

Jeane de Fátima Correia Silva

**VARIAÇÕES GENÉTICAS DA GLICOPROTEÍNA B DO
CITOMEGALOVÍRUS HUMANO E ASSOCIAÇÃO COM O
NÍVEL DE CITOCINAS EM PACIENTES SUBMETIDOS AO
TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS TRONCO
HEMATOPOIÉTICAS**

Belo Horizonte
Faculdade de Odontologia da UFMG
2010

Jeane de Fátima Correia Silva

**VARIAÇÕES GENÉTICAS DA GLICOPROTEÍNA B DO
CITOMEGALOVÍRUS HUMANO E ASSOCIAÇÃO COM O
NÍVEL DE CITOCINAS EM PACIENTES SUBMETIDOS AO
TRANSPLANTE ALOGÊNICO DE CÉLULAS TRONCO
HEMATOPOIÉTICAS**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Odontologia - Área de concentração em Patologia Bucal.
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez
Co-orientadora: Profa. Dra. Tarcilia Aparecida Silva

Belo Horizonte
Faculdade de Odontologia da UFMG
2010

S586v Silva, Jeane de Fátima Correia
2010 Variações genéticas da glicoproteína B do citomegalovírus humano e
T associação com o nível de citocinas em pacientes submetidos ao transplante
allogênico de células tronco hematopoiéticas / Jeane de Fátima Correia Silva,
2010.
121 fls.:il.
Orientador: Ricardo Santiago Gomez
Co-orientadora: Tarcilia Aparecida da Silva
Tese (Doutorado)- Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de
Odontologia.
1. Transplante de células-tronco hematopoiéticas – Teses. 2. Variação
genética – Teses. I. Gomez, Ricardo Santiago. II. Silva, Tarcilia Aparecida da.
III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia.
IV. Título.

BLACK D047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE DONTOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Tese intitulada "*Variações genéticas da glicoproteína B do citomegalovírus humano e associação com o nível de citocinas na saliva de pacientes submetidos ao transplante de células tronco hematopoiéticas alogênicas*", área de concentração em **Patologia Bucal**, apresentada por **Jeane de Fátima Correia Silva**, para obtenção do grau de **Doutor em Odontologia**, **APROVADA** pela Comissão Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Dr. Ricardo Santiago Gomez
(Orientador) - FO-UFMG

Dra. Tarcília Aparecida da Silva
Co-Orientadora - FO-UFMG

Dr. Ricardo Alves de Mesquita
FO-UFMG

Dra. Vanessa de Pinho da Silva
ICB - UFMG

Dr. Rodrigo Villamarim Soares
PUC-MG

Dra. Dicle Carine Barreto Arantes
FO-NEWTON PAIVA

Prof. Dr. Saul Martins de Paiva
Coordenador do Colegiado do -
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Aos meus pais Edna e João, pelos ensinamentos que formaram os alicerces de minha história.

Ao meu marido Moisés, por todo apoio, amor, compreensão e pela companhia ao longo dessa trajetória.

AGRADECIMENTOS

Em especial,

A Deus... entrego, confio, aceito e agradeço.

À minha família, meus pais e meus irmãos João, Rafael e Leonardo, por todo apoio.

Ao meu marido Moisés, por ter estado sempre ao meu lado.

Ao meu orientador, Ricardo Santiago Gomez, pesquisador brilhante. Minha eterna e sincera gratidão.

À minha co-orientadora, Tarcilia Aparecida Silva. Agradeço pelos ensinamentos transmitidos durante o curso, pela maneira amiga e paciente com a qual me orientou.

Muito obrigada!

Agradeço,

Ao Professor Doutor Henrique Bittencourt, pela disponibilidade e pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Mauro Henrique Nogueira Guimarães Abreu, pelas várias contribuições estatisticamente significantes para a realização deste trabalho.

Ao Colegiado de Pós-Graduação da FO-UFMG, na pessoa de seu coordenador, Prof. Dr. Saul Martins de Paiva.

Aos Professores da Disciplina de Patologia da FO-UFMG, Profa. Dra. Maria Cássia, Profa. Dra. Maria Auxiliadora e Prof. Dr. Ricardo Mesquita, agradeço pelos ensinamentos e a constante disposição em ajudar.

À Prof. Dra. Carolina Cavaleri Gomes, pelo carinho.

Ao Prof. Dr. Mauro Martins, por ter disponibilizado seu laboratório.

Às funcionárias do laboratório de Anatomia Patológica da FO-UFMG, Daniela, Inês e Heloisa, pelo apoio sempre que necessário.

À equipe do Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas do HC-UFMG, pela disponibilidade.

Aos Professores do Projeto de Extensão, “Atendimento Odontológico a Pacientes Submetidos ao TCTH”, Humberto Corrêa, José Eustáquio, Leandro Napier, Marcelo Carneiro, Ricardo Vaz e Ulisses Salomão, pelo carinho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo auxílio concedido.

À Renata Gonçalves Resende, pelo apoio e suporte que foram fundamentais para a realização deste trabalho. Agradeço pela amizade e dedicação.

À Cláudia Maria Pereira, pela inestimável amizade. Gostaria de te agradecer pelos momentos científicos e não tão científicos que compartilhamos, com certeza ficarão marcados para sempre.

Às colegas do Doutorado em Patologia, Ana Carolina Neto e Juliana Massote, pelas conversas e ajuda no decorrer do curso.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular, Fabrício, Paula, João, Fabiano, Leandro, Luciano, Luciana, Marcelo, Marina e Telma, pelo apoio que recebi de cada um de vocês.

Aos colegas da Pós-Graduação em Odontologia, Adriana, Alfonso, Aline, Daniela, Elizete, Giovanna, Frederico, Silvia, Vanessa, pela agradável convivência.

Aos pacientes que muito contribuíram para este estudo, o meu mais sincero agradecimento.

E a todos que, de alguma maneira, colaboraram para a realização deste trabalho.

Obrigada!

*“Há pessoas que desejam saber só por saber, e isso é curiosidade;
outras para alcançarem fama, e isso é vaidade;
outras para entriquecerem com sua ciência, e isso é um negócio torpe;
outras para serem edificadas, e isso é prudência;
outras para edificarem os outros, e isso é caridade.”*

S. Tomás de Aquino

RESUMO

Introdução: Infecção pelo citomegalovírus (HCMV) e níveis de citocinas têm sido considerados fatores importantes que influenciam o prognóstico do transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas (alo-TCTH). A glicoproteína B (gB) do HCMV tem sido relacionada com promoção de infecção viral e indução de resposta imune em pacientes com infecção pelo HCMV. Entretanto, os componentes imunológicos associados com controle de infecção causada pelo HCMV não estão completamente esclarecidos. **Objetivo:** O objetivo do estudo foi determinar a prevalência dos genótipos da gB em pacientes submetidos ao alo-TCTH e investigar a possível relação entre os genótipos e os níveis das citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α) nas amostras de saliva e de sangue destes pacientes. Além de investigar o impacto do nível destas citocinas e da carga viral nas amostras de saliva e de sangue, coletadas sete dias antes e 21 dias após o alo-TCTH, na sobrevida dos pacientes. **Materiais e Métodos:** Amostras de saliva e de sangue de 63 pacientes submetidos ao alo-TCTH acompanhados semanalmente durante os 100 primeiros dias do transplante foram avaliadas. A genotipagem da gB do HCMV foi realizada através de multiplex-nested-PCR. A quantidade de HCMV nas amostras de saliva e de sangue foi determinada por PCR em tempo real. Os níveis de citocinas foram analisados por ELISA. **Resultados:** Trinta e seis das 63 amostras de saliva e 52 das 63 amostras de sangue foram negativas para os genótipos da gB do HCMV. O genótipo tipo 2 da gB foi o mais prevalente na saliva (19/36) e no sangue (33/52). Pacientes com gB2 na saliva apresentaram níveis menores de IL-10, em relação aos pacientes sem este genótipo ($p=0.023$). Níveis menores de IFN- γ ($p=0.040$) e de IL-1 β ($p=0.050$) no sangue também foram observados em pacientes que apresentaram o genótipo 4 da gB em comparação com os pacientes que não apresentaram este genótipo. Gênero do paciente, combinação de gênero do paciente com o do doador, fonte de células tronco hematopoiéticas e ocorrência de aDECH influenciaram a sobrevida dos pacientes após o alo-TCTH. Altos níveis de IL-6 na saliva e baixos níveis de IFN- γ no sangue sete dias antes do alo-TCTH foram associados com aumento do risco de morte. Altos níveis de IL-6 no sangue e alto nível de HCMV na saliva 21 dias após o alo-TCTH foram associados com a

redução da sobrevida dos pacientes. **Conclusão:** O genótipo gB2 foi o mais prevalente na saliva e no sangue de pacientes submetidos ao alo-TCTH. Apesar da associação entre níveis de citocinas no sangue e na saliva em pacientes com diferentes genótipos da gB e também com a sobrevida, os genótipos do HCMV não apresentaram impacto na evolução dos pacientes. O aumento do nível de IL-6 na saliva e a redução do nível de IFN- γ no sangue estão associados com o pior índice de sobrevida. Esses dados sugerem uma potencial função desses marcadores em determinar a sobrevida de pacientes submetidos ao alo-TCTH. Futuros estudos são necessários para investigar a função da IL-6 salivar como um potencial biomarcador de sobrevida para os pacientes submetidos ao alo-TCTH e sua possível associação com a carga de HCMV na saliva.

Palavras Chave: Citomegalovírus humano, glicoproteína B, citocinas, transplante de células tronco hematopoiéticas, saliva

ABSTRACT

Introduction: Factors as human cytomegalovirus (HCMV) load, recipient/donor histocompatibility, patient/donor gender, recipient age, graft-versus-host disease (GVHD) and cytokine levels have been considered important prognostic parameters in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT). Glycoprotein B (gB) protein has proved to be important in HCMV infectivity and in eliciting an immune response in patients with HCMV infection. The immunological components associated with HCMV control are not completely understood.

Objective: The aims of the present study were to assess the prevalence of the gB genotypes in patients who underwent allo-HSCT and to investigate the possible relationship between these genotypes and IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ and TNF- α levels in saliva and blood samples. In addition, we evaluated the impact of the gB genotype, cytokines levels and other risk factors on patients survival. Thus, to investigate the impact of IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ and TNF- α levels, HCMV load in saliva and blood in recipients' survival

Methods: Saliva and blood samples were sampled weekly in 63 allo-HSCT patients until 100 days after transplant. HCMV gB genotyping was carried out by multiplex nested PCR. The cytokines levels were assessed by ELISA and HCMV load was determined by real time PCR assay.

Results: Thirty six of 63 saliva samples and 52 of 63 blood samples were negative to gB HCMV genotype. gB2 was the most common genotype in saliva (19/36) and blood (33/52). Patients with gB2 in saliva showed lower IL-10 salivary levels in comparison with patients without this genotype ($p=0.023$). Reduced blood levels of IFN- γ ($p=0.040$) and IL-1 β ($p=0.050$) were also found in recipients presenting the HCMV gB4 genotype comparing patients without it. Recipient gender, combination patient/donor gender, stem cell source and aGVHD presented impact in allo-HSCT survival. High levels of IL-6 in saliva and low levels of IFN- γ in blood seven days before allo-HSCT were associated with increased risk of death. High levels of IL-6 in blood and high HCMV load in saliva 21 days after allo-HSCT decrease the recipient survival.

Conclusions: The gB2 genotype is the most prevalent gB HCMV genotype in saliva and blood of patients who underwent allo-HSCT. Despite an association between blood and saliva cytokine levels in patients with different gB genotypes and also with survival, HCMV gB genotypes

have no impact on patient outcome. The increased IL-6 level and HCMV load in saliva, the increased IL-6 level and decreased IFN- γ level in blood are associated with a worst survival rate. These findings suggest a potential function for these markers in determination of allo-HSCT survival. Further studies are necessary to investigate the function of salivary IL-6 as a potential biomarker of allo-HSCT survival and its possible association with salivary HCMV load.

key words: Human cytomegalovirus, glycoprotein B, cytokines, hematopoietic stem cell transplantation, saliva

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática do citomegalovírus humano.....	27
Figura 2 – Modelo dos mecanismos empregados pelo HCMV para a entrada nas células humanas..	29
Artigo 1	
Figura 1- Análise de sobrevida dos pacientes após um ano do alo-TCTH de acordo com nível de IL-1 β e IL-10 no sangue. [Figure 1- One-year Overall Survival According to IL-1 β and IL-10 blood levels.]	75
Artigo 2	
Figura 1- Curva de sobrevida de Kaplan-Meier após o alo-TCTH. [Figure 1 - Kaplan-Meier estimates of overall survival after allo-HSCT.]	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Genes do HCMV associados com a evasão da resposta imunológica.	39
Tabela 2 – Primers (iniciadores) usados na primeira etapa da amplificação (iniciadores externos) e na segunda etapa da amplificação (iniciadores internos).	49
Tabela 3 – Kits empregados nas reações de ELISA para dosagem das citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α).....	50
Artigo 1	
Tabela 1 - Dados demográficos dos sessenta e três pacientes submetidos ao alo- TCTH. [Table 1 – Demographic characteristics of the sixty-three allo-HSCT patients].....	71
Tabela 2 - Comparação entre os genótipos da gB do HCMV determinados pela técnica de multiplex nested-PCR. [Table 2 - Comparison of HCMV gB genotypes determined by multiplex nested-PCR].	72
Tabela 3 - Níveis de citocinas de acordo com os genótipos da gB na saliva e no sangue dos pacientes submetidos ao alo-TCTH. [Table 3- Cytokine levels according to HCMV gB genotypes in saliva and blood samples of allo-HSCT patients].....	73
Tabela 4 - Sobrevida de acordo com o genótipo da gB e com os níveis de citocinas na saliva e no sangue determinado pelas análises univariada e multivariada. [Table 4- Survival according to gB genotype and cytokine levels in saliva and blood as determined by uni- and multivariate analysis].	74
Artigo 2	
Tabela 1- Características dos pacientes submetidos ao alo-TCTH e análise de sobrevida univariada. [Table 1- Baseline characteristics of allo-HSCT patients and survival univariate analysis].....	92
Tabela 2 - Sobrevida de acordo com os níveis de citocinas na saliva e no sangue, antes e após o alo-TCTH. [Table 2- Survival according to cytokine levels in the saliva and blood before and after allo-HSCT– Univariate analysis].....	94

Tabela 3 - Sobrevida de acordo com a carga de HCMV determinada pelo PCR em tempo real - análise univariada . [Table 3- Survival according to HCMV load by real-time PCR – Univariate analysis].....	95
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

alo-TCTH	Transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amônia
BSA	Albumina de soro bovino
CD4 ⁺	Linfócito T citolítico CD4 ⁺
CD8 ⁺	Linfócito T citotóxico CD8 ⁺
CMV	Citomegalovírus
CNS	Conselho Nacional de Saúde
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CSA	Ciclosporina
CXCL-8	Receptore de IL-8 humana
CXCR	Receptor para quimiocina CXC
DECH	Doença do enxerto contra o hospedeiro
DEPE	Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxi-nucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido tetra etileno diamino
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
g	Força da gravidade
gB	Glicoproteína B
gN	Glicoproteína N
gD	Glicoproteína D
gH	Glicoproteína H
gM	Glicoproteína M
gO	Glicoproteína O
gp	Glicoproteína
HC	Hospital das Clínicas
HCMV	Citomegalovírus humano
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA	Antígeno leucocitário humano
HSPGs	Proteoglicanos de Heparan Sulfato
IE	<i>Immediate-early</i> ou proteína viral produzida imediatamente após o início da infecção
IFN	Interferon
IL	Interleucina
Kb	Quilo bases
mCP	Proteína menor do capsídeo
MCP	Proteína maior do capsídeo
mg	Miligrama

MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
ml	Mililitros
μl	Microlitros
mM	Milimolar
mm ³	Milímetro cúbico
MMF	Micofenolato mofetil
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
MTX	Methotrexato
NaCl	Cloreto de sódio
NaPO ₄	Fosfato de sódio
ng	Nanograma
NK	Células natural killer ou citotóxica natural
°C	Graus Celsius
pb	Pares de base
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pg	Picograma
pH	Potencial de hidrogênio
pp65	Proteína menor da matriz
s	Segundos
TCTH	Transplante de células tronco hematopoiéticas
Th	T helper ou auxiliar
TLRs	Receptores <i>Toll-like</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR	Receptor do fator de necrose tumoral
Tris	Tris-hidroximetilaminometano
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
vCXCL-1	Quimiocina CXC ligante 1 viral

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	19
2- REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1- Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas	23
2.2- Complicações do Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas.....	25
2.3- Citomegalovírus.....	26
2.3.1- Estrutura do Citomegalovírus	26
2.3.2- Mecanismos de Infecção e Latência do Citomegalovírus.....	27
2.3.3- Terapia Anti-Viral.....	31
2.3.4- Diagnóstico de Infecção Causada pelo Citomegalovírus.....	31
2.3.5- Glicoproteína B do Citomegalovírus	32
2.3.6- Resposta Imunológica do Paciente ao Citomegalovírus.....	33
2.3.7- Mecanismos Empregados pelo Citomegalovírus para Evadir da Resposta Imunológica do Paciente.....	38
2.3.8- Genótipos da Glicoproteína B do HCMV e Níveis de Citocinas.....	40
3- OBJETIVOS	43
3.1- Objetivo Geral.....	43
3.2- Objetivos Específicos	43
4- MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1- Aspectos Éticos	45
4.2- Pacientes e Amostras.....	45
4.3- PCR em Tempo Real.....	47
4.4- Multiplex-nested-PCR para o gene UL55 (gB) do HCMV	48
4.5- ELISA	49
4.6- Análise Estatística	51
5- RESULTADOS	53
5.1 Artigo 1	53
5.2 Artigo 2	76
7- CONCLUSÕES	106
8- REFERÊNCIAS.....	108
ANEXOS	120

INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

Doenças causadas pelo citomegalovírus humano (HCMV) permanecem como uma importante causa de morbidade e mortalidade em pacientes submetidos ao transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) (Allice et al., 2008). O HCMV pertence à família Herpesviridae, e como os demais herpesvírus, apresenta estrutura viral, cinética de expressão de genes virais, tropismo por tecidos, e uma fase produtiva acompanhada por uma fase latente nas células do hospedeiro. Essa fase de latência assegura a persistência do genoma viral por toda a vida do indivíduo infectado (Kalpoe et al., 2004). O HCMV é capaz de alterar a expressão de genes celulares e apresenta uma característica específica dos betaherpesvírus que é o tropismo pelas glândulas, como as salivares (Morcarski, 2002). Durante a infecção primária, recorrência ou infecção persistente, há disseminação do vírus por múltiplos fluidos, como saliva, sangue, urina, leite materno e sêmen. Isto ocorre devido à replicação do vírus em células epiteliais glandulares, seguida pela sua liberação nestas secreções (Landolfo et al., 2003).

A patogênese do HCMV tem sido relacionada com interações de fatores virais e resposta imune do hospedeiro (Pang et a., 2008). O grande número de funções imunomodulatórias codificadas pelo HCMV favorece o aumento da eficiência durante a infecção, disseminação e reativação. As funções imunomodulatórias do vírus, como a capacidade de alterar a apresentação de antígeno via MHC, parecem contribuir para virulência do HCMV em pacientes imunocomprometidos. Esta imunomodulação afeta tanto a resposta imunológica inata quanto a adaptativa e também pode alterar a resposta celular um pouco

mais do que a resposta humoral (Mocarski, 2002). A virulência de diferentes genótipos do HCMV pode ser um importante fator de ocorrência de doença (Coaquette et al., 2004), devido a variações em genes virais envolvidos na entrada viral na célula do hospedeiro, no tropismo tecidual ou na replicação do HCMV (Halary et al., 2002). Um possível fator que afeta a virulência e patogênese do HCMV é a presença de regiões com grande número de polimorfismo no genoma viral (Yu et al., 2006). Uma destas regiões polimórficas é encontrada no gene UL55 que codifica a glicoproteína B (gB) do HCMV (Rasmussen et al., 1999).

A gB do HCMV tem sido relacionada com a entrada do vírus na célula, com a transmissão do vírus célula a célula e com a fusão do envelope viral com a célula do hospedeiro (Navarro et al., 1993; Yu et al., 2006). Além disso, a gB é altamente imunogênica em humanos, sendo importante alvo da resposta imunológica humoral e celular (Rasmussen et al., 1999).

Baseado nas variações da seqüência do gene UL55, são conhecidos cinco genótipos da gB (gB1, gB2, gB3, gB4 e gB5) (Chou et al., 1991; Shepp et al., 1998). O genótipo gB2 mostrou associação com tropismo neural em pacientes imunocomprometidos (Tarragó et al, 2003). Os genótipos gB 3 e 4 apresentaram associação com óbito em pacientes transplantados de medula óssea (Torok-Storb et al., 1997). Pacientes com infecção por múltiplos genótipos da gB do HCMV apresentaram relação com a presença de maior carga viral (Pang et al., 2008) e atraso na eliminação do HCMV do hospedeiro (Manuel et al., 2009). A infecção por múltiplos genótipos da gB pode ser um fator crucial para o desenvolvimento de sintomas graves de doença causada pelo HCMV em pacientes imunocomprometidos (Coaquette et al., 2004). Entretanto, os componentes da

resposta imunológica importantes para o controle da doença causada pelo HCMV ainda não foram completamente elucidados.

Durante o desenvolvimento de doença pelo HCMV, citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão são produzidas para recrutar células inflamatórias com o objetivo de controlar a infecção (Nordøy et al., 2000). A desregulação da produção de citocinas está envolvida com a rejeição do enxerto e indução de dano tecidual em pacientes submetidos ao TCTH (Ferrà et al., 1998). As citocinas produzidas em resposta ao HCMV têm sido consideradas de fundamental importância para proteção imunológica do paciente no desenvolvimento de doença infecciosa (Essa et al., 2009).

Estudos investigaram a associação entre a presença de determinados genótipos da gB do HCMV e a ocorrência de doença causada pelo vírus (Manuel et al., 2009; Pang et al., 2008). No entanto, ainda não foi avaliado se a presença de alguns genótipos da gB do HCMV ou de múltiplos genótipos estaria associada à alteração dos níveis de citocinas.

Considerando que as glândulas salivares são importantes sítios de latência do HCMV e que evidências sugerem que a imunossupressão está relacionada com a reativação viral, o estudo sobre a presença e a frequência de genótipos da gB do HCMV na saliva e sua relação com a produção de citocinas na saliva pode ajudar a elucidar os mecanismos imunológicos de regulação do HCMV e seu impacto na sobrevivência de pacientes submetidos ao TCTH.

REVISÃO DE LITERATURA

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas

O transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) é indicado como medida terapêutica para diversas neoplasias hematológicas ou de outros tecidos, insuficiências medulares e outros distúrbios congênitos da hematopoiese. O TCTH é um procedimento clínico que consiste na infusão, por via endovenosa, de células tronco hematopoiéticas obtidas de um doador, previamente selecionado, em um receptor adequadamente condicionado (Fonseca, 2000). O paciente é submetido a um regime de condicionamento com altas doses de quimioterapia associada ou não a irradiação corpórea total (Dahllöf et al., 1997).

O TCTH pode ser classificado de acordo com o tipo de doador, grau de parentesco do doador, semelhança do HLA e fonte de células tronco hematopoiéticas utilizadas para o transplante. Em relação ao tipo de doador o transplante pode ser dividido em: alogênico, quando o TCTH é realizado entre indivíduos diferentes, mas da mesma espécie; autólogo, quando são utilizadas células tronco hematopoiéticas do próprio paciente; e singênico, quando o TCTH ocorre entre indivíduos genotipicamente idênticos, como gêmeos univitelinos. O TCTH pode ser classificado quanto ao grau de parentesco do doador de células tronco hematopoiéticas em: aparentado, quando o transplante é realizado entre parentes de primeiro grau; e não aparentado, quando não há parentesco de primeiro grau entre o doador e o paciente. Quanto à semelhança do HLA do paciente e do doador, o TCTH pode ser dividido em: compatível, quando há semelhança entre antígenos de histocompatibilidade do doador e do receptor; e incompatível, quando existem diferenças entre antígenos de histocompatibilidade

do doador e do receptor. Por último, o TCTH pode ser classificado quanto à fonte de células progenitoras utilizadas no transplante em: transplante de medula óssea, quando as células progenitoras são aspiradas da medula óssea da crista ilíaca; transplante de células tronco periféricas, quando as células progenitoras são obtidas por aférese do sangue periférico por punção venosa ou por um catéter central; e transplante de cordão umbilical, quando a aspiração de células tronco ocorre na veia umbilical do doador (Amos e Gordon, 1995).

O TCTH pode ser dividido em 5 estágios ou fases, de acordo com os eventos biológicos e fisiológicos que ocorrem no curso do transplante. O estágio 1 corresponde ao período pré-transplante. O estágio 2 inclui a fase de condicionamento, que se inicia 10 dias antes do transplante (dia -10) e estende-se até o início da pega do enxerto, 20 dias após o TCTH (+20). O estágio 3 inicia-se com a pega do enxerto, que ocorre com aproximadamente 20 dias após o TCTH, e estende-se até a reconstituição hematológica, que ocorre em torno de 100 dias após o TCTH (dia +100). O estágio 4 inicia-se com a reconstituição hematológica e estende-se até a reconstituição imunológica, que ocorre em torno do dia +365. E o estágio 5 inicia após o 1 ano do TCTH e compreende todo o período de sobrevivência do paciente (Majorana et al., 2000).

No condicionamento para o TCTH, o paciente é submetido a altas doses de quimioterapia associada ou não à irradiação corpórea total, preparando-o, assim, para receber o enxerto, e assim reiniciar a atividade do sistema imunológico e hematopoiético). O regime condicionante para o TCTH é influenciado pela doença de base do paciente. Em pacientes com doenças não malignas, o protocolo do condicionamento é direcionado à imunossupressão, ao passo que, para pacientes portadores de doenças malignas o regime condicionante associa drogas

citotóxicas para destruição das células malignas à drogas imunossupressoras (Dahlöf et al., 1997).

2.2- Complicações do Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas

Embora o TCTH represente a única possibilidade de cura para diversas doenças, o tratamento não é isento de complicações, que podem ocorrer em todas as fases do transplante. Pacientes submetidos ao TCTH podem desenvolver complicações devido ao efeito da quimioterapia e da radioterapia, infecções devido à mielossupressão e imunossupressão, e ao aparecimento da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH). A DECH pode ser uma reação catastrófica e fatal onde às células imunocompetentes do doador reconhecem e provocam reação imunológica contra o tecido do paciente (hospedeiro) (Gale, 1985).

De qualquer forma, as infecções são as maiores causas de morbidade e mortalidade durante e após o TCTH (Bai et al., 1997). Dentre os agentes infecciosos que afetam seriamente pacientes submetidos ao TCTH, destaca-se o HCMV (Yan e Fedorko, 2002). Infecção primária, reinfecção e reativação do HCMV latente são possíveis de ocorrer em pacientes após o TCTH (Pass et al., 1999). Aproximadamente 70% dos receptores de TCTH são HCMV-soropositivos e/ou receberão transplante de doador HCMV-soropositivo (Hebart et al., 2000). Reativação por HCMV pode ocorrer em cerca de 80% dos pacientes CMV-soropositivos após o TCTH (Boriskin et al., 2002).

O diagnóstico clínico de infecção por HCMV é muito difícil devido a não especificidade dos sinais e sintomas, como também devido às variadas manifestações clínicas como, mononucleose-símile, febre persistente, mialgia, dor

de cabeça, linfadenopatia cervical, pneumonia, hepatites, distúrbios gastrointestinais, retinites, anemia hemolítica, trombocitopenia, distúrbios do sistema nervoso central e periférico e lesões cutâneas (Landolfo et al., 2003). As manifestações clínicas de infecção bucal por HCMV são raras e têm sido observadas como úlceras dolorosas e erosões, principalmente em pacientes imunocomprometidos (Kanas et al., 1987; Heinic et al., 1993). Apesar de todos os avanços para realização de diagnóstico precoce e do aperfeiçoamento de novas drogas, a infecção por HCMV continua sendo uma das maiores complicações no alo-TCTH (Liu & Zhang et al., 2008).

2.3- Citomegalovírus

2.3.1- Estrutura do Citomegalovírus

O HCMV é um membro da subfamília betaherpesvírus e como os demais membros apresentam estrutura viral, cinética de expressão de genes virais e persistência por toda a vida do hospedeiro, típicos dos herpesvírus (Morcarski, 2002).

O HCMV apresenta um nucleocapsídeo icosaédrico de 100 nm de diâmetro contendo um material genético composto por DNA de fita dupla de 230 Kb, circundado por uma camada protéica definida como tegumento ou matriz. O tegumento é cercado por uma bicamada lipídica contendo um grande número de glicoproteínas (gp) virais (Figura 1). Mais de 30 proteínas virais são encontradas no vírus maduro, sendo que quatro delas constituem o capsídeo [pUL46, pUL48. 5, a proteína menor do capsídeo (mCP), e a proteína maior do capsídeo (MCP)] (Landolfo et al., 2003). O envelope fosfolipídico contém seis glicoproteínas, gpUL55 (gB), gpUL73 (gN), gpUL74 (gO), gpUL75 (gH), gpUL100 (gM) e

gpUL115 (gL). Estas glicoproteínas promovem a entrada do vírus na célula do hospedeiro, auxiliam na infecção do vírus célula a célula e na maturação viral (Britt & Mach, 1996). A glicoproteína B é considerada um receptor viral e importante indutor de resposta imune (Contreras & Slots, 2000; Cunha et al., 2002). O ciclo replicativo dos herpesvírus é um processo de várias etapas regulado por várias glicoproteínas de envelope (gB, gD e gH) (WuDunn & Spear, 1989).

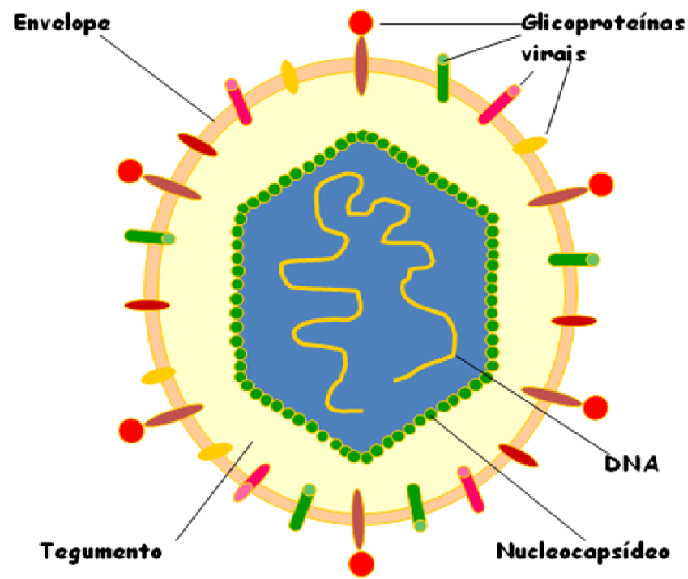


Figura 1 – Representação esquemática do citomegalovírus humano.

2.3.2- Mecanismos de Infecção e Latência do Citomegalovírus

A ligação e a entrada do HCMV na célula do hospedeiro ocorrem de forma rápida e eficiente tanto em células permissivas quanto em células não permissivas. Entretanto, a replicação é observada apenas em células humanas permissivas. Em células não permissivas, após a penetração viral ocorre o

bloqueio da expressão de genes virais. O citomegalovírus interage com a superfície da célula do hospedeiro por meio de ligações de baixa afinidade entre a glicoproteína viral (gB) com proteoglicanos de Heparan Sulfato (HSPGs) (Sinzger et al., 2000). Em um modelo dos mecanismos que o HCMV emprega para a entrada nas células humanas, proposto por Compton (2004), após a interação de baixa afinidade entre a gB com HSPGs, a gB interage com receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) em células permissivas ao HCMV ou com receptores, ainda não identificados, em células hematopoiéticas. Outras interações entre as glicoproteínas do envelope e integrinas celulares promovem a formação de aglomeração de receptores. Por último, uma destas interações dispara a fusão que conduz a internalização do vírion (partícula viral completa constituída por DNA e cercado pelo capsídeo). Sinais de transdução são iniciados pelo EGFRs e ou integrinas e esses eventos são hipotetizados como sendo os iniciadores e facilitadores de etapas do ciclo lítico viral como a translocação do capsídeo e expressão de genes virais. Receptores Toll-like (TLRs) detectam padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) expressos pelo HCMV durante a entrada do vírus conduzindo a eventos de sinalização distintos e a ativação da resposta imunológica (Figura 2) (Compton et al., 2003).

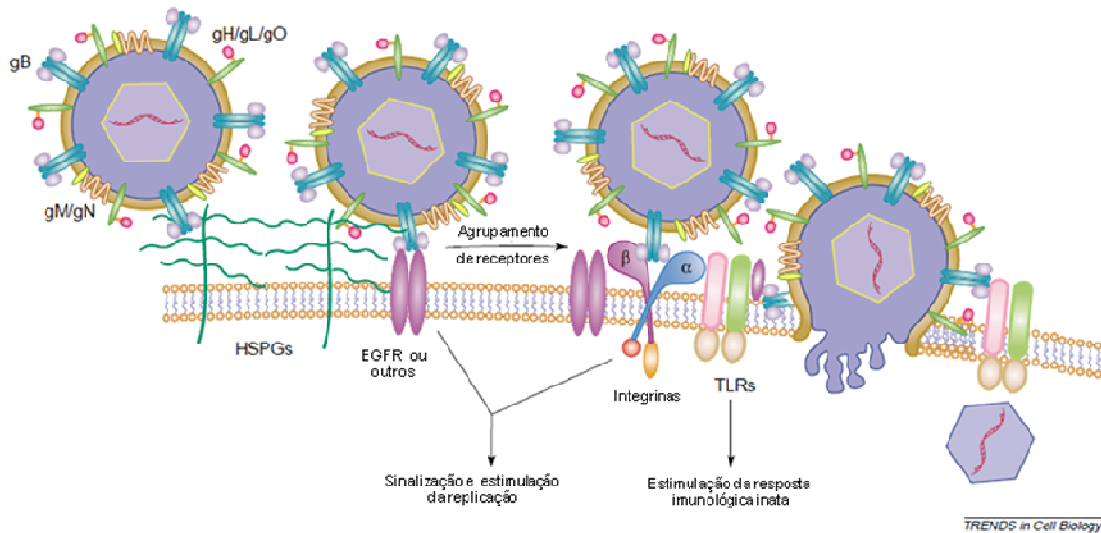


Figura 2 – Modelo dos mecanismos empregados pelo HCMV para a entrada nas células humanas. (Adaptado de Compton, 2004).

A persistência do genoma viral em uma forma não produtiva ocorre em sítios anatômicos específicos por meses ou vários anos (Hengel et al., 2000). Isto ocorre devido à capacidade do vírus de escapar do sistema imunológico ao induzir um estado de latência, ao utilizar alguns tecidos para replicação e ao expressar genes virais que interferem com a resposta imune (Morcarski, 2002). O escape do sistema imunológico, principalmente de células $CD8^+$ é mediado por importantes mecanismos, que atuam bloqueando a expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I (Machold et al., 1997). A escolha de células epiteliais das glândulas salivares para replicação viral ocorre devido à expressão de um número insuficiente de moléculas de MHC classe I nestas células, necessárias para iniciar o reconhecimento pelas células $CD8^+$ (Morcarski, 2002).

Ulceração na mucosa bucal associado ao HCMV foi descrita em pacientes que se submeteram ao TCTH (Lloid et al., 1994). Em três relatos de casos clínicos analisados foi observada manifestação bucal de doença por HCMV em

pacientes imunocomprometidos. Nestes pacientes foi encontrada presença viral em células endoteliais da mucosa bucal (Myerson et al. 1984; Kanas et al., 1987; Heinic et al., 1993). O epitélio ductal de glândulas salivares e o endotélio de vasos sanguíneos são os principais sítios bucais infectados pelo HCMV, enquanto o epitélio de revestimento da mucosa bucal é esporadicamente afetado. A razão desta predileção pelo epitélio ductal e endotelial é desconhecida. Foi sugerido que a vasculite localizada, associada com infecção de células endoteliais pelo HCMV, seria o mecanismo responsável pelo desenvolvimento de ulcerações bucais, já que este mecanismo já foi descrito em outros tecidos como pele e intestino (Kanas et al., 1987).

Durante a infecção primária, recorrência ou infecção persistente há disseminação do vírus por múltiplos fluidos, como saliva, sangue, urina, leite materno e sêmen. Isto ocorre devido à replicação do vírus em células epiteliais glandulares, seguida pela sua liberação nestas secreções (Landolfo et al., 2003). O DNA do HCMV pode ser detectado em amostras de saliva (Correia-Silva et al., 2007), sangue (Ehrnst et al., 1995), líquido amniótico (Gerna et al., 1994), por reação em cadeia da polimerase (PCR) qualitativo (Correia-Silva et al., 2007) e quantitativo (Allice et al., 2008). Estudo em modelo animal de infecção por citomegalovírus murino demonstrou que a reativação do vírus nas glândulas salivares e conseqüentemente a presença na saliva pode resultar em reinfeção de tecidos internos e órgãos possivelmente via pequenas lacerações das mucosas oral, da faringe e do esôfago, promovendo contínuas alterações no sistema imune do hospedeiro (Kloover et al., 2002). No entanto, as conseqüências da presença do DNA do HCMV na mucosa bucal de pacientes submetidos ao TCTH ainda não foram completamente elucidadas.

2.3.3- Terapia Anti-Viral

O ganciclovir, o cidofovir, e o foscarnet têm sido usados para tratamento de infecções por CMV em pacientes imunocomprometidos. Essas drogas têm provocado melhora clínica em alguns pacientes. No entanto, drogas usadas na terapia anti-HCMV podem apresentar pequena absorção via oral (5%), uma baixa potência, desenvolver resistência na prática clínica e apresentar uma toxicidade dose dependente, levando à necessidade de hospitalização do paciente. Estes efeitos adversos conduzem a uma baixa eficiência da terapia anti-HCMV (Landolfo et al., 2003).

2.3.4- Diagnóstico de Infecção Causada pelo Citomegalovírus

A antigenemia ainda é um método utilizado para monitorar a reativação/infecção e guiar a terapia anti-HCMV em pacientes transplantados de células tronco hematopoiéticas. Esta técnica consiste na detecção de antígenos pp65 do HCMV em leucócitos sanguíneos periféricos (Boech et al., 1996). Entretanto, o diagnóstico baseado na detecção de antígenos apresenta algumas desvantagens, pois apresenta baixa sensibilidade para detectar precocemente a infecção por HCMV, principalmente no período antes da “pega” do enxerto, devido ao baixo número de leucócitos no sangue. Além do mais, esta técnica requer processamento imediato, consome muito tempo e não é automatizada (Leruez-Ville et al., 2003). O desenvolvimento de tratamento eficaz anti-HCMV torna-se possível com o diagnóstico precoce da infecção. A terapia antiviral normalmente é baseada no diagnóstico laboratorial rápido. Por isso, testes laboratoriais rápidos, específicos e sensíveis para detectar infecção por HCMV são importantes para

instituição da terapia antes do início dos sintomas clínicos (Boriskin et al., 2002). O diagnóstico rápido de resistência a determinada droga antiviral pode alterar o curso da terapia, levando a substituição da droga e assim a obtenção de um resultado eficiente contra a infecção (Liu & Zhang, 2008).

Em estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, a detecção do HCMV na saliva de pacientes após o alo-TCTH mostrou-se significativamente maior que em indivíduos não transplantados (Correia-Silva et al., 2007). Apesar da alta soroprevalência para HCMV observada na população brasileira (Cunha et al., 2002), a presença de HCMV na cavidade bucal de pacientes imunocompetentes representa um evento incomum. Em outro estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, observamos uma alta correlação entre a detecção de DNA do HCMV na cavidade bucal e no sangue (Correia-Silva et al., 2010).

2.3.5- Glicoproteína B do Citomegalovírus

Polimorfismos no gene da gB são considerados como um dos principais mecanismos de escape da resposta imunológica do hospedeiro (Rasmussen, 1999). Locais de variabilidade foram descritos nas regiões do N e C terminal da gB (Meyer-Konig et al., 1998). Foi relatado um predomínio significativo de uma variante polimórfica da gB em pacientes HIV positivos quando comparados com grupo HIV negativo (Ramussen et al., 2003).

Estudo sugere que alguns genótipos da gB podem estar associados com as manifestações clínicas ou com tropismo do HCMV por diferentes órgãos (Tarragó et al., 2003). Proliferação de linfócitos específicos contra a gB e a produção de uma resposta citotóxica por meio de células CD8⁺ e CD4⁺ (T helper ou auxiliar) são de grande importância para limitar a infecção causada pelo HCMV

(Liu et al., 2008). Foi observado que pacientes com múltiplos genótipos da gB do HCMV apresentaram aumento significativo da carga viral em relação aos pacientes infectados com um único genótipo da gB (Pang et al., 2008). A infecção por múltiplos genótipos da gB do HCMV pode ser um fator importante para induzir a manifestação de sintomas clínicos graves em pacientes imunocomprometidos (Coaquette et al., 2004). Durante o curso da doença causada pelo HCMV, diversas citocinas, quimiocinas e moléculas da adesão são sintetizadas para recrutar células inflamatórias para o local da infecção (Nordøy et al., 2000).

Indivíduos imunocompetentes infectados pelo HCMV conseguem suprimir a replicação viral e manter o vírus latente por longo tempo devido à presença de uma resposta imunológica eficiente. Distúrbio da resposta imunológica permite a reativação do HCMV e possibilita, portanto, a ocorrência de doença (Mocarski, 2002). Infecção grave causada pelo HCMV, geralmente, ocorre em indivíduos que apresentam comprometimento da imunidade mediada por células. Este fato demonstra que a imunidade celular fornece a maior parte da proteção contra o HCMV. Contudo, o papel de suporte do sistema humoral em manter as cargas de HCMV abaixo do limiar crítico de reativação não deve ser negligenciado (Landolfo et al., 2003).

2.3.6- Resposta Imunológica do Paciente ao Citomegalovírus

Na fase inicial das infecções virais, o controle é realizado pelos interferons tipo I (IFN- α e IFN- β) produzidos pelos macrófagos e pelas células NK (“natural killer” ou citotóxica natural). Os interferons tipo I são produzidos por células infectadas por vírus e, ao interagir com uma célula não infectada, têm a propriedade de protegê-la contra a infecção, além de colaborar com a resposta

imune adaptativa. O IFN- γ também atua contra as infecções virais mediante a ativação dos macrófagos com destruição dos vírus e por meio da ativação das células NK, as quais, pela liberação de granzima e perforina, destroem as células infectadas. Adicionalmente, a IL (Interleucina) 12 possui participação importante na fase inicial, sendo produzida por macrófagos e outras células apresentadoras de antígenos, estimulando as células NK a exercer citotoxicidade e a produzir mais IFN- γ , que por sua vez aumenta o potencial antimicrobiano dos macrófagos (Chadha et al., 2004).

Durante a resposta imune adaptativa há ativação das células T CD4⁺ específicas para HCMV que desempenham um papel importante no controle da replicação viral (Ludwig et al., 2006; Essa et al., 2009). Células T CD4⁺ específicas para HCMV não têm apenas a atividade efetora direta mediada pela produção de citocinas, mas também estimulam a produção de anticorpos pelas células B e são essenciais para iniciar e manter a função das células T citotóxicas CD8⁺. Enquanto as células T CD8⁺ específicas para o HCMV desempenham uma função protetora por meio da sua atividade efetora primária, as células T CD4⁺ são importantes para o desenvolvimento de uma resposta imunológica prolongada e estável (Foster et al., 2002; Ludwig et al., 2006).

A imunidade adaptativa contra os antígenos virais ocorre com ativação de células T citotóxicas CD8⁺ que causam citotoxicidade pelo reconhecimento de antígenos virais via MHC classe I nas células alvo, e conseqüente liberação de granzima e de perforinas com lise das células infectadas e também dos vírus (Machado et al., 2004). Estudos têm demonstrado que a supressão de células T pode causar a reativação e a disseminação do HCMV. Foi observado também que ambas as células NK e células T citotóxicas CD8⁺ são de importância

primária na prevenção da reativação do HCMV (Hengel et al., 1998; Landolfo et al., 2003). Entretanto, a inativação de células T citotóxicas CD8⁺ com anticorpos ou em ratos mutantes com deficiente expressão de MHC de classe I revelaram atividades anti-HCMV adicionais intermediadas por citocinas derivadas de células CD4⁺ que não eram vistas quando as células CD8⁺ estavam presentes (Riera et al., 2001).

Apesar dos vírus serem agentes intracelulares, os anticorpos tem papel importante no combate às infecções virais, desde que, por ocasião da propagação da infecção viral, após multiplicarem-se em células infectadas, os vírus rompem essas células, ficando livres até a penetração em outra célula. Nessa fase extracelular os anticorpos podem ligar-se aos vírus e, por meio do mecanismo de neutralização, impedir que eles penetrem uma célula não infectada. Alternativamente, anticorpos podem ser adjuvantes no mecanismo de citotoxicidade celular dependente de anticorpos, ao se ligar às células infectadas, permitindo a ação das células NK (Machado et al., 2004). Evidências experimentais e clínicas mostram que a resposta humoral é benéfica. Ratos imunizados com a gB do CMV murino foram protegidos contra alterações letais causadas pelo vírus e a imunização de cobaias grávidas com a glicoproteína do envelope do CMV protegeu também os fetos da mesma maneira (Harrison et al., 1995). Muitas proteínas do HCMV são reconhecidas pelo sistema imune humoral. As glicoproteínas do envelope, principalmente a gB e a gH, são alvos de anticorpos para neutralização do HCMV em modelos experimentais empregando-se ratos (Pass, 2001). O predomínio da gB como alvo de anticorpos pode ser explicado pela sua imunogenicidade dominante e pela sua abundância comparada com outros componentes do envelope (Landolfo et al., 2003).

As citocinas desempenham um papel importante na resposta imunológica e têm sido relacionadas com a reativação e a patogênese de doença causada pelo HCMV (Zhang et al., 2009).

As células T CD4⁺ regulam as respostas imunológicas celular e humoral in vivo, principalmente, por meio da liberação de citocinas (Essa et al., 2009). A população de células T CD4⁺ é heterogênea, sendo que T helper ou auxiliar (Th) 1 e 2 constituem a maioria dos subtipos de células Th funcionais (Essa et al., 2002; Essa et al., 2009). Células Th1 induzem citotoxicidade e reações inflamatórias pela produção de altos níveis de interferon (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF- α), (TNF- β), interleucina (IL) 2 e IL-12 e são responsáveis por reações inflamatórias mediadas por células, enquanto as células Th2 liberam preferencialmente IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 e estão associados com a indução da produção de anticorpos pelas células B (Mosmann e Sad, 1996; Essa et al., 2002; Essa et al., 2009). É fundamental o entendimento de que tanto a resposta Th1 como a resposta Th2 são importantes na defesa do hospedeiro contra as infecções. Essas respostas são também antagônicas, desde que o IFN- γ modula negativamente a resposta Th2, e a IL-4 e a IL-10 modulam negativamente a resposta Th1, o que permite uma homeostasia no sistema imune e uma resposta imunológica balanceada (Machado et al., 2004).

A IL-1 β é uma potente citocina da resposta imunológica inata que apresenta diversas funções no processo inflamatório, incluindo a indução da resposta de fase aguda, ativação de componentes da imunidade adquirida e promoção de inflamação crônica. Monócitos produzem uma grande quantidade de IL-1 β por meio de indução do gene que codifica esta citocina após o contato com uma grande variedade de estímulos causados por agentes exógenos e

endógenos, principalmente associados a infecções, dentre eles o HCMV (Listman et al., 2007).

A IL-6 é uma citocina de ação pleiotrópica que desempenha uma função central na resposta imunológica contra infecções. Esta citocina é indutora da fase aguda de uma infecção, em resposta imune inata desencadeada por infecções e inflamações. A IL-6 é secretada por macrófagos ativados e desempenha diversas funções durante o desenvolvimento da resposta imunológica adaptativa contra patógenos, incluindo a regulação da expressão de genes que codificam citocinas e quimiocinas. Sendo assim, estimula a produção de anticorpos pelas células B, regula a diferenciação de macrófagos e células dendríticas e a resposta regulatória de células T contra infecções microbianas (Zedtwitz-Liebenstein et al., 2009).

A interleucina 10 é uma citocina antiinflamatória secretada, principalmente, pelos linfócitos T auxiliares do tipo 2 (Th2), que regula a resposta imune. A IL-10 é uma importante molécula imunoreguladora e atua como uma citocina multifuncional em doenças infecciosas humanas. Esta citocina é produzida por diversos tipos de células, incluindo células T e B, monócitos, macrófagos e queratinócitos (Zedtwitz-Liebenstein et al., 2007). Os monócitos após sua diferenciação pode ser local de replicação do HCMV, desempenham a função de células apresentadoras de antígenos e são as maiores produtoras de ambas as citocinas pró-inflamatória e antiinflamatória. O balanço entre as citocinas pró e antiinflamatória pode ser decisivo para a eliminação do vírus. A principal citocina antiinflamatória produzida por monócitos é a IL-10, que pode suprimir apresentação de antígenos, inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias e prejudicar a resposta proliferativa de células T (Gredmark et al., 2004; Zedtwitz-

Liebenstein et al., 2007). A IL-10 parece estar associada com a atenuação da defesa antiviral e pode contribuir de forma importante para imunossupressão após o transplante (Zhang et al., 2009).

Como mencionado anteriormente, o IFN- γ desempenha importante função na defesa mediada por células contra patógenos intracelulares, como o HCMV. Pacientes submetidos ao TCTH com episódios de reativação do HCMV apresentaram um aumento significativo da contagem de células T CD4⁺ IFN- γ ⁺ positivas, específicas para o HCMV, apenas antes da reativação do vírus (Ludwig et al., 2006). Estudo recente mostrou que a diminuição da expressão de mRNA do IFN- γ , em pacientes com infecção ativa do HCMV. Este resultado pode ser explicado pela perda de citotoxicidade mediada por células T, a qual pode levar a uma pobre defesa contra infecções causadas pelo HCMV, durante a imunossupressão (Zhang et al., 2009).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma das citocinas pro - inflamatórias produzidas por monócitos que existe nas formas solúvel e ligada à membrana. O aumento de TNF- α foi associado com a reativação do HCMV e com a doença causada pelo vírus em pacientes submetidos ao transplante renal (Nordøy et al., 2000).

2.3.7- Mecanismos Empregados pelo Citomegalovírus para Evadir da Resposta Imunológica do Paciente

O HCMV possui um grande número de genes que codificam proteínas que atuam na modulação da resposta imunológica do hospedeiro. Estas proteínas são capazes de alterar e/ou mimetizar: (1) função do MHC; (2) migração, ativação e

respostas dos leucócitos às citocinas; (3) susceptibilidade das células do hospedeiro a apoptose (Tabela 1). Estas proteínas com funções imunomodulatórias codificadas pelo HCMV aumentam a eficiência da infecção, da disseminação, da reativação e da persistência viral em indivíduos com sistema imunológico íntegro. Em indivíduos imunocomprometidos, estas proteínas capazes de modular o sistema imunológico do hospedeiro podem contribuir para aumentar a virulência do HCMV. Estas funções imunomodulatórias alteram tanto a resposta imunológica inata quanto a adaptativa e parecem afetar a resposta celular um pouco mais do que a resposta humoral (Mocarski, 2002).

Tabela 1 – Genes do HCMV associados com a evasão da resposta imunológica.

Função Imunológica	Gene Viral	Proteína Viral	Mecanismo
Ativação de células NK ^a	UL40	gp UL40	Sobre regulação da expressão de HLA: ligação de inibidores dos receptores de células NK
Apresentação de antígeno via MHC de classe I	US3	gp US3	Retenção de complexos de MHC de classe I no retículo endoplasmático
Apresentação e processamento de antígeno via MHC de classe II	US2	gp US2	Degradação de MHC de classe II e prevenção da apresentação antigênica para células CD4 ⁺
Modulação da produção de quimiocinas	US27/28	pUS27/28	Proteínas ligantes de quimiocinas β

^a – Células citotóxicas naturais (NK)

Embora a evasão da resposta imunológica seja um importante mecanismo para disseminação do HCMV, o efeito da presença de algumas proteínas virais no

processo inflamatório sugere que o aumento da inflamação possa beneficiar a disseminação viral (Mocarski, 2002). Uma quimiocina (vCXCL-1) viral codificada pelo HCMV que apresenta a função de atração de neutrófilos pode beneficiar a disseminação viral (Penfold et al., 1999). Esta quimiocina liga especificamente ao receptor CXCR-2 (receptor para quimiocina CXC), um dos dois receptores de IL-8 humana (CXCL-8), e não se liga a nenhum outro receptor de quimiocinas, incluindo CXCR-1. A proteína vCXCL-1 provavelmente modula o comportamento das células do hospedeiro que apresentam o receptor CXCR2, incluindo alguns tipos de células mononucleares e progenitoras que são potenciais veículos para a disseminação ou latência do HCMV (Penfold et al., 1999; Mocarski, 2002).

2.3.8- Genótipos da Glicoproteína B do HCMV e Níveis de Citocinas

Muitos estudos buscam uma correlação entre o genótipo da gB e a ocorrência de doença associada ao HCMV em pacientes imunocomprometidos (Coaquette et al., 2004; Pang et al., 2008; Manuel et al., 2009). Entretanto, permanece obscura a questão de que determinado genótipo da gB ou se múltiplos genótipos teriam associação com os níveis de produção de citocinas na infecção pelo HCMV.

A doença causada pelo HCMV pode envolver interações de múltiplos genes virais (Rasmussen et al., 2003). O conhecimento de marcadores genéticos poderá ser utilizado para prevenir a evolução de doença viral, pois cada HCMV isolado clinicamente apresenta uma identidade própria e pode conduzir a cursos diferentes para as infecções/reativações.

Avaliando a literatura apresentada e os trabalhos de investigação conduzidos pelo nosso grupo de pesquisa, nota-se a ausência de dados que

caracterizam o genótipo da gB do HCMV detectado na saliva e também não foi determinado, ainda, se há semelhança entre os genótipos da gB encontrado na saliva e no sangue ou se existe algum genótipo específico que configure um tropismo do HCMV para a cavidade bucal. Apesar das evidências que demonstram a associação entre a presença de genótipos específicos da gB com a evasão da resposta imune em pacientes submetidos ao TCTH, os dados sobre a presença destes polimorfismos virais na saliva de pacientes submetidos ao transplante de células tronco hematopoiéticas não foram avaliados. Finalmente, comparar as características genéticas do HCMV e níveis de citocinas no sangue e na saliva dos pacientes poderá estabelecer marcadores de prognóstico para os pacientes submetidos ao TCTH.

OBJETIVOS

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo Geral

Determinar a prevalência dos genótipos da glicoproteína B do citomegalovírus humano, sua relação com os níveis de citocinas e o impacto destes na sobrevida de pacientes submetidos ao transplante de células tronco hematopoiéticas alogênico.

3.2- Objetivos Específicos

1- Comparar a prevalência dos genótipos (gB1, gB2, gB3, gB4 e gB5) do HCMV na saliva com a do sangue de pacientes submetidos ao transplante alogênico de células tronco hematopoiéticas.

2- Avaliar a associação entre os níveis das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α em amostras de saliva e de sangue de pacientes submetidos ao transplante de células tronco hematopoiéticas alogênico com os genótipos da gB na saliva e no sangue.

3- Analisar o impacto da presença dos genótipos da gB do HCMV e da concentração das citocinas, determinadas no momento da detecção dos genótipos do vírus, na sobrevida dos pacientes submetidos ao alo-TCTH.

4- Investigar o impacto do nível das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α , no período de sete e vinte e um dias após o alo-TCTH, e da carga de HCMV nas amostras de saliva e de sangue, na sobrevida dos pacientes.

MATERAIS E MÉTODOS

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Aspectos Éticos

O projeto de pesquisa obedece ao que é exigido pela legislação brasileira, conforme as resoluções CNS nº 196/96 e 304/00 do Conselho Nacional de Saúde, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos. Esta proposta representa uma etapa previamente iniciada em 2006 e encontra-se aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (Parecer ETIC 097/06) e pela Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão (DEPE) do Hospital das Clínicas (HC) da UFMG (Parecer 040/06).

4.2- Pacientes e Amostras

Sessenta e três pacientes submetidos ao TCTH na Unidade de Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas da UFMG, no período de outubro de 2006 a outubro de 2008, foram incluídos no estudo. Os pacientes foram condicionados de acordo com o protocolo da Unidade de Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas da UFMG. Ciclosporina (CSA) combinado com Methotrexato (MTX) ou Micofenolato mofetil (MMF) foram usados como profilaxia de DECH e metilprednisona 2 mg/Kg combinado com CSA foram usados para o tratamento da DECH após o TCTH.

Os dados demográficos dos pacientes, bem como dados clínicos e laboratoriais foram revisados a partir dos prontuários do HC-UFMG. As informações clínicas dos pacientes submetidos ao alo-TCTH incluíram o tipo de doença primária, a fonte de células tronco, o gênero e a idade dos pacientes e

doadores, a sorologia para HCMV do doador e do paciente antes do transplante, o regime condicionante, a compatibilidade do HLA e os resultados dos exames de antigenemia.

Antigenemia foi mensurada pela quantificação de neutrófilos com marcação nuclear positiva para proteína pp65 em concentrado de 10^5 leucócitos sangüíneos, após o início da reconstituição neutrofílica (>500 neutrófilos/mm³). A terapia guiada anti-HCMV foi realizada de acordo com protocolo estabelecido pela Unidade de Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas do Hospital das Clínicas da UFMG. De acordo com este protocolo, terapia guiada inicia quando são detectadas, no mínimo, duas células pp65 positivas em 10^5 leucócitos sangüíneos de pacientes submetidos ao TCTH.

Os pacientes foram seguidos por um período de um ano após o alo-TCTH ou até o óbito. Foram coletadas amostras de sangue e de saliva de pacientes submetidos ao alo-TCTH no sétimo dia antes do transplante (dia -7), no dia do transplante (dia zero) e nas semanas subseqüentes até o paciente completar 100 dias de transplante (+7, +14, +21, +28, +35, +42, 49, +56, +63, +70, +77, +84, +91 e +100 dias após o TCTH).

Para realização de reações de PCR, foram coletadas amostras de saliva por meio de raspado da mucosa bucal com citobrush estéril. Em seguida, as amostras foram colocadas em um tubo de 1000 ul contendo 450 ul solução de Krebs, centrifugadas a 9300 g, em microcentrífuga (Eppendorf – 5415 D), por 10 minutos e o precipitado armazenado à -20°C até a extração de DNA. Para realização de reações de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), amostras de saliva foram coletadas com tubos SALIVETTE® (Sarstedt, Germany). A coleta da saliva é realizada facilmente colocando-se um rolinho de algodão na cavidade bucal do

paciente. Após 5 minutos o algodão é removido da cavidade bucal e colocado dentro do tubo Salivette®. A saliva é obtida por meio de centrifugação do tubo por 2 minutos a 1.000 g. Em seguida, a saliva é transferida para outro tubo e diluída (1:1) em solução de PBS (0.4 mM NaCl e 10 mM NaPO₄), contendo inibidores de proteases (0.1 mM PMSF, 0.1 mM cloreto de benzetônio, 10 mM EDTA e 0.01 mg/mL aprotinin A), e 0.05% tween-20. Após o processamento as amostras foram congeladas a -20 °C até a realização dos ensaios imunossorventes ligados a enzimas ou “Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay” (ELISA). Quatro mililitros de sangue foram coletados em tubo contendo EDTA e em seguida congelados a -20 °C. O DNA das amostras foi extraído com o uso do QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen 51106) de acordo com as instruções do fabricante. Logo após a extração, 2 µl de cada amostra foram diluídos em 98 µl água e usados para espectrometria. O restante das amostras foi estocado a -20 °C. Um total de 200 ng do DNA obtido de cada amostra foram usados para identificação do DNA do HCMV (Machida et al., 2000) através de PCR em tempo real. Quatro mililitros de sangue do paciente foram coletados em tubo sem anticoagulante e em seguida centrifugado por 10 minutos a 800g, logo após foi obtido o soro. O soro obtido foi distribuído em tubos de 1,5 ml e congelado a -20 °C até a realização das reações de ELISA.

4.3- PCR em Tempo Real

Amostras de saliva e de sangue de 30 pacientes transplantados de células tronco hematopoiéticas foram submetidas à quantificação do HCMV pela técnica de PCR em tempo real. Um total de 200 ng de DNA foram usados para reação de PCR em tempo real com pares de iniciadores do gene US17 do HCMV. As

reações de PCR foram realizadas com reagentes do Kit SYBR Green PCR Core Reagents da PE Biosystems (n° cat. 4304886; Warrington, UK), utilizando o termociclador ABI PRISM 7900 (PE Biosystems, Foster City, Calif). O resultado final da quantificação foi obtido a partir do cálculo da média das duplicatas realizadas para cada amostra. Os controles negativos para CMV foram realizados substituindo-se as amostras pelo mesmo volume de água na reação. Para controles positivos utilizamos DNA extraído da cultura de células AD169. Para confirmar a especificidade da reação em tempo real foi realizada, após cada reação, uma curva de dissociação como parte do programa estabelecido no ABI Prism 7900 (Correia-Silva et al., 2010).

4.4- Multiplex-nested-PCR para o gene UL55 (gB) do HCMV

Amostras de saliva e sangue de pacientes submetidos ao alo-TCTH, positivas para a antigenemia e/ou para o PCR em tempo real, foram submetidas à análise dos genótipos da gB do HCMV. Pacientes que não apresentaram nenhuma amostra positiva tanto para antigenemia quanto para o PCR em tempo real também tiveram as amostras, coletadas 21 dias após o transplante, examinadas quanto à presença dos genótipos da gB. Os genótipos da gB foram identificados por meio da técnica de multiplex-nested-PCR (Tarragó et al., 2003). Foram utilizados iniciadores “primers” descritos previamente por Tarragó et al. (2003) (Tabela 2). Um total de 200 ng do DNA extraído das amostras de saliva e de sangue foram adicionados a uma solução contendo 60 mM Tris (pH 8.5), 15 mM (NH₄)₂SO₄, 3 mM MgCl₂, 0,4 mM de dNTPs, 10 pm de cada primer CMVQ1+ e CMVQ1- e 2,5 U de Taq polimerase em um volume final de 50 µl. As

reações de PCR foram realizadas em 35 ciclos à 94°C por 30s, 60°C por 1 min e 72°C por 30s, utilizando o termociclador Gene Amp. PCR System 2400 (Applied Biosystems). Reações de multiplex-nested-PCR foram realizadas usando, 5 µl do produto final da primeira etapa da amplificação na segunda etapa da reação com os seguintes iniciadores internos: CMVGT1, CMVGT2, CMVGT3, CMVGT4, CMVGT5 e CMVQ2. As condições de termociclagem utilizadas na primeira etapa de amplificação foram as mesmas usadas na segunda etapa da amplificação, porém a temperatura de anelamento foi 60°C.

O produto amplificado foi analisado em gel de poliacrilamida 6,5% corado com solução de prata. O tamanho dos produtos é de 420, 613, 190, 465 e 139 pares de bases (pb) para a gB1, gB2, gB3, gB4 e gB5, respectivamente.

Tabela 2 – Primers (iniciadores) usados na primeira etapa da amplificação (iniciadores externos) e na segunda etapa da amplificação (iniciadores internos).

Iniciadores	Posição (nucleotídeos)	Seqüência (5'→3')
Externos		
CMVQ1+	868–885	TTTGGAGAAAACGCCGAC
CMVQ1-	1619–1597	CGCGCGGCAATCGGTTTGTGTA
Internos		
CMVGT1	1111–1130	ATGACCGCCACTTTCTTATC
CMVGT2	1074–1096	TTCCGACTTTGGAAGACCCAACG
CMVGT3	1341–1359	TAGCTCCGGTGTGAACTCC
CMVGT4	1057–1082	ACCATTGTTCCGAAGCCGAGGAGTCA
CMVGT5	307–325	TACCCTATCGCTGGAGAAC
CMVQ2-	1531–1513	GTTGATCCACRCACCAGGC

4.5- ELISA

As concentrações das citocinas IL-1β, IL-6, IL-10, IFN-γ e TNF-α nas amostras de sangue e de saliva foram determinadas pela técnica de sanduíche, descrita por Ondrey et al. (1999). As reações de ELISA foram realizadas com Kits

DuoSet (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) (Tabela 3) de acordo com as especificações do fabricante.

Tabela 3 – Kits empregados nas reações de ELISA para dosagem das citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α).

Citocinas	Kits
IL-1 β	Human IL-1 beta DuoSet (DY201)
IL-6	Human IL-6 DuoSet (DY206)
IL-10	Human IL-10 DuoSet (DY217B)
IFN- γ	Human IFN-gamma DuoSet (DY285)
TNF- α	Human TNF DuoSet (DY210)

Os níveis de detecção variaram de 3000-46 pg/ml para IL-1 β , de 600-9 pg/ml para IL-6, de 4000-62 pg/ml para IL-10, de 1000-15 pg/ml para IFN- γ e de 1000-15 pg/ml para TNF- α . Valores abaixo do limite de detecção foram considerados zero. As concentrações foram expressas em pg/ml para o sangue. A quantidade total de proteínas nas amostras de saliva foi mensurada por meio do método de Bradford (Bradford, 1976), usando reagente de Bradford (Sigma, Saint Louis, MO, USA) e curva padrão de BSA (Fermentas Life Sciences, Vilnius, Lithuania). As concentrações foram expressas em mg/ml. A concentração total de proteína em cada amostra de saliva foi usada para corrigir os seus respectivos níveis de citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF- α). Os valores das citocinas corrigidos pelo valor total de proteína nas amostras de saliva foram expressos em pg/mg de proteína.

4.6- Análise Estatística

Os dados foram armazenados em um banco de dados. A análise estatística foi realizada com ajuda do pacote estatístico SPSS versão 16.0. Para os desfechos dependentes de tempo foram geradas curvas atuariais de Kaplan Meier, comparadas a seguir pelo teste de Log Rank. Fatores prognósticos influenciando os desfechos em estudo foram inicialmente avaliados em modelos univariados e, no caso de valor de p menor que 25%, tais fatores foram avaliados através de análise multivariada, empregando modelos de regressão de Cox para as variáveis dependentes de tempo. Valores de $p \leq 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

RESULTADOS

5- RESULTADOS

5.1 Artigo 1

THE CYTOMEGALOVIRUS GLYCOPROTEIN B GENOTYPE AND ITS ASSOCIATION WITH CYTOKINE LEVELS ON OUTCOMES IN ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION

Jeane de Fátima Correia-Silva¹, Renata Gonçalves Resende¹, Telma Cristina Arão¹, Mauro Henrique Nogueira Guimarães Abreu², Mauro Martins Teixeira³, Henrique Bittencourt⁴, Tarcília Aparecida Silva¹, Ricardo Santiago Gomez¹

1 - Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

2 - Department of Community and Preventive Dentistry, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

3 - Department of Biochemical and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

4 - Hematopoietic Stem Cell Transplantation Unit, Department of Hematology, Hospital das Clínicas, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

Corresponding author: Prof. Ricardo Santiago Gomez, Departamento de Clínica Patologia e Cirurgia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brazil.

Telephone: +55 31 3409 2477

Fax: + 55 31 34092430

e-mail: rsgomez@ufmg.br

ABSTRACT

Background: Glycoprotein B (gB) may be important in human cytomegalovirus (HCMV) disease. The purpose of the present study was to assess the prevalence of gB genotypes in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) and investigate the possible relationship between them and cytokine levels in saliva and blood samples. **Methods:** Samples were obtained from 63 patients receiving an allo-HSCT. HCMV gB genotyping was carried out by multiplex nested PCR. The cytokine levels were assessed by ELISA assay. **Results:** A single or mixed genotype infection was detected in the saliva and blood of 36/63 and 52/63 subjects, respectively. Patients with gB2 in their saliva showed lower IL-10 levels in the saliva in comparison with patients without this genotype. Reduced blood levels of IFN- γ and IL-1 β were also found in recipients with the HCMV gB4 genotype compared to patients without it. Decreased IL-1 β and increased IL-10 blood levels were associated with lower survival. **Conclusions:** Although we have not observed association between HCMV gB genotypes on patient outcome, these genotypes affected cytokine levels in the saliva and blood.

Key words: Human cytomegalovirus, glycoprotein B, cytokines, allo-TCTH

INTRODUCTION

Human Cytomegalovirus (HCMV) disease remains an important cause of morbidity in immunocompromised patients, especially in allogeneic hematopoietic stem cell transplant (allo-HSCT) recipients [1]. HCMV is a member of the *betaherpesviridae* subfamily; it has the ability to establish lifelong persistence, latent infection following primary exposure [2] and alter cellular gene expression [3]. In addition, HCMV presents a characteristic salivary gland tropism of a prototype betaherpesvirus [4]. The large number of immunomodulatory functions encoded by HCMV could contribute to its virulence in immunosuppressed individuals. HCMV infection has an impact on transplant outcome by its effects on the cellular and humoral immune responses, including lymphocyte subpopulations and cytokines [5]. The mechanisms of viral pathogenesis are not well understood. The pathogenesis of HCMV infection has been related to an interrelation of viral factors and host immune responses [6]. The virulence of different HCMV strains may be an important factor in the occurrence of HCMV disease [7] due to genetic variation in genes that are involved in host cell penetration, tissue tropism, or replication [8], and polymorphism in the viral genome may play an important role [9].

HCMV glycoprotein B (gB) is the major envelope glycoprotein of HCMV, and it is encoded by the *UL55* gene [10]. HCMV gB has been associated with host cell entry, cell-to-cell virus transmission, and fusion of infected cells [9, 11]. HCMV gB is highly immunogenic in humans and is an important target of both humoral and cellular immune responses [10].

Based on sequence variation in the UL55 gene, which encodes glycoprotein B (gB), HCMV can be classified into five gB genotypes (gB1, gB2, gB3, gB4 and gB5) [12-13]. The gB genotypes may be associated with different clinical manifestations or organ tropism [14]. Patients with mixed-genotype infections present significantly higher HCMV viral loads than those with single-genotype infections [6]. Coinfection of HCMV with multiple gB genotypes could be a critical factor leading to severe clinical symptoms in immunocompromised patients, such as HSCT subjects [7]. Glycoprotein B (gB) is very important in viral infectivity and in eliciting a protective immune response in patients with HCMV infection [15]. The immunological components important for the control of HCMV are not completely understood.

During HCMV disease, several cytokines, chemokines, and adhesion molecules are expressed to recruit inflammatory cells for infection control [5]. The deregulation of cytokine production seems to be involved in graft rejection and tissue damage in allo-HSCT [16]. In addition, previous studies have indicated that interleukin concentrations may serve as a clinical parameter of the severity of HCMV infection [17].

Studies have attempted to find a correlation between the gB genotype and the occurrence of HCMV-associated disease in immunocompromised patients [6]. However, it remains unclear whether certain gB genotypes or mixed gB genotypes are associated with distinct levels of cytokine production in HCMV infection. Salivary glands harbour latent HCMV infection, and evidence suggests that immunosuppression is related to its reactivation. Therefore, a study of the presence and the frequency of gB HCMV genotypes in saliva and its relationship with saliva cytokines concentrations can clarify the HCMV-regulated immune

responses and its impact on allo-HSCT patients' survival. The aims of the present study were to assess the prevalence of the gB genotypes in saliva and blood of patients who underwent allo-HSCT and to investigate a possible relationship between these genotypes and IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ and TNF- α levels. In addition, we also evaluated the impact of gB genotype and cytokine production on patients' survival.

METHODS

Patients and Samples

Sixty-three allo-HSCT recipients at Hospital das Clínicas of Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFGM) between October 2006 and October 2008 were eligible for and included in this study. Patients were conditioned for allo-HSCT according to specific protocols from the Stem Cell Transplant Unit at HC-UFGM, which varied according to the type and status of disease at the time of transplant. Cyclosporin (CSA) in combination with Methotrexate (MTX) or Mycophenolate mofetil (MMF) was used for graft versus host disease (GVHD) prophylaxis, and Methylprednisolone (2 mg/kg) was used for GVHD treatment. Patient demographics as well as clinical and laboratory data were available through the database of HC-UFGM. Clinical information included underlying primary disease, source of stem cells, gender and age of the patient and donor, recipient and donor HCMV serostatus before transplant, conditioning regimen, HLA matching and HCMV reactivation (tested by pp65 antigenemia).

Patients were followed until 100 days (day +100) after allo-HSCT. Samples collection were available previously submitted to HCMV analysis by real time PCR

(26) and/or pp65 antigenemia assay. Samples that showed HCMV positive first time were used for gB HCMV genotypes identification and cytokines detection. We attempted to obtain saliva and blood samples simultaneously from each allo-HSCT recipient (median of 35 days; range 15-100 days) for use in PCR and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). For the PCR test, the oral fluid was collected on swabs [18] from the normal oral mucosa of subjects using a sterile citobrush (Kolplast Ltda, Brazil), placed immediately in 500 μ L of Krebs buffer, and then stored at -20°C until processing. For the ELISA assay, oral fluid was collected on Salivette neutral cotton swabs (Sarstedt, Germany). Salivette neutral cotton swabs were placed between the cheek and the gum or under the tongue until they were saturated with oral fluid. The cotton swab was sometimes chewed to stimulate oral fluid production. After collection, the swab was centrifuged to release the oral fluid. Subsequently, the oral fluid was transferred to tubes and diluted (1:1) in PBS (0.4 mM NaCl and 10 mM NaPO₄) containing protease inhibitors (0.1 mM PMSF, 0.1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA and 0.01 mg/mL aprotinin A), and 0.05% Tween-20, and frozen at -20 °C until analysis. Four ml of peripheral blood was collected in an EDTA tube for the PCR assay and stored at -20°C until processing. Four ml of peripheral blood was collected in anticoagulant-free tubes and centrifuged for 10 min at 800 g after being allowed to clot at room temperature for 30 min. The recovered serum was stored in aliquots at -20°C until cytokine quantification.

DNA Extraction

Total genomic DNA was extracted from saliva and whole-blood samples using a QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, USA) and was stored at -20°C until use.

Two hundred nanograms of extracted DNA were used for HCMV gB multiplex nested PCR.

Multiplex nested PCR (M-nPCR)

gB genotypes of HCMV were determined by multiplex nested PCR, using primers published elsewhere [14]. PCR was performed in an ABI Master Cycler (Applied Biosystems, USA). As a positive control for gB2, a DNA sample from the HCMV AD169 strain was used. Negative controls contained reagents only. gB genotypes were determined by comparison of bands with size standards after electrophoresis in a 6.5% polyacrylamide gel and silver staining. The expected band sizes were 420, 613, 190, 465 and 139 bp for HCMV gB1, gB2, gB3, gB4 and gB5, respectively.

ELISA

The concentrations of IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ and TNF- α in saliva and blood were determined using commercially available quantitative sandwich enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kits (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturer's instructions. The detection ranges were 3000-46 pg/ml for IL-1 β , 600-9 pg/ml for IL-6, 4000-62 pg/ml for IL-10, 1000-15 pg/ml for IFN- γ and 1000-15 pg/ml for TNF- α . Values below the detection limits were assumed to be zero. Concentrations were expressed as pg/mL for blood. Total protein in the saliva samples was measured using the Bradford method (Sigma, Saint Louis, MO, USA) compared to the BSA standard (Fermentas Life Sciences, Vilnius, Lithuania), and concentrations were expressed in mg/ml. Total protein concentration was used to correct saliva cytokine (IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ

and TNF- α) values for each sample. Saliva sample values corrected for total proteins were expressed in pg/mg protein.

Statistical analysis

Univariate analyses were performed using the Mann-Whitney and Kruskal–Wallis tests. Time from transplant until death was displayed using the mean of the Kaplan–Meier method, and results were initially compared by the log-rank test. Variables showing $p < 0.25$ were included in a multivariate Cox proportional hazards model analysis. The records of each patient were reviewed 12 months after allo-HSCT to evaluate survival. Statistical analyses were performed using SPSS software (SPSS Inc., version 16.0, Chicago, IL), and a p value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

The demographic characteristics of the 63 allo-HSCT patients are summarised in Table 1. A single or mixed genotype infection was detected in the saliva and blood of 36 and 52 subjects, respectively. The gB5 genotype was not detected in any of the samples. gB2 was the most common genotype in the saliva (19/36) and blood (33/52) samples. A single-genotype infection with gB1, gB2, gB3 or gB4 in the saliva was detected in 2/63 (3.0%), 11/63 (17.0%), 6/63 (9.5%), and 1/63 (1.5%) of the samples, respectively. A mixed-genotype infection was detected in 16/63 (25.4%) saliva samples. Of these 16 mixed-genotype infections, 12 (19%) were dual gB genotype infections, 3 (4.5%) were three genotype infections and 1 (1.5%) showed four genotype infections. A single-genotype

infection with gB1, gB2, gB3 or gB4 in the blood was detected in 1/63 (1.5%), 14/63 (22.2%), 5/63 (7.9%), and 3/63 (4.5%) of the samples, respectively. A mixed genotype infection was detected in 29/63 (46.0%) of blood samples. Of these 29 mixed-genotype infections, 20 (31.7%) were dual gB genotype infections and 9 (14%) presented three simultaneous genotype infections. Evaluating only samples with the presence of the gB genotype, infection with a mixed HCMV gB genotype was more often detected in blood (29/52 - 55.7%) than in saliva (16/36 - 44.4%) (Table 2).

Table 3 shows cytokine levels in saliva and blood along with the presence or absence of HCMV gB genotypes. Patients with the HCMV gB2 genotype in the saliva (n=16) showed lower IL-10 saliva levels compared to patients without this genotype (n=32) ($p=0.02$). IFN- γ and IL-1 β levels in the blood of patients with the HCMV gB4 genotype (n=18) were significantly lower than in individuals without this genotype (n=45/ $p=0.04$ and n=43/ $p=0.05$, respectively). There was no difference on IL-1 β , IL-6, IFN- γ or TNF- α levels among patients who were gB negative, who had one gB genotype, or who had the simultaneous presence of two, three or four gB genotypes (data not shown). However, patients with one or more than one gB genotype (n=26) showed decreased levels of IL-10 in the saliva compared to recipients without the gB genotype (n=22) ($p=0.02$) (data not shown).

Thirty-eight patients were alive one year after allo-HSCT. The median survival was 365 (range 17-365) days after allo-HSCT. Survival according to gB genotype and cytokine level are shown in Table 4. In univariate analysis, gB genotypes showed no effect on patients' survival. Only the IL-1 β blood level was associated with survival rate one year after allo-HSCT in univariate analysis ($p=0.009$). Multivariate analysis showed a reduced risk of death for patients with

higher IL-1 β blood levels (HR: 0.207; 95% CI 0.072–0.590; $p= 0.003$) and an increased risk of death for patients with higher IL-10 blood levels (HR: 2.813; 95% CI 1.117–7.086; $p=0.03$) (Fig. 1).

DISCUSSION

Because of its interaction with the immune system, the gene encoding gB has been detected as a highly polymorphic locus that can be clustered in different genotypes in clinical isolates [12-13,19]. Previous reports suggested that HCMV gB genotypes are a determinant for viral virulence and pathogenesis [6, 20].

Virulence among HCMV strains could differ due to genetic variation in the gene UL55 that codifies glycoprotein B, which is implicated in host cell penetration, tissue tropism, and replication and is a target for both the humoral and the cellular immune response [8,15]. In AIDS patients, several studies showed predominance of the gB2 genotype [21]. Studies with renal transplant patients and with other solid-organ transplant recipients showed that HCMV gB1 is the most frequent common genotype identified [20,22]. In HSCT recipients, gB3 was found less frequently than gB1 and gB2 [23]. However, another study found that gB type 2 virus was less frequent than gB type 3 [24]. Differences in genotype frequencies may be due to variation in geographical distribution of HCMV genotypes in immunocompromised patients [7,25]. According to Vogelberg et al. [23], HCMV types are possibly selected during the process of virus isolation. Another possible explanation for gB genotype prevalence could be due to HCMV cell or tissue tropism given that studies had used different source of cells or tissues such as blood, bronchoalveolar lavage, biopsies, swabs and urine [21-22,23]. In the

present study, gB2 was the predominant genotype in the saliva and blood of allo-HSCT patients. The same prevalence of gB2 genotype could be due to a similar kinetics of HCMV infection observed in saliva and in blood [26]. However, infection with a mixed HCMV gB genotype was detected more often in blood than in saliva. Therefore, in transplant recipients, HCMV infection may be caused by a variety of gB genotypes, including the patient's latent virus, as well as donor-acquired strains of HCMV [6]. HCMV in saliva samples may represent the patient's own pre-transplant latent virus, while the gB genotypes in blood samples may also be a latent virus reactivation experienced by the donor. However, further studies are necessary to confirm such assumptions. Despite a higher correlation between HCMV load in saliva and in blood samples of allo-HSCT recipients, the viral load in saliva tended to be lower than that in blood [26]. A higher HCMV level and delayed viral clearance has been associated with mixed gB HCMV genotype infections [6,20]. In addition, it has been suggested that infection with mixed genotypes increases the risk of progression to HCMV disease [7,14]. However, our data do not support the hypothesis that a specific genotype or mixed genotypes have an impact on an allo-HSCT patient's survival.

Immune mechanisms involved in protection from HCMV reactivation or reinfection are complex and are far from being fully understood [15]. HCMV might cause different immunological changes in immune function during and after recovery from viral infection. HCMV may modulate immunological status of host cells by altering expression of cellular genes coding for pro-inflammatory proteins and inducing local production of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1, IL-6 and IL-8 [27-28]. HCMV disease in solid organ transplant patients has been associated with increase of anti-inflammatory cytokine (IL-10) release [29-31].

Patients with the HCMV gB2 genotype in saliva samples showed lower IL-10 levels in saliva in comparison with patients without this genotype. In line with these findings, the reduced levels of the IL-10 may be associated with an effective cell-mediated immunity to HCMV in patients with the gB2 genotype [32]. It is interesting to note that patients with the gB2 genotype died of infections associated with neutropenia less frequently when compared to subjects with the HCMV gB4 genotype [33].

Patients positive for the HCMV gB4 genotype in the blood had reduced levels of circulating IFN- γ and IL-1B in comparison with patients without the gB4 genotype. Previously study indicated that HCMV genotypes types 3 and 4 are capable of escaping immune recognition in the marrow and therefore persist to cause more damage. In keeping with this, our earlier report suggested that the HCMV gB4 genotype elicits lower levels of protective immune responses mediated by IFN- γ and IL1- β [33]. In accordance with these findings, low levels of IL-1 β in the blood correlates with increased risk of death for allo-HSCT patients. Human peripheral blood monocytes infected with HCMV display a rapid but sustained level of IL-1 β expression that is measured in days [34]. Also its was reported that reduced levels of IFN- γ is involved with reduced cell-mediated immunity to HCMV and development of viral infection [32].

IL-10 is produced by multiple cell types, including T and B cells, monocytes, macrophages, and keratinocytes [35]. IL-10 has been known for its potent anti-inflammatory effect and for its contribution to the immunosuppressive properties of HCMV [31]. We observed that IL-10 levels in saliva specimens were significantly higher in patients without the gB2 genotype than in recipients with this genotype. In addition, IL-10 levels in saliva specimens were significantly higher in patients

without the gB genotype than in recipients with one or more distinct genotypes present. These results suggest that the presence of one or more different genotypes could also be associated with increased inflammatory immune response. In multivariate analysis, we observed that decreased IL-1 β and increased IL-10 levels in the blood decrease survival of allo-HSCT patients. Recently, an association between decreased pro-inflammatory cytokines and increased anti-inflammatory cytokines with reduced cell-mediated immunity to HCMV has been demonstrated [32]. Our study gives further strength to the theory that the imbalance of inflammatory response is not desirable for allo-HSCT patients.

In conclusion, the HCMV gB2 genotype is the most prevalent gB HCMV genotype in saliva and blood samples of patients who underwent allo-HSCT. Although we have not observed association between HCMV gB genotypes on patient outcome, these genotypes affected cytokine levels in the saliva and blood.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported in part by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil. RS Gomez, MM Teixeira and TA Silva are research fellows of CNPq. We thank Daniele Ramalho da Silva for technical assistance. Potential conflicts of interest: The authors declare that they no conflict of interest.

REFERENCES

- 1-Alice T, Cerutti F, Pittaluga F, Varetto S, Franchello A, Salizzoni M, Ghisetti V. (2008). Evaluation of a novel real-time PCR system for cytomegalovirus DNA quantitation on whole blood and correlation with pp65-antigen test in guiding pre-emptive antiviral treatment. *J Virol Methods*.148:9-16.
- 2-Nichols WG, Boeckh M. (2000). Recent advances in the therapy and prevention of CMV infections. *J Clin Virol*.16:25-40.
- 3-Simmen KA, Singh J, Luukkonen BG, Lopper M, Bittner A, Miller NE, Jackson MR, Compton T, Früh K. (2001). Global modulation of cellular transcription by human cytomegalovirus is initiated by viral glycoprotein B. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98:7140-5.
- 4-Morcarski ES Jr. (2002). Immunomodulation by cytomegaloviruses: manipulative strategies beyond evasion. *Trends Microbiol*.10:332-9.
- 5-Nordøy I, Müller F, Nordal KP, Rollag H, Lien E, Aukrust P, Froland SS. (2000). The role of the tumor necrosis factor system and interleukin-10 during cytomegalovirus infection in renal transplant recipients. *J Infect Dis*.181:51-7.
- 6-Pang X, Humar A, Preiksaitis JK. (2008). Concurrent genotyping and quantitation of cytomegalovirus gB genotypes in solid-organ-transplant recipients by use of a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol*.46:4004-10.
- 7-Coaquette A, Bourgeois A, Dirand C, Varin A, Chen W, Herbein G. (2004) Mixed cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis*.39:155-61.
- 8-Halary F, Amara A, Lortat-Jacob H, Messerle M, Delaunay T, Houllès C, Fieschi F, Arenzana-Seisdedos F, Moreau JF, Déchanet-Merville J. (2002) Human

cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity*.17:653–64.

9-Yu ZS, Zou CC, Zheng JY, Zhao ZY. (2006) Cytomegalovirus gB genotype and clinical features in Chinese infants with congenital infections. *Intervirol*.49:281-5.

10-Rasmussen L, Geissler A, Winters M. (2003) Inter- and intragenic variations complicate the molecular epidemiology of human cytomegalovirus. *J Infect Dis*. 187:809-19.

11-Navarro D, Paz P, Tugizov S, Topp K, La Vail J, Pereira L. (1993) Glycoprotein B of human cytomegalovirus promotes virion penetration into cells, transmission of infection from cell to cell, and fusion of infected cells. *Virology*.197:143-58.

12-Chou SW, Dennison KM. (1991) Analysis of interstrain variation in cytomegalovirus glycoprotein B sequences encoding neutralization-related epitopes. *J Infect Dis*. 163:1229-34.

13-Shepp DH, Match ME, Lipson SM, Pergolizzi RG. (1998) A fifth human cytomegalovirus glycoprotein B genotype. *Res Virol*.149:109-14.

14-Tarragó D, Quereda C, Tenorio A. (2003) Different cytomegalovirus glycoprotein B genotype distribution in serum and cerebrospinal fluid specimens determined by a novel multiplex nested PCR. *J Clin Microbiol*.41:2872-7.

15-Ludwig B, Kraus FB, Kipp M, Preiser W, Schwerdtfeger R, Doerr HW, Buxbaum S. (2006) Cytomegalovirus-specific CD4 T-cell and glycoprotein B specific antibody response in recipients of allogenic stem cell transplantation. *J Clin Virol*.35:160-6.

16- Ferrà C, de Sanjosé S, Gallardo D, Berlanga JJ, Rueda F, Marín D, de la Banda E, Ancín I, Peris J, García J, Grañena A. (1998) IL-6 and IL-8 levels in

plasma during hematopoietic progenitor transplantation. *Haematologica*.83:1082-7.

17- Zedtwitz-Liebenstein K, Jaksch P, Burgmann H, Friehs H, Hofbauer R, Schellongowski P, Frass M. (2009) Evaluation of interleukin-6 and interleukin-10 in lung transplant patients with human cytomegalovirus infection. *Clin Transplant*.23:687-91.

18- Correia-Silva J F, Victória JM, Guimarães AL, Salomão UE, de Abreu MH, Bittencourt H, Gomez RS. (2007) Cytomegalovirus shedding in the oral cavity of allogeneic haematopoietic stem cell transplant patients. *Oral Dis*.13:163-9.

19- Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, Lembo D. (2003) The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther*.98:269-97.

20- Manuel O, Asberg A, Pang X, Rollag H, Emery VC, Preiksaitis JK, Kumar D, Pescovitz MD, Bignamini AA, Hartmann A, Jardine AG, Humar A. (2009) Impact of genetic polymorphisms in cytomegalovirus glycoprotein B on outcomes in solid-organ transplant recipients with cytomegalovirus disease. *Clin Infect Dis*.49:1160-6.

21-Meyer-König U, Haberland M, von Laer D, Haller O, Hufert FT. (1998) Intragenic variability of human cytomegalovirus glycoprotein B in clinical strains. *J Infect Dis*.177:1162-9.

22-Nogueira E, Ozaki KS, Tomiyama H, Câmara NO, Granato CF. (2009) Clinical correlations of human cytomegalovirus strains and viral load in kidney transplant recipients. *Int Immunopharmacol*.9:26-31.

23-Vogelberg C, Meyer-König U, Hufert FT, Kirste G, von Laer D. (1996) Human cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in renal transplant recipients. *J Med Virol*.50:31-4.

24-Fries BC, Chou S, Boeckh M, Torok-Storb B. (1994) Frequency distribution of cytomegalovirus envelope glycoprotein genotypes in bone marrow transplant recipients. *J Infect Dis.*169:769-74.

25- Zipeto D, Hong C, Gerna G, Zavattoni M, Katzenstein D, Merigan TC, Rasmussen L. (1998) Geographic and demographic differences in the frequency of human cytomegalovirus gB genotypes 1-4 in immunocompromised patients. *AIDS Res Hum Retroviruses.*14:533-536.

26- Correia-Silva JF, Bruna-Romero O, Resende RG, Miranda LPM, Oliveira FE, Costa FO, Xavier SG, Figueiredo-Neves SP, Almeida HC, Bittencourt H, Gomez RS. (2010) Saliva as a source of HCMV DNA in allogeneic stem cell transplantation patients *Oral Diseases.*16: 210-6.

27-Cinatl J, Vogel JU, Kotchetkov R, Scholz M, Doerr HW. (1999) Proinflammatory potential of cytomegalovirus infection. *Intervirology.*42:419-24.

28- Nickel P, Bold G, Presber F, Biti D, Babel N, Kreutzer S, Pratschke J, Schönemann C, Kern F, Volk HD, Reinke P. (2009) High levels of CMV-IE-1-specific memory T cells are associated with less alloimmunity and improved renal allograft function. *Transpl Immunol.*20:238-42.

29- Jayaraman S, Heiligenhaus A, Rodriguez A, Soukiasian S, Dorf ME, Foster CS. (1993) Exacerbation of murine herpes simplex virus-mediated keratitis by Th2 type T cells. *J. Immunol.*151: 5777-89.

30- Cervera C, Filella X, Linares L, Pineda M, Esteva C, Antón A, Marcos MA, Cofán F, Navasa M, Pérez-Villa F, Pumarola T, Moreno A. (2007) TH1/TH2 cytokine release pattern during in vivo cytomegalovirus disease in solid organ transplantation. *Transplant Proc.*39:2233-5.

- 31- Sadeghi M, Süsal C, Daniel V, Naujokat C, Zimmermann R, Huth-Kühne A, Opelz G. (2007) Short communication: decreasing soluble CD30 and increasing IFN-gamma plasma levels are indicators of effective highly active antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses*.23:886-90.
- 32-Essa S, Pacsa A, Raghupathy R, Said T, Nampoory MR, Johny KV, Al-Nakib W. (2009) Low levels of Th1-type cytokines and increased levels of Th2-type cytokines in kidney transplant recipients with active cytomegalovirus infection. *Transplant Proc*.41:1643-7.
- 33-Torok-Storb B, Boeckh M, Hoy C, Leisenring W, Myerson D, Gooley T. (1997) Association of specific cytomegalovirus genotypes with death from myelosuppression after marrow transplantation. *Blood*.90:2097-102.
- 34- Listman JA, Race JE, Walker-Kopp N, Unlu S, Auron PE. (2008) Inhibition of IL-1beta transcription by peptides derived from the hCMV IE2 transactivator. *Mol Immunol*.;45:2667-77.
- 35-Spits H, de Waal Malefyt R. (1992) Functional characterization of human IL-10. *Int Arch Allergy Immunol*.99:8-15.
- 36- Sadeghi M, Süsal C, Daniel V, Naujokat C, Zimmermann R, Huth-Kühne A, Opelz G. (2007) Short communication: decreasing soluble CD30 and increasing IFN-gamma plasma levels are indicators of effective highly active antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses*.23:886-90.

TABLES

Table 1 – Demographic characteristics of the sixty-three allo-HSCT patients.

Parameters	Total (n=63)
Median age in years (range)	30 (05-56)
Recipient /Donor gender	
-Male / Male	16 (25.4%)
-Female / Female	17 (27.0%)
-Male / Female	11 (17.5%)
-Female / Male	18 (28.6%)
-NA	1 (1.6%)
Recipient gender	
-Male	35 (55.6%)
-Female	28 (44.4%)
Donor gender	
-Male	33 (52.4%)
-Female	29 (46.0%)
-NA	1 (1.6%)
Primary disease	
- Malignant	42 (66.7%)
- Non-Malignant	21 (33.3%)
Stem cell source	
-Blood stem cell	26 (41.3%)
-Bone Marrow	37 (58.7%)
HLA matching	
-matched related	53 (84.1%)
-mismatched unrelated	5 (7.9%)
-matched unrelated	5 (7.9%)
HCMV serology status recipient/donor	
- Positive / Positive	50 (79.4%)
- Positive / Negative	8 (12.7%)
- Negative / Positive	2 (3.2%)
- Negative / Negative	3 (4.8%)
pp65 antigenemia	
- Positive	40 (63.5%)
- Negative	19 (30.1%)
- NA	4 (6,41%)

(HLA) Human leukocyte antigen. NA: Data not available.

Table 2 - Comparison of HCMV gB genotypes prevalence in saliva and blood samples of allo-TCTH.

Genotype Classification	Genotype(s) determined	No. of patients genotyped	
		Saliva	Blood
1	gB1	2	1
2	gB2	11	14
3	gB3	6	5
4	gB4	1	3
5	gB1+gB2	1	6
6	gB1+gB3	1	1
7	gB1+gB4	5	8
8	gB2+gB3	2	3
9	gB2+gB4	2	2
10	gB3+gB4	1	0
11	gB1+gB2+gB3	1	5
12	gB1+gB2+gB4	1	3
13	gB1+gB3+gB4	1	1
14	gB2+gB3+gB4	0	0
15	gB1+gB2+gB3+gB4	1	0
	Total	36	52

Table 3- Cytokine levels according to HCMV gB genotypes in saliva and blood samples of allo-HSCT patients.

		gB1			gB2			gB3			gB4			
		Absence	Presence	p value †	Absence	Presence	p value †	Absence	Presence	p value †	Absence	Presence	P value †	
Saliva (pg/mg protein)	IFN- γ	N	28	8	0.070	25	11	0.565	31	5	0.163	29	7	0.505
		Median	5	0		2	0		0	0		0	0	
		Range	0-717	0-8		0-609	0-717		0-717	0-11		0-717	0-164	
	IL1- β	N	33	10	0.107	31	12	0.947	37	6	0.262	35	8	0.592
		Median	9	29		11	10		10	33		10	14	
		Range	0-296	0-143		0-296	0-148		0-296	0-148		0-297	0-144	
	IL-6	N	35	11	0.722	33	13	0.278	39	7	0.590	37	9	0.207
		Median	1	3		1	23		2	0		1	24	
		Range	0-646	0-244		0-646	0-560		0-646	0-560		0-646	0-244	
	IL-10	N	37	11	0.235	32	16	0.023*	41	7	0.422	39	9	0.603
		Median	64	19		104	18		64	43		64	20	
		Range	0-558	0-324		0-558	0-80		0-558	0-324		0-558	0-324	
	TNF- α	N	36	11	0.641	34	13	0.264	40	7	0.354	38	9	0.989
		Median	0	0		0	0		0	0		0	0	
		Range	0-111	0-20		0-111	0-44		0-111	0-2		0-111	0-21	
Blood (pg/ml)	IFN- γ	N	38	25	0.227	30	33	0.479	48	15	0.340	45	18	0.040*
		Median	109	9		42	110		86	2		107	0	
		Range	0-1507	0-2063		0-1507	0-2063		0-2063	0-1458		0-2063	0-937	
	IL1- β	N	36	25	0.547	29	32	1.000	46	15	0.712	43	18	0.050*
		Median	19	11		15	18		17	15		24	8	
		Range	0-77	0-102		0-77	0-102		0-59	0-102		0-102	0-48	
	IL-6	N	37	24	0.266	30	31	0.223	46	15	0.699	43	18	0.436
		Median	31	18		31	18		31	18		18	43	
		Range	0-4193	0-2016		0-4193	0-1821		0-4193	0-856		0-4193	0-2016	
	IL-10	N	36	24	0.737	28	32	0.841	45	15	0.831	43	17	0.289
		Median	0	0		0	0		0	0		0	0	
		Range	0-5954	0-934		0-5954	0-1352		0-1352	0-5954		0-5954	0-362	
	TNF- α	N	37	25	0.238	30	32	0.904	47	15	0.993	44	18	0.167
		Median	138	83		100	145		107	102		161	92	
		Range	0-1364	0-862		0-1364	0-862		0-1364	0-1244		0-1364	337	

† Mann-Whitney test

* Significance values

Table 4- Survival according to gB genotype and cytokine levels in saliva and blood as determined by uni- and multivariate analysis.

Saliva			Blood		
Parameters	Univariate P value	Multivariate - HR (95% CI) and P value	Parameters	Univariate P value	Multivariate - HR (95% CI) and P value
gB genotypes			gB genotypes		
-gB1 absence	0,37		-gB1 absence	0.06	
-gB1 presence			-gB1 presence		
-gB2 absence	0.78		-gB2 absence	0.92	
-gB2 presence			-gB2 presence		
-gB3 absence	0.44		-gB3 absence	0.21	
-gB3 presence			-gB3 presence		
-gB4 absence	0.82		-gB4 absence	0.06	
-gB4 presence			-gB4 presence		
gB genotypes number			gB genotypes number		
-absence	0.78		-absence	0.55	
-one or more genotypes			-one or more genotypes		
gB genotypes number			gB genotypes number		
-absence	0.73		-absence	0.25	
-one genotype			-one genotype		
- multiple genotypes			- multiple genotypes		
IFN-γ			IFN-γ		
- 0 [†] (pg/mg protein)	0.14		- $\leq 55^{\dagger}$ (pg/ml)	0.26	
- >0 [†] (pg/mg protein)			- >55 [†] (pg/ml)		
IL-1 β			IL-1 β		
- $\leq 10^{\dagger}$ (pg/mg protein)	0.75		- $\leq 16^{\dagger}$ (pg/ml)	0.009*	0.207 (0.072–0.590) p= 0.003*
- >10 [†] (pg/mg protein)			- >16 [†] (pg/ml)		
IL-6			IL-6		
- $\leq 1^{\dagger}$ (pg/mg protein)	0.41		- $\leq 28^{\dagger}$ (pg/ml)	0.41	
- >1 [†] (pg/mg protein)			- >28 [†] (pg/ml)		
IL-10			IL-10		
- $\leq 58^{\dagger}$ (pg/mg protein)	0.26		- 0 [†] (pg/ml)	0.07*	2.81 (1.12–7.09) p=0.03*
- >58 [†] (pg/mg protein)			- >0 [†] (pg/ml)		
TNF- α			TNF- α		
- 0 [†] (pg/mg protein)	0.69		- $\leq 107^{\dagger}$ (pg/ml)	0.81	
- >0 [†] (pg/mg protein)			- >107 [†] (pg/ml)		

[†]Median cytokines levels

* Significance values

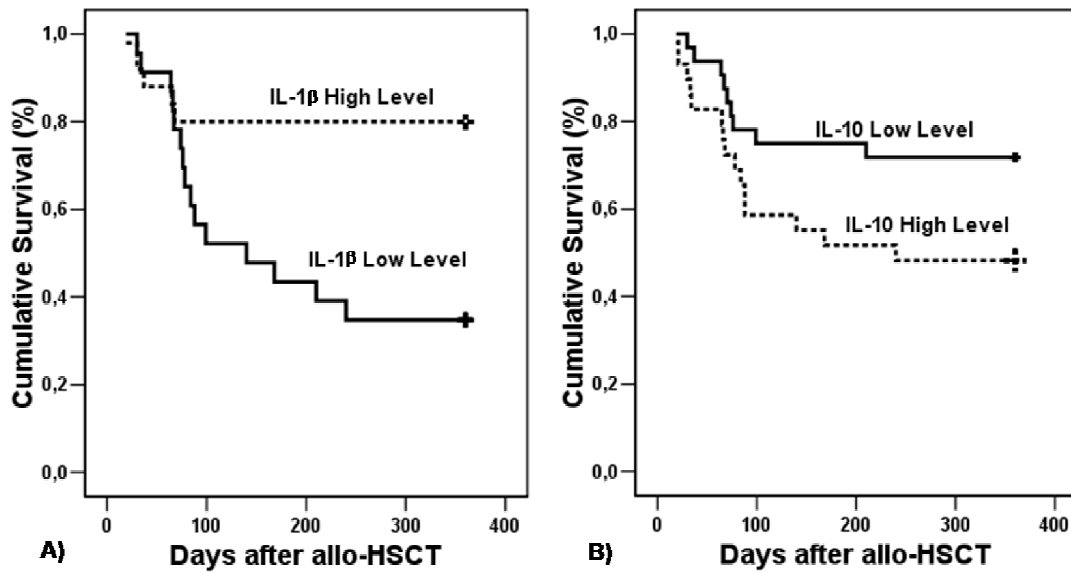


Figure 1- One-year Overall Survival According to IL-1 β and IL-10 blood levels. Kaplan-Meier estimate of overall survival after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation (allo-HSCT). A) IL-1 β levels in blood (High level - >16 mg/ml; Low level - \leq 16 mg/ml). B) IL-10 levels in blood (High level >0 mg/ml; Low level = 0 mg/ml).

5.2 Artigo 2

IMPACT OF CYTOKINE LEVELS AND HUMAN CYTOMEGALOVIRUS LOAD IN ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION SURVIVAL

Short Title: CYTOKINES AND HCMV IN ALLO-HSCT SURVIVAL

J F Correia-Silva¹, R G Resende¹, M H N G Abreu², A L Teixeira³, M.M. Teixeira⁴, H Bittencourt⁵, R S Gomez¹, T A Silva^{1*}

¹Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. ²Department of Community and Preventive Dentistry, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil. ³ Department of Clinical Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais, Faculty of Medicine Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. ⁴Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. ⁵Hematopoietic Stem Cell Transplantation Unit, Department of Hematology, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

*Corresponding author: Prof. Tarcilia Aparecida Silva, Departamento de Clínica Patologia e Cirurgia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brazil. Telephone: +55 31 3409 2478; Fax: +55 31 34092430. E-mail: tarcilia@ufmg.br

ABSTRACT

Human cytomegalovirus (HCMV) load, recipient/donor histocompatibility, patient/donor gender, recipient age, graft-versus-host disease (GVHD) and cytokine levels have been considered to be important risk factors in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT). The purpose of this study was to investigate the impact of IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ and TNF- α levels and HCMV load in the saliva and blood on the survival of allo-HSCT recipients. Saliva and blood samples were obtained from 63 patients 7 days before and 21 days after allo-HSCT. Cytokines levels were assessed by ELISA, and HCMV load was determined by real-time PCR. Risk factors for recipient survival were estimated before and after transplantation using univariate and multivariate Cox proportional hazard regression models. Survival curves were estimated using the Kaplan-Meier method. Of the 63 patients, 38 (60%) remained alive 12 months after allo-HSCT. Recipient gender, patient/donor gender, stem cell source and aGVHD affected allo-HSCT survival. High levels of IL-6 in the saliva and low levels of IFN- γ in the blood before allo-HSCT were associated with increased risk of death. High levels of IL-6 in the blood and high HCMV load in the saliva after allo-HSCT were associated with decreased recipient survival. Increased IL-6 levels and HCMV load in the saliva and increased IL-6 levels and decreased IFN- γ levels in the blood were associated with the worst prognosis. Further studies are necessary to investigate the function of salivary IL-6 and other factors as potential biomarkers of allo-HSCT survival.

KEY WORDS: Allogeneic HSCT, Cytokines, HCMV

INTRODUCTION

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) is performed for a range of disorders, including hematological malignancy, severe aplastic anemia and genetic diseases [1]. The attractive aspect of this therapeutic strategy is the development of a potent donor T-cell-mediated immune responses that can eliminate malignant cells, which has traditionally been termed the graft versus leukemia (GVL) effect [2]. Although allo-HSCT provides the only curative therapy for many patients with malignant and non-malignant diseases, it is also associated with a high incidence of treatment-related morbidity and mortality [3].

Allo-HSCT recipients, generally, present three disturbance levels in the first weeks after allo-HSCT. These disturbances can potentially stimulate a massive release of inflammatory cytokines [4]. First, baseline circulating inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin (IL)-1 could be increased as a result of disease, therapy, comorbidities or ongoing infections that occur before allo-HSCT. Second, immediately after allo-HSCT, the immune dysfunction caused by the conditioning regimen, which may produce tissue injury and consequently the production of inflammatory cytokines, may affect the reconstitution of white blood cells. Third, after allo-HSCT, activated, mature donor T cells can set off a cytokine response that in turn stimulates host T-cell responses related to the onset of acute graft-versus-host disease (aGVHD) [4-5]. Immune dysfunction following allo-HSCT involves activated T cells secreting interferon (IFN)- γ , as well as other cytokines, which activate monocytes and dendritic cells. This process appears to be associated with the induction of aGVHD, resulting in significant morbidity and mortality. In addition, a prolonged immune deficiency can

occur, which is characterized by lymphopenia and susceptibility to infection [3]. The deregulation of inflammatory cytokines is also associated with multiple symptoms (pain, sleep disturbance, and depression) during neutropenia after allo-HSCT [4].

Human cytomegalovirus (HCMV) infection remains one of the most important causes of morbidity and mortality in allo-HSCT recipients [6-7]. Infection by HCMV may not only result in HCMV disease but is also associated with other adverse effects due to its immunomodulatory effects, which might result in an increased risk of bacterial, fungal and viral infections and also of aGVHD [8].

Allo-HSCT outcomes could be affected by factors such as HCMV infection, recipient/donor histocompatibility, patient/donor gender, recipient age, GVHD and cytokine production [9-10]. The purpose of this study was to investigate the impact of cytokine levels (IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ and TNF- α) and HCMV load in the saliva and blood before and after allo-HSCT on recipient survival.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Samples

Sixty-three allo-HSCT recipients were included in this study. The patients were conditioned for allo-HSCT according to the protocols of the Stem Cell Transplant Unit at Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Minas Gerais (HC-UFMG), which vary according to type and status of the disease. Cyclosporine (CSA) in combination with either methotrexate (MTX) or mycophenolate mofetil (MMF) was used for GVHD prophylaxis, and methylprednisolone in combination with CSA was used for GVHD treatment. Antigenemia assay was routinely used for preemptive ganciclovir treatment of HCMV infection.

Demographic information, as well as clinical and laboratory data, were available through the database of the HC-UFMG. This clinical information includes the underlying disease, the source of stem cells, the gender and age of the patient, the gender of the donor, the HCMV serostatus of the donor and recipient before transplantation, conditioning regimes, Human leukocyte antigen (HLA) matching and pp65 antigenemia status.

Patients were followed until one year after allo-HSCT or until the death of the recipient. Saliva and blood samples were simultaneously obtained from each of the 63 recipients 7 days before and 21 days after HSCT.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Saliva and blood from 63 patients submitted to allo-HSCT were collected for quantification of cytokines by ELISA. Oral fluid was collected using Salivette® neutral cotton swabs (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). Recovery of the saliva was achieved by centrifuging the container at 1500 rpm for 10 minutes. Saliva samples were diluted (1:1) in PBS (0.4 mM NaCl and 10 mM NaPO₄) containing protease inhibitors (0.1 mM PMSF, 0.1 mM benzethonium chloride, 10 mM EDTA and 0.01 mg/mL aprotinin A) and 0.05% Tween-20 and frozen at -20°C until analysis. Four milliliters of peripheral blood was collected in anticoagulant-free tubes and centrifuged at room temperature for 30 min. The recovered serum was stored in small aliquots at -20°C until the cytokines were quantified. Concentrations of IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ and TNF- α in the saliva and blood were determined using commercially available quantitative sandwich ELISA kits (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), according to the manufacturers' instructions. The detection ranges were 3000-46 pg/ml for IL-1 β , 600-9 pg/ml for IL-6, 4000-62

pg/ml for IL-10, 1000-15 pg/ml for IFN- γ and 1000-15 pg/ml for TNF- α . Values below the detection limits were assumed to be zero. Concentrations were expressed as pg/mL for blood. The total protein in the saliva samples was measured using the Bradford method according to the BSA standard (Fermentas Life Sciences, Vilnius, Lithuania), and concentrations were expressed as mg/ml. Total protein concentration was used to correct the saliva cytokines values for each sample. The saliva samples values corrected by the total protein values were expressed in pg/mg protein.

Real-time PCR

The saliva and blood of the first 30 patients enrolled in this study were collected for real-time PCR assays. Oral fluid was collected by swab as previously described [6]. Four milliliters of peripheral blood was collected in an EDTA tube for the PCR assay and stored at -20°C until processing. Total genomic DNA was extracted from saliva and whole-blood samples using a QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, USA) and stored at -20°C until use. Two hundred nanograms of extracted DNA was used for HCMV real-time PCR. The HCMV-specific PCR primers used in the assay were selected from the US17 region of HCMV AD169 [11]. Quantification of HCMV DNA was performed using SYBR Green PCR Core Reagents (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). PCR was performed in an ABI Prism 7900 instrument (PE Applied Biosystems) using 96-well plates. The mean value of the duplicates was used in calculations of HCMV DNA.

Statistical analysis

Time to decease after allo-HSCT was displayed using the Kaplan-Meier method. The results of the Kaplan-Meier plots were initially compared using the log-rank test. Based on p values lower than 0.25 or if clinically relevant, variables

were included in the Cox proportional hazards model. Survival time after HSCT was calculated until the last follow-up or death. Statistical analyses were performed using SPSS software (SPSS Inc., version 16.0, Chicago, IL), and p values ≤ 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Demographic Data

Allo-HSCT recipients were followed from 7 days until one year after allo-HSCT or until the death of recipient. The survival median of the patients after allo-HSCT was 360 days (range 17-360). Of 63 allo-HSCT recipients, 38 (60%) remained alive one year after HSCT. Patients and transplant characteristics, conditioning therapy, aGVHD, and survival univariate analyses are shown in Table 1.

The average age of the patients studied was 30 years (range 5-56). Of the 63 patients, 35 (55%) were men. Compared to female recipients, male recipients demonstrated an increased risk of death after allo-HSCT (hazard ratio (HR): 4.271; 95% CI = 1.599-11.407, $p= 0.004$) (Fig. 1A). Transplantation for a male donor to a female recipient was associated with a reduced risk of death after allo-HSCT (HR: 0.665; 95% CI = 0.469-0.943, $p= 0.022$) (Fig. 1B). We also observed a higher incidence of death after HSCT in patients receiving to peripheral blood stem cell (PBSC) a source of hematopoietic stem cells for transplant (17/26; 65%) (HR: 3.842; 95% CI = 1.653-8.933, $p=0.002$) (Fig. 1C) and in patients developing systemic aGVHD (HR: 2.660; 95% CI = 1.168-6.055, $p=0.020$) (Fig. 1D).

Cytokine Levels

IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ and TNF- α levels in the saliva and blood of 63 allo-HSCT recipients were determined before and after allo-HSCT. The influence of

cytokine levels before (7 days) and after (21 days) allo-HSCT on the patients' survival was investigated and is shown in Table 2.

Deceased allo-HSCT recipients presented higher IL-6 levels in their saliva before allo-HSCT in comparison with surviving patients. Blood IL-6 levels before transplantation were also higher in patients who died compared to patients who survived, but this difference was not statistically significant. Significantly increased levels of IL-6 in the blood after allo-HSCT were observed in recipients who died relative to those who survived (HR = 1.001; 95% CI = 1.000-1.001, $p=0.003$) (Table 2).

Reduced IFN- γ levels in the blood before allo-HSCT also affected patient survival (HR = 1.000; 95% CI = 1.000-1.001, $p=0.015$). The median level of IFN- γ in deceased recipients was lower than that of living recipients (Table 2).

Human cytomegalovirus (HCMV)

The results of the analysis of the impact of the HCMV load detected by real-time PCR in the saliva and blood on survival after allo-HSCT are shown in Table 3.

Univariate analysis showed that deceased recipients had a higher HCMV load in their saliva after HSCT (HCMV load median, 1.9 copies/200 ng DNA; range, 0-902) relative to living recipients (HCMV load median, 0 copy/200 ng DNA; range, 0-32) (HR = 1.004; 95% CI = 1.000-1.007, $p=0.023$) (Table 3).

Multivariate Analysis

The multivariate analysis demonstrated a significant association between stem cell source, IL-6 levels in the saliva before allo-HSCT, blood IFN- γ levels before allo-HSCT, blood IL-6 levels after allo-HSCT, and patient survival. There is

an increased risk of death for patients receiving a PBSC transplantation (HR: 6.117; 95% CI 1.926–19.433; $p=0.002$), for patients with higher IL-6 levels in their saliva before allo-HSCT (HR: 1.003; 95% CI 1.000-1.005; $p=0.035$), for patients with low IFN- γ levels in their blood before allo-HSCT (HR: 1.000; 95% CI 1.000-1.001; $p=0.015$) and for patients with high IL-6 levels in their blood 21 days after allo-HSCT (HR: 1.000; 95% CI 1.000-1.001; $p=0.024$).

DISCUSSION

Previous studies have shown that recipient and/or donor gender can affect recipient survival [12-13]. In this study, male patients demonstrated an increased risk of death after allo-HSCT relative to female patients. In addition, a male donor with a female recipient was associated with reduced risk of death after allo-HSCT. In agreement with the European Group for Blood and Marrow Transplantation, male recipients with female donors presented the worst outcome after HSCT relative to all other donor-recipient gender combinations [13]. In another study, female donors were associated with an increased risk of patient death [14].

We found that the survival rates of allo-HSCT recipients was also influenced by the source of hematopoietic stem cell and was higher for BM in comparison to PBSC transplantation. We also observed that the presence of aGVHD was associated with an increased risk of death after allo-HSCT. PBSC transplantation is associated with faster blood cell and immunity recoveries. However, PBSC transplantation has also been found to be associated with increased acute GVHD incidence and severity [9]. GVHD is a complication classically associated with morbidity and mortality after HSCT [15].

Cytokines are an important part of saliva and regulate oral cavity homeostasis. Altered salivary levels of cytokines have been found in patients with various diseases and may reflect oral and/or systemic conditions [16]. Deceased allo-HSCT recipients presented higher IL-6 levels in saliva before allo-HSCT in comparison with surviving patients. The multivariate analysis also demonstrated an increased risk of death for patients with high IL-6 levels in their saliva before allo-HSCT. Salivary IL-6 is an important inflammatory mediator involved in the response to localized mucosal inflammation and has been shown to be positively associated with oral chronic GVHD severity, ulceration and erythema [17]. The increased IL-6 levels could imply an increased risk of developing oral complications, such as xerostomia and mucositis, which cause significant morbidity and potential mortality for patients undergoing allo-HSCT [18]. Further studies are necessary to investigate the function of salivary IL-6 as a potential biomarker of allo-HSCT survival.

We observed increased levels of IL-6 in the blood after allo-HSCT of patients who died in comparison with patients who survived. This result suggests that IL-6 levels in the blood have a significant impact on the survival of allo-HSCT patients. In accordance with previous reports, recipients with functional single-nucleotide polymorphisms in the promoter region of the IL-6 gene produced high serum levels of IL-6 and presented decreased survival rates after allo-HSCT [19]. IL-6 is a pleiotropic cytokine implicated in both innate and acquired immune responses and is an important pro-inflammatory mediator in immune-mediated complications of allo-HSCT [19-20]. IL-6 also plays multiple roles during the subsequent development of acquired immunity against incoming pathogens, including regulation of cytokine and chemokine gene expression [20]. Previous

results suggested that IL-6 seemed to be the most important cytokine during the initial phase of the inflammatory process, as it was the earliest cytokine to increase in expression in the first week after HSCT [21]. In response to conditioning and stem cell infusion, serum levels of IL-6 increased during the initial 30 days after allo-HSCT (the acute phase), and recipients with early complications presented higher IL-6 levels during the first week after transplantation [4, 21]. The inflammatory effects of IL-6 have also been implicated in the failure of organs in allo-HSCT recipients [22]. Moreover, an overproduction of IL-6 during GVHD course has also been observed [23].

Reduced IFN- γ levels in the blood before allo-HSCT also affected patient survival. IFN- γ is a potent proinflammatory cytokine produced by CD4 T cell subset 1 (Th1) cells, cytolytic CD8 effector T cells and NK cells and plays important and complex roles in both innate and adaptive immune responses [24-25]. A previous study suggested that IFN- γ plays a role in T cell homeostasis by regulating T cell expansion and survival and activation-induced cell death [26]. IFN- γ also acts in anti-microbial responses, antigen processing, inflammation, growth suppression, cell death, tumor immunity and autoimmunity [25]. Thus, a deficiency in IFN- γ production may increase the hosts' susceptibility to the development of infections and tumors [24-25]. Reduced IFN- γ levels could be deleterious for patients after allo-HSCT, as this cytokine may facilitate graft-versus-leukemic (GVL) effects and even inhibit GVHD by donor CD4 T cells [24,27]. For these reasons, reduced IFN- γ levels in the blood before allo-HSCT showed negative association on recipient survival.

Patients with a high HCMV load in the saliva after allo-HSCT presented an increased risk of death. Previous studies have shown that high HCMV loads are a risk factor for the development of HCMV disease and are also associated with poor survival in infected patients [28]. It has also been reported that immunosuppression related to allo-HSCT affects HCMV reactivation in the oral cavity [6-7]. Furthermore, studies suggest that GVHD and HCMV replication are pathogenetically associated. HCMV may influence the development of GVHD, and GVHD and its treatment may put patients at risk for HCMV replication [29]. HCMV infection affects allograft outcome by effecting cellular and humoral responses, including cytokine production [30]. HCMV replication in renal transplant recipients is associated with increased IL-6 and decreased IFN- γ levels [30-31]. HCMV DNA levels detected by real-time PCR represent a precise method for determining viral load kinetics, which is useful for predicting HCMV disease [32]. A previous study showed that the HCMV load in the saliva detected by real-time PCR had similar kinetics compared with blood. Moreover, this study also indicated that saliva can be a useful source for real-time PCR for the monitoring and diagnosis of HCMV disease in patients submitted to HSCT [7].

In summary, these findings suggest a potential function of these biomarkers in the determination of allo-HSCT survival. Further studies are necessary to investigate the function of salivary IL-6 as a potential biomarker of allo-HSCT survival and its possible association with salivary HCMV load.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported in part by grants from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and from the Conselho Nacional

de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil. TA Silva, MM Teixeira, AL Teixeira and RS Gomez are research fellows of CNPq.

REFERENCES

- 1- Martin PJ, Counts GW Jr, Appelbaum FR, et al. Life expectancy in patients surviving more than 5 years after hematopoietic cell transplantation. *J Clin Oncol.* 2010; 28:1011-1016.
- 2- Kolb HJ. Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood.* 2008;112:4371-4383.
- 3- Talmadge JE. Hematopoietic stem cell graft manipulation as a mechanism of immunotherapy. *Int Immunopharmacol.* 2003;3:1121-1143.
- 4- Wang ZY, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood.* 2008;111:2505-2515.
- 5- Basara N, Kiehl MG, Fauser AA. New therapeutic modalities in the treatment of graft-versus-host disease. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2001;38:129-138.
- 6- Correia-Silva J F, Victória JM, Guimarães AL, et al. Cytomegalovirus shedding in the oral cavity of allogeneic haematopoietic stem cell transplant patients. *Oral Dis.* 2007;13:163-169.
- 7- Correia-Silva JF, Bruna-Romero O, Resende RG, et al. Saliva as a source of HCMV DNA in allogeneic stem cell transplantation patients. *Oral Diseases.* 2010;16:210–216.
- 8- Behrendt CE, Rosenthal J, Bolotin E, Nakamura R, Zaia J, Forman SJ. Donor and recipient CMV serostatus and outcome of pediatric allogeneic HSCT for acute leukemia in the era of CMV-preemptive therapy. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2009;15:54-60.
- 9-Bittencourt H, Lopes M, de Macedo AV, et al. A retrospective comparison of allogeneic peripheral blood stem cell versus bone marrow transplantation. *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 2009; 2:272-277.

- 10- Terwey TH, Hemmati PG, Martus P, et al. A modified EBMT risk score and the hematopoietic cell transplantation-specific comorbidity index for pre-transplant risk assessment in adult acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2010;95:810-818.
- 11- Machida U, Kami M, Fukui T, et al. Real-time automated PCR for early diagnosis and monitoring of cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation. *J. Clin. Microbiol.* 2000;38:2536–2542.
- 12- De Souza CA, Vigorito AC, Ruiz MA, et al. Validation of the EBMT risk score in chronic myeloid leukemia in Brazil and allogeneic transplant outcome. *Haematologica*. 2005;90:232-237.
- 13- Gratwohl A, Stern M, Brand R, et al.; European Group for Blood and Marrow Transplantation and the European Leukemia Net. Risk score for outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective analysis. *Cancer*. 2009;115:4715-4726.
- 14- Souza LN, Carneiro MA, de Azevedo WM, Gomez RS. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and chronic graft-versus-host disease (cGVHD) in salivary glands of bone marrow transplant (BMT) recipients. *J Oral Pathol Med*. 2004;33:13-16.
- 15- Mielcarek M, Storer BE, Boeckh M, et al. Initial therapy of acute graft-versus-host disease with low-dose prednisone does not compromise patient outcomes. *Blood*. 2009;113:2888-2894.
- 16- Boras VV, Lukac J, Brailo V, Picek P, Kordić D, Zilić IA. Salivary interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in patients with recurrent aphthous ulceration. *J Oral Pathol Med*. 2006;35:241-243.

- 17- Fall-Dickson JM, Mitchell SA, Marden S, et al.; NIH Chronic GVHD Study Group. Oral Symptom Intensity, Health-Related Quality of Life, and Correlative Salivary Cytokines in Adult Survivors of Hematopoietic Stem Cell Transplantation with Oral Chronic Graft-Versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010. Original Article Epub ahead of print.
- 18- Bogusławska-Kapala A, Cackowska-Lass A, Balon J, Hellmann A, Kochańska B. Saliva secretion and abnormal moistening of oral mucosa after bone marrow transplantation. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol*. 2006;47:1-5.
- 19- Ambruzova Z, Mrazek F, Raida L, et al.. Association of IL-6 gene polymorphism with the outcome of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation in Czech patients. *Int J Immunogenet*. 2008;35:401-403.
- 20- Zedtwitz-Liebenstein K, Jaksch P, Burgmann H, et al. Evaluation of interleukin-6 and interleukin-10 in lung transplant patients with human cytomegalovirus infection. *Clin Transplant*. 2009;23:687-691.
- 21- Min CK, Lee WY, Min DJ, et al. The kinetics of circulating cytokines including IL-6, TNF-alpha, IL-8 and IL-10 following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2001;28:935-940.
- 22- Ogata M, Satou T, Kawano R, et al. Correlations of HHV-6 viral load and plasma IL-6 concentration with HHV-6 encephalitis in allogeneic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2010;45:129-136.
- 23- Chen X, Das R, Komorowski R, et al.. Blockade of interleukin-6 signaling augments regulatory T-cell reconstitution and attenuates the severity of graft-versus-host disease. *Blood*. 2009;114:891-900.
- 24- Yang YG, Wang H, Asavaroengchai W, Dey BR. Role of Interferon-gamma in GVHD and GVL. *Cell Mol Immunol*. 2005;2:323-329.

- 25- Saha B, Jyothi Prasanna S, Chandrasekar B, Nandi D. Gene modulation and immunoregulatory roles of interferon gamma. *Cytokine*. 2010; 50:1-14.
- 26- Refaeli Y, Van Parijs L, Alexander SI, Abbas AK. Interferon gamma is required for activation-induced death of T lymphocytes. *J Exp Med*. 2002;196:999-1005.
- 27- Welniak LA, Blazar BR, Anver MR, Wiltrot RH, Murphy WJ. Opposing roles of interferon-gamma on CD4+ T cell-mediated graft-versus-host disease: effects of conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2000;6:604-612.
- 28- Kim ST, Lee MH, Kim SY, et al. A randomized trial of preemptive therapy for prevention of cytomegalovirus disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol*. 2010. Original Article Epub ahead of print.
- 29- Cantoni N, Hirsch HH, Khanna N, et al. Evidence for a bidirectional relationship between cytomegalovirus replication and acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010. Original Article Epub ahead of print.
- 30- Sadeghi M, Süsal C, Daniel V, et al. Short communication: decreasing soluble CD30 and increasing IFN-gamma plasma levels are indicators of effective highly active antiretroviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2007;23:886-890.
- 31- Essa S, Pacsa A, Raghupathy R, et al. Low levels of Th1-type cytokines and increased levels of Th2-type cytokines in kidney transplant recipients with active cytomegalovirus infection. *Transplant Proc*. 2009;41:1643-1647.
- 32- Allice T, Cerutti F, Pittaluga F, et al. Evaluation of a novel real-time PCR system for cytomegalovirus DNA quantitation on whole blood and correlation with pp65-antigen test in guiding pre-emptive antiviral treatment. *J Virol Methods*. 2008;148:9-16.

Table 1- Baseline characteristics of patients and survival univariate analysis.

Parameters	Total (n=63)	Deceased (n=25)	Alive (n=38)	p-value	HR (95% CI)
Age of patient (years)					
-Median (Years)	30 (05-56)	29 (11 -54)	31 (05 -56)	0.711	0.994 (0.965-1.025)
Recipient gender					
-Male	35	20	15	0.004*	0.234 (0.088-0.625)
-Female	28	5	23		
Donor gender					
-Male	33	10	23	0.231	1.642 (0.729-3.701)
-Female	29	14	15		
-NA	1				
Recipient/Donor gender					
-Male/Male	16	8	8	0.022*	0.665 (0.469-0.943)
-Female/Female	17	9	8		
-Male/Female	11	5	6		
-Female/Male	18	2	16		
-NA	1	1	0		
Primary disease					
- Malignant	42	19	23	0.347	1.554 (0.620-3.894)
- Non-malignant	21	06	15		
Stem cell source					
-Blood Stem Cell	26	17	09	0.002*	3.842 (1.653-8.933)
-Bone Marrow	37	08	29		
HLA matching					
-Matched Related	53	20	33	0.446	1.269 (0.687-2.242)
-Mismatch Unrelated	5	2	2		
-Matched Unrelated	5	3	3		
Clinical systemic aGVHD					
-Absent	36	9	27	0.016*	2.750 (1.208-6.263)
-Present	27	16	11		
pp65 antigenemia					
-Negative	19	5	14	0.778	0.889 (0.393-2.013)
-Positive	40	16	24		
-NA	4	4	0		
HCMV serology (patient/donor)					
-Positive/Positive	50	21	29	0.534	0.773 (0.344-1.738)
-Positive/Negative	8	3	5		
-Negative/Positive	2	0	2		
-Negative/Negative	3	1	2		
Conditioning regimen					
-BU/CY	20	8	12	0.067	1.241 (0.895-1.563)
-CY±ATG or Alemtuzumab	12	1	11		
-BU+FLU±Alemtuzumab	11	4	7		
-CY+FLU±Alemtuzumab	7	3	4		
-MEL+FLU±Campath	9	6	3		
-Others ^c	4	3	1		

BU: busulfan, CY: cyclophosphamide, FLU: fludarabine, MEL: melphalan, ATG: antithymoglobulins; ^c BU/MEL (n=2); cytarabine/campath/FLUD (n=1). * Significant

Table 2- Survival according to cytokine levels in the saliva and blood before and after HSCT– Univariate analysis:

		Before HSCT				After HSCT			
Saliva (pg/mg protein)		Deceased (n=25)	Alive (n=38)	p-value	HR (95% CI)	Deceased (n=25)	Alive (n=38)	P-value	HR (95% CI)
IFN-γ	Patients (n)	15	26	0.278	1.001 (1.000-1.001)	8	24	0.459	0.998 (0.992-1.004)
	Median (Range)	10 (0-2716)	15 (0-469)			0 (0 -341)	0 (0-688)		
IL-1 β	Patients (n)	15	26	0.375	0.992 (0.973-1.010)	8	23	0.430	0.991 (0.969-1.014)
	Median (Range)	5 (0-140)	15 (0-413)			17 (0- 47)	19 (0-290714)		
IL-6	Patients (n)	17	26	0.045*	1.003 (1.000-1.006)	9	24	0.968	1.000 (0.990-1.009)
	Median (Range)	21 (0-645)	1 (0-331)			22 (0- 120)	1 (0-326)		
IL-10	Patients (n)	16	26	0.083	1.000 (1.000-1.001)	8	24	0.353	0.997 (0.990-1.004)
	Median (Range)	28 (0 -7529)	23 (0-559)			64 (0- 117)	44 (0-1246)		
TNF- α	Patients (n)	16	26	0.074	1.002 (1.000-1.004)	8	24	0.480	1.010 (0.982-1.038)
	Median (Range)	0 (0-794)	0 (0-63)			0 (0- 95)	0 (0-49)		
Blood (pg/ml)		Deceased (n=25)	Alive (n=38)	p-value	HR (95% CI)	Deceased (n=25)	Alive (n=38)	P-value	HR (95% CI)
IFN-γ	Patients (n)	20	29	0.015*	1.000 (1.000-1.001)	20	28	0.695	1.000 (1.000-1.001)
	Median (Range)	0 (0- 7740)	41 (0-1309)			4 (0- 5473)	76 (0-4494)		
IL-1 β	Patients (n)	20	28	0.064	1.000 (1.000-1.001)	20	28	0.412	0.992 (0.974-1.011)
	Median (Range)	6 (0- 7113)	33 (0-126)			5 (0- 144)	25 (0-120)		
IL-6	Patients (n)	19	30	0.088	1.000 (1.000-1.001)	20	29	0.003*	1.001 (1.000-1.001)
	Median (Range)	37 (0- 4239)	19 (0-2467)			250 (0- 4386)	19 (0-611)		
IL-10	Patients (n)	20	27	0.126	1.000 (1.000-1.001)	19	27	0.267	1.000 (1.000-1.001)
	Median (Range)	0 (0-7265)	0 (0-3835)			128 (0-5297)	16 (0-3322)		
TNF- α	Patients (n)	19	29	0.484	1.000 (1.000-1.001)	19	27	0.139	1.001 (1.000-1.002)
	Median (Range)	103 (0- 2520)	92 (0-2296)			148 (0- 1555)	146 (0-849)		

* Significant

Table 3- Survival according to HCMV load by real-time PCR – Univariate analysis

Parameters	Before HSCT					After HSCT				
	Total (n=63)	Deceased (n=25)	Alive (n=38)	p-value	HR (95% CI)	Total (n=63)	Deceased (n=25)	Alive (n=38)	p-value	HR (95% CI)
HCMV by real-time PCR										
Saliva										
Patients number	27	13	14	0.478	0.831 (0.498-1.386)	26	14	12	0.023*	1.004 (1.000-1.007)
Median (Range)	0 (0-328)	0 (0-2)	0 (0-328)			0.7 (0-902)	1.9 (0-902)	0(0-32)		
Blood										
Patients number	25	12	13	0.546	0.759 (0.309-1.861)	24	11	13	0.909	1.000 (0.992-1.009)
Median (Range)	0 (0-18)	0.2 (0-1.7)	0 (0-18)			0 (0-275)	0(0-275)	0.53 (0-196)		

* Significant

FIGURE

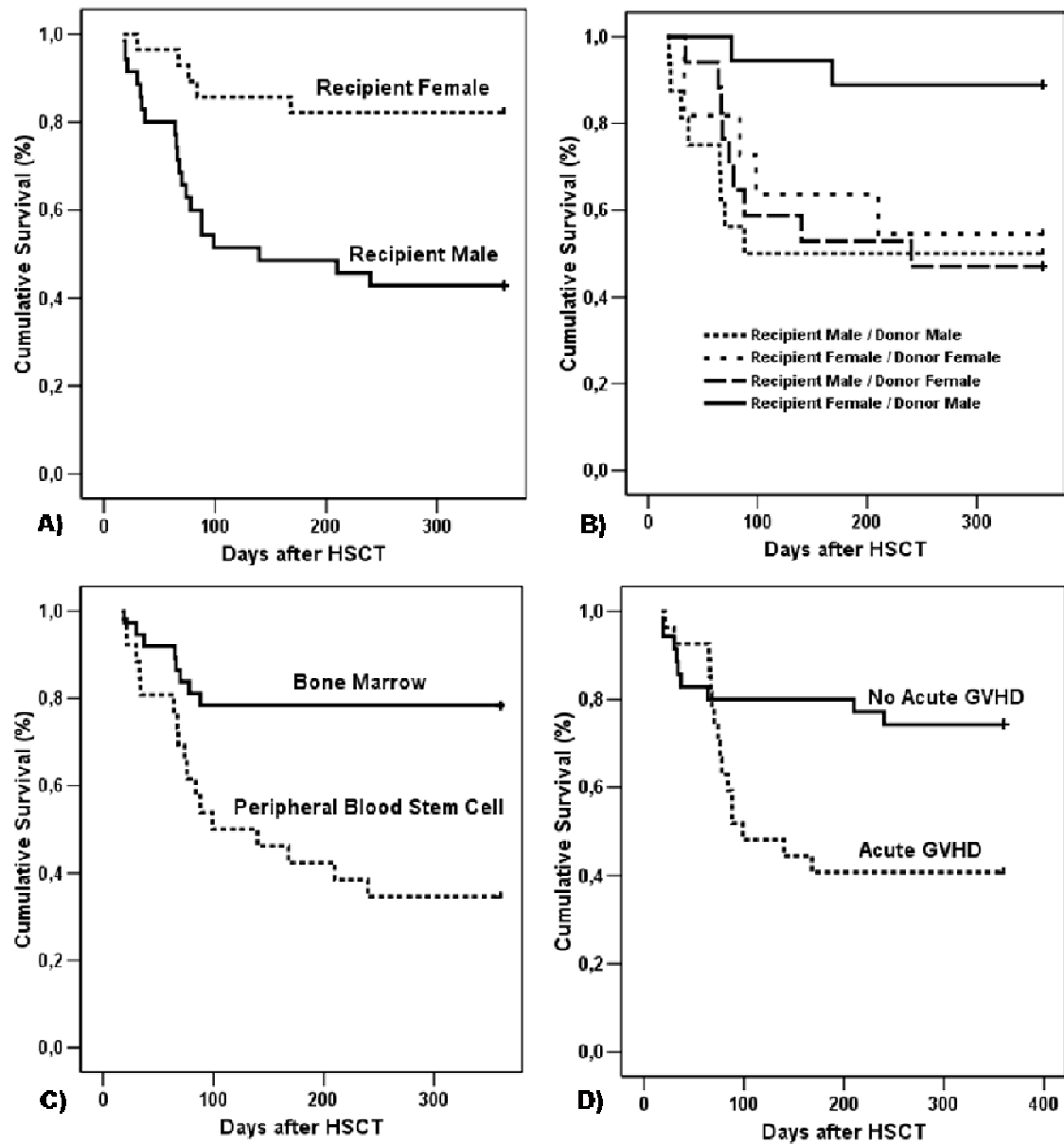


Figure 1 - Kaplan-Meier estimates of overall survival after allo-HSCT. A) Recipient gender. B) Recipient/Donor gender. C) Stem cell source. D) Acute GVHD.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

6- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na cavidade bucal são encontrados 3 tipos de fluidos, a saliva, o fluido crevicular gengival (FCG) e o transudato de mucosa. A saliva total é constituída por esses três tipos de fluidos (Streckfus & Bigler, 2002). Na saliva total pode ser encontrado os seguintes constituintes: água, proteínas, eletrólitos, moléculas orgânicas secretadas pelas glândulas salivares, microrganismos, células epiteliais descamadas e fatores extrínsecos. A saliva pode ser usada para monitoramento de diversos parâmetros do estado de saúde e de doenças, dentre eles podemos incluir o nível de substâncias como cortisol e uma grande variedade de moléculas introduzidas no organismo por métodos terapêuticos como níveis hormonais. A análise da saliva também possibilita avaliar o estado nutricional, metabólico, microbiológico e imunológico dos pacientes (Streckfus & Bigler, 2002; Wong, 2006). Uma das principais razões para o uso da saliva como meio de diagnóstico é facilidade da coleta da amostra, por ser um método não invasivo (Wong, 2006). Entretanto, apresenta suas limitações como todo método de diagnóstico. Pacientes que apresentem redução do fluxo salivar podem dificultar a coleta da amostra e comprometer a realização do teste para diagnóstico (Alborghetti et al., 2005). Em pacientes submetidos ao TCTH, a saliva também pode apresentar contaminação com o sangue, como por exemplo, em indivíduos com DECH bucal devido à presença ulcerações bucais (Schubert & Correa, 2008). Além disso, a saliva está sujeita a alterações relacionadas ao ciclo circadiano, estímulos gustatórios, tipo de regime condicionante para o TCTH e idade do paciente (Dahlöf et al., 1997; Tornhage et al., 2006).

Todas as regiões da mucosa bucal são caracterizadas pela elevada vascularização e permeabilidade. A permeabilidade elevada da mucosa bucal promove o contato freqüente de antígenos potencialmente prejudiciais e antígenos inofensivos com células imunológicas locais. As células imunes locais asseguram o contínuo reconhecimento de antígenos, impedindo a entrada de microorganismos patogênicos. Tecidos mucosos, de modo geral, apresentam uma rede imune especializada composta de sítios indutores e efetores. Na mucosa bucal, as células dendríticas do epitélio reconheçam os antígenos, amadurecem e migram para lâmina basal, nos agregados linfóides bucais ou para órgãos linfóides regionais, como as amígdalas, para apresentar os antígenos às células T e induzir uma resposta efetora (Novak et al., 2008).

Células da mucosa bucal como as células epiteliais e fibroblastos expressam uma variedade de receptores e produzem diversas substâncias regulatórias imune, como citocinas quimiocinas, proteases, mediadores químicos e ativam o sistema imunológico do hospedeiro por meio da interação direta ou indireta com células imunes (Sugawara, 2005). As células epiteliais da mucosa bucal produzem uma variedade de citocinas, como IFN- γ e quimiocinas em resposta a microrganismos (Rouabhia et al., 2002; Steele & Fidel, 2002).

Lesões bucais causadas pelo HCMV não foram diagnosticadas nos pacientes submetidos ao alo-TCTH neste estudo, apesar da presença de DNA do vírus na saliva desses pacientes. Em um relato de cinco casos clínicos foi descrito a ocorrência de ulcerações na mucosa bucal de pacientes que se submeteram ao TCTH e a associação com infecção causada pelo HCMV (Lloid et al., 1994). Em outros três casos clínicos descritos na literatura, foram observadas manifestações bucais de doença por HCMV em pacientes imunocomprometidos. Nesses

pacientes foram encontrados a presença do HCMV em células endoteliais da cavidade bucal (Myerson et al. 1984; Kanas et al., 1987; Heinic et al., 1993). O epitélio ductal de glândulas salivares e o endotélio de vasos sanguíneos são os principais sítios bucais infectados pelo HCMV, enquanto o epitélio de revestimento da mucosa bucal é esporadicamente afetado. A razão da predileção do HCMV em infectar células epiteliais ductais e células endoteliais é desconhecida. Foi sugerido que a vasculite localizada, associada com infecção de células endoteliais pelo HCMV, seria o mecanismo responsável pelo desenvolvimento de ulcerações na cavidade bucal. Essa associação do HCMV com a formação de ulcerações, já foi descrito em outros tecidos como pele e intestino (Kanas et al., 1987). No entanto, a presença freqüente do HCMV na saliva de pacientes imunocomprometidos pode apresentar conseqüências na saúde geral do paciente, já que localmente são raros os efeitos atribuídos ao vírus.

O FCG é uma mistura de substâncias derivadas do soro sanguíneo, leucócitos, células estruturais do periodonto e microrganismos bucais (Uitto et al., 2003; Teles et al., 2010). O FCG é um fluido facilmente coletado de forma não invasiva para mensurar in vivo o nível de mediadores inflamatórios liberados durante os processos de doença que afetam periodonto. A relação entre os microrganismos subgengivais e os mediadores do hospedeiro podem ser examinado analisando amostras do biofilme subgengival e do FCG coletado no mesmo sítio periodontal (Teles et al., 2010). Embora o papel das bactérias na etiologia da periodontite seja bem estabelecido, sugere-se que o citomegalovírus poderia contribuir para o início e para a progressão da doença. Foi observada a

alta prevalência de HCMV no FCG de pacientes com periodontite em relação a pacientes saudáveis (Grenier et al. 2009).

As glândulas salivares são consideradas importantes sítios de reativação do HCMV. A liberação assintomática de HCMV na saliva é uma fonte importante de transmissão viral, demonstrando que a replicação do vírus nas glândulas salivares é fundamental para a transmissão horizontal (Landolfo et al., 2003). Após a infecção sistêmica, a replicação do CMV em ratos inicia-se em órgãos viscerais como o fígado, mas a produção viral é limitada por células NK e pela imunidade celular adaptativa dentro de uma semana após a infecção. Apesar da imunidade celular, ocorre replicação viral em células epiteliais acinares das glândulas salivares de indivíduos imunocompetentes. O CMV estabelece latência e persiste dentro das glândulas salivares (Humphreys et al., 2007). As lesões nas glândulas submandibulares de ratos infectados com o CMV mostram que após a replicação o vírus é liberado no lúmen dos canalículos acinares. Além disso, os linfócitos ao liberarem substâncias citotóxicas com o objetivo de eliminar as células infectadas pelo vírus causam a necrose indiscriminada de células acinares, independente de estarem infectadas ou não, devido à difusão de substância citotóxicas (Henson, Strano, 1972).

De acordo com que foi exposto acima, o HCMV detectado na saliva podem ser de origem dos três fluidos que a constitui. Entretanto, a maior parte do fluido que constitui a saliva é proveniente da secreção das glândulas salivares. Sendo assim, acredita-se que a principal fonte de HCMV detectado na saliva seja as glândulas salivares.

Além da possível associação entre a presença do HCMV com o nível de citocinas na saliva, outros fatores também causar a liberação de citocinas na

saliva de pacientes submetidos ao alo-TCTH, como a presença de outras infecções, a ocorrência de DECH, o desenvolvimento de mucosite, dentre outros. A produção de citocinas na saliva tem sido observada em pacientes portadores destas condições (Costa et al., 2010; Fall-Dickson et al., 2010), no entanto, os relatos são escassos.

A antigenemia ainda é um método utilizado para monitorar a reativação/infecção e guiar a terapia anti-HCMV em pacientes transplantados de células tronco hematopoiéticas. Essa técnica consiste na detecção de antígenos pp65 em leucócitos sanguíneos periféricos por HCMV (Gerna et al., 2008). Entretanto, o diagnóstico baseado na detecção de antígenos possui algumas desvantagens, pois a técnica apresenta baixa sensibilidade para detectar, precocemente, infecções por HCMV, principalmente no período antes da “pega” do enxerto, devido ao baixo número de leucócitos no sangue. Além disso, a antigenemia requer processamento imediato das amostras, consome muito tempo para sua realização e não é automatizada (Leruez-Ville et al., 2003). O protocolo da unidade de Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas do Hospital das Clínicas da UFMG adota como teste diagnóstico, para guiar a terapia anti-HCMV, a identificação de pelo menos duas células pp65 positivas na antigenemia. No entanto, não foi possível analisar a presença dos genótipos de acordo com a reativação do HCMV detectado pela antigenemia devido à ocorrência de pacientes com antigenemia negativa e a detecção de genótipos do HCMV tanto na saliva quanto no sangue por meio de PCR. Sendo assim, métodos de detecção do HCMV que apresentam diferentes níveis de sensibilidade diferentes, como o PCR e a antigenemia, não podem ser usados como critério de inclusão entre os grupos.

Nos últimos anos, têm sido descrito importantes avanços no uso da saliva como meio de diagnóstico e de prevenção de doenças. Entretanto, algumas barreiras à aplicação da saliva, como fluido diagnóstico, ainda precisam ser rompidas para permitir o avanço de pesquisas nesta área. Este estudo reforça a questão da aplicação do uso da saliva como meio de diagnóstico de infecção viral além de apontar perspectivas futuras no estudo do monitoramento do perfil de citocinas produzidas por pacientes submetidos ao alo-TCTH.

CONCLUSÕES

7- CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que:

- 1- O genótipo gB2 foi o mais prevalente na saliva e no sangue de pacientes submetidos ao alo-TCTH.
- 2- Pacientes com gB2 na saliva apresentaram menor nível de IL-10 na saliva em comparação com pacientes que não apresentaram este genótipo.
- 3- Níveis reduzidos de IFN- γ e IL-1 β foram encontrados em pacientes com o genótipo gB4 comparados com pacientes sem este genótipo.
- 4- Redução de IL-1 β e aumento de IL-10 mostraram associação com menor índice de sobrevida após o alo-TCTH.
- 5- Apesar da associação entre níveis de citocinas no sangue e na saliva em pacientes com diferentes genótipos da gB e também com a sobrevida, os genótipos do HCMV não apresentaram impacto na evolução dos pacientes.
- 6- O aumento do nível de IL-6 na saliva e a redução do nível de IFN- γ no sangue, sete dias antes do alo-TCTH, apresentaram associação com um pior índice de sobrevida dos pacientes.
- 7- Um nível alto de IL-6 no sangue e uma carga de HCMV alta na saliva, após 21 dias do alo-TCTH, apresentaram um impacto negativo na sobrevida dos pacientes.
- 8- O nível IL-6, IFN- γ e a carga de HCMV podem apresentar uma potencial função em determinar a sobrevida de pacientes submetidos ao alo-TCTH. Futuros estudos são necessários para investigar a função da IL-6 salivar como um potencial biomarcador de sobrevida para estes pacientes e determinar sua possível associação com a carga de HCMV na saliva.

REFERÊNCIAS

8- REFERÊNCIAS

- 1- Alborghetti MR, Corrêa ME, Adam RL, Metze K, Coracin FL, de Souza CA, Cintra ML. Late effects of chronic graft-vs.-host disease in minor salivary glands. *J Oral Pathol Med.*v.34, n.8, p.486-493, Sep, 2005
- 2- Alice T, Cerutti F, Pittaluga F, Varetto S, Franchello A, Salizzoni M, Ghisetti V. Evaluation of a novel real-time PCR system for cytomegalovirus DNA quantitation on whole blood and correlation with pp65-antigen test in guiding pre-emptive antiviral treatment. *J Virol Methods.* v.148, n.1-2, p.9-16, Mar, 2008.
- 3-Amos TA & Gordon MY. Sources of human hematopoietic stem cells for transplantation -a review. *Cell Transplant* v.4, n.6, p.547-569, Nov-Dec., 1995.
- 4-Bai X, Hosler G, Rogers BB, Dawson DB, Scheuermann RH. Quantitative polymerase chain reaction for human herpesvirus diagnosis and measurement of Epstein-Barr virus burden in posttransplant lymphoproliferative disorder. *Clin Chem.* v.43, n.10, p.1843-1849, Oct, 1997.
- 5-Boeckh M, Gooley TA, Myerson D, Cunningham T, Schoch G, Bowden RA. Cytomegalovirus pp65 antigenemia-guided early treatment with ganciclovir versus foscarnet at engraftment after allogeneic marrow transplantation: a randomized double-blind study. *Blood.* v.88, n.10, p.4063-4071, Nov, 1996.
- 6-Boriskin YS, Fuller K, Powles RL, Vipond IB, Rice PS, Booth JC, Caul EO, Butcher PD. Early detection of cytomegalovirus (CMV) infection in bone marrow transplant patients by reverse transcription-PCR for CMV spliced late gene UL21.5: a two site evaluation. *J Clin Virol.* v.24, n.1-2, p.13-23, Feb, 2002.

7-Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* v.72, p.248-254, May, 1976.

8-Britt WJ, Mach M. Human cytomegalovirus glycoproteins. *Intervirology.* v.39, n.5-6, p. 401-412, 1996.

9-Chadha KC, Ambrus JL Jr, Dembinski W, Ambrus JL Sr. Interferons and interferon inhibitory activity in disease and therapy. *Exp Biol Med* ;229(4):285-90, Apr, 2004.

10-Chou SW, Dennison KM. Analysis of interstrain variation in cytomegalovirus glycoprotein B sequences encoding neutralization-related epitopes. *J Infect Dis.* v.163, n.6, p.1229-34, Jun, 1991.

11-Coaquette A, Bourgeois A, Dirand C, Varin A, Chen W, Herbein G. Mixed cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis.* v.39, n.2, p.155-61, Jul, 2004.

12-Compton T. Receptors and immune sensors: the complex entry path of human cytomegalovirus. *Trends Cell Biol.* v.14, n.1, p.5-8, Jan, 2004.

13- Compton T, Kurt-Jones EA, Boehme KW, Belko J, Latz E, Golenbock DT, Finberg RW. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J. Virol.* v.77,n.8, p.4588–4596, 2003.

14- Contreras A, Slots J. Herpesviruses in human periodontal disease. *J Periodontal Res.* V.35, n.1, p.3-16, Feb, 2000.

15-Correia-Silva J F, Victória JM, Guimarães AL, Salomão UE, de Abreu MH, Bittencourt H, Gomez RS. Cytomegalovirus shedding in the oral cavity of allogeneic haematopoietic stem cell transplant patients. *Oral Dis.*v.13, n.2, p.163-169, Mar, 2007.

16-Correia-Silva JF, Bruna-Romero O, Resende RG, Miranda LPM, Oliveira FE, Costa FO, Xavier SG, Figueiredo-Neves SP, Almeida HC, Bittencourt H, Gomez RS. Saliva as a source of HCMV DNA in allogeneic stem cell transplantation patients. *Oral Diseases* v.16, p.210–216, Mar, 2010.

17- Costa PP, Trevisan GL, Macedo GO, Palioto DB, Souza SL, Grisi MF, Novaes AB Jr, Taba M Jr. Salivary interleukin-6, matrix metalloproteinase-8, and osteoprotegerin in patients with periodontitis and diabetes. *J Periodontol.* v.81, n.3, p.384-931, Mar, 2010.

18- Cunha AA, Marin LJ, Aquino VH, Figueiredo LT. Diagnosis of cytomegalovirus infections by qualitative and quantitative PCR in HIV infected patients. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* v.44, n.3, p.127-132, May-Jun, 2002.

19- Dahllöf G, Bagesund M, Ringden O. Impact of conditioning regimens on salivary function, caries-associated microorganisms and dental caries in children after bone marrow transplantation. A 4-year longitudinal study. *Bone Marrow Transplant.* v.20, n.6, p.479-483, Sep, 1997.

20- Davignon JL, Clément D, Alriquet J, Michelson S, Davrinche C. Analysis of the proliferative T cell response to human cytomegalovirus major immediate-early protein (IE1): phenotype, frequency and variability. *Scand J Immunol.* v.41, n.3, p.247-255, Mar, 1995.

21- Ehrnst A, Barkholt L, Lewensohn-Fuchs I, Ljungman P, Teodosiu O, Staland A, Ringden O, Tyden G, Johansson B. CMV PCR monitoring in leucocytes of transplant patients. *Clin Diagn Virol.* v.3, n.2, p.139-153, Feb, 1995.

22- Essa S, Pacsa A, Raghupathy R, Said T, Nampoory MR, Johny KV, Al-Nakib W. Low levels of Th1-type cytokines and increased levels of Th2-type cytokines in

kidney transplant recipients with active cytomegalovirus infection. *Transplant Proc.* v.41, n.5, p.1643-1647, 2009.

23-Fall-Dickson JM, Mitchell SA, Marden S, Ramsay ES, Guadagnini JP, Wu T, St John L, Pavletic SZ; NIH Chronic GVHD Study Group. Oral Symptom Intensity, Health-Related Quality of Life, and Correlative Salivary Cytokines in Adult Survivors of Hematopoietic Stem Cell Transplantation with Oral Chronic Graft-Versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* v.4, Feb, 2010.

24- Ferrà C, de Sanjosé S, Gallardo D, Berlanga JJ, Rueda F, Marín D, de la Banda E, Ancin I, Peris J, García J, Grañena A. IL-6 and IL-8 levels in plasma during hematopoietic progenitor transplantation. *Haematologica.* v.83, n.12, p.1082-1087, 1998.

25- Fonseca MA. Long-term oral and craniofacial complications following pediatric bone marrow transplantation. *Pediatr Dent.*, v.22, n.1, v.57-62, Jan-Feb, 2000.

26- Foster AE, Gottlieb DJ, Sartor M, Hertzberg MS, Bradstock KF. Cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T-cells follow a similar reconstitution pattern after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* v.8, n.9, p.501-511, 2002.

27- Gale RP. Graft-versus-host disease. *Immunol. Rev.* v.88, p.193-214, Dec, 1985.

28- Gerna G, Baldanti F, Sarasini A, Furione M, Percivalle E, Revello MG, Zipeto D, Zella D. Effect of foscarnet induction treatment on quantitation of human cytomegalovirus (HCMV) DNA in peripheral blood polymorphonuclear leukocytes and aqueous humor of AIDS patients with HCMV retinitis. The Italian Foscarnet Study Group. *Antimicrob Agents Chemother.* v.38, n.1, p.38-44, Jan, 1994.

- 29- Gerna G, Lilleri D, Caldera D, Furione M, Zenone Bragotti L, Alessandrino EP. Validation of a DNAemia cutoff for preemptive therapy of cytomegalovirus infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant.* v.41, n.10, p.873-879, May, 2008.
- 30- Gredmark S, Tilburgs T, Söderberg-Nauclér C. Human cytomegalovirus inhibits cytokine-induced macrophage differentiation. *J Virol.* v.78, n.19, p.10378-10389, Oct, 2004.
- 31- Grenier G, Gagnon G, Grenier D. Detection of herpetic viruses in gingival crevicular fluid of patients suffering from periodontal diseases: prevalence and effect of treatment. *Oral Microbiol Immunol.* v.24, n.6, p.506- 509, Dec, 2009.
- 32- Halary F, Amara A, Lortat-Jacob H, et al. Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity.* v.17, p.653–664, Nov, 2002.
- 33- Harrison CJ, Britt WJ, Chapan NM, Mullican J, Tracy S. Reduced congenital cytomegalovirus (CMV) infection after maternal immunization with a guinea pig CMV glycoprotein before gestational primary CMV infection in the guinea pig model. *J Infect Dis.* v.172, p.1212-1220, 1995.
- 34- Hebart H, Jahn G, Sinzger C, Kanz L, Einsele H. CMV Infection in Bone Marrow and Solid Organ Transplant Patients in the Era of Antiviral Prophylaxis. *Herpes.* v.7, n.1, p.13-17, Feb, 2000.
- 35- Heinic GS, Northfelt DW, Greenspan JS, MacPhail LA, Greenspan D. Concurrent oral cytomegalovirus and herpes simplex virus infection in association with HIV infection. A case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* v.75, n.4, p.488-494, Apr, 1993.

- 36- Hengel H, Reusch U, Geginat G, Holtappels R, Ruppert T, Hellebrand E, Koszinowski UH. Macrophages escape inhibition of major histocompatibility complex class I-dependent antigen presentation by cytomegalovirus. *J Virol.* v.74, n.17, p.7861-7868, Sep, 2000.
- 37- Henson D, and Strano AH. Mouse cytomegalovirus: necrosis of infected and morphologically normal submaxillary gland acinar cells during termination of chronic infection. *Am. J. Pathol.* v.68, p.183–202, 1972.
- 38- Humphreys IR, de Trez C, Kinkade A, Benedict CA, Croft M, Ware CF. Cytomegalovirus exploits IL-10-mediated immune regulation in the salivary glands. *J Exp Med.* v.204, n.5, p.1217-1225, May, 2007.
- 39-Kalpoe JS, Kroes AC, Jong MD, Schinkel J, Brouwer CS, Beersma MF, Claas EC. Validation of clinical application of cytomegalovirus plasma DNA load measurement and definition of treatment criteria by analysis of correlation to antigen detection. *J.Clin. Microbiol.* v.42, n.4, p.1498–1504, Apr, 2004.
- 40-Kanas RJ, Jensen JL, Abrams AM, Wuerker RB. Oral mucosal cytomegalovirus as a manifestation of the acquired immune deficiency syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* v.64, n.2, p.183-189, Aug,1987.
- 41-Kern F, Surel IP, Faulhaber N, Frömmel C, Schneider-Mergener J, Schönemann C, Reinke P, Volk HD. Target structures of the CD8(+)-T-cell response to human cytomegalovirus: the 72-kilodalton major immediate-early protein revisited. *J Virol.* v.73, n.10, p.8179-8184, Oct, 1999.
- 42-Kloover JS, van den Bogaard AE, van Dam JG, Grauls GE, Vink C, Bruggeman CA. Persistent rat cytomegalovirus (RCMV) infection of the salivary glands contributes to the anti-RCMV humoral immune response. *Virus Res.* v.85, n.2, p.163-172, May, 2002.

43-Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, Lembo D. The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther.* v.98, n.3, p.269-297, Jun, 2003.

44-Leruez-Ville M, Ouachee M, Delarue R, Sauget AS, Blanche S, Buzyn A, Rouzioux C. Monitoring cytomegalovirus infection in adult and pediatric bone marrow transplant recipients by a real-time PCR assay performed with blood plasma. *J Clin Microbiol.* v.41, n.5, p.2040-2046, May, 2003.

45-Listman JA, Race JE, Walker-Kopp N, Unlu S, Auron PE. Inhibition of IL-1beta transcription by peptides derived from the hCMV IE2 transactivator. *Mol Immunol.* v.45,n.9, p.2667-2677, May, 2008.

46-Liu JB, Zhang Z. Development of SYBR Green I-based real-time PCR assay for detection of drug resistance mutations in cytomegalovirus. *J Virol Methods.* v. 149, n. 1, p. 129-135, Apr, 2008.

47-Liu YN, Curtsinger J, Donahue PR, Klaus A, Optiz G, Cooper J, Karr RW, Bach FH, Gehrz RC. Molecular analysis of the immune response to human cytomegalovirus glycoprotein B. I. Mapping of HLA-restricted helper T cell epitopes on gp93. *J Gen Virol.* v.74, n.10, p.2207-2214, Oct, 1993.

48-Lloid ME, Schubert MM, Myerson D, Bowden R, Meyers JD, Hackman RC. Cytomegalovirus infection of the tongue following marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* v.14, n.1, p.99-104, Jul, 1994.

49-Ludwig B, Kraus FB, Kipp M, Preiser W, Schwerdtfeger R, Doerr HW, Buxbaum S. Cytomegalovirus-specific CD4 T-cell and glycoprotein B specific antibody response in recipients of allogenic stem cell transplantation. *J Clin Virol.* v.35, n.2, p.160-166, Feb, 2006.

50-Machida U, Kami M, Fukui T, Kazuyama Y, Kinoshita M, Tanaka Y, Kanda Y, Ogawa S, Honda H, Chiba S, Mitani K, Muto Y, Osumi K, Kimura S, Hirai H. Real-

time automated PCR for early diagnosis and monitoring of cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation. *J. Clin. Microbiol.* v. 38, n.7, p. 2536–2542, Jul ,2000.

51- Machado P RL, Araújo M I A S, Carvalho L, Carvalho E M. Immune response mechanisms to infections. *An. Bras. Dermatol.* v.79, n.6, p.647-662, Nov., 2004.

52-Machold RP, Wiertz EJ, Jones TR, Ploegh HL. The HCMV gene products US11 and US2 differ in their ability to attack allelic forms of murine major histocompatibility complex (MHC) class I heavy chains. *J Exp Med* v.185, n.2, p.363-366, Jan, 1997.

53-Manuel O, Asberg A, Pang X, Rollag H, Emery VC, Preiksaitis JK, Kumar D, Pescovitz MD, Bignamini AA, Hartmann A, Jardine AG, Humar A. Impact of genetic polymorphisms in cytomegalovirus glycoprotein B on outcomes in solid-organ transplant recipients with cytomegalovirus disease. *Clin Infect Dis.* v.49, n.8, p.1160-6, Oct, 2009.

54-Meyer-König U, Haberland M, von Laer D, Haller O, Hufert FT. Intragenic variability of human cytomegalovirus glycoprotein B in clinical strains.*J Infect Dis.* v.177, n.5, p.1162-1169, May, 1998.

55-Morcarski ES Jr. Immunomodulation by cytomegaloviruses: manipulative strategies beyond evasion. *Trends Microbiol.* v.10, n.7, p.332-339, Jul, 2002.

Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today.* v.17, p.138-146, 1996

56-Myerson D, Hackman RC, Nelson JA, Ward DC, McDougall JK. Widespread presence of histologically occult cytomegalovirus.*Hum Pathol.* v.15, n.5, p.430-439, May, 1984.

57-Navarro D, Paz P, Tugizov S, Topp K, La Vail J, Pereira L. Glycoprotein B of human cytomegalovirus promotes virion penetration into cells, transmission of infection from cell to cell, and fusion of infected cells. *Virology*. v.197, n.1, p.143-58, Nov,1993.

58-Nordøy I, Müller F, Nordal KP, Rollag H, Lien E, Aukrust P, Froland SS. The role of the tumor necrosis factor system and interleukin-10 during cytomegalovirus infection in renal transplant recipients. *J Infect Dis*. v.181, n.1, p.51-7, Jan, 2000.

59-Novak N, Haberstock J, Bieber T, Allam JP. The immune privilege of the oral mucosa. *Trends Mol Med*. v.14, n.5, p.191-198, May, 2008.

60-Pang X, Humar A, Preiksaitis JK. Concurrent genotyping and quantitation of cytomegalovirus gB genotypes in solid-organ-transplant recipients by use of a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol*. v.46, n.12, p.4004-10, Dec, 2008.

61-Pass RF, Duliege AM, Boppana S, Sekulovich R, Percell S, Britt W, Burke RL. A subunit cytomegalovirus vaccine based on recombinant envelope glycoprotein B and a new adjuvant. *J Infect Dis*. v.180, n.4, p.970-975, Oct, 1999.

62-Penfold ME, Dairaghi DJ, Duke GM, Saederup N, Mocarski ES, Kemble GW, Schall TJ. Cytomegalovirus encodes a potent alpha chemokine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v.96, n.17, p.9839-9844, Aug, 1999.

63-Rasmussen L. Molecular pathogenesis of human cytomegalovirus infection. *Transpl Infect Dis*. v.1, n.2, p.127-134, Jun, 1999.

64-Rasmussen L, Geissler A, Winters M. Inter- and intragenic variations complicate the molecular epidemiology of human cytomegalovirus. *J Infect Dis*. v.187, n.5, p.809-819, Mar, 2003.

65-Riera L, Gariglio M, Valente G, Müllbacher A, Museteanu C, Landolfo S, Simon MM. Murine cytomegalovirus replication in salivary glands is controlled by both

perforin and granzymes during acute infection. *Eur J Immunol.* v.30, n.5, p.1350-1355, May, 2000.

66-Rouabhia M, Ross G, Pagé N, Chakir J. Interleukin-18 and gamma interferon production by oral epithelial cells in response to exposure to *Candida albicans* or lipopolysaccharide stimulation. *Infect Immun.* v.70, n.12, p.7073-7080, Dec, 2002.

67-Shepp DH, Match ME, Lipson SM, Pergolizzi RG. A fifth human cytomegalovirus glycoprotein B genotype. *Res Virol.* v.149, n.2, p.109-14, Mar-Apr, 1998.

68-Schubert MM, Correa ME. Oral graft-versus-host disease. *Dent Clin North Am.* v.52, n.1, p.79-109, Jan, 2008.

69-Sinzger C, Kahl M, Laib K, Klingel K, Rieger P, Plachter B, Jahn G. Tropism of human cytomegalovirus for endothelial cells is determined by a post-entry step dependent on efficient translocation to the nucleus. *J Gen Virol.* v.81, n. 12, p.3021-3035, Dec, 2000.

70-Steele C, Fidel PL Jr. Cytokine and chemokine production by human oral and vaginal epithelial cells in response to *Candida albicans*. *Infect Immun.* v.70, n.2, p.577-583, Feb, 2002.

71-Streckfus CF, Bigler LR. Saliva as a diagnostic fluid. *Oral Dis.* v.8, n.2, p.69-76, Mar, 2002.

72-Sugawara S. Host Defense of Oral Mucosa and the Molecular Mechanism of Oral Mucosal Signal Transduction Diseases. *Journal of Oral Biosciences.* v. 47, n.2, p.115-125, 2005.

73-Tarragó D, Quereda C, Tenorio A. Different cytomegalovirus glycoprotein B genotype distribution in serum and cerebrospinal fluid specimens determined by a novel multiplex nested PCR. *J Clin Microbiol.* v.41, n.7, p.2872-2877 Jul, 2003.

74-Teles R, Sakellari D, Teles F, Konstantinidis A, Kent R, Socransky S, Haffajee A. Relationships among gingival crevicular fluid biomarkers, clinical parameters of periodontal disease, and the subgingival microbiota. *J Periodontol.* v.81, n.1, p.89-98, Jan, 2010.

75-Tornhage CJ, Alfven G. Diurnal salivary cortisol concentration in school-aged children: increased morning cortisol concentration and total cortisol concentration negatively correlated to body mass index in children with recurrent abdominal pain of psychosomatic origin. *J Pediatr Endocrinol Metab.*v.19, p.843-854, 2006.

76-Torok-Storb B, Boeckh M, Hoy C, Leisenring W, Myerson D, Gooley T. Association of specific cytomegalovirus genotypes with death from myelosuppression after marrow transplantation. *Blood.* v.90, n.5, p.2097-102, Sep,1997.

77-Uitto VJ, Overall CM, McCulloch C. Proteolytic host cell enzymes in gingival crevice fluid. *Periodontol 2000.* v.31, n.1, p.77-104, 2003.

78-Wong DT. Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics. *J Am Dent Assoc.* v.137, n.3, p.313-321, Mar, 2006.

79-WuDunn D, Spear PG. Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *J Virol.* v.63, n.1, p.:52-58, Jan, 1989.

80-Yan SS, Fedorko DP. Recent advances in laboratory diagnosis of cytomegalovirus infection. *Clinical and Applied immunology Reviews.* v.2, p.155-167, Jun, 2002.

81-Yu ZS, Zou CC, Zheng JY, Zhao ZY. Cytomegalovirus gB genotype and clinical features in Chinese infants with congenital infections. *Intervirology.* v.49, n.5, p.281-285, May, 2006.

82-Zedtwitz-Liebenstein K, Jaksch P, Wulkersdorfer B, Friehs H, Pempelfort SD, Burgmann H, Frass M. Usefulness of interleukin-10 detection in lung transplant patients with human cytomegalovirus infection with respect to virus persistence. *Transplantation*. v.84, n.2, p.268-271, Jul, 2007.

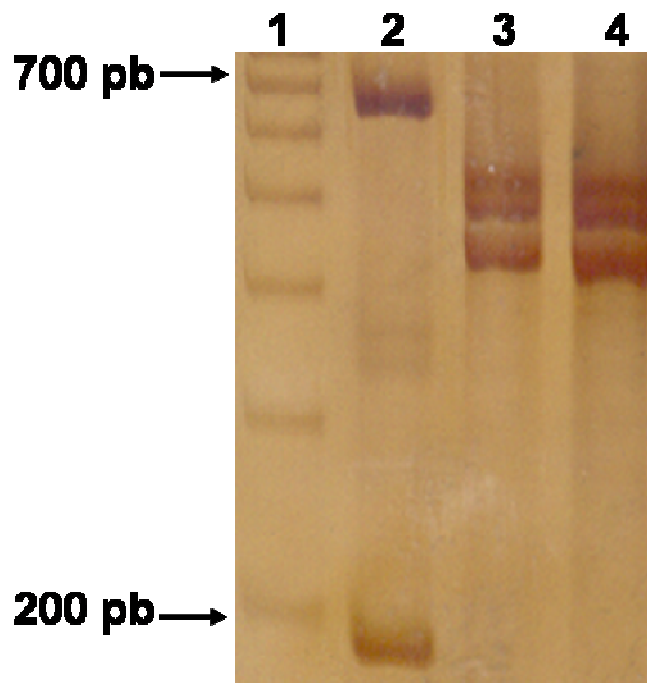
83-Zedtwitz-Liebenstein K, Jaksch P, Burgmann H, Friehs H, Hofbauer R, Schellongowski P, Frass M. Evaluation of interleukin-6 and interleukin-10 in lung transplant patients with human cytomegalovirus infection. *Clin Transplant*. v.23, n.5, p.687-691, Sep-Oct, 2009.

84-Zhang Y, Wang YL, Liu YW, Li Q, Yuan YH, Niu WY, Sun LY, Zhu ZJ, Shen ZY, Han RF. Change of peripheral blood mononuclear cells IFN-gamma, IL-10, and TGF-beta1 mRNA expression levels with active human cytomegalovirus infection in orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc*. v.41, n.5, p.1767-1769, Jun, 2009.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo A – Produtos da segunda amplificação do multiplex-nested-PCR, utilizando os iniciadores internos, para detecção dos genótipos da gB do HCMV em gel de acrilamida 6,5% corado com solução de prata.



Canaleta 1: padrão de peso molecular de 100 pares de bases (pb). Canaleta 2: fragmentos de 190 pb (gB3) e de 613 pb (gB2). Canaleta 3: fragmentos de 420 pb (gB1) e de 465 pb (gB4). Canaleta 4: fragmentos de 420 pb (gB1) e de 465 pb (gB4).