pois não existe consenso acerca da classificação de gravidade no desfecho da infecção por HCMV em indivíduos transplantados. O que é encontrado na literatura e em manuais clínicos hoje é a forma de transmissão do vírus, classificação de infecção (infecção primária, reativação viral, superinfecção ou reinfecção), sintomas, diagnóstico e tratamento (KAYE, 2021; CUKURANOVIC, 2012).

Ao todo, foram incluídos 25 indivíduos no estudo: 20 pacientes transplantados e cinco saudáveis não transplantados. Os transplantados foram distribuídos em dois grupos, 11 com infecção grave por HCMV e, 9 com infecção leve. Além disso, 2 pacientes transplantados se revelaram sem infecção por HCMV e seus dados foram utilizados em algumas análises juntamente ao grupo controle. Assim, o grupo controle foi composto pelos transplantados sem infecção (2 indivíduos) e pelos saudáveis não transplantados (5 indivíduos).

Os dados laboratoriais e as características clínicas estão apresentados na Tabela 3. Na tabela 4 estão as informações de idade, sexo, sorologia pré-transplante (IgG), medicação imunossupressora e tipo de transplante dos indivíduos recrutados.

Tabela 3. Informações clínicas dos indivíduos transplantados incluídos no estudo in vitro.

N° PCTE	COMPROVAÇÃO	PRESENÇA DE SINTOMAS	TEMPO DE TRATAMENTO	GRAVIDADE	HCMV APÓS O TRANSPLANTE	TEMPO DE COLETA APÓS HCMV
PACIENTE 1	ANTIGENEMIA 10 céls	NÃO	15 dias	LEVE	30 DIAS	5 ANOS
PACIENTE 2	PCR 264.130 cópias	SIM	25 dias	SEVERO	30 DIAS	5 ANOS
PACIENTE 3	PCR 256.794 cópias	SIM	34 dias	SEVERO	12 DIAS	3 ANOS
PACIENTE 4	PCR 300.000 cópias	SIM	30 dias	SEVERO	10 DIAS	2 ANOS
PACIENTE 5	PCR 156.805 cópias	SIM	28 dias	SEVERO	60 DIAS	1 ANO
PACIENTE 6	PCR 92.288 cópias	SIM	27 dias	SEVERO	60 DIAS	3 ANOS
PACIENTE 7	PCR 3.619 cópias	SIM	28 dias	SEVERO	300 DIAS	1 ANO
PACIENTE 8	PCR 37.006 cópias	SIM	37 dias	SEVERO	37 DIAS	6 MESES
PACIENTE 9	PCR NSA	NÃO	12 dias	LEVE	14 DIAS	6 MESES
PACIENTE 10	ANTIGENEMIA 20 céls	NÃO	14 dias	LEVE	30 DIAS	6 MESES
PACIENTE 11	PCR NSA	NÃO	19 dias	LEVE	90 DIAS	6 MESES
PACIENTE 12	ANTIGENEMIA 132 céls	NÃO	21 dias	LEVE	60 DIAS	1 ANO
PACIENTE 13	ANTIGENEMIA 10 céls	SIM	2x 15 dias/14 dias	SEVERO	30 DIAS	6 ANOS
PACIENTE 14	PCR 102.623 cópias	SIM	28 dias	SEVERO	30 DIAS	6 MESES
PACIENTE 15	ANTIGENEMIA 50 céls	SIM	14 dias	LEVE	25 DIAS	1 ANO
PACIENTE 16	ANTIGENEMIA 3 céls	SIM	2x 14 dias/14 dias	SEVERO	60 DIAS	6 ANOS
PACIENTE 17	CONTROLE SEM HCMV	XXX	XXX	XXX	**	6 MESES
PACIENTE 18	PCR 5.367 cópias	NÃO	22 dias	LEVE	30 DIAS	6 MESES
PACIENTE 19	PCR 4.264	NÃO	14 dias	LEVE	30 DIAS	6 MESES
PACIENTE 20	PCR 1.989	NÃO	21 dias	LEVE	30 DIAS	6 MESES
PACIENTE 21	CONTROLE SEM HCMV	XXX	XXX	XXX	**	6 MESES
PACIENTE 22	ANTIGENEMIA 42 céls PCR 7.998 cópias	NÃO	2x 21 dias/15 dias	SEVERO	60 DIAS	6 MESES

*NSA: Não se aplica. Não foram encontrados registros de valores de PCR no prontuário desses pacientes

Tabela 4. Informações dos participantes do estudo in vitro.

In vitro	HCMV Leve	HCMV Grave
N amostral	9	11
Idade	50.14 (34-75)	46.9 (28-63)
Sexo (m)	71,42% (7/9)	63% (7/11)
IgG (+) pré-tx	72,72% (8/9)	63% (7/11)
Medicação Imunossupressora	Tacrolimus (tac) + micofelonato de sódio (mps) + prednisona (pred)	
Tipo de Transplante	RIM: 7 FÍGADO: 1 CORAÇÃO:1	RIM: 11

4.3 A biblioteca de peptídeos do HCMV é capaz de estimular resposta de memória específica de linfócitos T CD8

Para validar a capacidade da biblioteca de peptídeos em estimular os linfócitos T CD8, PBMCs de todos os participantes foram cultivadas na presença ou ausência da biblioteca de peptídeos por 24 horas e submetidas à marcação para citometria de fluxo. Foi avaliada a produção de IFN γ em PBMCs sem estímulo (SE) e PBMCs estimuladas com a biblioteca de peptídeos (HCMV). A biblioteca de peptídeos foi capaz de aumentar a produção de IFN γ (Figura 10) validando a utilização da biblioteca para estimular linfócitos específicos ao HCMV.

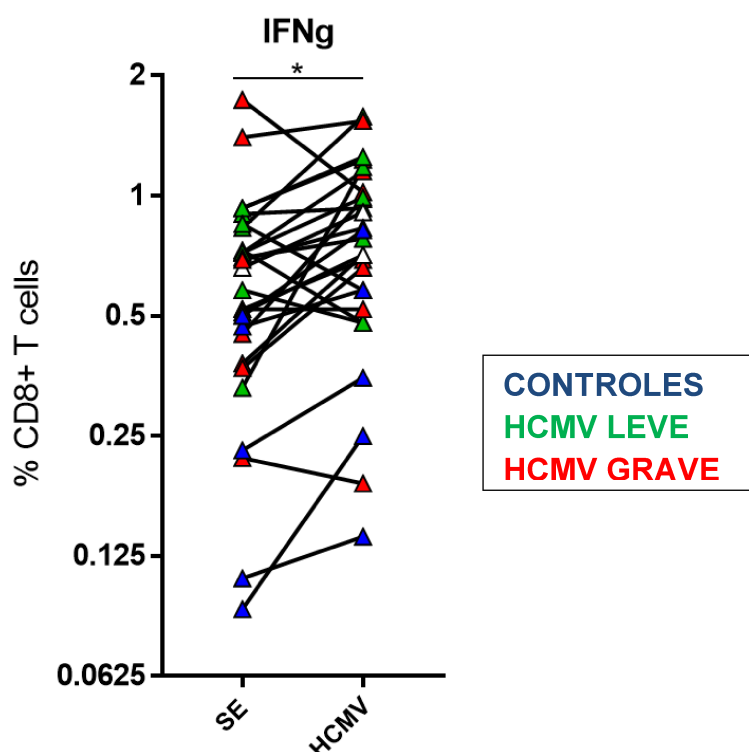


Figura 9. Avaliação da capacidade da biblioteca de peptídeos do HCMV em estimular as células e induzir produção de citocinas. Cultura de PBMCs de todos os participantes do estudo. A cultura foi estimulada por 12 horas com a biblioteca de peptídeo específicos do HCMV e posteriormente foi realizada a marcação e a leitura da citometria para avaliar a frequência de células produtoras de IFN γ . Em vermelho estão os pacientes de infecção grave; em verde pacientes de infecção leve por HCMV em azul os indivíduos saudáveis e em branco, pacientes transplantados sem infecção prévia pelo HCMV. A diferença observada entre as duas condições foi analisada pelo teste t two-tailed. (* p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001)

O IFN γ é uma citocina muito importante na resposta imune participando ativamente da proteção das células e na resolução de infecção viral. Ele estimula a expressão de genes e mecanismos celulares que impedem a replicação de vírus. Além disso, estimula apresentação de antígenos por estimular proteínas de processamento e maior expressão de MHC (GRANDVAUX et al., 2002; GOODWIN et al., 2018).

Na infecção por HCMV a produção de IFN γ ocorre principalmente pelos linfócitos TCD8+ e células NK (SAINZ et al., 2005; YAN et al., 2012). E por ser considerado determinante na resposta imune efetiva contra o HCMV e muito presente nos estudos de perfil de resposta aos vírus, o IFN γ começou a ser utilizado em um teste de prognóstico clínico, o QuantiFERON-CMV. O teste mensura a produção de IFN γ na resposta específica ao vírus, e com isso é possível inferir se o indivíduo terá uma boa resposta celular caso tenha infecção pelo HCMV (GIULIERI; MANUEL O, 2011). Porém, o teste tem algumas desvantagens, como por exemplo resultados indeterminados em pacientes imunocomprometidos e sensibilidade reduzida em

casos de linfopenia (GIULIERI, S; MANUEL, O, 2011). Além disso, apesar do IFN γ ser realmente uma citocina importante na resposta contra o HCMV, diferentes perfis de resposta celular exibidos pelos indivíduos podem ter outras citocinas e marcadores importantes no desfecho da infecção, o que foi alvo de estudo nos pacientes recrutados.

A grande maioria dos estudos que utilizam peptídeos do HCMV para ensaios *in vitro* se limitam, na maioria das vezes a UL83. Ela é muito utilizada por ser a proteína tegumentar mais abundante e a principal responsável pela sobrevivência e replicação viral, por modular a resposta imune hospedeira (TOMTISHEN, 2012). A biblioteca criada neste estudo possui uma gama de diferentes peptídeos e, portanto, permite estudar uma variabilidade maior de linfócitos que podem ser ativados durante a infecção pelo HCMV. Isso possibilita a identificação de diferentes perfis de resposta ao vírus, contribuindo para o entendimento da evolução clínica positiva ou negativa dos pacientes.

Por possibilitar a análise de alvos específicos de um microrganismo, os estudos *in vitro* com PBMCs utilizam bibliotecas de peptídeos em suas metodologias. Esses estudos buscam, desde aprimorar o entendimento da resposta imunológica específica ao patógeno, até a elaboração de vacinas e outras imunoterapias mais específicas.

Como exemplo de aplicação, Hwang SU e colaboradores (2020) avaliaram a capacidade da expansão de linfócitos T CD8 $^{+}$ citotóxicos HCMV específicos estimulados por um *pool* de 138 peptídeos sobrepostos da pp65 com o objetivo de criar uma imunoterapia para indivíduos de transplante de medula com infecção grave pelo HCMV (HWANG et al., 2020). Esse trabalho se baseou na teoria de que peptídeos sobrepostos utilizados como antígeno, estimulam células T CD8 $^{+}$ de forma mais eficaz do que lisados virais ou antígenos exógenos. Análises fenotípicas demonstraram que os peptídeos sobrepostos aumentaram a frequência de células CD8 $^{+}$, mas não de células CD4 $^{+}$, CD14 $^{+}$ ou CD56 $^{+}$ (HWANG et al., 2020). Cabe ressaltar que, no presente estudo, a metodologia empregada para identificar os peptídeos imunogênicos contou com sobreposições de aminoácidos, para assim, possibilitar um maior número de peptídeos gerados para serem explorados com a respectiva afinidade com os HLAs, mas nos concentramos nas regiões de cada proteína que apresentavam alta afinidade com um grande número de HLAs diferentes.

Em um outro trabalho, a glicoproteína B (gB) foi o alvo do desenvolvimento de peptídeos com o objetivo de inibir sua atividade. A gB é muito importante não só para

o HCMV, mas em toda a família Herpesviridae devido a sua função principal de fundir o envelope viral com a membrana celular. Os resultados obtidos demonstraram diferentes porcentagens de inibição da gB em diferentes concentrações dos peptídeos de inibição. Dessa forma, o estudo mostrou que a identificação dos domínios principais de ação dessa proteína pode fornecer uma base de desenvolvimento de terapias preventivas frente a infecção por HCMV, evitando a fusão do vírus na célula-alvo (MELNIK et al., 2011).

Já outro estudo que utilizou *pools* de peptídeos sobrepostos, as proteínas IE1 e IE2 foram empregadas para estimular PBMCs de doadores saudáveis. Foi observado ativação das células T CD4+ e CD8+ por diferentes moléculas de HLA de classe I e II. Duas regiões de epítomos em ambas as proteínas foram reconhecidas por metade dos doadores (BRAENDSTRUP et al., 2014).

Jackson e colaboradores (2014), realizou uma coorte com voluntários de idade entre 20 a 80 anos de idade e utilizou como estímulo em um ensaio de disseminação viral, 11 ORFs de proteínas do vírus. O fenótipo predominante dos linfócitos foi CD45RA+, CD57+ e CD28+ que se mantiveram por um longo período. Os autores argumentaram que os linfócitos específicos para HCMV possuem a resposta antiviral bastante eficaz independentemente da proteína reconhecida, mesmo com a atuação dos mecanismos de evasão imune.

As análises realizadas em indivíduos saudáveis apresentam resultados mais favoráveis da resposta imune específica contra o HCMV, o que vai de encontro com a ausência de sintomas e infecção grave na grande maioria dos indivíduos imunocompetentes. Contudo, nos indivíduos imunossuprimidos nem sempre as intensidades de resposta e atividade do sistema imune serão tão evidentes. Estudos do estabelecimento de infecções virais pelo SARS-COV-2 e pelo vírus influenza sugerem que a infecção em imunossuprimidos pode ser favorável a mutação do vírus, mas ressaltam que o quanto isso afeta a resposta imune a nível populacional ainda é desconhecido (KUMATA, 2022). Cabe ressaltar, que os resultados desses estudos com peptídeos têm a vantagem de auxiliar na criação de potenciais alvos prognósticos, profiláticos (vacinais) e terapêuticos para serem destinados ao acompanhamento, prevenção e tratamento da população que é comprometida pela infecção do vírus.

4.4 Pacientes com infecção grave por HCMV apresentam aumento da expressão de TNF e CD57 em linfócitos T CD8+

Durante uma infecção, o sistema imune inato e adaptativo são ativados para combater o agente agressor, sendo a resposta direcionada de acordo com o tipo de estímulo. A fim de controlar a replicação viral, as células T produzem citocinas inflamatórias, como IFN γ e TNF, que compõem respostas de perfil Th1 (HOWARD et al., 2022). Porém, no contexto de pacientes transplantados que utilizam imunossupressores, o perfil de resposta pode ser alterado e os padrões de resposta imune observados em indivíduos saudáveis podem não se reproduzir (KUMATA; SASAKI, 2022). Cabe ressaltar que no presente estudo os pacientes transplantados, no contexto da infecção por HCMV, apresentam desfechos clínicos distintos mesmo utilizando regimes de imunossupressores semelhantes. Entretanto, o que determina essa distinção ou favorece uma infecção mais grave ainda precisa ser estudado.

Assim, para se investigar o perfil das células imunes nos diferentes desfechos de infecção pelo HCMV, leve ou grave, PBMCs dos pacientes foram estimuladas na presença da biblioteca de peptídeos. Avaliamos a produção de citocinas dos perfis Th1, Th2, Th17 e IL-10 por células T CD8+, assim como, a presença da molécula CD57, um dos marcadores de senescência de linfócitos e CD107a, marcador de citotoxicidade dos linfócitos T CD8+. Também foi analisada a produção das mesmas citocinas no grupo controle.

Mesmo com a condição de imunossupressão entre os pacientes transplantados, observamos valores próximos de produção das citocinas TNF, IL-17 e do marcador CD57 entre o grupo controle e HCMV leve. Já entre os pacientes do grupo grave, houve maior frequência de linfócitos T CD8+ produtores de TNF quando estimulados com a biblioteca de peptídeos em comparação com o grupo leve e o grupo controle (Figura 11). Além da expressão aumentada do TNF, o grupo grave também apresentou maior frequência do marcador CD57 nos linfócitos T CD8+, quando comparado com os grupos leve e controle. Não foram observadas diferenças na expressão de IL-2, IL-10, IL-17A, IFN γ e CD107 entre os grupos testados.

O aumento na frequência de células T CD8+ produtoras de TNF somente nos pacientes com infecção grave pode indicar uma participação do TNF na piora do desfecho clínico.

O fator de necrose tumoral (TNF) possui um papel muito importante na resposta imune, inflamação e defesa do organismo (KOLLIAS et al., 1999). Quando acoplada aos seus receptores, que são encontrados na maioria dos tipos celulares, ativam vias de transdução de sinal, contribuem com a ativação e sinalização nas células imunes para exercerem seu papel efetor, e por isso é considerada importante para a efetividade de muitos processos fisiológicos. Por ser um importante mediador de apoptose, sua atividade é estudada na patogênese de diversas doenças como artrite, diabetes, câncer, sepse, osteoporose e doenças inflamatórias intestinais, dentre outras. E especialmente nas complicações após o transplante, o TNF está presente na rejeição do enxerto, na oclusão dos vasos e nas síndromes de extravasamento endotelial

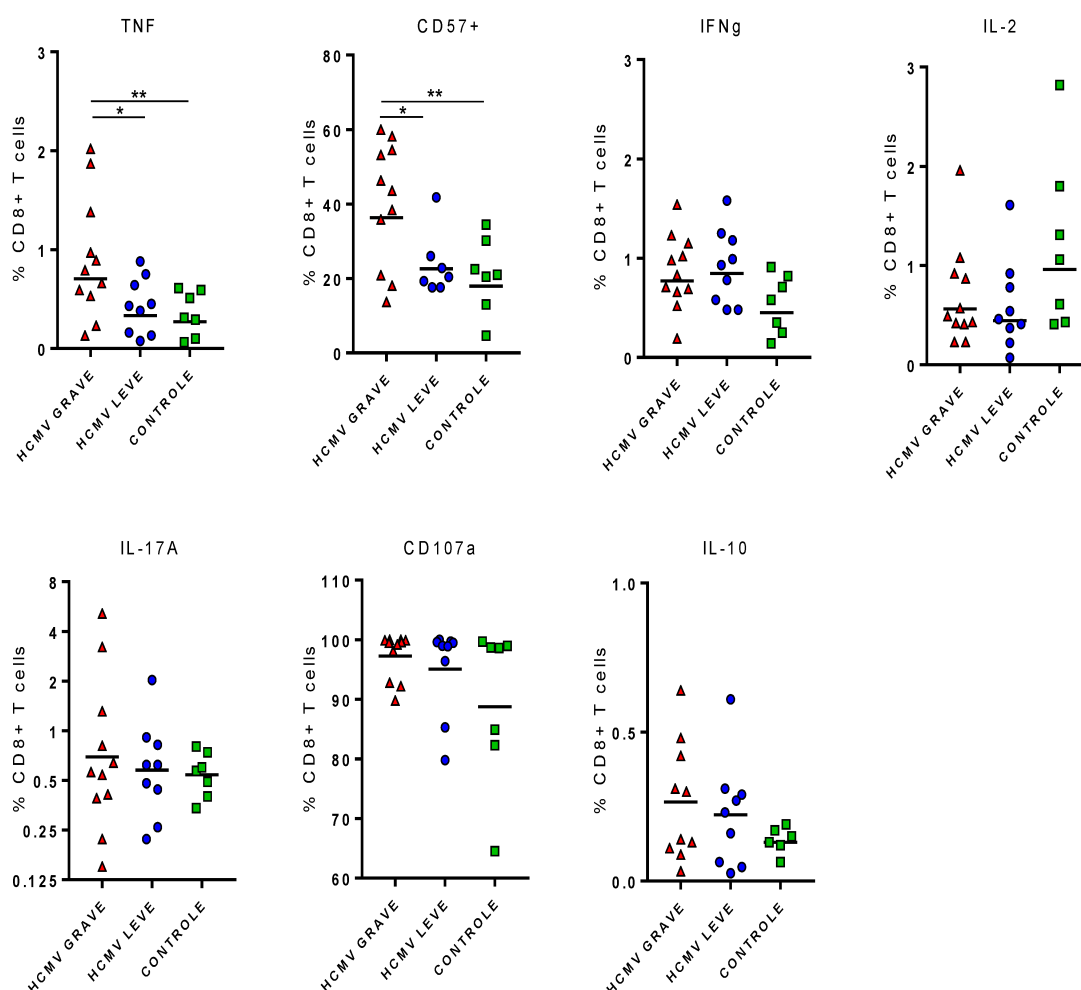


Figura 10. Frequência das citocinas TNF, IFN γ , IL-2, IL-17^a, IL-10 e presença de moléculas co-receptoras CD57 e CD107A nos linfócitos T CD8+ dos pacientes transplantados. Pacientes que tiveram desfecho clínico grave estão representados em triângulos vermelhos (n=11), os pacientes com desfecho clínico leve representados pelos círculos azuis (n=9) e o grupo controle pelos quadrados em verde (n=7). As diferenças observadas entre os grupos foram analisadas pelo teste estatístico de Mann-Whitney e One-Way ANOVA. (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001)

grave, causado por um infiltrado inflamatório de células imunes derivadas de uma resposta imunológica local e intensa (REDDY et al., 2005).

No contexto da infecção viral, o TNF pode ter um papel dual, atuando no sistema imunológico, e em alguns casos favorecer a expressão gênica e replicação do vírus. Os relatos de que a infecção por HCMV ativam a expressão de TNF estão presentes na literatura desde a década de 1990 (DUDDING, 1989; HOWARD, 1993; PULLIAM, 1995), e a sua atividade é definida pelo estado de diferenciação em que a célula se encontra. No caso dos monócitos por exemplo, por se tratar de um reservatório do vírus, caso haja atividade de TNF que estimule a ativação dessa célula, ela se diferencia e permite a replicação viral (BAILLIE, 2003). O mecanismo base desse fenômeno é indicado em alguns estudos mostrando que o MIEP do HCMV possui similaridades com promotores de genes que codificam esses mediadores da inflamação, e por isso, é possível que o MIEP viral seja um promotor inflamatório que favorece a transcrição do TNF nos estágios de ativação e diferenciação de células que possuem o gene viral incorporado em seu material genético (SINCLAIR, 2014).

Estudos descrevem o TNF como importante fator para indução de reativação do vírus após o estabelecimento de latência, favorecendo o aumento nas cópias de DNA e RNA virais (FORTE et al., 2018). Essa citocina tem sido proposta como importante para reativação de CMV em estudos *in vitro* e *in vivo* ao longo do tempo (HUMMEL e ABECASSIS, 2002; Cook, 2007). O TNF tem sido usado para reativar o HCMV em modelos celulares, bem como reativar CMV em modelos murinos (MCMV) (Hummel e Abecassis, 2002; Prösch et al., 2002; O'Connor e Murphy, 2012). Em consequência disso, antagonistas do TNF foram propostos para impedir a reativação do HCMV *in vivo*, mas ainda não há resultados concretos sobre essa estratégia.

Outros trabalhos afirmaram que a infecção por HCMV pode inibir a atividade do TNF atuando nos receptores TNFRI presentes na superfície de células infectadas, um receptor de TNF importante para realizar respostas antivirais (MONTAG et al., 2006). Por exemplo, já foi observado em isolados clínicos e laboratoriais de HCMV que a presença do vírus diminui o TNFRI no início da infecção lítica (BAILLIE et al., 2003; LE et al., 2011). Contudo, foi observado também que o produto do gene UL138 codificado pelo HCMV regula positivamente a expressão do TNFR1 na superfície celular (LE et al., 2011; MONTAG et al., 2011).

Alguns estudos também demonstraram a capacidade do TNF em inibir a produção viral em diferentes tipos celulares infectados. Em um estudo conduzido em

pacientes transplantados foi revelado que as citocinas TNF e IL-18 estavam aumentados nos órgãos com doença por HCMV, independente da sorologia prévia para o HCMV. O estudo destacou o TNF e a IL-18 como marcadores não invasivos de possível doença por HCMV, independentemente do tipo de transplante e sorologia prévia do doador (KARABA et al., 2021). Isso sinaliza que apesar do status sorológico ser preditivo de possível complicação caso ocorra infecção por HCMV em pacientes (R-/D+), não significa que os pacientes que possuem sorologia positiva prévia (R+) não possam evoluir para uma infecção grave por HCMV no pós transplante (KARABA et al., 2021).

Em comparação com os achados acima, observamos que pacientes com infecção grave por HCMV apresentaram maior produção de TNF por linfócitos T CD8+. Vale ressaltar que a maioria dos estudos relatados foram realizados em fibroblastos e em células precursoras mieloides e não refletem a infecção *in vivo*. Sendo assim, uma comparação mais próxima pode ser feita com um estudo que associou altos níveis de TNF ao aumento de chance de infecção por HCMV após o transplante de medula em que pacientes com altos níveis de TNF foram associados com o início mais rápido da detecção de antígenos do HCMV e com possível desfecho de morte (REDDY et al., 2005).

Além do TNF, no presente estudo, foi observado o aumento de um marcador de linfócitos muito estudado na infecção por HCMV, o CD57+. A presença desse marcador, de um modo geral, está associada a infecções crônicas, envelhecimento e imunossenescência (RODRIGUEZ, 2021). Na infecção por HCMV, os linfócitos T CD8+CD57+ que são específicos para HCMV possuem expressão aumentada de perforina e granzima mas também apresentam baixa capacidade proliferativa devido a diminuição acelerada dos telômeros que comprometem as funções celulares (JASON et al., 2003). Um outro estudo mostrou que a expressão de CD57 torna as células susceptíveis à morte celular induzida por ativação por apoptose (JASON et al., 2003). No presente estudo, verificamos um aumento na frequência de células T CD8+CD57+ nos pacientes que evoluíram para forma grave da infecção por HCMV quando comparado com os grupos leve e controle. Isso pode indicar um papel importante dessa subpopulação na piora da infecção por HCMV.

Muito é discutido sobre o fenótipo que as células T CD8+HCMV+ adquirem com a infecção pelo vírus, a presença do CD57+ nos linfócitos T afeta seu repertório e as habilidades de outras células que interagem com esses linfócitos (PAWELEC,

DERHOVANESESSIAN, 2011; CHOU, 2013). O CD57 pode limitar a capacidade de proliferação por induzir senescência acelerada, mas, existem algumas células que conseguem reparar essa disfunção e restabelecer a capacidade de proliferação. Porém, a infecção crônica pelo HCMV pode acelerar a imunossenescência devido a estimulação antigênica repetida (KOCH et al., 2011; STRIOGA et al., 2007; KOCH, 2007).

Há evidências que associam a presença dos linfócitos CD57+ com a resposta imune reduzida contra novos patógenos. Todavia, outros trabalhos afirmam que a funcionalidade das células T CD57+CD4+ e CD57+CD8+ pode ser considerada benéfica, especialmente sob certas condições patológicas, uma vez que as células T CD57+ possuem atividade imunossupressora (HASSOUNEH et al., 2021; CANTISÁN et al., 2007).

Um estudo conduzido em camundongos mostrou que para manter as células T efetoras ativas contra a reativação viral é necessário a estimulação contínua dos linfócitos T e exposição persistente ao antígeno (TORTI, et al., 2011). Essa exposição frequente ao longo da vida demanda um equilíbrio entre a presença de linfócitos T efetores CD57+ de curta duração e linfócitos T efetores CD8+CD57- de vida longa, para que haja uma imunidade prolongada contra o HCMV sem o desenvolvimento da doença (PALEY, et al., 2012; SMITH, et al., 2012).

Entretanto, os resultados desses estudos se referem a indivíduos saudáveis e modelos com camundongos. Por isso, há poucas chances de que o mesmo ocorra em pacientes transplantados, visto que a condição imunológica desses indivíduos é comprometida pelos imunossupressores e, quando somada ao envelhecimento, pode diminuir ainda mais a efetividade do sistema imune no controle da infecção.

Apesar de não ter sido encontrado diferença entre os indivíduos testados, o IFN γ é uma importante citocina para resposta antiviral, sua atividade contribui para a resolução das infecções, após a infecção viral, o IFN γ ativa vias de sinalização como a via JAK-STAT e promove ativação de genes dependentes de sua ação, como genes envolvidos na apresentação de antígenos, como por exemplo os genes de HLA de classe I e classe II e peptidases (FENG, et al., 2018; BARON; DAVIGNON, 2008).

No entanto, a resposta do IFN γ à infecção por HCMV é complexa, com picos temporais de atividade da citocina que ocorrem ao longo do ciclo viral e o seu papel precisa ser melhor investigado (GOODWIN, et al., 2018). Alguns estudos sobre a

citocina e o HCMV descrevem muito sobre sua atividade antiviral, mas evidenciam também os genes de evasão que o vírus possui e favorece a diminuição da atividade de IFN γ e favorece a resistência viral (FENG, et al., 2018; BARON; DAVIGNON, 2008; GOODWIN, et al., 2018; JACKSON, et al., 2017; MANANDHAR, et al., 2019). A ausência de diferença na produção de IFN γ nos grupos estudados, somado aos mecanismos do HCMV para diminuir a atividade da citocina na presença da infecção, pode ser um motivo para rever a produção de IFN γ como marcador de prognóstico favorável. Não se limitar a apenas uma citocina pode ser mais interessante, seja em uma ferramenta prognóstica ou ensaios celulares para avaliar melhores formas de tratamento profiláticos de HCMV.

Avaliamos também a citocina IL-2, inicialmente caracterizada como um fator de crescimento de linfócitos T, mas que atualmente também é identificada como um fator importante na morte celular induzida por ativação, no desenvolvimento de Tregs e de linfócitos T citotóxicos, expansão secundária de linfócitos T CD8 $^{+}$ de memória e modular a diferenciação de linfócitos T auxiliares (LIAO, et al., 2011).

A maioria dos estudos sobre a citocina IL-2 e o HCMV estão direcionados à capacidade de ativação de células imunes na presença da infecção pelo vírus. Como exemplo, Zeguang Wu e colaboradores (2015) observaram que a IL-2 secretada pelos linfócitos T CD4 $^{+}$ em uma reexposição ao vírus, aumenta a atividade das células NK na resposta às células infectadas. Essa foi a primeira evidência da contribuição de linfócitos T auxiliando as células NK na infecção por HCMV (WU Z, et al., 2015). Outros autores indicam que a produção de IL-2 pelos linfócitos T específicos se correlaciona com a habilidade de proliferar e contribuir com o controle da infecção viral (HARARI et al., 2005). E o autor salienta que os diferentes padrões de resposta dos linfócitos CD4 $^{+}$ e CD8 $^{+}$ vão depender do nível de replicação viral e atividade da doença (HARARI et al., 2006).

A IL-17A atua entre as respostas imune inata e adaptativa e é produzida por células como linfócitos T CD8, células NK e NKT, células linfoides inatas (ILC), mastócitos, eosinófilos e neutrófilos. O papel dessa citocina em diversas infecções virais (zika, dengue e chikungunya, covid-19, influenza, herpes vírus e outras) pode ser tanto importante para controlar os vírus, como também pode induzir condições deletérias em alguns casos (PAIVA, et. al., 2021). No contexto da infecção por HCMV, um estudo recente realizado com camundongos mostrou que no modelo animal a infecção por CMV causa danos ao enxerto transplantado quando há recrutamento de

células com perfil TH17. Os autores relatam também que ainda não foi descrito na literatura uma relação clínica direta entre infecção por HCMV e as células com perfil TH17 e sua participação na rejeição de transplantes (DHITAL, et al., 2022).

A IL-10, por sua vez, é uma citocina imunoregulatória que atua no controle da intensidade da resposta imune para evitar a exacerbação da inflamação e o dano tecidual. Essa interleucina é muito importante pois, em muitas infecções as complicações mais severas podem ser consequência de uma ativação excessiva da resposta imune (ROJAS, et al., 2017). Na infecção por HCMV o papel da IL-10 é muito associado ao favorecimento da replicação do vírus, por permitir um ambiente mais anti-inflamatório. Além disso, o HCMV possui um gene (UL111A) que codifica uma IL-10 homóloga com diversas funções imunomodulatórias como a supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias, inibição da maturação de células dendríticas e da expressão dos HLAs I e II (KOTENKO, et al., 2000). Um estudo que explorou a atividade dessa citocina homóloga, descreve que ela pode intensificar o efeito de imunossupressão da IL-10 humana, mas o impacto dessa atividade em conjunto na infecção por HCMV ainda é desconhecido (AVDIC, et al., 2016).

4.5 Células T CD8+CD57+ de pacientes que apresentaram infecção grave por HCMV possuem aumento na produção de TNF

Devido ao aumento da expressão de CD57 nos linfócitos TCD8+ de pacientes do grupo grave em relação ao grupo leve, verificamos o MFI (mediana de intensidade de fluorescência) de cada citocina TNF, IL-2, IL-17A, IL-10 e IFN γ produzida por essa subpopulação. A maioria das citocinas testadas não apresentaram diferenças de MFI entre os grupos avaliados. No entanto, observamos um maior valor de MFI do TNF

em pacientes do grupo grave quando comparado com os grupos leve e controle (Figura 12).

Como já mencionado anteriormente, a subpopulação de linfócitos CD57+ possui uma efetividade de combate a infecções reduzida, o que somado ao aumento de TNF produzido por essas células, pode indicar o desfecho clínico negativo observado nesse grupo. A maior produção dessa subpopulação em pacientes com desfecho grave pode estar contribuindo com a predominância da atividade do vírus em relação a resposta imune do indivíduo. No caso do TNF, aparentemente ele não só auxilia na infecção estimulando a replicação viral, como discutido anteriormente, mas pode ser patológico também.

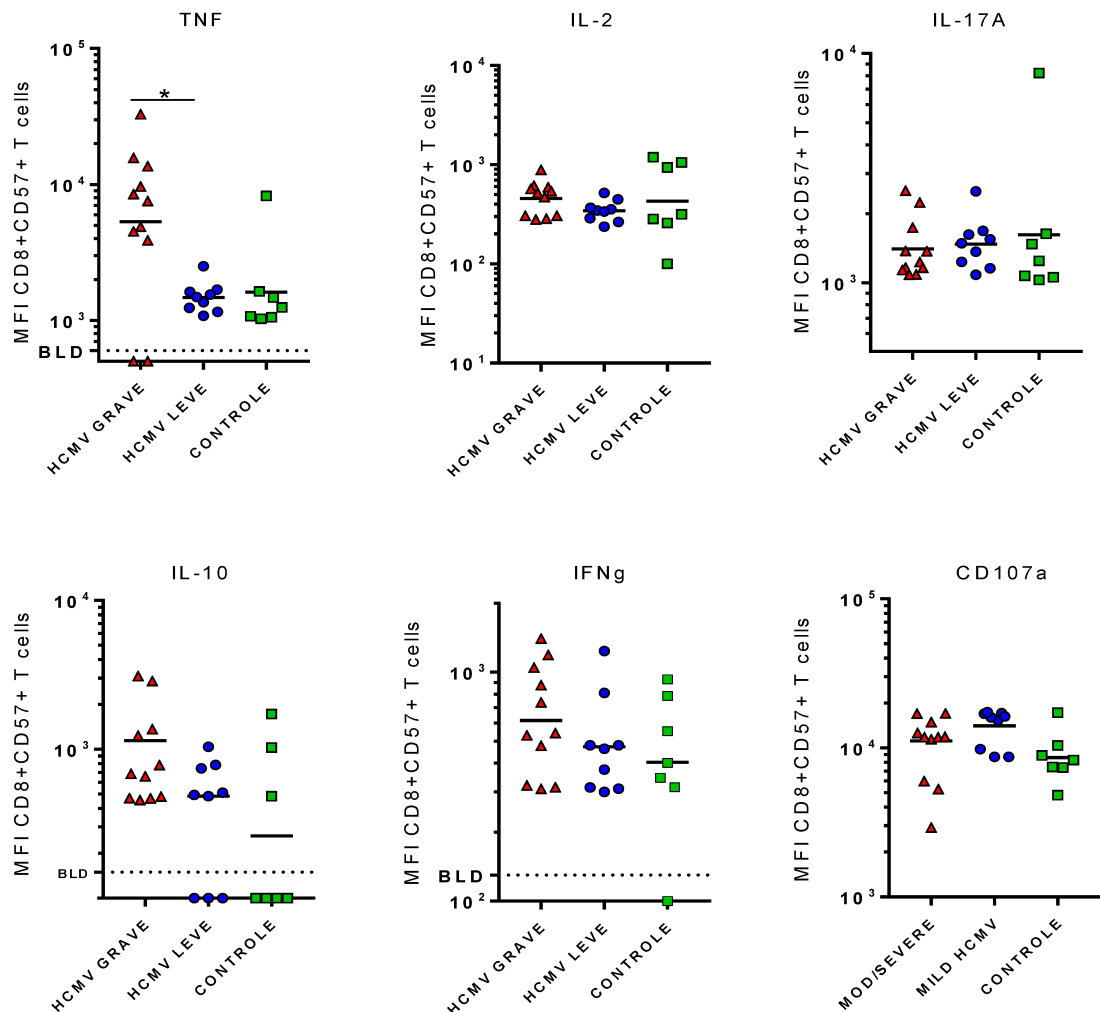


Figura 11. Análise do MFI das citocinas produzidas pelos linfócitos T CD8+ na subpopulação CD57+ dos pacientes transplantados. Pacientes que tiveram desfecho clínico grave estão representados em triângulos vermelhos (n=11), os pacientes com desfecho clínico leve representados pelos círculos azuis (n=9) e o grupo controle pelos quadrados em verde (n=7). As diferenças observadas entre os grupos foram analisadas pelo teste estatístico One-Way ANOVA. (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001)

Como o Brasil é um dos países que mais realiza transplantes no mundo, e a infecção por HCMV é muito prevalente nesse contexto, é preciso considerar que alguns outros avanços devem ser feitos para melhorar a conduta clínica na infecção do HCMV nos indivíduos transplantados. Um exemplo é a elaboração de uma classificação geral das gravidades de infecção, para conseguir segregar e entender melhor os desfechos encontrados nos transplantados e assim estudar melhor o perfil desses pacientes em todo Brasil. Principalmente pelo fato do SUS ser o responsável pelo transplante no país, estudos unificados podem ajudar a entender melhor o perfil clínico dos pacientes que recebem o mesmo tratamento, mas apresentam desfechos completamente diferentes na infecção por HCMV.

4.6. Diferentes alelos de HLA exibem perfis distintos de interação com proteínas imunogênicas do HCMV

Durante a elaboração da biblioteca de peptídeos do HCMV, na seleção das regiões das proteínas, observamos HLAs que realizaram muitas interações de alta e intermediária afinidade ao longo das proteínas, como também HLAs que fazem pouca ou nenhuma interação de afinidade alta e intermediária com as proteínas do vírus.

Nesse sentido, ao avaliar um repertório de 27 HLAs de classe I mais prevalentes na população mundial e suas respectivas interações com as proteínas do HCMV, observamos que alguns HLAs, como os A*02:03, A*02:06, A*31:01 e A*68:01 interagem bem com os epítomos da grande maioria das proteínas analisadas do HCMV (Tabela 5). Ao passo que, outros interagem muito pouco, como os A*01:01, A*26:01, B*51:01 e B*44:02 (Tabela 5). Por exemplo, o HLA A*02:03 foi o que apresentou mais interações com os peptídeos do HCMV em todas as proteínas, exceto a US32. Por outro lado, os HLAs A*26:01, A*01:01, B*51:01 apresentaram desempenho inferior, exibindo nenhuma ou pouca interação com peptídeos das 10 proteínas analisadas (Tabela 5). A UL48 (maior proteína do vírus) foi a proteína mais imunogênica, seguido por UL55, UL29, UL32, UL28, UL83 (pp65- mais estudada), UL122, UL123, US3 e US32.

Tabela 5. Análise da frequência dos HLAs presentes no estudo *in silico*

PROTEÍNA	HLAs DE MAIS INTERAÇÕES	HLAs DE MENOS INTERAÇÕES	HLAs SEM INTERAÇÕES
PP65	A*02:03>A*02:06>A*68:01>A*68:02	B*44:02>A*26:01/A*32:01>B*57:01	A*01:01 / B*51:01
UL48	A*02:03>A*02:06>A*31:01>A*68:01	B*44:02>A*26:01>A*01:01>B*51:01	XXX
UL28	A*02:03>A*02:06>A*31:01>A*68:01	B*44:02>B*53:01>A*01:01>A*26:01	B*51:01
UL29	A*02:06>A*02:03>A*31:01>A*68:02	B*58:01>B*53:01>A*01:01>A*26:01	B*51:01
UL32	B*07:02>A*68:02>A*02:03>A*68:01	A*24:02>A*26:01>A*01:01>B*51:01	XXX
UL55	A*02:03>A*02:06>A*68:01>A*68:02	B*44:03>B*08:01>B*53:01>B*51:01	XXX
UL122	A*02:03>A*02:06>A*68:02>B*07:02	A*23:01/A*26:01/B*51:01>B*44:03	A*01:01
UL123	A*02:03>A*02:06>A*68:01>A*68:02	B*51:01/B*57:01/B*58:01/A*26:01	XXX
US3	A*02:01>A*02:03>A*02:06>A*68:01	B*57:01/A*01:01/B*53:01>A*26:01	B*51:01
US32	A*31:01>A*33:01>A*68:01>A*30:01	B*35:01>A*26:01>B*44:02/A*01:01	A*02:01 / B*51:01

Para ilustrar, na figura 13 estão as interações da proteína UL48 com cada um dos 27 HLAs mais prevalentes do mundo, previamente selecionados no banco de dados do IEDB. Os HLAs A*02:03, A*02:06, A*31:01 e A*68:01 contornados pelo retângulo azul, representam os HLAs com maior número de interações. Em contrapartida, os HLAs A*01:01, A*26:01, B*44:02 e B*51:01 realizaram poucas ligações com a proteína.

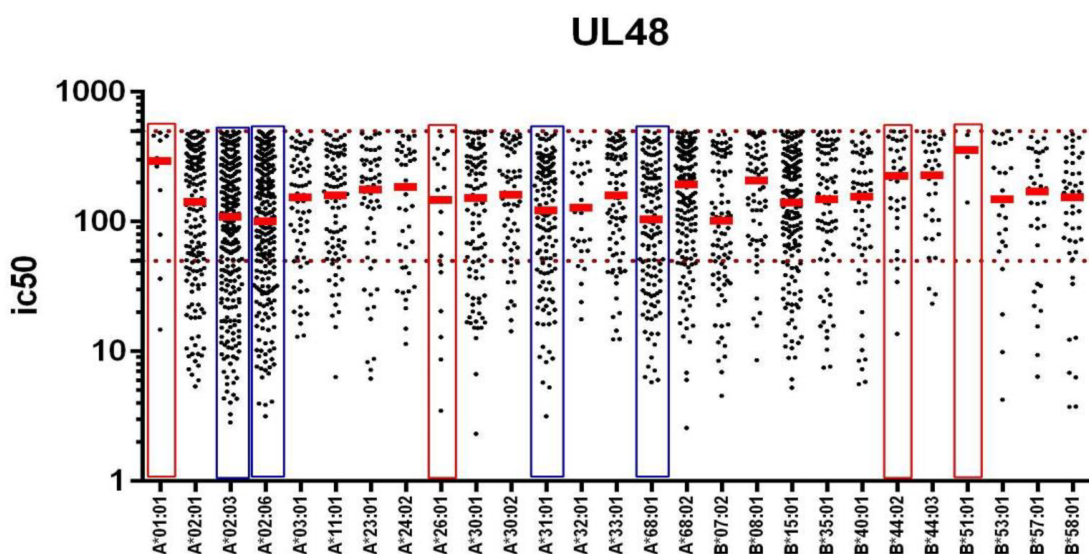


Figura 13. Interação de cada um dos 27 HLA's com a proteína UL48. A parte inferior do gráfico, abaixo da primeira linha vermelha (50nM) estão as ligações de alta afinidade e a parte superior, entre a primeira e a segunda linha (50 e 500nM), estão as ligações de afinidade intermediária. Os retângulos azuis representam os HLA's que mais interagem com a proteína, os vermelhos representam HLA's que menos interagem com a proteína.

Em contraste, a proteína US32 (Figura 14), não apresentou muitas interações com os HLA's, inclusive dois HLA's, A*02:01 e B*51:01 não apresentaram nenhuma interação de afinidade alta ou intermediária com essa proteína. Os HLA's com números mais significativos de interações foram o A*30:01, A*31:01, A*33:01 e A*68:01.

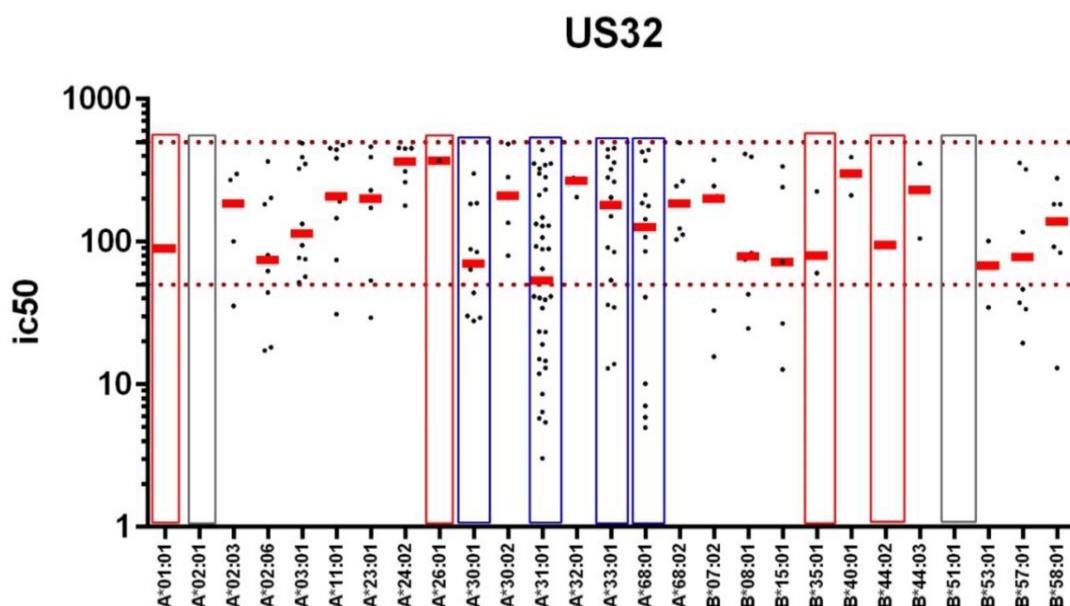


Figura 12. Interação de cada um dos 27 HLA's com a US32. A parte inferior do gráfico, abaixo da primeira linha vermelha (50nM) estão as ligações de alta afinidade e a parte superior, entre a primeira e a segunda linha (50 e 500nM), estão as ligações de afinidade intermediária. Os retângulos azuis representam os HLA's que mais interagem com a proteína, os vermelhos representam HLA's que menos interagem com a proteína e os retângulos em cinza destacam HLA's que não apresentaram interações de alta ou de afinidade intermediária.

Esses resultados foram obtidos utilizando métodos da imunoinformática que demonstram o potencial na identificação da diversidade de interações entre as proteínas virais e os diferentes HLAs presentes na população, levando-nos a especular sobre o tipo de repertório de HLA de um determinado indivíduo e sua resistência a doenças infecciosas. Como observado, alguns HLAs possuem alta capacidade de apresentar peptídeos de HCMV, enquanto alguns HLAs possuem baixa capacidade. Uma hipótese que emerge dessa observação é se indivíduos com um repertório de HLA com baixa capacidade de apresentação seria mais susceptível à infecção por HCMV.

4.7 Frequência de HLAs em pacientes transplantados com diferentes desfechos clínicos na infecção por HCMV

Para avaliar a importância do HLA no desfecho da infecção, realizamos um estudo *in silico* retrospectivo caso-controle com o objetivo de estudar o perfil dos diferentes repertórios de HLA dos pacientes transplantados que já tiveram infecção leve ou grave por HCMV.

4.7.1 Recrutamento dos pacientes para o estudo retrospectivo

O recrutamento dos pacientes transplantados para o estudo retrospectivo foi realizado no Hospital Felício Rocho localizado em Belo Horizonte/MG. Nessa parte do trabalho, os pacientes foram distribuídos em dois grupos: pacientes que tiveram infecção por HCMV leve (infecção assintomática, baixa carga viral, e menos de 25 dias de hospitalização) e pacientes que tiveram HCMV grave (infecção sintomática, alta carga viral e mais de 25 dias de hospitalização). Os dados dos pacientes estão representados na tabela 6:

Tabela 6. Tabela de informações dos participantes do estudo retrospectivo de caso-controle.

In silico	HCMV Leve	HCMV Grave
N amostral	40	31
Idade	47.75 (22-68)	49.8 (23-72)
Sexo (m)	67.5% (27/40)	41.9% (13/31)
IgG (+) pré-tx	100% (40/40)	100% (31/31)
Medicação Imunossupressora	Tacrolimus (tac) + micofelonato de sódio (mps) + prednisona (pred)	
Tipo de transplante	RIM	
Média tempo de HCMV após o transplante	41 DIAS	41 DIAS
Duração média de tratamento	16 DIAS	28 DIAS

4.7.2 Os pacientes presentes no estudo possuem HLAs de diferentes perfis de interação com as proteínas do HCMV

A população brasileira é conhecida pela grande variabilidade genética que possui advindo do processo de miscigenação de diferentes etnias que por aqui se fixaram desde a sua colonização pelos portugueses. As moléculas de HLA são altamente polimórficas por serem moléculas herdadas, cada indivíduo possui um alelo do pai e um da mãe (SECOLIN, et al., 2021; AZULAY; PORTO, et al., 2021).

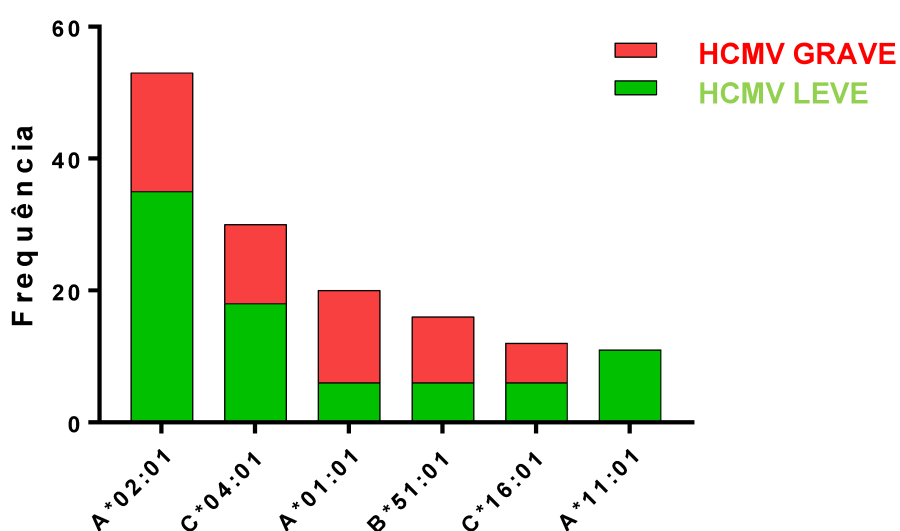


Figura 14. Frequência de alguns HLAs presentes nos pacientes. O preenchimento em verde nas barras dos HLAs representa a frequência encontrada em indivíduos que apresentaram desfecho clínico leve na infecção pelo HCMV, e o preenchimento em vermelho representam a frequência encontrada em indivíduos com desfecho grave pelo HCMV.

A figura 15 representa a frequência de alguns dos HLAs mais prevalentes nos pacientes recrutados para o estudo e a sua relação com a evolução clínica do HCMV. Observamos que alguns HLAs são mais frequentes em indivíduos que apresentaram desfecho leve na infecção por HCMV (A*02:01, A*04:01 e A*11:01) e em contrapartida, alguns HLAs são mais frequentes em indivíduos com desfecho grave na infecção por HCMV (A*01:01, C*16:01 e B*51:01). A diferença observada nessa frequência dos HLAs nos pacientes com diferentes desfechos clínicos nos leva a questionar se a presença desses alelos no repertório de cada paciente é capaz de determinar de forma isolada o desfecho clínico por HCMV, ou se um conjunto de alelos podem aumentar o risco de uma infecção mais grave se estabelecer.

O polimorfismo apresentado pelos HLAs contribui com as diferenças no perfil de resistência e susceptibilidade a infecções e doenças, interferindo na resposta imunológica a vários tipos de patógenos (SOMMER, et al., 2005). A relação entre o repertório de HLA e a susceptibilidade ou proteção a doenças é muito discutido, porém o mecanismo que determina essa característica do HLA na infecção ainda não é bem compreendido (MEDHASI, et al., 2022).

Obter a classificação de susceptibilidade ou proteção dos diferentes HLAs frente a uma infecção pode ajudar no entendimento do que determina a patogênese de doenças (PROFAIZER, et al., 2020). Portanto, a classificação de HLA pode identificar associações entre os alelos e as infecções em um indivíduo e com isso auxiliar na elucidação dos mecanismos imunológicos que contribuem com o desfecho clínico das doenças (CRUX; ELAHI, 2017; LIU; ZHANG, 2020).

Identificar HLAs com maior relevância clínica em diversas infecções pode contribuir com avanços e melhorias no diagnóstico, tratamento e prevenção, ou seja, a tipificação do HLA pode se tornar uma ferramenta médica para otimizar e melhorar a conduta clínica (MEDHASI; CHANTRATITA, et al., 2022). Cabe ressaltar que a grande variabilidade genética entre as populações pode ser um limitante na padronização da ferramenta para todos os contextos da saúde, talvez certos HLAs em uma população podem estar relacionados a um desfecho e em outras regiões e etnias o desfecho ser o contrário. Por isso, o desenvolvimento de uma pontuação (score) pode facilitar a utilização do HLA como ferramenta médica no futuro da chamada “medicina de precisão” como um critério a ser considerado na conduta clínica com o paciente.

4.8 Elaboração do score de HLAs do HCMV

Com as informações obtidas das planilhas de interação entre peptídeos e os HLAs, criamos um *score* baseado no número de interações de afinidade alta (H) e intermediária (I) $IC_{50} < 500nM$ de cada HLA com as proteínas mais imunogênicas do HCMV. Cada HLA apresentou um número de interações relevantes para cada proteína estudada e cálculo do valor do *score* foi realizado pelo somatório final do número de interações com as proteínas estudadas (Tabela 7).

Tabela 7. Score dos HLAs elaborado de acordo com o número de interações de intermediária e alta afinidade

HLAs	UL48	PP65	UL122	UL123	US32	US3	UL32	UL55	UL29	UL28	US29	SCORE
HLA-A*01:01	7	0	0	5	2	1	1	13	4	4	5	42
HLA-A*02:01	181	47	32	33	1	31	23	63	52	34	30	527
HLA-A*02:02	308	74	51	51	4	35	51	117	91	55	52	889
HLA-A*02:05	241	56	46	43	5	28	53	95	63	44	40	714
HLA-A*02:06	218	62	42	47	7	34	46	99	73	48	40	716
HLA-A*03:01	0	14	15	21	7	8	36	43	24	16	8	192
HLA-A*11:01	81	28	25	20	9	11	58	68	27	19	17	363
HLA-A*23:01	57	14	2	9	3	10	7	26	20	17	11	176
HLA-A*24:02	41	11	2	8	1	6	5	22	15	12	8	131
HLA-A*25:01	5	1	1	0	0	0	0	10	3	0	2	22
HLA-A*26:01	12	2	2	2	1	1	3	20	8	4	5	60
HLA-A*29:01	75	17	4	11	2	10	13	59	35	24	19	269
HLA-A*29:02	75	17	4	11	2	10	13	59	35	24	19	269
HLA-A*30:01	124	40	48	38	21	9	104	91	75	38	33	621
HLA-A*30:02	69	10	6	8	5	8	22	67	34	22	21	272
HLA-A*31:01	142	34	22	27	34	19	61	71	85	55	39	589
HLA-A*32:01	48	11	6	12	6	2	7	17	25	14	9	157
HLA-A*33:01	76	16	7	12	17	14	25	48	47	34	19	315
HLA-A*33:03	116	30	14	16	23	18	51	67	71	47	32	485
HLA-A*34:02	88	29	19	23	9	13	65	86	41	28	24	425
HLA-A*36:01	9	0	0	3	2	1	0	10	6	5	6	42
HLA-A*66:01	11	3	4	8	3	1	5	22	7	6	2	72
HLA-A*66:02	17	10	9	12	5	2	11	31	12	9	7	125
HLA-A*68:01	137	43	30	31	12	19	93	98	63	42	32	600
HLA-A*68:02	142	39	32	25	2	13	55	75	48	35	33	499
HLA-A*68:03	95	29	18	18	9	14	53	67	49	32	25	409
HLA-A*69:01	62	28	23	18	1	7	29	47	34	21	16	286
HLA-A*74:01	18	6	1	5	6	3	4	10	11	7	2	73
HLA-B*07:02	67	16	28	17	3	5	68	11	28	14	12	269
HLA-B*07:05	100	23	41	25	3	8	95	20	44	22	19	400
HLA-B*08:01	48	7	9	15	4	2	18	11	23	11	8	156
HLA-B*13:02	3	2	1	2	1	0	0	2	2	1	0	14
HLA-B*14:01	7	1	1	0	1	0	2	3	0	0	3	18
HLA-B*14:02	7	1	1	0	1	0	2	3	0	0	3	18
HLA-B*14:03	5	0	1	0	1	0	2	3	1	0	3	16
HLA-B*15:01	131	32	17	22	5	10	37	68	52	37	22	433
HLA-B*15:03	264	64	48	52	17	20	79	129	104	62	44	883
HLA-B*15:09	6	1	1	0	1	1	3	2	2	1	3	21
HLA-B*15:10	3	0	0	0	1	0	2	1	0	0	1	8
HLA-B*15:15	42	6	5	9	2	1	10	29	17	10	6	137
HLA-B*15:16	26	12	7	8	3	2	8	27	11	5	14	123
HLA-B*15:17	175	33	28	30	13	20	53	92	49	29	43	565
HLA-B*15:39	161	40	24	32	6	12	43	82	61	41	28	530
HLA-B*27:02	1	0	0	0	2	2	0	0	1	0	3	9
HLA-B*27:03	0	0	0	1	2	0	1	0	2	1	0	7
HLA-B*27:05	106	14	8	21	18	9	28	36	64	37	29	370
HLA-B*35:01	62	16	12	9	2	6	23	45	23	14	11	223
HLA-B*35:02	21	1	7	5	1	2	10	6	4	2	2	61
HLA-B*35:12	21	1	7	5	1	2	10	6	4	2	2	61
HLA-B*35:14	29	6	6	4	2	3	14	20	14	6	6	110
HLA-B*37:01	14	1	1	2	1	0	2	4	4	1	3	33
HLA-B*38:01	17	5	3	2	3	4	2	3	6	3	4	52
HLA-B*39:01	50	8	9	6	2	3	11	14	13	6	8	130
HLA-B*39:02	104	21	17	19	5	4	24	36	25	13	17	285
HLA-B*39:05	16	5	4	2	1	2	3	5	4	3	6	51
HLA-B*39:06	30	5	7	0	2	0	12	10	4	1	5	76
HLA-B*39:10	60	11	23	20	3	6	38	13	19	11	8	212
HLA-B*40:01	45	6	8	10	1	1	10	25	13	8	8	135
HLA-B*40:02	70	12	10	10	4	4	17	33	21	9	10	200
HLA-B*40:05	36	11	7	8	2	1	14	22	13	8	9	131
HLA-B*41:01	73	16	11	15	5	3	24	27	23	10	11	218
HLA-B*41:02	85	15	9	14	5	4	23	42	26	13	12	248
HLA-B*42:01	92	22	34	23	3	7	75	19	35	17	16	343

HLA-B*44:02	21	8	2	6	1	7	6	20	13	6	1	91
HLA-B*44:03	21	9	2	9	1	5	6	16	13	6	1	89
HLA-B*45:01	39	10	6	16	2	1	16	13	15	6	4	128
HLA-B*48:01	4	3	1	1	1	0	2	3	2	2	2	21
HLA-B*49:01	9	4	2	0	0	2	3	7	6	3	2	38
HLA-B*50:01	25	5	5	4	2	2	13	10	8	5	1	80
HLA-B*50:02	24	5	3	8	1	1	13	7	7	5	3	77
HLA-B*51:01	4	0	2	0	0	1	1	2	0	0	1	11
HLA-B*52:01	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
HLA-B*53:01	25	10	6	4	2	2	10	8	8	4	1	80
HLA-B*55:01	9	1	3	3	1	1	12	6	5	2	1	44
HLA-B*56:01	15	4	4	4	1	1	18	9	3	1	3	63
HLA-B*57:01	32	12	3	3	9	5	9	22	19	13	15	142
HLA-B*57:03	45	11	7	6	6	6	13	22	14	8	16	154
HLA-B*58:01	70	20	8	12	9	9	19	38	25	15	18	243
HLA-B*58:02	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
HLA-B*81:01	23	1	9	1	0	4	16	3	6	3	3	69
HLA-B*82:01	7	1	0	1	0	0	10	1	2	0	2	24
HLA-C*01:02	13	7	4	2	0	0	5	1	10	3	3	48
HLA-C*02:02	20	6	6	4	1	2	7	28	10	5	6	95
HLA-C*03:02	122	32	20	23	6	7	34	71	39	24	29	407
HLA-C*03:03	78	22	19	18	2	4	19	35	25	11	16	249
HLA-C*03:04	78	22	19	18	2	4	19	35	25	11	16	249
HLA-C*04:01	3	1	1	0	0	0	0	0	2	2	0	9
HLA-C*05:01	18	1	6	7	0	4	4	12	7	4	2	65
HLA-C*06:02	27	4	5	1	1	0	4	8	8	4	3	65
HLA-C*07:01	22	3	5	2	1	1	6	15	8	4	5	72
HLA-C*07:02	39	4	4	1	1	3	7	18	10	8	5	100
HLA-C*08:01	7	0	3	5	0	1	0	5	1	0	1	23
HLA-C*08:02	16	0	6	5	0	3	5	7	3	1	2	48
HLA-C*08:04	14	3	5	5	0	2	2	12	4	1	4	52
HLA-C*12:02	43	14	9	8	3	3	14	41	20	10	9	174
HLA-C*12:03	86	23	14	18	3	9	26	60	35	21	17	312
HLA-C*14:02	107	26	14	19	4	12	28	63	61	38	16	388
HLA-C*15:02	34	12	15	6	2	6	11	25	15	9	10	145
HLA-C*15:05	14	7	8	3	1	5	3	14	10	4	4	73
HLA-C*16:01	145	29	26	23	7	10	41	76	43	19	30	449
HLA-C*17:01	36	13	11	12	0	7	5	22	11	5	7	129
HLA-C*18:01	2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	4

4.8.1 Aplicação do score nos pacientes transplantados e estimativa da pontuação do repertório

Após a elaboração dos valores de *score* de cada HLA-I, ele foi aplicado aos respectivos HLAs de pacientes transplantados. Dessa forma, cada paciente recebeu uma pontuação para o seu repertório de HLA, que é a somatória dos scores de todos os HLAs do repertório (tabela 8).

Tabela 8. Representação da aplicação do score nos pacientes transplantados

	A1	A2	B1	B2	C1	C2	SCORE
PACIENTE 1	A*01:01	A*26:01	B*18:01	B*38:01	C*07:01	C*12:03	
SCORE	42	60	91	52	72	312	629
PACIENTE 2	A*24:02	A*24:02	B*18:01	B*18:01	C*05:01	C*05:01	
SCORE	131	131	91	91	65	65	574
PACIENTE 3	A*26:01	A*26:01	B*38:01	B*38:01	C*12:03	C*12:03	
SCORE	60	60	52	52	312	312	848
PACIENTE 4	A*01:01	A*24:02	B*08:01	B*44:02	C*07:01	C*05:01	
SCORE	42	131	156	91	72	65	557
PACIENTE 5	A*03:01	A*11:01	B*07:02	B*18:01	C*07:02	C*05:01	
SCORE	192	363	269	91	100	65	1080

4.9 O score de HLAs aplicado aos pacientes e sua capacidade em prever o desfecho clínico da infecção por HCMV

Ao obter o score dos pacientes transplantados e separá-los conforme o desfecho da infecção por HCMV, observamos que os pacientes com maior valor de *score* tiveram uma apresentação clínica da reativação da infecção do HCMV classificada como leve, provavelmente porque esse repertório de HLA seria o mais provável de reconhecer de forma mais efetiva o HCMV, e os pacientes que tiveram HCMV grave apresentaram valores de *score* mais baixos (Figura 16).

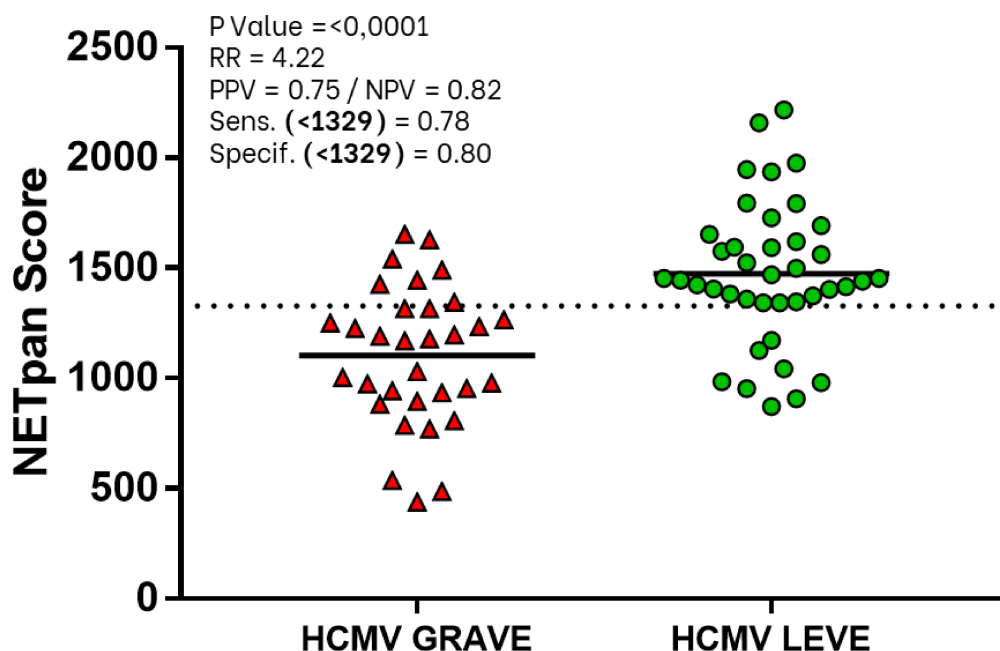


Figura 15. Score de HLA e desfecho clínico da infecção por HCMV em pacientes transplantados. Pacientes que tiveram a infecção grave por HCMV estão representados nos triângulos vermelhos e os pacientes de infecção leve por HCMV estão representados nos círculos verdes. A linha tracejada representa o ponto de corte para score alto e score baixo (1329). Ponto de corte calculado pela curva ROC; Relative Risk (RR) = 3.4; Positive Predictive Value (PPV) = 0.78; Negative Predictive Value (NPV) = 0.75; Sensitivity (Sens) = 0.73; Specificity (Specif) = 0.8.

Para definir um ponto de corte no valor de score para um possível uso prognóstico, foi realizado o cálculo da curva ROC (Figura 17), sendo o valor que melhor separa as populações de acordo com o desfecho de infecção por HCMV é 1329.

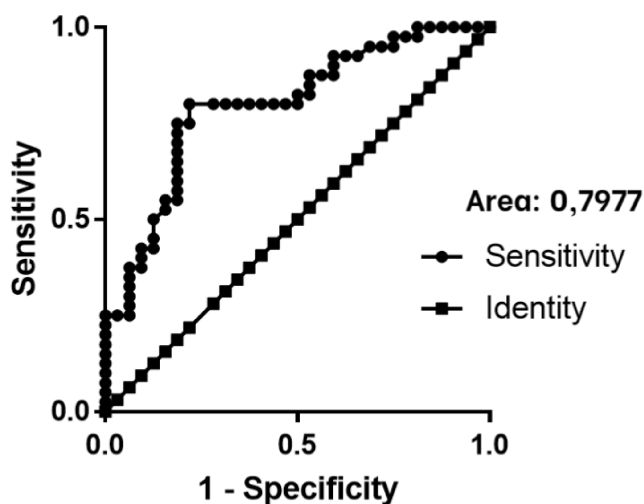


Figura 16. Análise da curva ROC para definir o ponto de corte no score de HLAs dos pacientes transplantados

De forma interessante, a maioria dos pacientes com *score* inferior a 1329 pertencem ao grupo de desfecho clínico grave na infecção por HCMV. Esses pacientes apresentaram sintomas como febre, infecção com alta carga viral, mais de 25 dias de hospitalização e, em alguns casos, inflamação no sítio do tecido transplantado. Essas complicações e manifestações de sintomas comprometem a recuperação após o transplante e aumentam os dias de permanência no hospital aumentando o risco de rejeição do órgão transplantado. Por outro lado, os pacientes com *score* superior a 1329 tiveram em geral desfecho clínico leve na infecção por HCMV com ausência de sintomas, baixa carga viral e menos que 25 dias de hospitalização.

Dentro da população testada, o *score* abaixo de 1329 apresentou um risco relativo (RR) de 4.22, ou seja, os pacientes com valor de *score* baixos têm 4x mais chances de apresentar um desfecho clínico grave caso tenham uma doença causada por reativação do HCMV. Além disso, o valor preditivo positivo (PPV) do *score* foi de 75%, o valor preditivo negativo (NPV) de 82% e a sensibilidade e especificidade do *score* foi de 78% e 80% respectivamente, baseado nos pacientes e desfechos clínicos analisados.

4.10 O *score* de HLAs dos pacientes se correlaciona negativamente com a produção de IL-10 e IL-17A pelos linfócitos T CD8+

Para avaliar se a produção de citocinas pode estar relacionada com o *score* dos pacientes e desfecho clínico, verificamos a correlação entre o *score* desenvolvido e os resultados de citocinas obtidos através da citometria de fluxo das PBMCs estimuladas com a biblioteca de peptídeos do HCMV. A produção das citocinas IL-10 e IL-17A pelos pacientes transplantados apresentaram uma correlação negativa com o valor de *score* apresentado pelos pacientes (Figura 18).

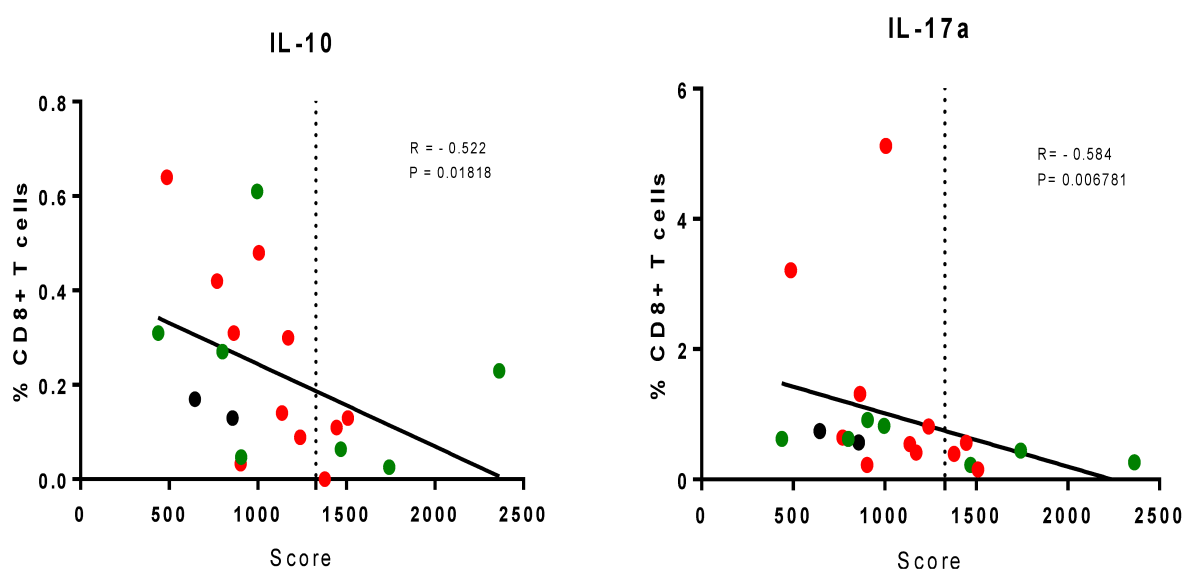


Figura 17. Correlação entre produção das citocinas IL-10 (A) e IL-17A (B) pelos linfócitos T CD8+ e o score de HLA. Pacientes que tiveram infecção grave pelo HCMV estão representados pelos círculos vermelhos e os pacientes que tiveram HCMV leve estão representados nos círculos verdes. Pacientes que nunca tiveram infecção por HCMV estão representados nos círculos pretos. A linha tracejada representa o valor de score de 1329. Os testes de correlação foram realizados no prisma e foram encontrados valores de R negativos, mostrando a correlação negativa entre valor de score e produção das citocinas.

A IL-10, uma citocina importante no controle da inflamação provocada pela resposta imune, proporciona um efeito mais anti-inflamatório e é muito estudada e citada nos estudos relacionados a resposta ao HCMV e na maioria das vezes exercendo um papel não tão regulador como esperado. A maioria dos estudos do sobre IL-10 nas respostas contra o HCMV relaciona altos níveis dessa citocina à presença de maior carga viral, contribuição na reativação do vírus e persistência da infecção em pacientes transplantados (SANDHU; BUCHKOVICH, 2020; MIN C-K, et al., 2020; HOLDER; GRANT, 2019). No presente estudo, não foi possível confirmar tal associação, pois não observamos diferenças na produção de IL-10 comparando os grupos leve e grave, provavelmente devido ao pequeno N amostral. Porém, observamos uma correlação negativa em que a grande maioria dos pacientes com score <1329 apresentam maior produção de IL-10, reforçando a suspeita dos efeitos deletérios dessa citocina na infecção.

Uma outra característica muito importante, é que o HCMV é capaz de produzir uma IL-10 homologa à do hospedeiro e propiciar um ambiente mais anti-inflamatório favorável à sua replicação e infecção, e no contexto dos indivíduos imunossuprimidos já existe uma desvantagem ao vírus no ponto de vista de efetividade do sistema imune. Ainda não é elucidado o quanto essa IL-10 do indivíduo pode ser associada

ao desfecho clínico, mas talvez, a presença da IL-10 homologa do vírus em conjunto com uma produção maior da IL-10 do paciente possa favorecer a continuidade da infecção pelo HCMV ou atrapalhar a resposta efetora associada ao seu controle (POOLE, et al., 2020; YOUNG, et al., 2017).

Em contrapartida, a participação da IL-17A na infecção por HCMV e no transplante ainda precisa ser muito estudada e discutida. Alguns estudos relacionam a presença da IL-17A com a rejeição no transplante, mas nada associado com a infecção por HCMV (FÁBREGA, et al., 2009). Já um estudo mais recente afirma que a presença de viremia do HCMV está associada a níveis séricos mais elevados de IL-17A nos pacientes de transplante renal que apresentam rejeição (DHITAL, et al., 2022). De acordo com esse trabalho, a infecção pelo vírus promove dano ao aloenxerto por meio do recrutamento de células do perfil Th1/17 mediado por citocinas (DHITAL, et al., 2022). Mais estudos com ênfase na IL-17A precisam ser realizados para se entender melhor o papel dessa citocina na infecção por HCMV em pacientes transplantados.

A grande maioria das infecções do HCMV são subclínicas e talvez por essa razão não existam muitos estudos buscando se aprofundar nos diferentes desfechos clínicos por ser um problema apenas em parte da população, os imunocomprometidos. Apesar de saber que a infecção causa danos a esses indivíduos, pouco se é explorado sobre as diferenças de uma infecção mais leve e uma mais grave, especialmente nos transplantados. Muitos estudos descrevem a biologia do vírus e principalmente os seus mecanismos de escape. Em contrapartida, não é possível hoje encontrar diretrizes que auxiliem na classificação de gravidade desses indivíduos na presença da infecção.

Uma das formas bem estabelecidas de definir risco de infecção por HCMV nos pacientes transplantados é o status sorológico. Na rotina clínica já é bem estabelecido que os transplantes que ocorrem entre doador IgG+ para o HCMV e o receptor IgG- são considerados de risco pela possível transmissão iatrogênica do vírus e também pela susceptibilidade aumentada devido a utilização dos imunossupressores. Porém, o risco de uma infecção mais grave não deve se limitar apenas a esse status sorológico, visto que nos dados do estudo retrospectivo a sorologia pré-transplante predominante em ambos os grupos de diferentes gravidades é IgG+. Além disso, muitos estudos sobre HCMV e transplantes também relacionam gravidade apenas à presença de viremia e se torna evidente que é preciso mais do que esses dois fatores

para determinar o risco de evolução na infecção, como por exemplo presença e gravidade de sintomas quando apresentados.

No presente estudo, foram considerados as manifestações de sintomas e tempo de internação para diferenciar um paciente como leve ou grave, de modo a evitar inserir um paciente em um grupo que não represente a sua gravidade de infecção. Ter essa classificação mais robusta e um consenso na clínica dos pacientes transplantados de uma maneira geral, contribuiria para comparar melhor os grupos de pacientes em estudos conduzidos em diferentes regiões por exemplo. Além disso, os resultados obtidos do score indicam que essa metodologia de classificar o repertório dos HLAs dos pacientes pode ser muito útil na detecção de pacientes transplantados que podem desenvolver uma infecção mais severa.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O número de transplantes realizados mundialmente tem crescido ano a ano e possibilitado que mais pacientes se recuperem de diversas doenças. É de se esperar que o número de complicações em pacientes transplantados e acometidos por HCMV também cresça. Em países com alta prevalência de infecção por HCMV, como o Brasil, o risco de complicações e perda do órgão é grande. De tal modo que mais pesquisas são necessárias para se evitar as complicações que o HCMV pode causar. Entre os pacientes transplantados com reativação de HCMV, alguns evoluem para formas de apresentação clínica graves e outros não. Investigar as diferenças na resposta imune desses pacientes poderá fornecer informações valiosas para o desenvolvimento de terapias mais eficazes para os pacientes que evoluem de forma grave, reduzindo a morbimortalidade e seus custos associados. O SUS é maior sistema público de transplantes no mundo. O fomento da pesquisa e desenvolvimento de novas estratégias na saúde pública, tais como o PPSUS (financiador deste projeto) é fundamental para melhoria dos resultados assistenciais e redução dos custos advindos de complicações pós-operatórias. Para isso, realizamos um estudo *in vitro* utilizando uma biblioteca de peptídeos de HCMV para estimular os PBMCs de pacientes que foram transplantados, e que possuíam desfecho clínico conhecido. Entre os pacientes que evoluíram de forma grave observamos um aumento da frequência de linfócitos T CD8⁺ produtores de TNF assim como aumento da

expressão do marcador CD57 nessa mesma população. Como já discutido, o papel dessa citocina tem sido descrito na literatura como sendo importante em alguns aspectos da infecção por HCMV, inclusive para reativação do vírus. Ao mesmo tempo, estudos sugeriram que o vírus possui mecanismos que poderiam bloquear os efeitos deletérios apresentados pelo TNF durante a infecção do vírus. Contudo, mais estudos são necessários para compreender o papel do TNF em diferentes momentos da infecção por HCMV. É necessário compreender como o TNF pode desencadear uma infecção mais grave nos pacientes transplantados com reativação do HCMV. E, se o TNF realmente for o causador de um desfecho mais grave, outra importante questão seria descrever as causas do aumento na expressão de TNF pelos linfócitos T CD8+.

Durante as análises para construção da biblioteca de peptídeos, uma segunda abordagem foi elaborada visando compreender os mecanismos pelos quais essa diferença no perfil de infecção pode ser desencadeada e se pode ter relação com os HLAs dos pacientes. Investigar o repertório de HLAs dos indivíduos transplantados e o tipo de interação estabelecida com os peptídeos do vírus poderia trazer informações importantes sobre a fase inicial e determinante da apresentação de antígenos. Para investigarmos o repertório de HLA dos pacientes e suas interações com o HCMV, realizamos um estudo retrospectivo de indivíduos transplantados previamente infectados e com desfecho leve e grave. De posse das informações da tipificação de HLA dos pacientes, por meio de estudos de bioinformática, foi gerado um score com base no número de interações de alta e intermediária afinidade que cada molécula de HLA realiza com epítopos das 10 proteínas mais imunogênicas do vírus. Observamos que de fato, o tipo de interação alta/intermediária ou baixa parece ter grande influência no desfecho clínico dos pacientes. De forma semelhante, para investigarmos o quanto esses dados se correlacionavam aplicamos o mesmo sistema de score para os pacientes que analisamos a resposta imune com a biblioteca de peptídeos. Quando cruzamos os dados das populações imunes e produção de citocinas dos pacientes com o valor de score, observamos uma correlação negativa entre o score e a produção de IL-10 e IL-17A. Portanto, os pacientes com score mais baixo e desfecho grave possuem maiores taxas de linfócitos T CD8+ produtoras de IL-10 e IL-17A. Isso indica uma possível relação entre o perfil do HLA do indivíduo, e consequentemente o tipo de interação com os peptídeos do HCMV, com a produção dessas citocinas. Para nossa surpresa, não foi observado uma correlação clara entre o valor de score e as populações produtoras de TNF. Além disso, as citocinas IL-10 e IL-17A que

apresentaram correlação negativa com o valor de score, não estavam aumentadas apenas nos pacientes com desfecho grave em relação aos casos leves no estudo da resposta imune.

Umas das possíveis explicações para tais achados pode ser a presença de valores altos de score em alguns pacientes graves e valores de score baixo em alguns pacientes leves, não havendo uma separação muito clara entre os dois grupos estudados. Além disso, seria desejável um número amostral maior para realização do estudo in vitro. Contudo, vale ressaltar que o recrutamento desses pacientes não é fácil, uma vez que muitos deles apresentam comprometimento de saúde ou de mobilidade para participação do estudo. Por isso, mais estudos e, especialmente, coortes mais longas são necessárias para obtenção de dados que confirmem esses achados. No entanto, o score elaborado no desenvolvimento do estudo se mostrou eficaz na determinação de desfecho clínico dos pacientes analisados no estudo retrospectivo.

O HLA é sabidamente importante no desenvolvimento de uma resposta imune, e com os resultados obtidos é possível inferir que ele também tenha papel determinante no desfecho das infecções. Por isso, o score pode se tornar uma ferramenta prognóstica promissora nos casos de infecção por HCMV em pacientes transplantados e integrar os critérios médicos para auxiliar na decisão do tratamento mais adequado. Além disso, caso se confirme a aplicabilidade do score em uma população maior, ele pode ser utilizado para classificar o risco em desenvolver diversas infecções conhecidas e de grande impacto mundial e compor mais uma linha de estudo voltada para a medicina personalizada, focada no organismo de cada indivíduo de acordo com suas informações biológicas.

6. REFERÊNCIAS

1. Adams, A.B; Williams, M.A; Jones, T.R, et al. (2003) **Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance**. The Journal of Clinical Investigation. 111: 1887–1895
2. Adland E, Klenerman P, Goulder P and Matthews PC (2015) **Ongoing burden of disease and mortality from HIV/CMV coinfection in Africa in the antiretroviral therapy era**. Front. Microbiol. 6:1016
3. Anika Wiechmann, Benjamin Wilde , et al. (2021) **CD107a+ (LAMP-1) Cytotoxic CD8+ T-Cells in Lupus Nephritis Patients**. Front. Med., 23 March 2021 Sec. Nephrology
4. Appay, V., J. J. Zaunders, L. Papagno, J. Sutton, A. Jaramillo, A. Waters, P. Easterbrook, P. Grey, D. Smith, A. J. McMichael, et al. (2002). **Characterization of CD4 CTLs ex vivo**. J. Immunol. 168:5954
5. Avdic S, McSharry BP, Steain M, Poole E, et al. (2016). **Human Cytomegalovirus-Encoded Human Interleukin-10 (IL-10) Homolog Amplifies Its Immunomodulatory Potential by Upregulating Human IL-10 in Monocytes**. J Virol. 2016 Mar 28;90(8):3819-3827. PMID: 26792743; PMCID: PMC4810557.
6. Azulay RSS, Porto LC, Silva DA, Tavares MDG, et al. (2021) **Genetic ancestry inferred from autosomal and Y chromosome markers and HLA genotypes in Type 1 Diabetes from an admixed Brazilian population**. Sci Rep. 2021 Jul 8;11(1):14157. PMID: 34239025; PMCID: PMC8266844.
7. Baillie J, Sahlender DA, Sinclair JH.(2003) **Human cytomegalovirus infection inhibits tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) signaling by targeting the 55-kilodalton TNF-alpha receptor**. J Virol. 2003 Jun;77(12):7007-16. PMID: 12768019; PMCID: PMC156201
8. Bewarder, M., Held, G., Thurner, L. et al. (2020) **Characterization of an HLA-restricted and human cytomegalovirus-specific antibody repertoire with therapeutic potential**. Cancer Immunol Immunother **69**, 1535–1548 (2020).
9. Biolatti, M.; Dell'Oste, V.; Pautasso, S.; Gugliesi, et al. (2018) **Human cytomegalovirus tegument protein pp65 (pUL83) dampens type I interferon production by inactivating the DNA sensor cGAS without affecting STING**. J. Virol. **2018**, **92**, e01774-01717
10. Biron, C.A.; Byron, K.S.; Sullivan, J.L. (1989) **Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells**. N. Engl. J. Med. 1989, 320, 1731–1735.
11. Braendstrup P, Mortensen BK, Justesen S, Osterby T, et al., (2014) **Identification and HLA-tetramer-validation of human CD4+ and CD8+ T cell responses against HCMV proteins IE1 and IE2**. PLoS One. 2014 Apr 23;9(4):e94892. PMID: 24760079; PMCID: PMC3997423

12. Bryceson, Y.T.; March, M.E.; Ljunggren, H.G.; Long, E.O. (2006) **Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion.** *Blood* 2006, 107, 159–166
13. Cantisán, S.; Páez-Vega, A.; Santos, F.; Rodríguez-Benot, A.; et al. (2017), **Impact of age and cytomegalovirus on CD8.** *Exp. Gerontol.* 2017, 95, 98–106.
14. Chen, K.C.; Stanton, R.J.; Banat, J.J.; Wills, M.R. (2016) **Leukocyte immunoglobulin-like receptor 1-expressing human natural killer cell subsets differentially recognize isolates of human cytomegalovirus through the viral major histocompatibility complex class I homolog ul18.** *J. Virol.* 2016, 90, 3123–3137
15. Chinen, J; Buckley, R.H. (2010) **Transplantation immunology: solid organ and bone marrow.** *The Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 125(2 Suppl 2):S324-35
16. Chou, J.P.; Effros, R.B. (2013) **T cell replicative senescence in human aging.** *Curr. Pharm. Des.* 2013, 19, 1680–1698
17. **Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex.** *Nature* 401, 921–923 (1999).
18. Compston, L.I., Li, C., Sarkodie, F., Owusu-Ofori, S., Opare-Sem, O. and Allain, J.-P. (2009), **Prevalence of persistent and latent viruses in untreated patients infected with HIV-1 from Ghana, West Africa.** *J. Med. Virol.*, 81: 1860-1868.
19. Compton, T; Nowlin, D.M; Cooper, N.R. (1993) **Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate.** *Virology* 193: 834–841.
20. Costa, H; Vale, P; Águas, R. (2002) **Transplantes e rejeição: A doença do enxerto vs. o hospedeiro.** Universidade de Évora. Disponível em: https://home.uevora.pt/~sinogas/TRABALHOS/2002/imuno02_GVHD.htm#_Toc47117795
21. Cottineau, J.; Kottemann, M.C.; Lach, F.P.; Kang, Y.H.; Vély, F.; Deenick, E.K.; Lazarov, T.; Gineau, L.; Wang, Y.; Farina, A.; et al. (2017) **Inherited GINS1 deficiency underlies growth retardation along with neutropenia and NK cell deficiency.** *J. Clin. Investig.* 2017.
22. Courtney, A.H; Lo, W.L, Weiss, A. (2017) **TCR signaling: mechanisms of initiation and propagation.** *Trends in Biochemical Science.* 43:108–23.
23. Crux and S. Elahi (2017) **“Human leukocyte antigen (HLA) and immune regulation: how do classical and non-classical HLA alleles modulate immune response to human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections?”** *Frontiers in Immunology*, vol. 8, p. 832, 2017. [12] Z. Mi, H.

24. Cukuranovic J, Ugrenovic S, Jovanovic I, Visnjic M, Stefanovic V. (2012) **Viral Infection in Renal Transplant Recipients**. The Scientific World Journal. 2012. ID 820621, 18 pages
25. Dausset, J. (1984), **The Birth of MAC**. Vox Sanguinis, 46: 235-237
26. Debprasad, Chattopadhyay & Khan, Mahmud Tareq Hassan. (2008). **Ethnomedicines and ethnomedicinal phytophores against Herpesviruses**. Biotechnology annual review. 14. 297-348. 10.1016/S1387-2656(08)00012-4.
27. Dell'Oste V, Biolatti M, Galitska G, Griffante G, Gugliesi F, Pasquero S, Zingoni A, Cerboni C and De Andrea M (2020) **Tuning the Orchestra: HCMV vs. Innate Immunity**. Front. Microbiol. 11:661.
28. DeMeritt, I.B; Milford, L.E; Yurochko, A.D. (2004) **Activation of the NF-kappaB pathway in human cytomegalovirus-infected cells is necessary for efficient transactivation of the major immediateearly promoter**. Journal of Virology, 78:4498–507.
29. Dhital, R, Anand, S, Graber, B, et al. (2022) **Murine cytomegalovirus promotes renal allograft inflammation via Th1/17 cells and IL-17A**. Am J Transplant. 2022; 22: 2306- 2322.
30. Dhital, R, Anand, S, Graber, B, et al. (2022) **Murine cytomegalovirus promotes renal allograft inflammation via Th1/17 cells and IL-17A**. Am J Transplant. 2022; 22: 2306- 2322.
31. Dudding, L., S. Haskill, B. D. Clark, P. E. Auron, S. Sporn, and E. S. Huang. (1989) **Cytomegalovirus infection stimulates expression of monocyte-associated mediator genes**. J. Immunol. 143:3343–3352.
32. Dumortier J, Streblow DN, Moses AV, Jacobs JM, Kreklywich CN, Camp D, Smith RD, Orloff SL, Nelson JA. (2008) **Human cytomegalovirus secretome contains factors that induce angiogenesis and wound healing**. J Virol. 2008 Jul;82(13):6524-35.
33. Fábrega, E., López-Hoyos, M., San Segundo, D, et al. (2009) **Changes in the serum levels of interleukin-17/interleukin-23 during acute rejection in liver transplantation**. Liver Transpl, 15: 629-633. <https://doi.org/10.1002/lt.21724>
34. Foley, B; Cooley, S; et al. (2012) **Human cytomegalovirus (CMV)-induced memory-like NK cells are transplantable and expand in vivo in response to recipient CMV antigen**. Journal of Immunology, 189: 5082–5088.
35. Folkman, J. (2003) **Fundamental concepts of the angiogenic process**. Curr. Mol. Med. 3:643–651.

36. Fonseca, M.A.; Carvalho, A.M. (2005). **Fragmento de vida: Representações sociais de doação de órgãos para transplante**. Interações, v. 10, n. 20, São Paulo, p. 85-108, julho-dezembro.
37. Frassanito, M.A.; Silvestris, F.; Cafforio, P.; Dammacco, F. (1998) **CD8+/CD57 cells and apoptosis suppress T-cell functions in multiple myeloma**. Br. J. Haematol. 1998, 100, 469–477
38. Frassanito, M.A.; Silvestris, F.; Cafforio, P.; Dammacco, F. (1998) **CD8+/CD57 cells and apoptosis suppress T-cell functions in multiple myeloma**. Br. J. Haematol. 1998, 100, 469–477
39. G. Damilano, O. Sued, S. Satorres, et al. (2020) **Bioinformatic analysis of post-transmission viral readaptation in Argentine patients with acute HIV-1 infection**. Infection, Genetics and Evolution.
40. Garces JC, Giusti S, Staffeld-Coit C, Bohorquez H, Cohen AJ, Loss GE (2017) **Antibody-mediated rejection: a review**. Ochsner J 17(1): 46–55
41. Garcia, S.C. Lopes, Schott, K.L. et al. (2004) **Ciclosporina A e tacrolimus: uma revisão**. J. Bras. Patol. Med. Lab. vol 40, no 6, p.393-401,2004.
42. Gilbert, M.J.; Riddell, S.R.; Plachter, B.; Greenberg, P.D.(1996) **Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate—Early gene product**. Nature 1996, 383, 720–722.
43. Giulieri S, Manuel O. (2011) **QuantiFERON®-CMV assay for the assessment of cytomegalovirus cell-mediated immunity**. Expert Rev Mol Diagn. 2011 Jan;11(1):17-25.
44. Giulieri, S., & Manuel, O. (2011) **QuantiFERON®-CMV assay for the assessment of cytomegalovirus cell-mediated immunity**. Expert Review of Molecular Diagnostics, 11(1), 17–25.
45. Glimcher LH, Townsend MJ, Sullivan BM, Lord GM. (2004) **Recent developments in the transcriptional regulation of cytolytic effector cells**. Nat Rev Immunol. 2004;4(11):900–911.
46. Goldberg, Anna Carla; RIZZO, Luiz Vicente (2015). **Estrutura do MHC e função – apresentação de antígenos. Parte 1**. Einstein (São Paulo), São Paulo,v. 13, n. 1, p. 153-156.
47. Goodwin CM, Ciesla JH, Munger J. (2018) **Who's Driving? Human Cytomegalovirus, Interferon, and NFκB Signaling**. Viruses. 2018 Aug 21;10(9):447. PMID: 30134546; PMCID: PMC6163874
48. Granato, C. (2001) **A problemática da infecção pelo citomegalovírus em pacientes imunodeprimidos**. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, São José do Rio Preto, v. 23, n. 3, p. 130-132.

49. Grandvaux N, tenOever BR, Servant MJ, Hiscott J. (2002) **The interferon antiviral response: from viral invasion to evasion.** *Curr Opin Infect Dis.* 2002 Jun;15(3):259-67. doi: 10.1097/00001432-200206000-00008. PMID: 12015460.
50. Griffiths, P., Reeves, M. (2021) **Pathogenesis of human cytomegalovirus in the immunocompromised host.** *Nat Rev Microbiol* 19, 759–773 (2021).
51. Halary, F; Amara, A; Lortat-Jac, H. et al. (2002) **Human cytomegalo-virus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection.** *Immunity* 17: 653–664.
52. Harari A, Vallelian F, Meylan PR, Pantaleo G (2005) **Functional heterogeneity of memory CD4 T cell responses in different conditions of antigen exposure and persistence.** *J Immunol* 2005; 174:1037–1045
53. Harari A, Dutoit V, Bart PA, Du Pasquier RA and pantaleo G. (2006) **Functional signatures of protective antiviral T-cell immunity in human virus infections.** *Immunol Rev* 2006; 211: 236–254
54. Harjula, A; Hockerstedt, K. (1995) **Preface. Atlas of Clinical Transplantation.** In: Ari Harjula, Krister Hockerstedt. Recallmed Ltd., pág. 09.
55. Hassan, Jaythoon & O'Neill, Derek et. al. (2016). **Cytomegalovirus Infection in Ireland.** *Medicine.* 95. e2735.
56. Hassouneh F, Goldeck D, Pera A, van Heemst D, Slagboom PE, Pawelec G, Solana R (2021) **Functional Changes of T-Cell Subsets with Age and CMV Infection.** *Int J Mol Sci.* 2021 Sep 15;22(18):9973. PMID: 34576140; PMCID: PMC8465008.
57. Holder KA, Grant MD (2019) **Human cytomegalovirus IL-10 augments NK cell cytotoxicity.** *J Leukoc Biol.* 2019 Aug;106(2):447-454. Epub 2019 Apr 9. PMID: 30964577.
58. Howard FHN, Kwan A, Winder N, Mughal A, et al., (2022) **Understanding Immune Responses to Viruses-Do Underlying Th1/Th2 Cell Biases Predict Outcome?** *Viruses.* 2022 Jul 8;14(7):1493. doi: 10.3390/v14071493. PMID: 35891472; PMCID: PMC9324514
59. Howard, O. M., K. A. Clouse, C. Smith, R. G. Goodwin, and W. L. Farrar. (1993). **Soluble tumor necrosis factor receptor: inhibition of human immunodeficiency virus activation.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2335–2339.
60. Huang, K. Huang, R. Xu et al., (2016) **“The associations of HLA*02:01 and DRB1*11:01 with hepatitis C virus spontaneous clearance are independent of IL28B in the Chinese population,”** *Scientific Reports*, vol. 6, no. 1, p. 31485, 2016.

61. Hummel, M; Abecassis, M.M. (2002) **A model for reactivation of CMV from latency**. *Journal of Clinical Virology*, 25(Suppl 2): S123–S136
62. Hwang SU, Lee JH, Choi SY, Lee YT, Park SY, Lee HS, Jae JW, Jung NC, Wang Y, Lim DS. (2020) **A simple and efficient method of generating HCMV pp65-specific T cells using overlapping peptides**. *Acta Virol.* 2020;64(4):470-479. doi: 10.4149/av_2020_414. PMID: 33151741.
63. Ivon Johanna Rodriguez, Nicolas Lalinde Ruiz, Manuela Llano Leo (2021) **Immunosenescence Study of T Cells: A Systematic Review**. *Front. Immunol.*, 15 January 2021. Sec. T Cell Biology <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.604591>
64. Jackson SE, Mason GM, Okecha G, Sissons JG, Wills MR (2014) **Diverse specificities, phenotypes, and antiviral activities of cytomegalovirus-specific CD8⁺ T cells**. *J Virol.* 2014 Sep;88(18):10894-908. PMID: 25008941; PMCID: PMC4178885.
65. Jackson SE, Redeker A, Arens R, van Baarle D, van den Berg SPH, Benedict CA, Čičin-Šain L, Hill AB, Wills MR (2017). **CMV immune evasion and manipulation of the immune system with aging**. *Geroscience*. 2017 Jun;39(3):273-291. doi: 10.1007/s11357-017-9986-6. Epub 2017 Jun 24.
66. Jason M. Brenchley, Nitin J. Karandikar, Michael R. Betts, et al. (2003) **Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8⁺ T cells**. *Blood* 2003; 101 (7): 2711–2720.
67. Joffre, M.R. (2011) **Imunodepressão, Imunossupressão**. *Revista de Patologia Tropical*. Vol. 40 (2): 199-201. abr.-jun. 2011.
68. Junqueira, J.J; SANCHO, T.M. (2008) **Citomegalovírus: Revisão dos Aspectos Epidemiológicos, Clínicos, Diagnósticos e de Tratamento**. *News Lab. São Paulo*, ed 86, p. 88-104.
69. Kaminski, H; Fishman, J.A. (2016) **The cell biology of cytomegalovirus: implications for transplantation**. *American Journal of Transplantation*, 16(8):2254–2269
70. Karaba AH, Figueroa A, Werbel WA, Dioverti MV, Steinke SM, Ray SC, Cox AL, Avery RK. (2021) **Interleukin-18 and tumor necrosis factor- α are elevated in solid organ transplant recipients with possible cytomegalovirus end-organ disease**. *Transpl Infect Dis.* 2021 Aug;23(4):e13682. Epub 2021 Jul 16. PMID: 34216086; PMCID: PMC8455421.
71. Kato, M; Morozumi, K; et al. (2003) **Complement fragment C4d deposition in peritubular capillaries in acute humoral rejection after ABO blood group-incompatible human kidney transplantation**. *Transplantation* - 75:663.
72. Kenneth M. Kaye (2021). **Infecção por Citomegalovírus 2021**. Merck & Co, Inc., Rahway, NJ, EUA. Revista eletrônica. Disponível em: www.msdmanuals.com Acesso em 30 de novembro de 2022.

73. Koch, S.; Larbi, A.; Ozcelik, D.; Solana, R.; et al. (2007). **Cytomegalovirus infection: A driving force in human T cell immunosenescence**. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2007, 1114, 23–35.
74. Kollias G, Douni E, Kassiotis G, Kontoyiannis D. (1999) **The function of tumour necrosis factor and receptors in models of multi-organ inflammation, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and inflammatory bowel disease**. *Ann Rheum Dis.* 1999; 58:132–9
75. Kotenko SV, Sacconi S, Izotova LS, Mirochnitchenko OV, Pestka S. (2000). **Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10)**. *Proc Natl Acad SciUSA* 97:1695–1700. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.97.4.1695>.
76. Kumata R, Sasaki A. (2022) **Antigenic escape is accelerated by the presence of immunocompromised hosts**. *Proc. R. Soc. B* 289: 20221437. <https://doi.org/10.1098/rspb.2022.1437>
77. Kumata R, Sasaki A. (2022) **Antigenic escape is accelerated by the presence of immunocompromised hosts**. *Proc. R. Soc. B* 289: 20221437. <https://doi.org/10.1098/rspb.2022.1437>
78. Li, T.; Chen, J.; Cristea, I.M. (2013) **Human cytomegalovirus tegument protein pUL83 inhibits IFI16-mediated DNA sensing for immune evasion**. *Cell Host Microbe*, 14, 591–599.
79. Li, X.C; Rothstein, D.M; Sayegh, M.H. (2009). **Costimulatory pathways in transplantation: challenges and new developments**. *Immunological Reviews*, 229: 271-293
80. Liao W, Lin JX, Leonard WJ. (2011) **IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation**. *Curr Opin Immunol.* 2011 Oct;23(5):598-604.Epub 2011 Aug 31. PMID: 21889323; PMCID:PMC3405730.
81. Ligat G, Cazal R, Hantz S, Alain S. (2018) **The human cytomegalovirus terminase complex as an antiviral target: a close-up view**. *FEMS Microbiol Rev.* 2018 Mar 1;42(2):137-145. PMID: 29361041; PMCID: PMC5972660.
82. Lim EY, Jackson SE and Wills MR (2020) **The CD4+ T Cell Response to Human Cytomegalovirus in Healthy and Immunocompromised People**. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10:202. doi: 10.3389/fcimb.2020.00202
83. Liu, and F. Zhang (2020) **“Advances in the immunology and genetics of leprosy,”** *Frontiers in Immunology*, vol. 11, p. 567, 2020.
84. Lundegaard, C; Nielsen, M; Lund, O. (2006) **The validity of predicted T-cell epitopes**. *Trends Biotechnology* 24:537–8.

85. Macedo, C. et al. (2009) **Contribution of naive and memory T-cell populations to the human alloimmune response**. American Journal of Transplantation. 9:2057–66.
86. Madden, K., Chabot-Richards, D. (2019) **HLA testing in the molecular diagnostic laboratory**. Virchows Arch 474, 139–147.
87. Manandhar T, Hò GT, Pump WC, Blasczyk R, Bade-Doeding C. **Battle between Host Immune Cellular Responses and HCMV Immune Evasion**. Int J Mol Sci. 2019 Jul 24;20(15):3626.
88. Medhasi S, Chantratita N. (2022) **Human Leukocyte Antigen (HLA) System: Genetics and Association with Bacterial and Viral Infections**. J Immunol Res. 2022.
89. Melnik, L.I., Garry, R.F. & Morris, C.A. (2011) **Peptide inhibition of human cytomegalovirus infection**. *Virology* 8, 76.
90. Mesquita Júnior, Danilo et al. (2022). **Sistema imunitário - parte II: fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B**. Revista Brasileira de Reumatologia [online]. 2010, v. 50, n. 5 [Acessado 30 novembro 2022] pp. 552-580.
91. Michael R. Betts, Jason M. Brenchley, David et al., (2003). **Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation**. Journal of Immunological Methods, Volume 281, Issues 1–2, 2003, Pages 65-78, ISSN 0022-1759.
92. Miller-Kit, M; Sparer, T.E. (2009) **Feeling manipulated: Cytomegalovirus immune manipulation**. Virology Journal, 6: 4.
93. Mills, K.H. (2011) **TLR-dependent T cell activation in autoimmunity**. Nature Reviews in Immunology. 11:807–22.
94. Min C-K, Shakya AK, Lee B-J, Streblow DN, Caposio P and Yurochko AD (2020) **The Differentiation of Human Cytomegalovirus Infected-Monocytes Is Required for Viral Replication**. Front. Cell. Infect. Microbiol. 10:368. doi: 10.3389/fcimb.2020.00368
95. Montag C, Wagner J, Gruska I, Hagemeyer C. (2006) **Human cytomegalovirus blocks tumor necrosis factor alpha- and interleukin-1beta-mediated NF-kappaB signaling**. J Virol. 2006 Dec;80(23):11686-98. Epub 2006 Sep 27. PMID: 17005669; PMCID: PMC1642604.
96. Nielsen, M. et al. (2004) **Improved prediction of MHC class I and class II epitopes using a novel Gibbs sampling approach**. Bioinformatics, 20, 1388–1397
97. Numar, H; Kawai, T; Akira, S. (2011) **Pathogen recognition by the innate immune system**. International Reviews of Immunology. 30: 16–34.

98. Paiva IA, Badolato-Corrêa J, Familiar-Macedo D, de-Oliveira-Pinto LM. (2021) **Th17 Cells in Viral Infections-Friend or Foe? Cells.** 2021 May 11;10(5): 1159.. PMID: 34064728; PMCID: PMC8151546
99. Paley, M.A.; Kroy, D.C.; Odorizzi, P.M.; et al. (2012) **Progenitor and terminal subsets of CD8+ T-cells cooperate to contain chronic viral infection.** Science 2012, 338, 1220–1225.
100. Pawelec, G.; Derhovanessian, E. (2011) **Role of CMV in immune senescence.** Virus Res. 2011, 157, 175–179.
101. Pearce EL, et al (2003). **Control of effector CD8+ T cell function by the transcription factor Eomesodermin.** Science. 2003;302(5647):1041–1043.
102. Pereira, W.A. (2004). **Manual de Transplantes de Órgãos e tecidos.** 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
103. Poole E, Neves TC, Oliveira MT, Sinclair J and da Silva MCC (2020) **Human Cytomegalovirus Interleukin 10 Homologs: Facing the Immune System.** Front. Cell. Infect. Microbiol. 10:245.
104. Poole, E; McGregor, S.R; et al. (2011) **Virally induced changes in cellular microRNAs maintain latency of human cytomegalovirus in CD34 progenitors.** Journal Genetics and Virology, 92:1539–49.
105. Profaizer, Pole, Monds, et al. (2020) **“Clinical utility of next generation sequencing based HLA typing for disease association and pharmacogenetic testing,”** Human Immunology, vol. 81, no. 7, pp. 354–360, 2020
106. Pulliam, L., D. Moore, and D. C. West. (1995) **Human cytomegalovirus induces IL-6 and TNF alpha from macrophages and microglial cells: possible role in neurotoxicity.** J. Neurovirol. 1:219–227.
107. Quinzo, M.J., Lafuente, E.M., Zuluaga, P. et al. (2019) **Computational assembly of a human Cytomegalovirus vaccine upon experimental epitope legacy.** BMC Bioinformatics 20, 476. Ramanan, P; Razonable. (2013) **Cytomegalovirus Infections in solid organ transplantation: A review.** Infection and Chemotherapy Journal. Minnesota, EUA.
108. Rathinam, V.A; Jiang, Z; et al. (2010) **The AIM2 inflam-masome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses.** Nature Immunology 11: 395–402.
109. Razonable, R; et al. (2001) **Alograft rejection predicts the occurrence of late-onset cytomegalovirus (CMV) disease among CMV-mismatched solid organ transplant patients receiving prophylaxis with oral ganciclovir.** J Infect Dis. 184:1461-4.

110. Reddy V, Meier-Kriesche HU, Greene S, Schold JD, Wingard JR. (2015) **Increased levels of tumor necrosis factor alpha are associated with an increased risk of cytomegalovirus infection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.** *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005 Sep;11(9):698-705. doi: 10.1016/j.bbmt.2005.05.013. PMID: 16125640
111. Rojas, J.M.; Avia, M.; Martín, V.; Sevilla, N. (2017) **IL-10: A Multifunctional Cytokine in Viral Infections.** *J. Immunol. Res.* 2017, 2017, 1–14
112. Roman A, Manito N, Campistol JM, et al; ATOS working group (2014). **The impact of the prevention strategies on the indirect effects of CMV infection in solid organ transplant recipients.** *Transplant Rev (Orlando).* 2014 Apr;28(2):84-91. Accessed 10/20/2022.
113. Sadat-Sowti, B.; Debre, P.; Mollet, L.; Quint, L.; Hadida, F.; Leblond, V.; Bismuth, G.; Autran, B. (1994) **An inhibitor of cytotoxic functions produced by CD8+CD57+ T lymphocytes from patients suffering from AIDS and immunosuppressed bone marrow recipients.** *Eur. J. Immunol.* 1994,
114. Sadat-Sowti, B.; Debre, P.; Mollet, L.; Quint, L.; Hadida, F.; Leblond, V.; Bismuth, G.; Autran, B. (1994) **An inhibitor of cytotoxic functions produced by CD8+CD57+ T lymphocytes from patients suffering from AIDS and immunosuppressed bone marrow recipients.** *Eur. J. Immunol.* 1994, 24, 2882–2888.
115. Sainz, B., LaMarca, H.L., Garry, R.F. et al. (2005) **Synergistic inhibition of human cytomegalovirus replication by interferon-alpha/beta and interferon-gamma.** *Virology* 2, 14 (2005).
116. Salmela, K; Ahone, J; Helsinki; Kootstra, G; Maastricht. (1995). **Renal Transplantation. Atlas of Clinical Transplantation.** Recallmed Ltd., pág. 69.
117. Sandhu PK, Buchkovich NJ. (2020) **Human cytomegalovirus decreases major histocompatibility complex class II by regulating class II transactivator transcript levels in a myeloid cell line.** *J Virol* 94:e01901-19.
118. Schafer, D.F. (2001). **Liver Transplantation. Looking Back, Looking Forward.** *Transplantation of the Liver.* Maddrey WC, Schiff ER, Sorrell MF, editors.
119. Secolin, R., de Araujo, T.K., Gonsales, M.C. et al. (2021) **Genetic variability in COVID-19-related genes in the Brazilian population.** *Hum Genome Var* 8, 15 (2021).
120. Smith, C.; Elhassen, D.; Gras, S.; et al. (2012) **Endogenous antigen presentation impacts on T-box transcription factor expression and functional maturation of CD8+ T-cells.** *Blood* 2012, 120, 3237–3245.

121. Soderberg-Naucler, C; Fish, K.N; Nelson, J.A. (1997) **Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha specifically induce formation of cytomegalovirus-permissive monocyte-derived macrophages that are refractory to the antiviral activity of these cytokines.** Journal of Clinical Investigation, 100: 3154–3163.
122. Soderberg, C; Giugni, T.D; Zaia, J.A. et al. (1993) **CD13 (human aminopeptidase N) mediates human cytomegalovirus infection.** Journal of Virology, 67: 6576–6585.
123. Sommer, S. (2005) **The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation.** Front Zool 2, 16 (2005).
124. Sorrentino, K. Marinic, P. Motta, et al. (2000) **“HLA class I alleles associated with susceptibility or resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection among a population in Chaco Province, Argentina,”** The Journal of Infectious Diseases, vol. 182, no. 5, pp. 1523–1526, 2000.
125. Strioga, M.; Pasukoniene, V.; Characiejus, D. (2011) **CD8+ CD28- and CD8+ CD57+ T cells and their role in health and disease.** Immunology 2011, 134, 17–
126. Süsal, C; Opelz, G. (2013). **Current role of human leukocyte antigen matching in kidney transplantation.** Current Opinion in Organ Transplantation, 18(4):438-444.
127. Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, Taormina C, Pelte C, Ruchti F, Sleath PR, Grabstein KH, Hosken NA, Kern F, Nelson JA, Picker LJ. (2005) **Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects.** J Exp Med. 2005 Sep 5;202(5):673-85.
128. Tomita, T. Ikeda, R. Sato, and T. Sakagami (2020) **“Association between HLA gene polymorphisms and mortality of COVID-19: an in-silico analysis,”** Immunity, Inflammation and Disease, vol. 8, no. 4, pp. 684–694, 2020
129. Tomtishen JP 3rd. **Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28).** Virol J. 2012 Jan 17; 9:22. PMID: 22251420; PMCID: PMC3278345
130. Torti, N.; Walton, S.M.; Brocker, T.; Rulicke, T.; Oxenius, A. (2011) **Non-hematopoietic cells in lymph nodes drive memory CD8 T-cell inflation during murine cytomegalovirus infection.** PLoS Pathog. 2011, 7, e1002313
131. Tovar-Salazar A, Patterson-Bartlett J, Jesser R, Weinberg A. (2009) **Regulatory function of cytomegalovirus-specific CD4+CD27-CD28- T cells.** Virology. 2010 Mar 15;398(2):158-67. 2009.11.038. Epub 2009 Dec 24. PMID: 20034645;
132. V. Renganathan (2019). **Overview of artificial neural network models in the biomedical domain.** Bratislava Medical Journal Vol.120, No.7, p.536–540.

133. Van Stijn, A. et al. (2008). **Human cytomegalovirus infection induces a rapid and sustained change in the expression of NK cell receptors on CD8+ T cells.** *Journal of Immunology*, 180, 4550–4560.
134. Varun Chauhan, Mini P Singh (2020). **Immuno-informatics approach to design a multi-epitope vaccine to combat Cytomegalovirus infection.** *European Journal of Pharmaceutical Sciences*.
135. Verleden, G. M. et al. (2002) **Successful conversion from cyclosporine to tacrolimus for gastric motor dysfunction in a lung transplant recipient.** *Transplantation*, v. 73, n. 12, p. 1974-6, 2002
136. Viljoen, J., Tuaillon, E., Nagot, N., Danaviah, S., Peries, M., Padayachee, P., et al. (2015) **Cytomegalovirus, and possibly Epstein-Barr virus, shedding in breastmilk is associated with HIV-1 transmission by breastfeeding.** *AIDS* 29, 145–153
137. Woodroffe, S.B; Garnett, H.M; Danis, V.A. (1993) **Interleukin-1 production and cell-activation response to cytomegalovirus infection of vascular endothelial cells.** *Archives of Virology*, 133: 295–308.
138. Wu Z, Frascaroli G, Bayer C, Schmal T, Mertens T. (2015) **Interleukin-2 from Adaptive T Cells Enhances Natural Killer Cell Activity against Human Cytomegalovirus-Infected Macrophages.** *J Virol.* 2015 Jun;89(12):6435-41. Epub 2015 Apr 8. PMID: 25855747; PMCID: PMC4474314.
139. Yan, N., Chen, Z. (2012) **Intrinsic antiviral immunity.** *Nat Immunol* 13, 214–222 (2012).
140. Young VP, Mariano MC, Tu CC, Allaire KM, et al. (2017) **Modulation of the Host Environment by Human Cytomegalovirus with Viral Interleukin 10 in Peripheral Blood.** *J Infect Dis.* 2017 Mar 15;215(6):874-882. PMID: 28453840; PMCID: PMC5853888.

7. ANEXOS

Estudo das alterações do sistema imunológico após o transplante de órgãos sólidos.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Adultos)

Você está sendo convocado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

Desde logo fica garantido o sigilo das informações que iremos coletar de você. Quando apresentarmos os resultados dessa pesquisa, garantimos que sua identidade não será relevada. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma. Salientamos que sua participação (ou não-participação) nesse projeto não poderá acarretar em qualquer prejuízo seja para você, seja financeiro ou qualquer outro tipo de prejuízo. Você pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, mesmo se tiver concordado previamente. Solicitamos que caso sinta-se prejudicado de alguma forma, tenha alguma dúvida ética ou deseje qualquer informação extra, comunique-se à equipe do projeto ou ao CEP (telefones abaixo).

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: Estudo das alterações do sistema imunológico em transplante de órgãos sólidos.

Pesquisador Responsável: Cristiano Xavier Lima

Endereço e telefone do responsável pelo estudo

- Av. do Contorno, 9530
- Telefone: 31 992963578 ou 31 35147000

Endereço e telefone institucional do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Hospital Felício Rocho:

- Av. do Contorno, 9530 Bairro Barro Preto, Belo Horizonte, MG
- TeleFax: (31) 3514 7000

O objetivo desse estudo é buscar um melhor entendimento sobre a forma como o sistema imunológico do corpo humano responde à ao transplante de órgãos e ao uso de medicamentos imunossupressores. Os medicamentos para evitar a rejeição do órgão transplantado alteram o sistema imunológico do paciente. Estas alterações, além de proteger contra a rejeição podem mudar a forma como o organismo atua na defesa contra infecções. Os pacientes transplantados em uso de medicamentos imunossupressores apresentam maior risco de infecções do que o paciente não transplantado. Sabe-se pouco sobre a forma como o sistema de defesa do corpo humano (sistema imunológico) do paciente transplantado responde à infecção. O objetivo desse estudo é investigar como o sistema imunológico do paciente transplantado reage ao uso de medicamentos imunossupressores e como podemos evitar a rejeição sem aumentar o risco da infecção. Assim, pretendemos recrutar voluntários saudáveis e pacientes em lista de espera para transplante de fígado ou rim.

Se você aceitar participar desse estudo, vamos colher até 60 ml. de sangue antes do seu transplante, 30 dias após o transplante, para a realização de exames e testes de laboratório para verificar como seu organismo está lidando com os medicamentos imunossupressores. A coleta do sangue será realizada usando tubos pequenos através de uma punção na veia do membro superior da sua preferência durante a coleta dos exames pré transplantes de rotina. Dependendo de como você evoluir, poderemos te convidar para coletas futuras entre 1-6 meses em caso de rejeição ou infecção. É importante lembrar que a coleta de sangue pode causar desconforto e hematoma no local de introdução da agulha. Em raros casos, algumas pessoas desmaiam por verem o seu próprio sangue. Seu sangue será utilizado para os exames e suas células poderão ser congeladas para estudos posteriores com novas tecnologias. Também pedimos autorização para avaliar sua ficha médica a fim de caracterizar seu caso. Informamos que sua participação neste estudo não envolve qualquer remuneração.

1/2

Rubrica participante _____

Rubrica pesquisado _____

Estudo das alterações do sistema imunológico após o transplante de órgãos sólidos.

♦ **CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO**

Eu, _____, idade____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo "Estudo das alterações do sistema imunológico após o transplante de órgãos sólidos. " como voluntário. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador _____ sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido o sigilo das informações e que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento.

Nome: _____

Telefone: _____

Endereço: _____

Data _____

Assinatura do participante

♦ Nome e Assinatura do pesquisador:

|

Sequência peptídica das 10 proteínas do HCMV

PROTEÍNA	TAMANHO	SEQUÊNCIA
UL48	2241	MKVTQASCHQGDIARFGARAGNQCVCNGIMFLHALHLGGTSAVLQTEALDAIMEEGARLDARLEREL QKKLPAGGRLPVYRLGDEVPRRLESRFGRVHALSRPFNGTTETCDLDGYMCPGIFDLRYAHAKPR PTYVLVTNLSARAVVFTEDHMLVFDPHSSAECHNAAVYHCEGLHQVLMVLTGFGVQLSPAIFYEAL FLYMLDVATVPEAEIAARLVSTYRDRDIDLTGVVRESADTAATTTTAAPSLPPLDPDIVDPGCPPGVAP SIPVYDPSSSPKKTPKRRKDLGSKHGGKKKPPSTTSKTLATASSSPSAIAAASSSSAVPPSYSCGE GALPALGRYQQLVDEVEQELKALTLPPLPANTSATWTLHAAGTESGANAAATATAPSFDEAFLTDRLQQL IIHAVNQRSCLRRPCGPQSAQAQAVRAYLGLSKKLDAFLNWLHGLDLQRMHDYLSHKTTKGTYSTL DRALLEKMQVVFDPYGRQHGPALIAWVEMLRYVESKPTNELSQLRQFVTKRPMVSDSFVCLRPV DFQRLTQVIEQRRRVLRQREEYHGVEYHLAGLITSIDIHDLASDLNRREILKALQPLDDNAKQELFRL GNAKMLELQMDLDRSTQLLTVHNLHILNGFLPVEDLKQMERVVQVLRFLFYDLRDLKLCDSYEEGF VVIREQLSYLMTGTVRDNPVLLQEILQLRHAYQQATQQNEGRLTQIHDLHVIETLVRDPGSRGSALT ALVQEQLAQLEALGGLQLPEVQQRLQNAQLALSRLYEEEEETQRFDLGSLYDDPPTEQTIKRHPQLRE MLRRDEQTRLRLINAVLSMFHTLVMLARDESPRPTFFDAVSLLLQQLPPDSHEREDLRAANATYAQM VKKLEQIEKAGTGASEKRFQALRELVYFFRNHEYFFQHVMVGRGLGVGPQVTELERYQHMEEEQHLE LEREWQEEAGKLTVTSVEDVQVRLARAPSHRVMHMQMQTLTTKMQDFLDKEKRKQEEQQRQLLDG YQKKVQDLQRVVDVAVKGEMLSTIPHQPLEATLELLGLDQRAQPLDKFNQDLALQQLSKKLDGR INECLHGVLTGVERRCHPHREAAQTQASLNHLQILGPQLLIHETQQALQHAVHQAQFIEKQQG DPTTAITGSEFESDFARYRSSQKMEGQLQETRQQTETSERLDRSLRQDPGSSSVTRVPEKPFKG QELAGRITPPPADFQRPVFKTLDDQADAARKALSDEADLLNQKVQTLRQRDEQLSTAQNLTDLV TRHKMSGGLDVTPDAKALMEKPLETLRELLGKATQQLPYLSAERTVRWMLAFLEEAQAQITADPTHP HHGSRTHYRNLQQQAVESAVTLAQIEQNAACENFIAHQEATANGASTPRVDMVQAVEAVWQRL PGRVAGGAARHQVQELLQRLGQTLGDLELQETLATEYFALLHGIQTFSYGLDFRSQLEKIRDLRTRF AELAKRCGTRLSNEGALPNPRKPQATTSLGAFTRLNALERHVQLGHQYLLNKLNGSSLVYRLEDIPS VLPPTHETDPALIMRDLRRLCFARHHDFTLEVVDVFGMRQIVTQAGEPIYLVTDYGNVAFKYLALRDD GRPLAWRRRCSSGGGLKNVVTTRYKAITVAVAVCQTLRTFWPQISQYDLRPYLQHQSHTHPAETHTL HNLKLCYLVSTAWHQRIDTQQLTAADRVGSGEGGDVGEQRPGRGTVLRSLQEFVCLIAALYPEYI YTVLKYPVQMSPLSLTAHLHQDVIAHVNNTHKMPPDHLPEQVKAFCITPTQWPAMQNLKLFWENKL VQQLCQVGPQKSTPSLGLWLAMATLVFPQDMLQCLWLELKPQYAEYASVSELVQTLFQIFTQQC EMVTEGYTQPLPTGEPVLQMIVRQRDTTTTDTNTTTEPGLLDVFIQTETALDYALGSLWFGIPVCLG VHVADLLKGQVRLVARHLEYTSRDRDLRIQSRDLNLSQLLQDTWTETPLEHCWLQAQIRRLRDYLR FPTRLEFIPLVIYNAQDHTVVRVLRPPSTFEQDHSRLVLDEAFPTFPLYDQDDNTSADNVAASGAAPT PVPFNRVVPNIQFLRENPPPIARVQPPRRHRHRAAAAADDDGQIDHAQDDTSRTADSALVSTAFGG SVFQENRLGETPLCRDELVAVAPGAASTSFASPPITVLQNVLSALEILRLVRLDLRLQAQSVQDTIQH MRFLYLL
pp65/UL83	561	MESRGRRCPEMISVLGPISGHVLKAVFSRGDTPVLPHETRLQLTGIVHVRVQPSLILVSQYTPDSTPCH RGDNQLQVQHTYFTGSEVENSVNVHNPTGRSICPSQEPMSIYVYALPKMLNIPINVHHYPSAAER KXRLPVDADAVIHASGKQMWQARLTVSGLAWTRQQNQWKEPDVYYTSAFVFPTKDVALRHVCAHE LVCSMENTRATKMQVIGDQYVKVYLESFCEDVPSGKLFMHVTLGSDVEEDLTMTNRPQPFMRPHER NGFTVLCPKNMIIKPGKISHIMLDVAFTSHEHFGLLCPKSIPGLSISGNLLMNGQQIFLEVQAIREVELR QYDPVAALFFDIDLLQRGPPQYSEHPTFTSQYRIQKLEYRHTWDRHDEGAAGQDDDDVWTSGLSDS DEELVTTERKTPRVTGGGAMASASTSAGRKRKSASSATACTAGVMTRGRLKAESTVAPEEDTDEDS DNEIHNPVFTWPPWQAGILARNLVPMVATVQGNLKYQEFFWDANDIYRIFAELEGVWQPAAPQPKR RRHRQDALPGPCIASTPKKHRG
UL122/IE2	580	MESSAKRKMDDPNPDEGPSSKVPREPPTVTKATTFQLQTLRKEVNSQLSLGDLFPPELAEEESLKTFE QVTEDCNENPEKDLTELGDILAQAVNHAGIDSSSTGPTLTTHSCSVSSAPLNKPTPTSVAVTNTPLPG ASATPELSPRKKPRKTTTPFKVIIKPPVPPAPIMPLIKQEDIKPEPDFTIQYRNKIIDTAGCIVISDSEEEQ GEEVETRGATASSPSTGSGTPRVTSPTHPLSQMNHPLPLDPLGRPDESSSSSSSSSSSASDSESES EEMKSSSGGASVTSSSHGRGGFGGAASSLLSCGHQSSGGASTGPRKKKSKRISELDNEKVRNIM KDKNTPFCPTNVQTRGRVKIDEVSRMFRHTNRSLEYKNLPFIMPSMHQVLEAAIKVCKTMQVNNKGI QIYTRNHEVKNEVDQVRCRLGSMCNLALSTPFLMEHTMPVTHPPDVAQRTADACNDGVKAVWNLKE LHTHQLCPRSSDYRNIIHAATPVDLLGALNLCPLMQKFKQVMVRIFSTNQGGFMLPIYETAAKAYA VGQFEKPTETPPEDLDTLSLAIEAAIQDLRNKSQ

UL123/IE1	397	MMGMYGAISLLTEFCRVLCYILEETSULLAKRPLITKPEVINIMKRRIEEICMKVFAQYILGADPLRVCS PSVDDLRAIAEESDEENAIAYTLATAGASSSDSLVSPPESPVPATIPLSVIVAENSDDQEESEQSDEER EEGAQEEREDTVSVKSEPVSEIEQVASEEEEEEGAEEPTTSGGKSTHPMVTRSKADH
US32	183	MAMYTSESERDWRRVIHDSHGLWCDCGDWREHLYCVYDSHFQRRPTTRAERRAANWRRQMRLH RLWCFCQDWKCHALYAEWDGKESDDESSASSSGEAPQVPAWKTVRAFSRAYHHRINRGLRGTP PPRNLPGYEHASEGWRFCNRRERREDDLRTAEPDRVVFQLGGVPPRRHRETYV
UL28	272	MLGDTQYFGVVRDHKTYRRFSCLRQAGRLYFIGLVSVEYCPDANTAPEIWSGHGHAFAYLPGEDK VYVLGLSFGEFFENGLFAVYSFFERDYVDEIVEGAWFKHTFAGMYELSQLHSDRTNLLRVCQLHAGSKI RLGGSPACTFTFGSWNVAEADANNFVIGVLEQAHFVVGWMEPVNKAVFMDAHGGIHLVLLYGTMLV KLAETLRGFIQGSFWFRCPRRFCFSPLDSSATVAAKPVSSHTSPAYDVSEYVFSGRSVLDSVSGTG AS
US29	462	MRCFRWWLYSGWWWLTFGCARTVTVGFAPTVRAQSTVVRSEPAAPPSETTRDNDNTSYFSSTSFH SSVSPATSVDRQFRRTTYDRWDGRRWLTRYGNASACVTGTQWSTNFFFSQCEHYPSFVKLNGVQ RWTPVRRPMGEVAYYGGCCMVGGGNRAYVILVSGYGTASYGNALRVDFGRGNCAPKRTYPRRLE LHDGRTDPSRCDPYQVYFYGLQCPEQLVITAHGGVGMRRCPGSRPTPSRPHRHDLENELHGLCVD LLVCVLLALLLLELVPMEAVRHPLFWRRVALSPSTSKVDRAVKLCLRRMLGLPPPSVAPPGEKKEL PAQAALSPPLTTWSLPPFPSTRIPDSPPPPYQLRHATSLVTPTLLLYTSSDIGDTASETTCAHAHYG EPPEPARSTATVQECTVLAPNCGIVNNDGAVSEGQDHGDAVHSLDVSQCAADTGVDVDTSE
US3	95	PWFQIEDNRCYIDNGKLFARGSIIVGNMSRFVDFPKADYGGVGENLYVHADDVEFVPGESLKWNVRLN DVMPIFETLALRLVLQGDVWLRCVPEL
UL32	1048	MSLQFIGLQRRDVALVNLRLHRLTQKPDVDLEAHPKILKKCEKRLHRRTVLFNELMLWLGYRELRF HNPDLSSVLEEFVRCVAVARRGYTYPFGDRGKARDHLAVLDRTEFDTDRHDAEIVERALVSAVILA KMSVRETLVTAIGQTEPIAFVHLKDTEVQRIEENLEGVRRNMFVCKPLDLNDRHANTALVNAVNLVY TGRLIMNVRRSWEELERKCLARIQERCKLLVKELRMCLSFDSNYCRNLIKHAVENGDSADTLELLIED FDIYVDSFPQSAHTFLGARSPSLEFDDANLLSLGGGSASFSSVPKKHVPTQPLDGSWSIASPWKGHK PFRFEAHGSLAPAAEAHAARSAAVGYDEEEKRRERQKRVDEVVQREKQQLKAWERQQNLQQR QQQPPPPARKPSASRRLFGSSADEDDDDDDDEKNIFTPIKPGTSGKGAASGGGVSSIFSGLSSGS QKPTSGPLNIPQQQQRHAASLVSQVTKASPGVRVRDSAWDVRPLTETRGLFSGDESDSDSDGY PPNRQDPRFTDLVDITDTEAKPPVTAYKFEQPTLTFGAGVNPAGAGAAITPTVPNPSTAPAPA PTPTFAGTQTPVNGNSPWAPTAPLPGDMNPANWPRERAWALKNPHLAYNPFMRPTTSTASQNTVST TPRRPSTPRAAVQTASRDADEVWALRDQTAESPVEDSEEDDDSDSDTGSVSLGHTTSPSSDYN DVISPPSQTPESQTPSRIRKAKLSSPMTTSTSTSQKPVLGKRVATPHASARAQTVTSTPVQGRLEKQVS GTPSTVPATLLQPQPASSKTTSSRNVTSAGAGTSSASSARQPSASASVLSPTEDDVSPATSPLSMLSS ASPSPAKSAPPSPVKGRGSRVGVPSLKPTLGGKAVVGRPPSPVPSGSAPGRLSGSSRAASTTPTYP VTTVYPPSSTAKSSVSNAPPVSPSILKPGASAAQSRRTGTAAVGSVPKSTTGKMTVAFDLSSPQK SGTGPPQGSAGMGGAKTPSDAVQNILQKIEKIKNTEE
UL55	907	MESRIWCLVVCNLCIVCLGAAVSSSTRGTSATHSHHSHTTSAHSRSGSVSQRVTSSQTVSHGV NETIYNTTLKYGDVVGVTTKYPYRVCSMAQGTDLIRFERNIVCTSMKPINEDLDEGIMVYKRNIVAH TFKVRVYQKVLTFRRSYAYIHTTYLLGSNTEYVAPPMWEIHINSHSQCYSSYSRVIAGTVFVAYHRDS YENKTMQLMPDDYSNTHSTRYVTVKQDWHSRGSTWLYRETCLNLCMVTITTARSKYPYHFFATSTG DVVDISPFYNGTNRNASYFGENADKFFIFPNYIVSDFGRPNSAETHRLVAFLERADSVISWDIQDEK NVTQQLTFWEASERTIRSEAEDSYHFSSAKMTATFLSKKQEVNMSDSALDCVRDEAINKLQIFNTSY NQTYEKYGNVSFVETTGGLVFWQGIKQKSLVELERLANRSSNLNTHNRKTRSTDGNNATHLSNMES VHNLVYAQLQFTYDTRGYINRALAQIAEAWCVDQRRRTLEVFKELSKINPSAILSAIYNKPIAARFMGDV LGLASCVTINQTSVKVLRDMNVKESPGRCYSRPVVFNFANSSYVYQQLGEDNEILLGNHRTTEECQL PSLKIFIAGNSAYEYVDYLFKRMIDLSSISTVDSMIALDIDPLENTDFRVLELYSQKELRSSNVFDLEEIMR EFNSYKQRVKYVEDKVVDPLPPYLKGLDDLMSGLGAAGKAVGVAIGAVGGAVASVVEGVATFLKNPF GAFTIILVAIAVVIITYLIYTRQRLCTQPLQNLFPYLVADGTTVTSGSTKDTSLQAPPSYEEVSYNSGR KGPSPSSDASTAAPPYTNEQAYQMLLALARLDAEQRAQNGTDSLDRGTGTQDKGQKPNLLDRLR HRKNGYRHLKDSDEEENV