

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

AVALIAÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS DE INTERESSE CLÍNICO EM AMOSTRAS
DE PACIENTES COM TRANSPLANTE HEMATOPOIÉTICO

Lara Okuyama Afonso Costa

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado para obtenção de título de
Bacharel em Ciências Biomédicas com
Ênfase em Ciências Básicas da Saúde.

RIBEIRÃO PRETO - SP
2022

Lara Okuyama Afonso Costa

AVALIAÇÃO MOLECULAR DE VÍRUS DE INTERESSE CLÍNICO EM AMOSTRAS
DE PACIENTES COM TRANSPLANTE HEMATOPOIÉTICO

Orientador:
Dr. Svetoslav Nanev Slavov

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado para obtenção de título de
Bacharel em Ciências Biomédicas com
Ênfase em Ciências Básicas da Saúde.

RIBEIRÃO PRETO - SP
2022

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Elaine
e Nando, ao meu irmão, Fernando, e aos
meus avós, por serem minha base.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Nando e Elaine, por terem me dado suporte ao longo dos anos, e por nunca terem medido esforços para me proporcionar as melhores oportunidades. Agradeço também pelo privilégio de ter pais que acreditam nos meus sonhos e os apoiam de todas as formas possíveis, e com quem posso contar nas situações mais adversas. Eu não teria chegado onde estou hoje sem o norte dado por vocês.

Agradeço aos meus avós, em especial à minha avó Carmen, por ter sido uma das pessoas mais obstinadas que já conheci, e o fazer sempre de uma maneira tão leve, que fazia isso parecer algo simples. Sem a sua influência, nem eu, nem minha mãe, seríamos quem somos hoje.

Gostaria de agradecer às amizades forjadas na Universidade de São Paulo, tão plurais e únicas, e cada uma trouxe, a seu modo, acolhimento e momentos de diversão (ambos tão necessários durante a graduação). Agradeço o apoio e ensinamentos de cada uma dessas amizades, e por nossos caminhos terem se encontrado durante essa fase. Gostaria de agradecer especialmente à Gabi, com quem tive várias conversas sobre nossos TCCs e muito mais, e ao Nathan, por me distrair disso tudo.

Agradeço à Dona Bete e sua família, especialmente à Dani e à Andréia, por terem me recebido tão bem em Ribeirão.

Quero agradecer ao meu orientador, Dr. Svetoslav, por ter aberto as portas de seu laboratório para mim, e por me orientar ao longo dos últimos três semestres, compartilhando seu vasto conhecimento e experiência. Agradeço também a todos os pesquisadores, pós-graduandos, alunos de Iniciação Científica e funcionários que fizeram parte da minha trajetória no Hemocentro de Ribeirão Preto, em especial à Victória, ao Gabriel, ao Péricles, à Débora, ao Johnathan, à Simone, à Josi, à Mari, à Eva, à Elaine, à Carmen e à Dalvinha.

Agradeço também à Universidade de São Paulo, por me proporcionar um ensino superior de qualidade e propiciar oportunidades que eu não teria em outras circunstâncias. Por fim, agradeço à FAPESP, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, por ter sido a agência de fomento da qual fui bolsista

(Processo 2021/10595-8), e que proporcionou os recursos necessários para realizar minha pesquisa.

RESUMO

As doenças infecciosas, entre elas as infecções virais, apresentam uma das principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes com transplante hematopoiético. Devido à similaridade na sintomatologia clínica, e à presença de vírus não suspeitos, a metodologia mais adequada para identificação viral torna-se a metagenômica. A partir de estudos metagenômicos em amostras de plasma de pacientes submetidos ao transplante hematopoiético, foi identificada uma variedade de vírus com importância clínica, muitos dos quais são capazes de impactar significativamente o quadro clínico desses pacientes. O objetivo deste trabalho é confirmar diretamente os vírus identificados, bem como analisar algumas características dos mesmos, como cargas virais (através de *Cycle threshold*) e genótipos infectantes. Amostras de plasma de 32 indivíduos submetidos ao transplante hematopoiético foram obtidas do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto FMRP-USP (20 pacientes, dos quais foram obtidas 49 amostras) e do Hospital Amaral Carvalho (12 pacientes, dos quais foram obtidas 33 amostras), nas cidades de Ribeirão Preto e Jaú, ambas no estado de São Paulo. Nessas amostras foi realizada triagem molecular (PCR convencional e em tempo real) dos seguintes vírus com relevância clínica: citomegalovírus (sigla CMV), herpesvírus humano 6 (HHV-6), vírus Epstein-Barr (EBV) e Adenovírus do tipo B. Foram avaliados também alguns vírus comensais, como o Pegivírus humano do tipo 1 (sigla HPgV-1), 5 diferentes subtipos de Torque Teno vírus (TTV-3, TTV-16, TTV-19, TTV-21 e TTV-22) e Gemycircularvirus humano SL3. Além disso, foi realizada a análise filogenética com intuito de avaliar os genótipos e as taxas de reinfecções por HPgV-1. Entre os pacientes analisados, a prevalência dos vírus foi a seguinte: 56,3% (18/32) de HPgV-1, 40,6% (13/32) de CMV, 12,5% (4/32) de TTV-16, 6,3% (2/32) de HHV-6, enquanto EBV e Adenovírus do tipo B foram de 3,1% cada (1/32). A análise filogenética do HPgV-1 demonstrou que quase na totalidade as sequências pertencem ao genótipo 2 e apenas duas cepas de Jaú foram caracterizadas como genótipo 1. Esses achados, juntamente ao estado de imunossupressão apresentado pelos pacientes, evidenciam a necessidade de confirmar molecularmente a

presença dos vírus estudados, bem como de monitorar essa presença ao longo do tempo, relacionando também os dados obtidos com as informações clínicas de cada paciente.

Palavras-chave: Transplante hematopoiético; Infecções virais; Triagem molecular, PCR; Genótipos.

ABSTRACT

Infectious diseases, such as viral infections, represent one of the main causes of morbidity and mortality of hematopoietic transplant recipients. Due to the similarity in clinical symptomatology, and due to the presence of unsuspected viruses, metagenomics is the most adequate methodology for viral identification. From previous metagenomic studies using plasma samples obtained from patients subjected to hematopoietic stem cell transplantation, a wide variety of viruses were identified, many of which are able to clinically impact the transplant patients. The goal of this study was to directly confirm the identified viruses, as well as analyze some of their characteristics, such as viral loads (using Cycle threshold) and genotypes. The studied plasma samples were collected from 32 individuals subjected to hematopoietic transplantation in the the University Hospital of the School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP) and in the Amaral Carvalho Hospital, from the cities of Ribeirão Preto and Jaú, state of São Paulo. Molecular screening for cytomegalovirus (CMV), human herpesvirus 6 (HHV-6), Epstein-Barr virus (EBV) and type B Adenovirus (AdV) was performed. Moreover, we also assessed some commensal viruses like Human pegivirus type 1 (HPgV), 5 different subtypes of Torque teno virus (TTV-3, TTV-16, TTV-19, TTV-21 e TTV-22) and Gemycircularvirus SL3. Furthermore, HPgV-1 phylogenetic analysis was performed to analyze the circulating genotypes and reinfection rates in these patients. Among the examined patients, viral prevalence was: 56,3% (18/32) of HPgV-1, 40,6% (13/32) of CMV, 12,5% (n=4/32) of TTV-16, 6,2% (2/32) of HHV-6, while EBV and AdV were 3,1% (1/32) each. The performed HPgV-1 phylogenetic analysis demonstrated that almost all sequences belonged to genotype 2, while only two patients from Jaú showed genotype 1. Those findings, along with the immunosuppressive state presented by the patients, underlines the need of molecular confirmation of the studied viruses, as well as the necessity to monitor their presence over time, relating the obtained virological data to each patient's clinical conditions.

Key words: Hematopoietic transplantation; Viral infections; Molecular screening; PCR, Genotypes.

LISTA DE ABREVIATURAS

AdV: Adenovírus

CMV: Citomegalovírus

Ct: *Cycle threshold*

DLPT: doença linfoproliferativa pós-transplante

EBV: Vírus Epstein-Barr

FP: *Forward primer*

GemyCV: Gemycircular virus

HHV-6: Herpesvírus humano 6

HPgV-1: Pegivírus humano do tipo 1

PCR: *Polymerase chain reaction*

RP: *Reverse primer*

RT-PCR: *Reverse-transcriptase* PCR

TCTH: Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas

TMO: Transplante de Medula Óssea

TTV: Torque teno vírus

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Transplante de células-tronco hematopoiéticas	1
1.1.2. Transplante autólogo	2
1.1.3. Transplante alogênico	3
1.1.4. Transplante alogênico aparentado	3
1.1.5. Transplante alogênico não-aparentado	3
1.1.6. Transplante haploidêntico	4
1.2. Impactos clínicos de infecções em pacientes de transplante de células-tronco hematopoiéticas	4
1.2. 1. Infecções virais de importância clínica em pacientes de transplante de células-tronco hematopoiéticas	5
1.2. 2. Citomegalovírus	5
1.2. 3. Herpes vírus do tipo 6	6
1.2. 4. Vírus Epstein-Barr	6
1.2.7. Adenovírus do tipo B	7
1.3. Vírus comensais identificados em pacientes com transplante hematopoiético	7
1.3.1. Torque teno vírus	7
1.3.2. Pegivírus humano do tipo 1	8
1.3.3. Vírus Gemycircular SL3	9
2. JUSTIFICATIVA	11
3. OBJETIVOS	12
3.1. Objetivo geral	12
3.2. Objetivos específicos	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS	14
4.1. Dados dos pacientes	14
4.2. Extração de ácidos nucleicos	15
4.3. Detecção molecular de vírus de interesse clínico em pacientes de transplante hematopoiético	15
4.3. 1. Detecção molecular de Citomegalovírus humano por meio de PCR em tempo real	15
4.3. 2. Detecção molecular de Herpesvírus humano do tipo 6 (HHV-6) por meio de PCR em tempo real	16

4. 3. 3. Detecção molecular do vírus Epstein-Barr (EBV) por meio de PCR em tempo real	17
4. 3. 4. Detecção molecular de Adenovírus do tipo B (AdV-B)	18
4. 3. 4. 1. Detecção de Adenovírus do tipo b (AdV-B) por PCR em tempo real	18
4. 3. 4. 2. Detecção de AdV-B através de PCR do tipo Nested	19
4. 4. Vírus emergentes detectados em pacientes de transplante hematopoiético	20
4. 4. 1. Detecção molecular de Torque teno vírus dos subtipos 3, 16, 19, 21 e 22 por meio de PCR em tempo real	20
4. 4. 2. Detecção molecular de Pegivirus humano do tipo 1 (HPgV-1)	22
4. 4. 2. 1. Detecção molecular de Pegivirus humano do tipo 1 (HPgV-1) por meio de PCR em tempo real	22
4. 4. 2. 2. Detecção de HPgV-1 por PCR do tipo Nested para genotipagem	22
4. 4. 2. 3. Sequenciamento das amostras positivas para HPgV-1	23
4. 4. 2. 4. Análise filogenética para genotipagem de HPgV-1	24
4. 4. 3. Detecção de Gemycircularvirus SL3 por meio de Nested-PCR	24
5. RESULTADOS	26
5.1. Vírus de relevância clínica em pacientes de transplante hematopoiético	26
5.1.1. Confirmação por PCR em tempo real e prevalência de CMV	26
5.1.2. Confirmação por PCR em tempo real e prevalência para HHV-6	29
5.1.3. Confirmação por PCR em tempo real e prevalência de EBV	30
5.1.4. Detecção de Adenovírus do tipo B	31
5.1.4.1. Detecção de AdV do tipo B por meio de PCR em tempo real	31
5.1.4.2. Nested-PCR para Adenovírus do tipo B	33
5.2. Vírus comensais identificados em pacientes com transplante hematopoiético	33
5.2.1. PCR em tempo real para Torque Teno vírus	33
5.2.1.1. Pegivírus Humano do tipo 1	35
5.2.1.2. PCR em tempo real para Pegivírus Humano do tipo 1 e sua prevalência	35
5.2.1.4. Análise filogenética de HPgV-1	40
5.2.2. Nested-PCR para Detecção de Gemycircularvirus SL3	41
6. DISCUSSÃO	43
7. CONCLUSÕES	50
8. REFERÊNCIAS	51

1. INTRODUÇÃO

1.1. Transplante de células-tronco hematopoiéticas

O transplante de células-tronco hematopoiéticas é o procedimento padrão para uma série de doenças, oferecendo tratamento curativo para uma ampla gama de doenças (MAZIARZ, 2015). Entre as patologias cujo o tratamento pode incluir o transplante de células-tronco hematopoiéticas estão: doenças benignas, como a anemia aplástica grave (em que não há formação das células do sangue pela medula óssea) e a doença falciforme; doenças malignas, como os diferentes tipos de leucemia (câncer que compromete os leucócitos) e a síndrome mielodisplásica grave (COPELAN, 2006). O principal aspecto desse tipo de transplante é a substituição completa da função hematopoiética original do paciente (receptor) por células-tronco hematopoiéticas que possuem outra fonte, seja do próprio paciente (transplante autólogo), quanto de outro indivíduo (transplante alogênico) (MAZIARZ, 2015).

Para que as células-tronco hematopoiéticas transplantadas possam ser aderidas de forma segura e satisfatória, é necessário que as células-tronco do receptor sejam completamente substituídas pelas células do doador, com o intuito de evitar a ativação do sistema imune, resultando em um estado de imunossupressão (MORRIS e STORB, 2003). Para evitar que o sistema imune reconheça as células hematopoiéticas doadas como não próprias, é necessário que o indivíduo receptor receba, antes do transplante, uma terapia de condicionamento, que inclui quimioterapia, radioterapia e/ou imunoterapia (ZULU e KENYON, 2018). Ademais, a terapia de condicionamento também tem como objetivo erradicar a doença, quando maligna (MORRIS e STORB, 2003), e criar espaço físico para as células transplantadas se instaurarem no interior da medula óssea. Entretanto, nem sempre é necessário realizar a mieloablação, que elimina completamente a função hematopoiética do receptor por meio de altas doses de radiação, e o condicionamento não mieloablativo surge como alternativa, especialmente em pacientes acima de 50 anos (JENQ e VAN DER BINK, 2010).

Contudo, a terapia de condicionamento possui uma série de efeitos colaterais, e a imunossupressão induzida deixa o paciente vulnerável a diferentes tipos de infecções (STYCZYNSKI e GIL, 2008). Ainda que infecções fúngicas (especialmente por aspergilose) (KONTOYIANNIS et al., 2010) e bacterianas (que podem levar à sepse) (OMRANI e ALMAGHRABI, 2017) sejam também muito frequentes em pacientes de transplante hematopoiético, o tratamento para infecções virais é pouco desenvolvido, com exceção daquele contra citomegalovírus (MAFFINI et al., 2016), e tampouco evoluiu nas últimas décadas. Portanto, averiguar as infecções virais que acometem os pacientes submetidos ao transplante hematopoiético, bem como avaliar sua prevalência, é de suma importância para o manejo adequado dessas infecções, que ainda representam significativa causa de morbidade e mortalidade em pacientes desse tipo de transplante (ANNALORO et al., 2021).

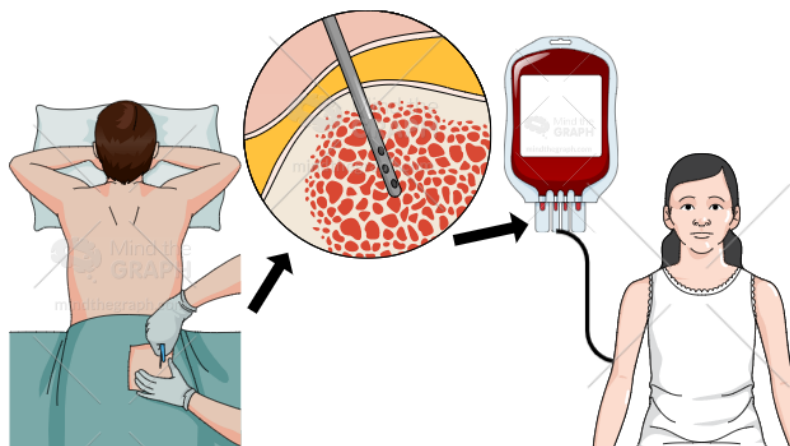


Figura 1. Procedimento de transplante alogênico de medula óssea. Figura criada na plataforma “*Mind the Graph*”, em <https://mindthegraph.com/>

1.1.2. Transplante autólogo

Neste tipo de transplante, células-tronco hematopoiéticas do paciente são coletadas, criopreservadas e re-implantadas após o paciente ser submetido à quimioterapia ou radioterapia. Sua principal vantagem é a ausência de risco de doença do enxerto versus o hospedeiro e há menores chances de rejeição do transplante, sendo mais comuns relapsos em casos específicos, como em pacientes com mieloma múltiplo (MICHAEL e BERRY, 2016).

1.1.3. Transplante alogênico

No transplante alogênico, o paciente recebe células-tronco hematopoiéticas de um doador totalmente ou parcialmente compatível para o sistema antígeno leucocitário humano (HLA). Dessa forma, o complexo de histocompatibilidade maior (MHC, na sigla em inglês para "*Major Histocompatibility Complex*") é de grande importância, possuindo maior destaque a compatibilidade das moléculas de HLA do tipo I e do tipo II, localizadas no cromossomo 6 (GALGANO e HUTT, 2018). O doador pode ser um membro da família biológica do paciente (aparentado), ou ser encontrado por meio dos registros em bancos de doadores de medula óssea (não-aparentado). O regime de condicionamento a que os pacientes são submetidos tem como objetivo a eliminar as células tumorais (em caso de doenças malignas); erradicar o tecido hematopoiético original do paciente, para que haja espaço para o enxerto advindo do doador; e suprimir a resposta imune do paciente, diminuindo então as chances de rejeição do transplante.

1.1.4. Transplante alogênico aparentado

Em um cenário ideal, o doador para transplante haploidêmico é um irmão de HLA-idêntico. Há uma chance de 25% que cada irmão do paciente possua HLA-idêntico, uma vez que cada indivíduo herda 50% do haplótipo de cada pai. Caso o doador seja um gêmeo monocoriônico, o transplante pode ser chamado de sinérgico. Contudo, é possível que o paciente não tenha irmãos ou que nenhum dos irmãos possua compatibilidade completa: nesse contexto, pode-se buscar um doador para transplante alogênico não-aparentado ou para transplante haploidêmico.

1.1.5. Transplante alogênico não-aparentado

Caso o paciente não possua irmãos ou haja incompatibilidade de HLA entre os irmãos, seus dados podem ser cadastrados no Registro Nacional de Receptores de Medula Óssea (REREME), e busca-se doadores de medula óssea compatíveis no Registro Nacional de Doadores Voluntários de Medula Óssea (REDOME) e

concomitantemente no "*Bone Marrow Donors Worldwide*" ("Doadores de Medula Óssea no Mundo", em tradução livre).

1.1.6. Transplante haploidêntico

Caso não seja possível encontrar um doador com compatibilidade completa para o HLA (seja aparentado ou não aparentado), pode-se realizar a doação a partir de um indivíduo que possui compatibilidade parcial de HLA (compatibilidade de um haplótipo). Tal tipo de transplante costuma ser realizado em contextos de urgência, pois diminui o tempo de busca por um doador aceitável (TRELEAVEN e BARRET, 2009). Entre as vantagens desse tipo de transplante, estão: oferecer maior chance de sobrevivência para pacientes com doenças muito agressivas (GALGANO e HUTT, 2018). Contudo, esse tipo de transplante possui também desvantagens significativas, como a maior suscetibilidade às infecções oportunistas, principalmente às infecções virais por Citomegalovírus e vírus Epstein-Barr (TRELEAVEN e BARRET, 2009), uma vez que o paciente é submetido a um condicionamento especialmente agressivo. Além disso, pacientes submetidos ao transplante haploidêntico apresentam uma resposta menos expressiva à terapia antiviral (TRELEAVEN e BARRET, 2009).

1.2. Impactos clínicos de infecções em pacientes de transplante de células-tronco hematopoiéticas

Infecções estão entre as maiores causas de mortalidade e morbidade em indivíduos submetidos ao transplante de medula óssea (ROVIRA; MENSA; CARRERAS, 2012). De acordo com dados da EBMT ("*European Society for Blood and Marrow Transplantation*", ou "Sociedade Europeia para Transplante de Sangue e Medula Óssea", em tradução livre), infecções persistem como segunda principal *causa mortis* nos receptores de transplante hematopoiético na atualidade (STYCZYŃSKI et al., 2020), ainda que o número de mortes por infecções nesses pacientes tenha decaído ao fim do século XX (GRATWOHL et al., 2005). A infecção fúngica por *Aspergillus spp.* se destaca por atingir de 5 a 15% dos pacientes (ROVIRA; MENSA; CARRERAS, 2012) e possuir taxa de óbito de 60%

(MAERTENS, 2011), apesar da existência de medicamentos eficazes para seu tratamento. Contudo, os fatores relacionados à mortalidade por infecções virais ainda são pouco claros, e a maioria (59,4%) das infecções com desfecho em óbito possui etiologia desconhecida, sendo que as reconhecidamente virais compõe 9,2% das infecções letais (STYCZYŃSKI et al., 2020).

1. 2. 1. Infecções virais de importância clínica em pacientes de transplante de células-tronco hematopoiéticas

1.2. 2. Citomegalovírus

A infecção por Citomegalovírus (CMV) foi por décadas a principal infecção causadora de complicações no período de 30 a 100 dias pós-transplante hematopoiético (LJUNGMAN et al., 2003). Esse intervalo de tempo crítico após o transplante é iniciado pelo procedimento de transplante e seu fim é marcado pela enxertia. Atualmente, as medidas profiláticas e a vigilância contra CMV contribuíram para diminuir a mortalidade causada por esse vírus em pacientes de transplante hematopoiético (ROVIRA; MENSA; CARRERAS, 2012).

É importante ressaltar que a soroprevalência de CMV na população em geral é bastante alta, podendo chegar a 80% (ZUHAIR et al., 2019), e após a infecção (presença de anticorpos IgM contra CMV), o vírus se torna latente (presença de anticorpos IgG) (ROVIRA; MENSA; CARRERAS, 2012). Assim, a imunossupressão induzida pelo condicionamento pode causar reativação do vírus latente em pacientes de transplante hematopoiético. A infecção por CMV em pacientes de TCTH pode causar sintomas como febre, indisposição, alteração das funções hepáticas, doenças gastrointestinais, mielite, coriorretinite e complicações neurológicas, mas a complicação mais fatal é a pneumonia intersticial (TRELEAVEN e BARRET, 2008). Ademais, a mortalidade e morbidade em pacientes de TCTH infectados por CMV é maior naqueles submetidos à transplante alogênico (TRELEAVEN e BARRET, 2008). Como a infecção por CMV está relacionada a uma piora de prognóstico nesses pacientes, caso o receptor tenha a sorologia negativa para CMV, deve-se buscar

idealmente doadores que também não sejam infectados pelo vírus (ROVIRA; MENSA; CARRERAS, 2012).

Uma das formas de detectar infecção ou reativação de CMV é por meio de PCR (*polymerase chain-reaction*) a partir de amostras sanguíneas, e existência de métodos eficazes de detecção é essencial para que se possa diagnosticar, e portanto, começar a tratar precocemente essa infecção em pacientes vulneráveis, como os submetidos ao transplante.

1. 2. 3. Herpes vírus do tipo 6

Estima-se que mais de 90% da população adulta em países desenvolvidos seja sorologicamente positiva para HHV-6 (AGUT; BONNAFOUS; GAUTHERET-DEJEAN, 2015), e como outros herpesvírus, após a infecção inicial, o vírus permanece no organismo do hospedeiro de forma latente (GOMPLES e MACAULEY, 1995). Mesmo quando a infecção está ativa, é comum a ausência de sintomas, porém, o estado de imunossupressão (que é induzido em pacientes de transplante hematopoiético) pode levar à manifestação de sintomas sérios, desde exantemas (AGUT, BONNAFOUS e GAUTHERET-DEJEAN, 2015) até encefalites graves (OGATA; FUKUDA; TESHIMA, 2015), as quais estão associadas a piores prognósticos após o transplante. Ademais, a reinfecção por HHV-6 é especialmente relevante em pacientes pediátricos, onde está associada à maior mortalidade e morbidade (DE PAGTER et al., 2008).

1. 2. 4. Vírus Epstein-Barr

A soroprevalência de EBV é de acima de 97% na população mundial, enquanto o DNA desse vírus pode ser detectado em mais de 50% dessa população (SMATTI et al., 2017). A infecção por vírus Epstein-Barr está associada ao desenvolvimento de DLPT (doença linfoproliferativa pós-transplante), um tipo de linfoma que acomete principalmente o trato gastrointestinal e o sistema nervoso central (HOLMES e SOKOL, 2002), e assim, pode se tornar uma complicação mortal. Dessa forma, recomenda-se monitorar semanalmente, por meio de PCR, a reativação e a presença de EBV em pacientes de transplante hematopoiético de alto-risco, como aqueles submetidos ao transplante não-aparentado ou em que há

discordância sorológica entre doador e receptor (ROVIRA, MENSA; CARRERAS, 2012).

1.2.7. Adenovírus do tipo B

A infecção por Adenovírus humano está associada a diversas complicações graves, e maior risco de morbidade e mortalidade, em pacientes submetidos ao transplante hematopoiético (FEGHOUL et al., 2015). Em indivíduos imunocompetentes, o Adenovírus do tipo B comumente causa infecções auto contingentes no trato respiratório superior (HALE et al., 1999), sendo responsável por 5% a 10% desse tipo de infecção do trato respiratório em crianças (GEORGE et al., 2012). No contexto de transplante hematopoiético, a infecção por Adenovírus é também particularmente relevante em pacientes pediátricos, em que a taxa de mortalidade pode chegar a 83% (FEUCHT et al., 2015). Enquanto a prevalência de infecção por Adenovírus é de 6% em adultos submetidos ao transplante hematopoiético, em pacientes pediátricos, é de 6% a 28% (FEUCHT et al., 2015; LION et al., 2014; MUÑOZ-COBO et al., 2011; ÖHRMALM et al., 2011)

Já foram identificados mais de 51 subtipos de Adenovírus (LION, 2014), divididos em 6 grupos diferentes, de A a F, e o tipo B está dividido em 2 subgrupos: B1 e B2 (SETO et al., 2009). O tipo B também está associado a sintomas como cistite (FEUCHTINGER et al., 2007), meningoencefalite, queratoconjuntivite e pneumonia (LION, 2014).

1.3. Vírus comensais identificados em pacientes com transplante hematopoiético

1.3.1. Torque teno vírus

A infecção por Torque Teno vírus costuma acontecer na infância, e a infecção permanece latente em células da medula óssea e linfócitos (SCHMITZ et al., 2020). Além disso, as infecções são assintomáticas (FOCOSI et al., 2016) e sua importância clínica ainda é desconhecida. Apesar de ser um dos componentes mais presentes no viroma humano (DE VLAMINCK et al., 2013), os diferentes subtipos de TTV são pouco estudados, pois ainda não existem modelos de cultivo *in vitro* nem

modelos de estudo animal (FOCOSI et al., 2016). Não há consenso na literatura sobre a correlação exata entre viremia de TTV e imunossupressão (SCHMITZ et al., 2020; MOUTON et al., 2020), porém a presença de DNA desse vírus em plasma de pacientes submetidos a diferentes tipos de transplante é vista como um possível indicador de imunossupressão.

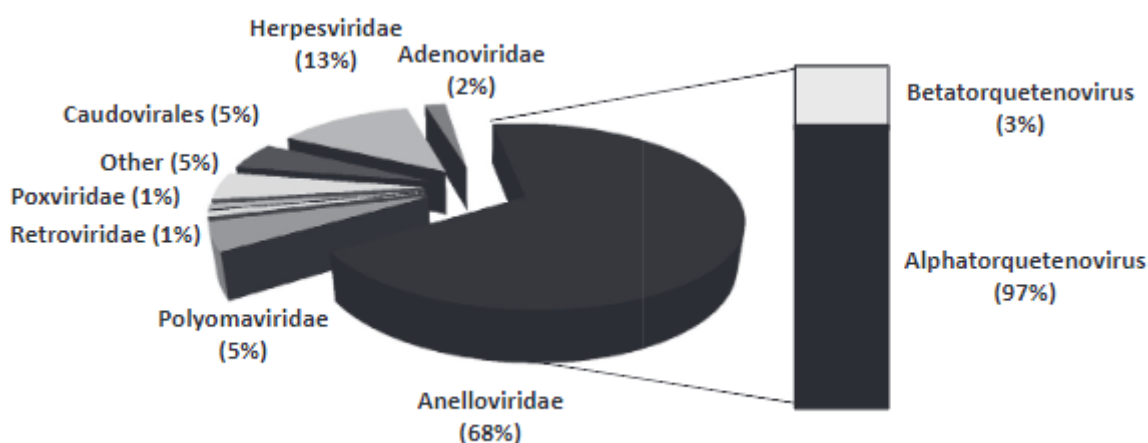


Figura2. Composição do viroma do plasma humano (retirado de FOCOSI et al., 2016, a partir de dados de DE VLAMINCK et al., 2013)

1.3.2. Pegivírus humano do tipo 1

O Pegivírus humano do tipo 1 (HPgV-1) é um flavivírus de RNA de fita única (ZIMMERMAN e BLACKARD, 2022), e possui tropismo por células sanguíneas mononucleares periféricas (CHIVERO e STAPLETON, 2015) e células-tronco hematopoiéticas (VU et al., 2019). Ainda que não existam patologias ou sintomas conhecidos causados por esse tipo viral, o que resulta à sua classificação como vírus comensal. Contudo, esse vírus, quando em coinfecção por outros tipos virais como HIV, demonstrou capacidade de diminuir a progressão da doença causada por esse vírus e reduzir a mortalidade dos pacientes (CHIVERO e STAPLETON, 2015; LAUCK et al., 2015). Uma vez que a prevalência de infecção por HPgV é de aproximadamente 20% em doadores de sangue em países em desenvolvimento (MOHR; STAPLETON, 2009), indivíduos submetidos ao transplante hematopoiético podem estar previamente infectados ou adquirir a infecção por meio do procedimento de transplante (KLEINMAN, 2001).

Ademais, em estudos de caracterização do perfil de infecções virais em pacientes submetidos ao transplante alogênico de medula óssea, a prevalência de HPgV foi mais de 30%, sendo o vírus detectável antes do transplante, e prevalência aumenta em cerca de 10% após o transplante hematopoiético (VU et al., 2019). Contudo, a influência de tal infecção no desfecho desses indivíduos ainda é inconclusiva, mesmo que o quadro infeccioso se apresente persistente (VU et al., 2019). Assim, torna-se relevante averiguar a presença de HPgV-1 no plasma de indivíduos submetidos ao transplante de células tronco-hematopoiéticas em diferentes momentos pré e pós procedimento.

1.3.3. Vírus Gemycircular SL3

Em 2015, foi detectado por meio de análise metagenômica em amostras de plasma e fezes, dois tipos de vírus de fita única e genoma circular, denominados Gemycircular e Ciclovírus (PHAN et al., 2015). Esses dois tipos de vírus são classificados como ciclovírus, um gênero da família *Circoviridae*, caracterizada por possuir DNA de fita simples e genoma curto (LI et al., 2010). Inicialmente detectados em fezes de animais silvestres (GE et al., 2011) e animais de corte (TAN et al., 2013; GARIGLIANY et al., 2014), ciclovírus também foram encontrados no fluido cefalorraquidiano de pacientes com paralisia e indivíduos saudáveis (TAN et al., 2013) que habitavam próximos aos animais infectados. Para a análise metagenômica de Phan et al., foram utilizadas amostras de fezes de pacientes acometidos por diarreia de causa desconhecida oriundos do Brasil e Nicarágua, amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes com encefalite e esgoto não-tratado do Nepal, que foram submetidos a Sequenciamento de Nova Geração e, posteriormente, à análise filogenética. Por fim, Phan et al. propôs a classificação de uma nova espécie, que possuía menor similaridade com outros ciclovírus conhecidos, e a denominou Gemycircular (havendo subtipos SL1, SL2 e SL3, BZ1 e BZ2). Apesar de a presença de vírus Gemycircular ter sido confirmada por meio de PCR nas amostras de líquido cefalorraquidiano (subtipos SL) e fezes analisadas (subtipos BZ1 e BZ2) (PHAN et al., 2015), pouco se sabe sobre a transmissão, replicação e impactos clínicos desse vírus.

Com o objetivo de avaliar a presença de vírus Gemycircular em outros contextos, Macera et al., 2019, averiguaram a presença desse vírus também em plasma de pacientes submetidos ao transplante hematopoiético, de doadores de sangue saudáveis e de portadores do vírus HIV. Ao tentar estabelecer correlações entre o estado de imunossupressão, apresentado tanto por pacientes transplantados quanto por portadores de HIV, e a detecção de vírus Gemycircular, a prevalência em todos os grupos foi baixa (MACERA et al., 2019). Contudo, o estudo foi realizado na Itália, e ainda não existem avaliações do impacto do vírus Gemycircular em pacientes de transplante hematopoiético em outras populações. Essa lacuna, em conjunto com o caráter emergente do vírus Gemycircular e sua detecção prévia em amostras provenientes do Brasil, motiva a avaliação desse tipo de vírus em pacientes submetidos ao transplante hematopoiético no país.

2. JUSTIFICATIVA

As doenças infecciosas continuam sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade entre pacientes com transplante hematopoiético, e o estado de profunda imunossupressão desses pacientes é responsável pelo quadro clínico grave causado pelas infecções reativadas ou adquiridas no período pós-transplante, sendo elas bacterianas, fúngicas ou virais. Um dos grandes desafios clínicos é diagnosticar essas infecções, o que pode se apresentar como uma tarefa difícil devido à sintomatologia parecida e à grande quantidade de patógenos que podem acometer pacientes com transplante hematopoiético. As infecções virais são especialmente problemáticas, devido a sintomatologia pouco específica e a diversidade de sintomas que podem apresentar estes pacientes.

Dessa forma, a análise metagenômica viral do plasma dos pacientes permite uma visão ampla da abundância dos vírus presentes no organismo desses indivíduos. Porém, a metagenômica apresenta algumas limitações, como o risco de classificações errôneas dos vírus (devido à presença de contaminantes ou disponibilidade limitada de genomas de referência nos bancos de dados) e a necessidade de trabalhar utilizando-se *pools* de amostras para reduzir o custo de sequenciamento, o que impede a análise individual de cada amostra. Ademais, as características moleculares das infecções virais, especialmente a carga viral, a qual pode influenciar o prognóstico, não são reveladas pela metagenômica viral.

Desse modo, a confirmação direta da presença de DNA de diferentes vírus no plasma é de suma importância, e deve ser realizada por meio de métodos moleculares como a reação de amplificação em cadeia ou PCR (*Polymerase chain reaction*), que pode ser PCR em tempo real (verificação do *Cycle threshold* ou Ct), ou PCR convencional. Assim, enquanto a metagenômica fornece um panorama geral sobre os vírus presentes no plasma dos pacientes, a confirmação direta dos agentes infecciosos virais permite verificar esses achados e obter informações mais específicas sobre as infecções virais. Portanto, o objetivo deste trabalho é avaliar por métodos moleculares a presença direta em amostras individuais de pacientes de transplante hematopoiético os agentes virais de importância clínica, seja conhecida ou ainda desconhecida, que foram previamente identificados através da análise do metagenoma viral.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- 3.1.1. Confirmar através de métodos moleculares (PCR, sequenciamento) a presença de infecções virais, identificadas por meio de análise metagenômica viral prévia realizada em pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas.

3.2. Objetivos específicos

- 3.2.1. Avaliar por meio de PCR em Tempo Real a presença de DNA genômico de Citomegalovírus (CMV) no plasma sanguíneo de pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas;
- 3.2.2. Avaliar por meio de PCR em Tempo Real a presença de fragmentos de DNA de vírus Epstein-Barr (EBV) no plasma sanguíneo de pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas;
- 3.2.3. Avaliar por meio de PCR em Tempo Real a presença de fragmentos de DNA de vírus Herpesvírus Humano do tipo 6 (HHV-6) no plasma sanguíneo de pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas;
- 3.2.4. Avaliar por meio de PCR em Tempo Real a presença de fragmentos de DNA de Torque Teno vírus (subtipos 3, 16, 19, 21 e 22) no plasma sanguíneo de pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas;
- 3.2.5. Avaliar por meio de PCR em Tempo Real e PCR Convencional a presença de fragmentos de Adenovírus do tipo B no plasma sanguíneo de pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas;

- 3.2.6. Avaliar por meio de PCR em Tempo Real e RT-PCR do tipo Nested a presença de fragmentos de RNA de Pegivírus humano do tipo 1 (HPgV-1) no plasma sanguíneo de pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas;
- 3.2.7. Avaliar por meio de PCR convencional a presença de DNA do vírus Gemycircular humano SL3;
- 3.2.8. Realizar análise filogenética dos genótipos de HPgV-1 presentes em amostras positivas de pacientes submetidos a transplante de medula óssea, para verificar a prevalência dos diferentes subtipos de HPgV-1.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Dados dos pacientes

Foram coletadas 82 amostras de plasma de 32 pacientes oriundos das cidades de Jaú (SP) e Ribeirão Preto (SP), os quais estavam sendo tratados no Hospital Amaral Carvalho e no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, respectivamente. As amostras eram colhidas nos seguintes intervalos: pré-transplante, 30 dias após o transplante e 100 dias após o transplante. Tais amostras serão também referidas como de primeira coleta, segunda coleta e terceira coleta, respectivamente. Infelizmente, não foi possível obter amostras de todos os intervalos para todos os pacientes, pois além da perda de acompanhamento, alguns também chegaram a óbito. A obtenção das amostras para fins de pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (número do processo CAAE 05142818.7.0000.5440).

Entre os pacientes do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, a média de idade era de 38,9 anos (os indivíduos possuíam idade entre 18 e 66 anos), havendo 20 pacientes, 8 deles (40%) do sexo feminino e 12 (60%) do sexo masculino. Ademais, as doenças de base apresentadas por eles incluíam patologias benignas, como anemia aplástica (6 indivíduos ou 30% do total) e doença falciforme (1 indivíduo ou 5%), além de doenças malignas, tal qual a leucemia mielóide crônica (3 pacientes ou 15%), a leucemia mielóide aguda (5 pacientes ou 25%) e a leucemia linfóide aguda (5 pacientes ou 25%). Além disso, em relação ao tipo de transplante a que os pacientes foram submetidos, houveram 6 transplantes haploidênticos (30%), 11 do tipo alogênico aparentado (55%) e 3 alogênicos não-aparentados (15%).

Já entre os 12 pacientes do Hospital Amaral Carvalho, na cidade de Jaú, a média de idade dos indivíduos era de 26,3 anos (sendo que a idade dos pacientes era entre 6 e 59 anos), sendo 10 do sexo masculino (83,3%) e 2 do sexo feminino (16,7%). As doenças apresentadas por eles incluíam: leucemia aguda de fenótipo misto (2 pacientes ou 16,6%), anemia aplástica grave (1 indivíduo ou 8,3%), mielofibrose primária (1 paciente ou 8,3%), leucemia linfóide aguda (3 pacientes ou 25%), leucemia mielóide aguda (3 pacientes ou 25%), e síndromes mieloblásticas (2

pacientes ou 16,6%). No que diz respeito ao tipo de transplante, 3 pacientes foram submetidos a transplante haploidêntico (25%), 6 foram submetidos a transplante alogênico aparentado (50%) e 3 foram submetidos a transplante alogênico não-aparentado (25%).

4.2. Extração de ácidos nucleicos

Os ácidos nucleicos foram extraídos manualmente a partir de 140 µl de soro/plasma utilizando-se QIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante.

4.3. Detecção molecular de vírus de interesse clínico em pacientes de transplante hematopoiético

4. 3. 1. Detecção molecular de Citomegalovírus humano por meio de PCR em tempo real

A detecção do CMV foi feita utilizando primers e sonda presentes na Tabela 1 desenhados por Slavov et al., 2016. A reação foi realizada em volume final de 25 µl contendo os seguintes reagentes: 12,5 µl de TaqMan Buffer (1X), 300 nM de Primer *Forward*, 300 nM de Primer *Reverso*, 150 nM de sonda, 5 µl de DNA extraído de cada amostra e 4 µl de H₂O. A ciclagem foi feita em QuantStudio 5, Applied Biosystems (ThermoFisher Scientific) seguindo o seguinte protocolo: passo inicial de 50 °C por 2 minutos, desnaturação por 10 minutos a 95 °C, e 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C. seguido por etapa de anelamento/alongamento por 1 min a 60°C. A visualização das reações positivas foi observada por meio de curvas de amplificação. Os valores do Ct (cycle threshold) também foram avaliados.

Tabela 1. Sequências de primers e sondas utilizados para detecção de Citomegalovírus humano em pacientes com transplante hematopoiético.

Tipo viral	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (3'-5')	Sonda (FAM/MGB)	Localização no genoma
CMV (SLAVOV et al., 2016)	ACCGTCTGCGCG AATGTTA	TCGCAGATGAGC AGCTTCTG	CACCCTGCTTTCC GAC	FP 143,285–143,303 RP 143,332–143,351 Sonda 143,305–143,320

4. 3. 2. Detecção molecular de Herpesvírus humano do tipo 6 (HHV-6) por meio de PCR em tempo real

A detecção do HHV-6 foi feita utilizando os primers e sonda desenvolvidos por WATZINGER et al., 2004, presentes na Tabela 2. A reação foi realizada em volume final de 25 µl contendo os seguintes reagentes: 12,5 µl de TaqMan Buffer, 300 nM de Primer *Forward*, 300 nM de Primer reverso, 150 nM de sonda, 6 µl de DNA (~ 20 ng/µL) extraído de cada amostra e 1,5 µl de H₂O. A ciclagem foi feita em QuantStudio5, Applied Biosystems (ThermoFisher Scientific) seguindo o seguinte protocolo: passo inicial de 50 °C por 2 minutos, desnaturação por 10 minutos a 95 °C, e 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C, seguido por etapa de extensão por 1 min a 60 °C. Novamente, as amostras positivas foram observadas por meio de curvas de amplificação e os valores de Ct (cycle thresholds) foram avaliados .

Tabela 2. Sequências de primers utilizados para detecção de Herpesvírus do tipo 6

Tipo viral	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (3'-5')	Sonda (FAM/TAMRA)	Localização no genoma
HHV-6 (WATZINGER et al., 2004)	GAAGCAGCAATC GCAACACA	ACAACATGTAACT CGGTGTACGGT	AACCCGTGCGCC GCTCCC	FP 57,517–57,536 RP 57,568–57,590 Sonda 57,544–57,561

4. 3. 3. Detecção molecular do vírus Epstein-Barr (EBV) por meio de PCR em tempo real

A detecção do EBV foi feita utilizando as sequências de primers e sondas desenvolvidos por Biasolo et al., 2002, presentes na Tabela3. A reação foi realizada em volume final de 25 µl contendo os seguintes reagentes: 12,5 µl de TaqMan Buffer, 300 nM µl de Primer *Forward*, 300 nM de Primer Reverso, 150 nM de sonda, 5 µl de DNA extraído de cada amostra e 4 µl de H₂O. A ciclagem foi feita em QuantStudio 5, Applied Biosystems (ThermoFisher Scientific) seguindo o seguinte protocolo: passo inicial de 50 °C por 2 minutos, desnaturação por 10 minutos a 95 °C, e 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C, seguido por etapa de anelamento/alongamento por 1 min a 60°C. A visualização das reações positivas foi observada em forma de curvas de amplificação. Os valores do Ct (cycle threshold) também foram avaliados.

Tabela 3. Sequências de primers utilizados para detecção de vírus Epstein-Barr em pacientes com transplante hematopoiético.

Tipo viral	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (3'-5')	Sonda (FAM/TAMRA)	Localização no genoma
EBV (BIASOLO et al., 2002)	TCAACCTCTTCCA TGTCAGTGA	TGGGTGAGCGGA GGTTAGTAA	TCAGCCCCTCCA CCAGTGACAATTC	FP 78,019–77,996 RP 77,912–77,932 Sonda 77,973–77,949

4. 3. 4. Detecção molecular de Adenovírus do tipo B (AdV-B)

4. 3. 4. 1. Detecção de Adenovírus do tipo b (AdV-B) por PCR em tempo real

A detecção do Adenovírus do tipo B (ADV-B) foi feita por meio de PCR em tempo real, utilizando as sequências presentes na Tabela 1, conforme ALLARD, ALBINSSON e WADELL, 2001. A amplificação dos ácidos nucleicos foi realizada utilizando 5 µl de Buffer 10X, 3µl de MgCl₂, 1,25 µl de dNTPs, 0,25 µl de Platinum Taq DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific), 5000 nM de cada primer, 6 µl de DNA extraído e 29,5 µl de H₂O, resultando em um volume final de 50 µl de mix para reação. As condições de ciclagem para a primeira reação incluíam uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida por 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 s e 72°C por 1 min, e por fim, uma extensão final por 5 min a 72°C. A amplificação foi realizada em ciclador Veriti 96-well Thermal Cycler (ThermoFisher Scientific). Para a segunda reação, utilizou-se 4 µl do produto de amplificação obtido na primeira reação com a mesma concentração de reagentes, com exceção de H₂O, da qual foram utilizados 31,5 µl. As condições de amplificação foram as mesmas da primeira reação, com a distinção de que 40 ciclos foram aplicados. A visualização dos amplicons foi realizada utilizando-se gel de agarose 2% corada com GelRed e a visualização foi feita no ChemiDoc XRS+ empregando Image Lab Software (Bio-Rad). Todos os passos foram realizados em diferentes salas de laboratório, para evitar contaminação.

Tabela 4. Sequências de primers utilizados para detecção de Adenovírus do tipo B

Tipo viral	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (3'-5')	Sonda (FAM/TAMRA)
Adenovírus do tipo B (ALLARD; ALBINSSON; WADELL, 2001)	CGCCGGACAGGATGC TT	CTACGGTCGGTGGTC AC	AGTCCGGGTCTGGTG CAGTTCGCC

4. 3. 4. 2. Detecção de AdV-B através de PCR do tipo Nested

A detecção do Adenovírus do tipo B foi feita também por meio de Nested-PCR, utilizando as sequências presentes na Tabela 5, como descritas por Allard, Albinsson e Wadell, 2001. A amplificação dos ácidos nucleicos foi realizada utilizando 5 µl de Buffer de PCR 10X, 3µl de MgCl₂, 1,25 µl de dNTPs, 0,25 µl de Platinum Taq DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific), 500 nM de cada primer, 6 µl de DNA extraído e 29,5 µl de H₂O, resultando em um volume final de 50 µl de mix para reação. As condições de ciclagem para a primeira reação incluíam uma desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, seguida por 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 s e 72 °C por 1 min, e por fim, uma extensão final por 5 min a 72 °C. A amplificação foi realizada em ciclador Veriti 96-well Thermal Cycler (ThermoFisher Scientific). Para a segunda reação, utilizou-se 4µl do produto de amplificação obtido na primeira reação com a mesma concentração de reagentes, com exceção de H₂O, da qual foram utilizados 31,5µl. As condições de amplificação foram as mesmas da primeira reação, com a distinção de que 40 ciclos foram aplicados. A visualização dos amplicons foi realizada utilizando-se gel de agarose 2% corada com GelRed e a visualização foi feita no ChemiDoc XRS+ empregando Image Lab Software (Bio-Rad). Todos os passos foram realizados em diferentes salas de laboratório, para evitar contaminação.

Tabela 5. Sequências de primers utilizados para detecção de Adenovírus do tipo B do em pacientes com transplante hematopoiético, por meio de PCR do tipo Nested.

Tipo de primer	Primers (5'-3')
hex1deg	GCCSCARTGGKWCWTACATGCACATC
hex2deg	CAGCACSCCICGRATGTCAAA
nehex3deg	GCCCGYGCMACIGAIACSTACTTC
nehex4deg	CCYACRGCCAGIGTRWAICGMRCYTTGTA

4. 4. Vírus emergentes detectados em pacientes de transplante hematopoiético

4. 4. 1. Detecção molecular de Torque teno vírus dos subtipos 3, 16, 19, 21 e 22 por meio de PCR em tempo real

A detecção dos cinco diferentes subtipos de Torque Teno vírus foi realizada separadamente, mas empregando o mesmo protocolo, e utilizando as sequências presentes na Tabela 5. Cabe ressaltar que estes vírus foram escolhidos seguindo a classificação taxonômica obtida a partir de análise metagenômica, de acordo com a qual foram os mais abundantes. A detecção dos subtipos 3, 16, 19, 21 e 22 de Torque Teno vírus foi realizada in-house, por meio do desenho de sequências de oligonucleotídeos. Os primers para cada dos cinco subtipos foram desenhados manualmente a partir das seguintes sequências de referência NC_014081.1 (TTV-3), NC_014091.1 (TTV-16), NC_014078.1 (TTV-19), NC_038341.1 (TTV-21) e NC_043415.1 (TTV-22), disponíveis no GenBank, em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Para o desenho dos oligonucleotídeos foi utilizado o software Oligoanalyzer (IDT), aplicando condições padrão. As posições aproximadas dos primers no genoma de cada subtipo, bem como suas características, estão presentes na tabela 6.

A reação foi realizada em volume final de 25 µl contendo os seguintes reagentes: 12,5 µl de TaqMan Buffer, 300 nM µl de Primer *Forward*, 300 nM de Primer reverso, 150 nM de sonda, 5 µl de DNA extraído de cada amostra e 4 µl de H₂O. A ciclagem foi feita em QuantStudio 6 (ThermoFisher Scientific), seguindo o seguinte protocolo: passo inicial de 50 °C por 2 minutos, desnaturação por 10

minutos a 95 °C, e 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C, seguido por etapa de anelamento/alongamento por 1 min a 60 °C.

Tabela 6. Sequências de primers utilizados para detecção de Torque Teno vírus dos tipos 3, 16, 19, 21 e 22

Subtipo viral	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Sonda (FAM-TAMRA)	Localização no genoma
TTV-3	CTTTGGCCAGGC	TGACCTGGGTGT	TTTCTCCAGTCCA	FP 2,443-2,462
	AGGTATTA	CTCTCTT	CAGACCCAAACG	RP 2,525 -2,543 Sonda 2,496-2,520
TTV-16	GGAACCCGGCAA	GGAAAGGTTGAG	TGCAACATTAAGG	FP 833-853
	TAGTTAAGA	GAGTGTAGTC	GCGGACTTCCA	RP 934-955 Sonda 856-879
TTV-19	CCGATAGACACC	TGATAGCTCCCTC	TGTTCCACTCCTT	FP 2,417-2,439
	CTAGAGGAATA	GCTAAGA	TGACTGGCGAA	RP 2,508-2,527 Sonda 2,477-2,500
TTV-21	CTCACGTAGCTG	CAGCGTGTACTTC	AACTTACCCATGT	FP 1,807-1,829
	CAGATGTATAA	AGATCCTAAT	GGGCCATGGTT	RP 1,888-1,910 Sonda 1,835-1,858
TTV-22	CTGTAGTGAGAC	TCTGTGTAGTCCT	CCCATTCTAATAT	FP 1,059-1,080
	GCTGCTTTAT	CGCTATGT	GCGGGCACACA	RP 1,141-1,161 Sonda 1,094-1, 117

4. 4. 2. Detecção molecular de Pegivirus humano do tipo 1 (HPgV-1)

4. 4. 2. 1. Detecção molecular de Pegivirus humano do tipo 1 (HPgV-1) por meio de PCR em tempo real

Para a detecção de HPgV-1 por PCR em tempo real, foi realizada reação incorporando transcrição reversa e amplificação utilizando o kit GoTaq 1 step RT PCR (Promega). O volume final dessa reação foi de 20 µl, sendo 4 µl de DNA proveniente das amostras dos pacientes, e 16 µl dos seguintes reagentes: 10 µl de GoTaq® RT-qPCR, 0,4 µl de GoScript™ Reverse Transcription System (transcriptase reversa), 400 nM de cada primer e 0,8 µl de sonda. A ciclagem foi feita em QuantStudio 6 Applied Biosystems (ThermoFisher Scientific) seguindo o seguinte protocolo: passo inicial de 40 °C por 40 minutos, desnaturação por 2 minutos a 95 °C, e 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C, seguido por etapa de anelamento/alongamento por 1 min a 60 °C. As sequências utilizadas nos primers e sonda, desenhadas por Chang et al., 2014, estão presentes na Tabela 7.

Tabela 7. Sequências de primers utilizados para detecção de Pegivírus humano do tipo 1 em pacientes com transplante hematopoiético.

Tipo viral	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (3'-5')	Sonda (FAM/TAMRA)	Localização no genoma
HPgV-1 (CHANG et al., 2014)	GGCGACCGGCCA AAA	CTTAAGACC CACCTATAGTGGC TAC	TGACCGGGATTTA CGACCTACCAAC CCT	FP 97-110 RP 164-188 Sonda 131-158

4. 4. 2. 2. Detecção de HPgV-1 por PCR do tipo Nested para genotipagem

Com a finalidade de genotipar as cepas do HPgV-1 que infectaram os pacientes com transplante hematopoiético, as amostras positivas para este vírus foram submetidas a amplificação da região hipervariável UTR, a qual é responsável pela classificação taxonômica deste agente viral. A amplificação ocorreu segundo o

protocolo descrito por MIAO et al., 2017. Primeiramente, foi necessária a realização do protocolo de transcrição reversa, como consta a seguir: 2µl de 10X RT Buffer, 0,8µl de dNTPs, 500 nM de Primer GUTRR01, 1µl de MultiScribe RT (ThermoFisher Scientific) e 5,2µl de H₂O, totalizando 10µl de mix de reação, ao qual foi adicionado 10 µl de DNA extraído (20 µl volume final). A amplificação do cDNA foi realizada utilizando 5µl de PCR Buffer 10X, 1,5 µl de MgCl₂, 1µl de dNTPs, 0,25 µl de Taq Polymerase (ThermoFisher Scientific), 400 nM de cada primer, 33,25µl de H₂O e 5 µl de cDNA (obtido por meio do passo de transcrição reversa), resultando em um volume final de 50µl de mix para reação. As condições de ciclagem para a primeira reação incluíam uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30s e 72°C por 1 min,e por fim, uma extensão final por 10 min a 72°C. A amplificação foi realizada em ciclador Veriti 96-well Thermal Cycler (ThermoFisher Scientific). Para a segunda reação, utilizou-se 1µl do produto de amplificação obtido na primeira reação com a mesma concentração de reagentes, com exceção de H₂O, da qual utilizou-se 37,25 µl. As condições de amplificação foram as mesmas da primeira reação, com a distinção de que 40 ciclos foram aplicados. A visualização dos amplicons foi realizada utilizando-se gel de agarose 2% corada com GelRed e a visualização foi feita no ChemiDoc XRS+ empregando Image Lab Software (Bio-Rad). Todos os passos foram realizados em diferentes salas de laboratório, para evitar contaminação.

4. 4. 2. 3. Sequenciamento das amostras positivas para HPgV-1

Os amplicons do HPgV-1 obtidos na reação Nested foram submetidos a sequenciamento. Para a realização do sequenciamento, foi realizado o seguinte protocolo: 2 µl de 5x Sequencing Buffer, 2 µl de BigDye™ Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific), ambos provenientes do BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific), 10 µM de Primer GUTRF2, 3 µl de H₂O e 2 µl do produto final da reação de PCR do tipo Nested-PCR para HPgV-1. As condições de amplificação foram: um ciclo de desnaturação a 95°C por 1 minuto, seguido por 25 ciclos de 95°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos.

4. 4. 2. 4. Análise filogenética para genotipagem de HPgV-1

A análise filogenética foi realizada utilizando-se um *dataset* de genomas completos, os quais foram obtidos do banco de dados do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), e os genomas de referência utilizados foram retirados de Slavov et al., 2019, sendo eles: AB003291, AB008236, AB013500, U36380, D90600, U45966, AF104403, AF121950, AX309966, AF081782, D87255, U44402, NCO001710, AY196904, AB003289, AF031828, AF031827, U63715, AB003293, D87708, D87714, AB008335, D87712, AB008342, D87263, D87262, AF006500, U94695, D90601, D87709, AB003290, D87711, D87713, AB003288, D87710, D87715, DH019, DH021, AB021287, AB018667, AY949771, AB003292, DH028, KY111, KY101, DL185, KY117, KY129. O alinhamento desses genomas com as sequências obtidas neste estudo foi realizado utilizando o algoritmo CLUSTALX do programa MEGA-X. A árvore filogenética foi reconstruída seguindo o algoritmo Neighbour-Joining (NJ) com modelo de substituição nucleotídica *Kimura-2-parameter* e teste de suporte estatístico de 1000 réplicas também utilizando o programa MEGA-X. A árvore filogenética resultante foi visualizada e editada com o software FigTree v.1.4.4.

4. 4. 3. Detecção de Gemycircularvirus SL3 por meio de Nested-PCR

A detecção para Gemycircularvirus SL3 foi realizada por meio de Nested-PCR, com primers confeccionados *in house*, cujas sequências foram baseadas no genoma de referência KP133077.1, disponível no GenBank em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. As posições aproximadas dos primers no genoma, bem como suas características, estão presentes na tabela 8. A amplificação dos ácidos nucleicos foi realizada por meio do seguinte protocolo: 5 µl de PCR Buffer 10X, 2 µl de MgCl₂, 1µl de dNTPs, 0,25 µl de Taq Polymerase (ThermoFisher Scientific), 400 nM de cada primer, 32,75 µl de H₂O e 5 µl de DNA extraído, resultando em um volume final de 50 µl. Para essa primeira reação, as condições de ciclagem foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30s e 72°C por 1 min, e por fim, uma extensão final por 10 min a 72°C. Para a segunda reação, foram utilizados 2 µl do produto final

obtido na primeira reação em conjunto com a mesma concentração de reagentes da primeira reação, com exceção de H₂O, da qual foram utilizados 35,75 µl. As condições de amplificação foram as mesmas da primeira reação, com a distinção de que 40 ciclos foram aplicados. As amplificações foram realizadas em ciclador Veriti 96-well Thermal Cycler (ThermoFisher Scientific). A visualização dos amplicons foi realizada utilizando-se gel de agarose 1% corada com GelRed e a visualização foi feita no ChemiDoc XRS+ empregando Image Lab Software (Bio-Rad). Todos os passos foram realizados em diferentes salas de laboratório, para evitar contaminação.

Tabela 8. Sequências utilizadas para detecção de Gemycircularvirus SL3 no plasma de pacientes com transplante hematopoiético.

Tipo de primer	Sequência (5'-3')
GYC1F	CCTGCCACAATGTCACCATC
GYC1R	AACTCGACCCCTGGAAAGTT
GYC2F	ATAGTCGAAGCCCTCACGTG
GYC2R	ATCACCTTGGAGAACTTCGAG

5. RESULTADOS

5.1. Vírus de relevância clínica em pacientes de transplante hematopoiético

5.1.1. Confirmação por PCR em tempo real e prevalência de CMV

A PCR em tempo-real para Citomegalovírus (CMV) demonstrou resultado positivo em 13 amostras (advindas de 13 pacientes), originárias dos dois centros de transplante hematopoiético. O Ct ("Cycle threshold", também chamado de limiar de ciclo) mais baixo (e portanto, significando carga viral mais alta) foi de 26,749, advindo da segunda coleta (realizada 30 dias após o transplante) do paciente 18 de Ribeirão Preto.

Em relação às outras amostras positivas do Centro de Transplantes do HC de Ribeirão Preto, houve 5 amostras positivas, todas de pacientes distintos (pacientes 3, 5, 9, 10, 19 e 21). Somente a supracitada amostra positiva do paciente 18 era de uma coleta pré-transplante, e apresentou Ct relativamente baixo (26,749), caracterizado, portanto, pela carga viral alta. Por outro lado, os pacientes 3, 5, 19 e 21 tiveram como positivas suas segundas amostras (30 dias pós-transplante), com Cts de 39,062, 38,826, 38,653 e 35,574, respectivamente. Entretanto, os pacientes 3 e 19 vieram a óbito antes de suas terceiras coletas (100 dias após o transplante), não estando disponíveis então tais amostras.

Entre os pacientes de Jaú dos quais estavam disponíveis as três amostras (6, 8, 9 e 11), somente a segunda coleta foi positiva (com Cts de 35,049, 35,426, 39,050 e 39,006, respectivamente). As demais amostras positivas dessa cidade (dos pacientes 3 e 4) eram as últimas disponíveis daqueles indivíduos, sendo que a do paciente 3 era originária da segunda coleta (30 dias, com Ct de 38,506), enquanto a do paciente 4 era oriunda da terceira coleta (100 dias, com Ct de 35,974). Todas as amostras desses pacientes foram caracterizadas com Cts altos, ou seja carga viral provavelmente muito baixa.

13 pacientes (n=13/32 ou 40,625% do total) tiveram PCR positiva para CMV, sendo que 6 desses pacientes eram do hospital Amaral Carvalho (n=6/12 ou 50% entre pacientes de Jaú) e 7 pacientes eram oriundos do Hospital das Clínicas de

Ribeirão Preto (n=7/20 ou 35% de incidência no hospital de Ribeirão Preto). 11/13 dos pacientes, ou 82,61%, tinham amostras das três coletas disponíveis. Os demais pacientes, 2/13 ($\approx 15,4\%$), dos quais somente duas coletas foram obtidas, tiveram somente sua segunda coleta positiva para CMV. Ademais, todos os 13 tiveram resultado positivo em somente uma das coletas disponíveis, seja ela pré-transplante (1/13 ou $\approx 7,7\%$), 30 dias após o transplante (9/13 ou $\approx 69,2\%$) ou 100 dias após o transplante (3/13 ou $\approx 23\%$). Por fim, entre esses 13 indivíduos, a incidência de doenças de base era a seguinte: 4/13 ($\approx 30,8\%$) de anemia aplástica grave, 3/13 ($\approx 23\%$) de leucemia mielóide aguda, 3/13 ($\approx 23\%$) de leucemia linfoblástica aguda, 1/13 ($\approx 7,7\%$) de leucemia mielóide crônica, 1/13 ($\approx 7,7\%$) de síndrome mielodisplásica e 1/13 ($\approx 7,7\%$) de leucemia aguda de fenótipo misto. Ademais, os tipos de transplante a que os indivíduos foram submetidos eram: 5/13 ($\approx 38,5\%$) de transplante haploide, 4/13 ($\approx 30,8\%$) de alogênico aparentado e 3/13 ($\approx 23\%$) de alogênico não-aparentado. Por fim, 10/13 ($\approx 76,9\%$) era do sexo masculino, enquanto 3/13 ($\approx 23\%$) dos pacientes era do sexo feminino, e a média de idade desses 13 indivíduos era de 26,77 anos (idades entre 6 e 66 anos).

Tabela 9. Pacientes do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto com Cts positivas para CMV.

Paciente (Ribeirão Preto)	Ct da 1ª coleta (pré-transplante)	Ct da 2ª coleta (30 dias após transplante)	Ct da 3ª coleta (100 dias após o transplante)
3	-	39,062	†
5	-	38,653	-
9	-	-	38,735
10	-	-	38,826
18	26,749	-	-
19	-	38,653	†
21	-	35,575	-

Tabela 10. Pacientes do Hospital do Hospital Amaral Carvalho de Jaú com Cts positivas para CMV.

Paciente (Jaú)	Ct da 1ª coleta (pré-transplante)	Ct da 2ª coleta (30 dias após transplante)	Ct da 3ª coleta (100 dias após o transplante)
3	-	38,506	†
4	-	-	35,974
6	-	35,049	-
8	-	35,426	-
9	-	39,050	-
11	-	39,006	-

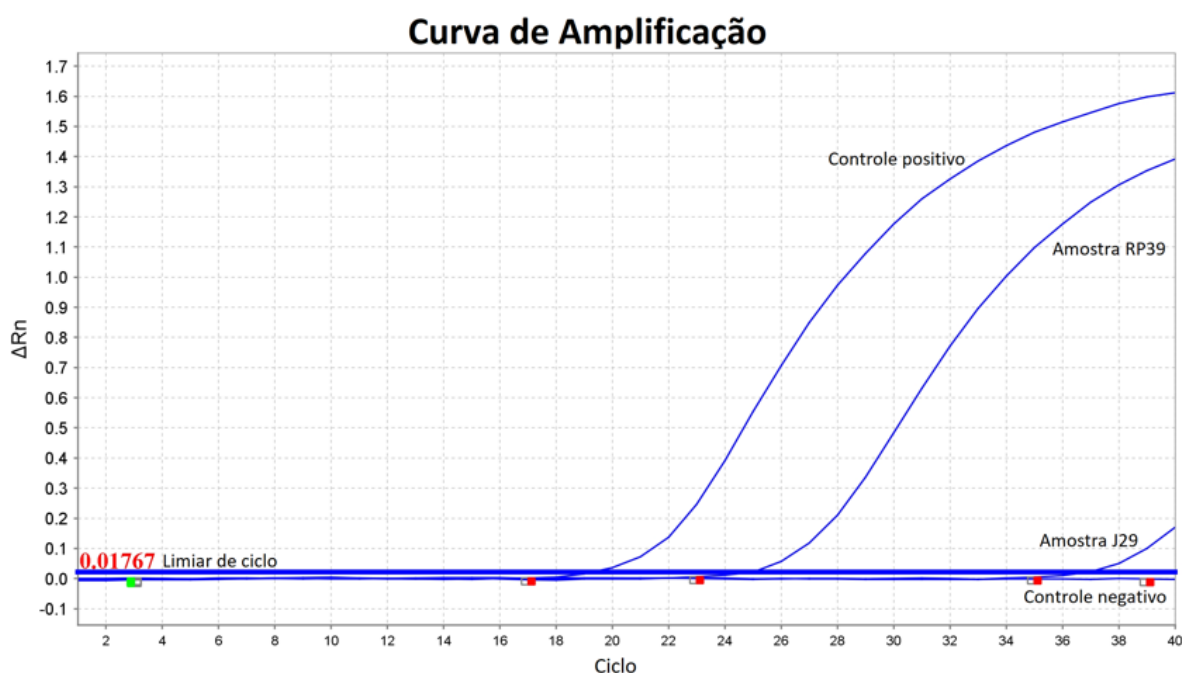


Figura 3. Amplificação de citomegalovírus (CMV) em três amostras distintas: a primeira curva (da esquerda para a direita) representa a amplificação do controle positivo, cujo CT é 21,490; a segunda curva representa a amplificação da 1ª amostra do paciente 18 (antes do transplante), do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (CT de 26.749); a terceira curva indica a amplificação da 2ª amostra do paciente 11 do Hospital Amaral Carvalho de Jaú (CT de 39,006); por fim, a linha abaixo do threshold representa a amplificação do controle negativo (não houve aumento da fluorescência)

5.1.2. Confirmação por PCR em tempo real e prevalência para HHV-6

De acordo com a PCR em tempo real realizada para esse tipo de vírus, 3 amostras foram positivas. Duas destas amostras pertenciam ao paciente 5 de Jaú e foram coletadas no período de 30 e 100 dias. A outra amostra era da segunda coleta do paciente 4, também da cidade de Jaú, e foi obtida 30 dias após o transplante.

Dois pacientes (n=2/32 ou 6,25% do total) tiveram PCR positiva para HHV-6, sendo que os 2 pacientes eram do hospital Amaral Carvalho (n=2/12 ou 16,66% do total de indivíduos advindos hospital). Ambos os pacientes tinham amostras das três coletas disponíveis, e ambos também tiveram suas amostras de segunda coleta (30 dias pós-transplante) positivas, enquanto somente um dos pacientes (paciente 5) continuou apresentando resultado positivo 100 dias após o transplante. Além disso, entre esses 2 indivíduos, a incidência de doenças de base era de 100% (2/2) de síndrome mielodisplásica. Ademais, os tipos de transplante a que os indivíduos foram submetidos era: 50% ($\frac{1}{2}$) de transplante haploidêntico e 50% ($\frac{1}{2}$) de alogênico não-aparentado. Por fim, 100% (2/2) dos pacientes era do sexo masculino, e a média de idade desses indivíduos era de 25 anos (idades entre 11 e 39 anos).

Tabela 11. Pacientes com Cts positivas para HHV-6.

Paciente (Jaú)	Ct da 1ª coleta (pré-transplante)	Ct da 2ª coleta (30 dias após transplante)	Ct da 3ª coleta (100 dias após o transplante)
4	-	38,911	-
5	-	33,842	34,818

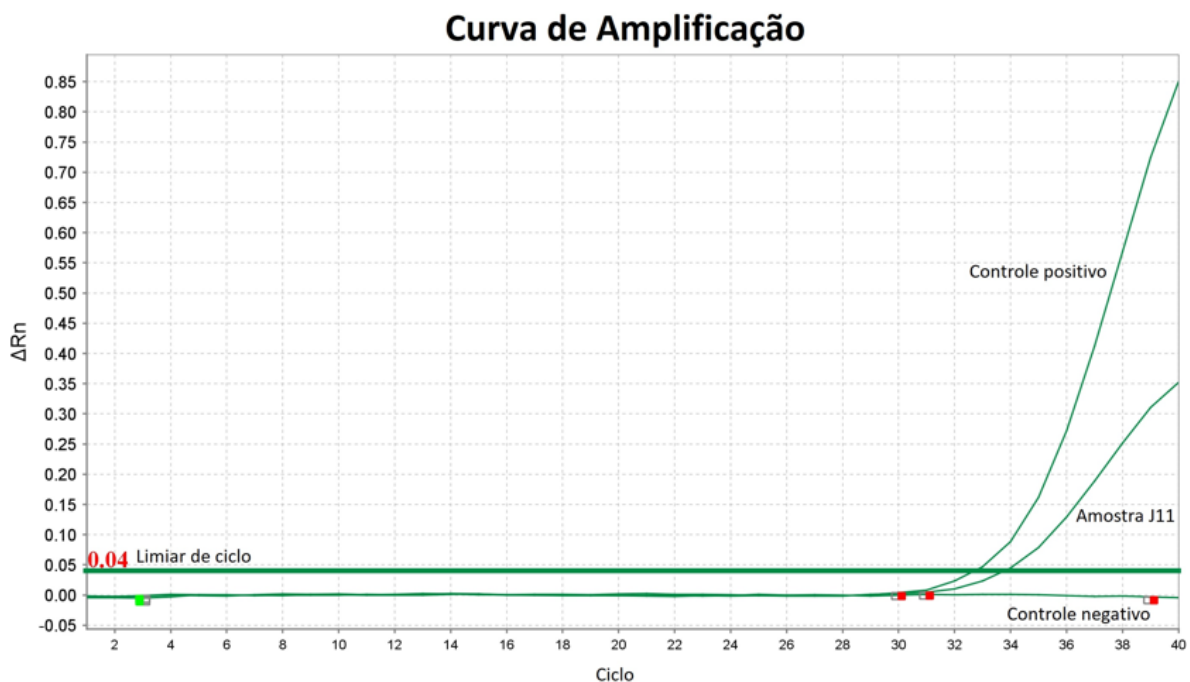


Figura 4. Amplificação de amostra positiva para herpesvírus humano do tipo 6 (HHV-6) do paciente 5, de Jaú (Ct de 33,842) (30 dias após o procedimento de transplante).

5.1.3. Confirmação por PCR em tempo real e prevalência de EBV

Na triagem para EBV, apenas uma amostra demonstrou resultado positivo, com Ct de 38,307. Tal amostra foi coletada 100 dias após a realização do transplante, e é oriunda do paciente 18, de Ribeirão Preto. Tratava-se de um indivíduo do sexo feminino, de 60 anos (nas duas primeiras coletas) e posteriormente 61 anos (no momento da terceira coleta), submetido a transplante alogênico aparentado e cuja doença base era a Anemia Aplástica Grave.

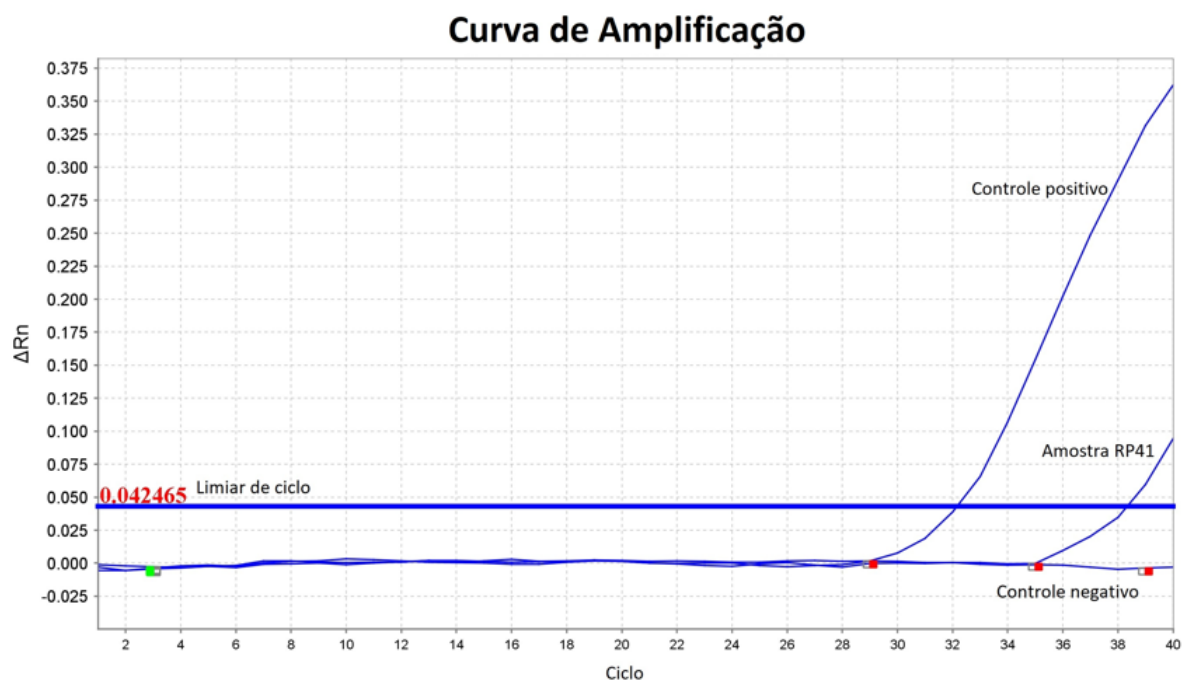


Figura 5. Amplificação da 3ª amostra do paciente 18, de Ribeirão Preto, para o vírus Epstein-Barr (Ct de 38,31).

5.1.4. Detecção de Adenovírus do tipo B

5.1.4.1. Detecção de AdV do tipo B por meio de PCR em tempo real

Nas análises metagenômicas, foi detectado um pool contendo sequências de Adenovírus do tipo B. Com a finalidade de confirmar esta infecção em plasma, por se tratar de uma situação clínica relativamente rara (SANDKOVSKY; VARGAS; FLORESCU, 2014; MUÑOZ-COBO et al., 2011) em relação às infecções por CMV, HHV-6 e EBV, foi feita PCR em tempo real e convencional para este agente viral. Na abertura do pool de amostras submetido à análise metagenômica, apenas uma amostra foi positiva, proveniente do paciente 19 de Ribeirão Preto. Na triagem para adenovírus do tipo B por meio de PCR em tempo real, somente uma amostra foi considerada positiva, tendo Ct de 31,469. Essa amostra foi coletada 30 dias após o transplante hematopoiético, sendo também a última amostra disponível do paciente 19 de Ribeirão Preto. Tal indivíduo era do sexo masculino e estava então com 66 anos de idade, tendo sido submetido a transplante haploidêntico, e sua doença de base era a Leucemia Mielóide Aguda.

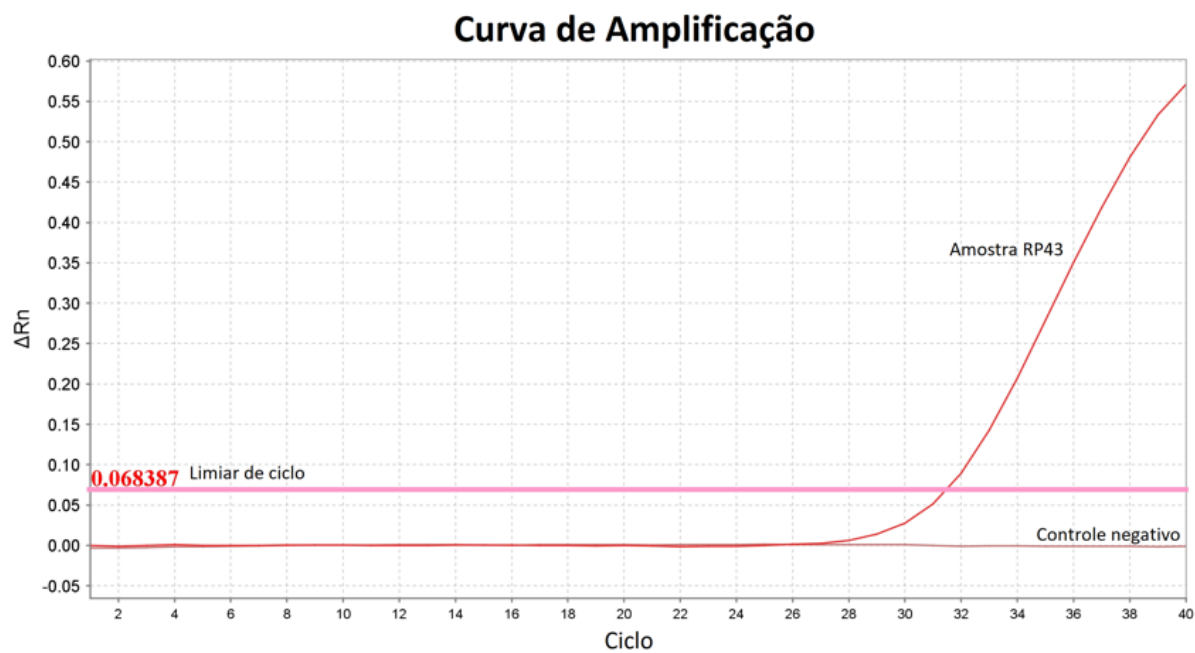


Figura 6. Em vermelho, está a curva de amplificação da 2ª amostra do paciente 19 de Ribeirão Preto (Ct de 31,469). A outra linha presente, em roxo, indica o branco para controle de contaminação durante a amplificação.

5.1.4.2. Nested-PCR para Adenovírus do tipo B

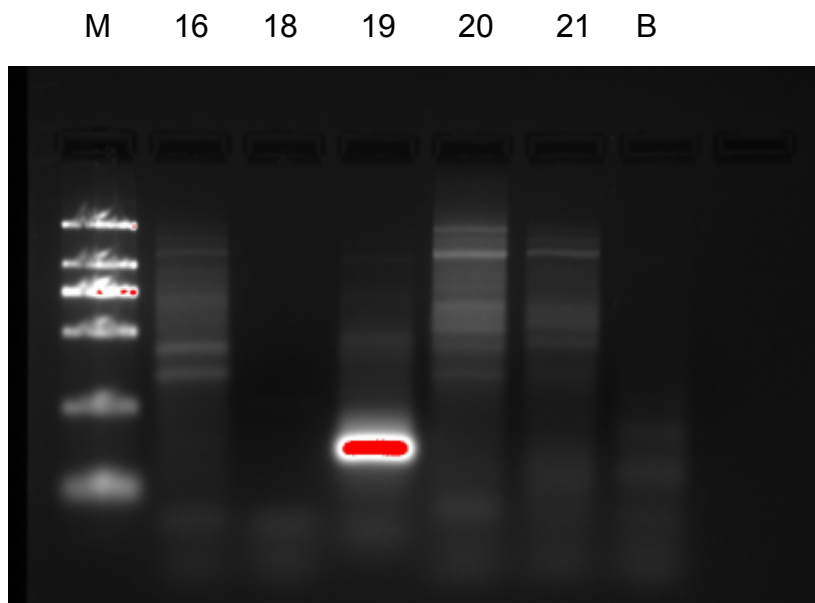


Figura 7. Gel de eletroforese dos amplicons positivos para Adenovírus obtidos através da amplificação com primers gênero-específicos para os adenovírus. Identificação: M: marcador de peso molecular; B: amostra em branco; 16, 18, 19, 20 e 21: amostras de diferentes pacientes submetidos a transplante hematopoiético no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Apenas a amostra do paciente 19 foi positiva.

5.2. Vírus comensais identificados em pacientes com transplante hematopoiético

5.2.1. PCR em tempo real para Torque Teno vírus

Foram desenhados *in house* primers e sondas para cinco tipos de TTV. No entanto, quando aplicados para os tipos 3, 19, 21 e 22, todas as amostras foram negativas. O único tipo TTV que resultou em positivos foi o TTV -16 em quatro pacientes, um de Ribeirão Preto e três de Jaú. Com a exceção do Ct do paciente 10 de Jaú, em todos os casos os valores foram correlacionados com cargas baixas. Tal amostra do paciente 10 de Jaú mostrou uma carga mais alta, provavelmente devido ao fato que a coleta foi realizada nos primeiros 30 dias após o transplante, período

em que a reativação de vírus comensais é comum, devido às alterações imunológicas pós-transplante (MAGGI, 2010).

4 pacientes (n=4/32 ou 12,5% do total) tiveram PCR positiva para TTV-16, sendo que na avaliação por localidade, 3 pacientes eram do hospital Amaral Carvalho (n=3/12 ou 25% do total de pacientes analisados naquele hospital) e 1 paciente era oriundo do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (n=1/20 ou 5% de incidência em Ribeirão Preto). Todos os pacientes (4/4 ou 100%) tinham amostras das três coletas disponíveis, e somente uma delas foi positiva, sendo que 2 das amostras positivas (2/4 ou 50%) eram da coleta pré-transplante, 1 (1/4 ou 25%) era da coleta 30 dias após o transplante e 1 (1/4 ou 25%) era proveniente da coleta 100 dias após o transplante. Além disso, entre esses 4 indivíduos, a incidência de doenças de base era a seguinte: 25% (1/4) de leucemia mielóide crônica, 25% (1/4) de leucemia mielóide aguda, 25% (1/4) de leucemia linfoblástica aguda e 25% (1/4) de aplasia de medula óssea. Ademais, 100% (4/4) dos pacientes foram submetidos a transplante do tipo alogênico aparentado. Além disso, 75% (3/4) dos pacientes era do sexo masculino, enquanto 25% (1/4) era do sexo feminino, e a média de idade desses indivíduos era de 25,5 anos (idades entre 8 e 59 anos).

Tabela 12. Pacientes com Cts positivas para TTV-16.

Paciente	Ct da 1ª coleta (pré-transplante)	Ct da 2ª coleta (30 dias após transplante)	Ct da 3ª coleta (100 dias após o transplante)
Paciente 9, de Ribeirão Preto	-	-	35,288
Paciente 9, de Jaú	34,455	-	-
Paciente 10, de Jaú	-	27,745	-
Paciente 11, de Jaú	38,594	-	-

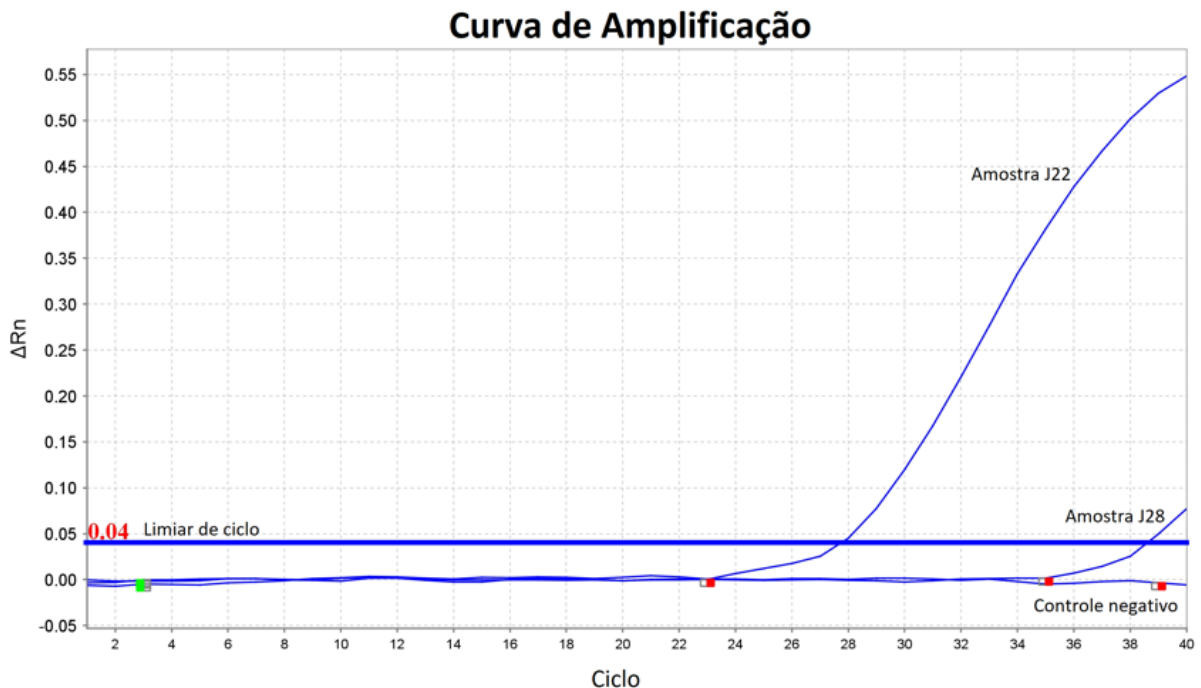


Figura 8. Amplificação do TTV-16. A primeira curva (da esquerda para a direita) representa a amplificação da 1ª amostra do paciente 9 de Jaú, Ct de 27,745. A segunda curva indica a amplificação da 1ª amostra do paciente 11 de Jaú (Ct de 38,594). A terceira curva indica o controle negativo (Branco), para o qual não houve amplificação.

5.2.1.1. Pegivírus Humano do tipo 1

Com a finalidade de avaliar os genótipos do HPgV-1 circulando entre pacientes com transplante hematopoiético, bem como possíveis reinfecções, foi realizada a amplificação da região hipervariável UTR em todas as amostras positivas para HPgV-1. Em seguida, a mesma foi submetida a sequenciamento. Esta região é utilizada para a classificação taxonômica dos genótipos 1 a 7 do HPgV-1. Das 82 amostras testadas, 33 demonstraram resultado positivo.

5.2.1.2. PCR em tempo real para Pegivírus Humano do tipo 1 e sua prevalência

Entre os vírus avaliados por RT-PCR, a detecção de HPgV-1 foi a mais frequente. Ao mesmo tempo, este vírus foi da mesma maneira detectado em quase

todos os as amostras por meio de metagenômica, o que tem correlação positiva com a detecção por meio de PCR.

No total, 18 pacientes (n=18/32 ou 56,25% do total) tiveram PCR positiva para HPgV-1, sendo que na avaliação por localidade, 9 pacientes eram do hospital Amaral Carvalho (n=9/12 ou 75% do total de pacientes analisados naquele hospital) e 9 pacientes eram oriundos do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (n=9/20 ou 45% de incidência em Ribeirão Preto). Além disso, entre esses 18 indivíduos, a incidência de doenças de base era a seguinte: 5/18 ($\cong 27,8\%$) de anemia aplástica grave, 5/18 ($\cong 27,8\%$) de leucemia mielóide aguda, 4/18 ($\cong 22,2\%$) de leucemia linfoblástica aguda, 2/18 ($\cong 11,1\%$) de leucemia aguda de fenótipo misto, 1/18 (5,5%) de mielofibrose primária e 1/18 ($\cong 5,55\%$) de síndrome mielodisplásica. Ademais, os tipos de transplante a que os indivíduos foram submetidos eram: 10/18 ou 55,55% de alogênico aparentado, 5/18 ou $\cong 27,8\%$ de transplante haploidêntico e, por fim, 3/18 ou 16,66% de alogênico não aparentado. Por último, 13/18 ou $\cong 72,22\%$ era do sexo masculino, enquanto 5/18 ou $\cong 27,8\%$ dos pacientes era do sexo feminino, e a média de idade desses 18 indivíduos era de $\cong 31,17$ anos (idades entre 6 e 66 anos).

Isso resultou em maior número de amostras positivas: 32 no total, sendo 17 da cidade de Ribeirão Preto e 15 de Jaú, e advindas de 18 indivíduos distintos. 5 indivíduos tiveram três amostras positivas: pacientes 10, 11, 16 e 21 de Ribeirão Preto, e os pacientes 8 e 9 de Jaú. Ademais, um indivíduo, paciente 2 de Ribeirão Preto, teve sua única amostra (pré-transplante) como positiva para HPgV-1. Os pacientes positivos, assim como os Cts de amplificação estão mostrados na tabela 13.

Curiosamente, todos os quatro pacientes de Ribeirão Preto cuja totalidade de amostras foi positiva para HPgV-1 (pacientes 10, 11, 16 e 21) possuíam a mesma patologia: anemia aplástica grave. Por outro lado, os pacientes de Jaú que também foram positivos para todas as coletas apresentavam outras doenças de base (paciente 8 possuía leucemia aguda de fenótipo misto, enquanto o paciente 9 apresentava leucemia aguda grave).

Tabela 13. Pacientes que tiveram amostras com Cts positivas para HPgV-1.

Paciente	Ct da 1ª coleta (pré-transplante)	Ct da 2ª coleta (30 dias após transplante)	Ct da 3ª coleta (100 dias após o transplante)	Identificação na Figura 10
2, de Ribeirão Preto	33,349	†	†	1
3, de Ribeirão Preto	-	33,183	†	2
4, de Ribeirão Preto	31,700	-	-	3
7, de Ribeirão Preto	-	31,604	†	4
10, de Ribeirão Preto	31,916	28,922	23,863	5, 6 e 7
11, de Ribeirão Preto	27,673	29,841	24,629	8, 9 e 10
16, de Ribeirão Preto	32,919	28,366	31,970	11, 12 e 13
20, de Ribeirão Preto	22,599	-	-	14
21, de Ribeirão Preto	29,517	31,970	29,599	15, 16 e 17
3, de Jaú	31,258	35,377	†	18 e 19
5, de Jaú	35,555	-	-	20
6, de Jaú	32,015	28,167	-	21 e 22
7, de Jaú	-	-	30,929	23
8, de Jaú	27,835	31,994	29,202	24, 25 e 26
9, de Jaú	25,651	28,232	26,189	27, 28 e 29
10, de Jaú	36,581	-	-	30
11, de Jaú	38,881	-	-	31
12, de Jaú	-	32,322	25,804	32 e 33

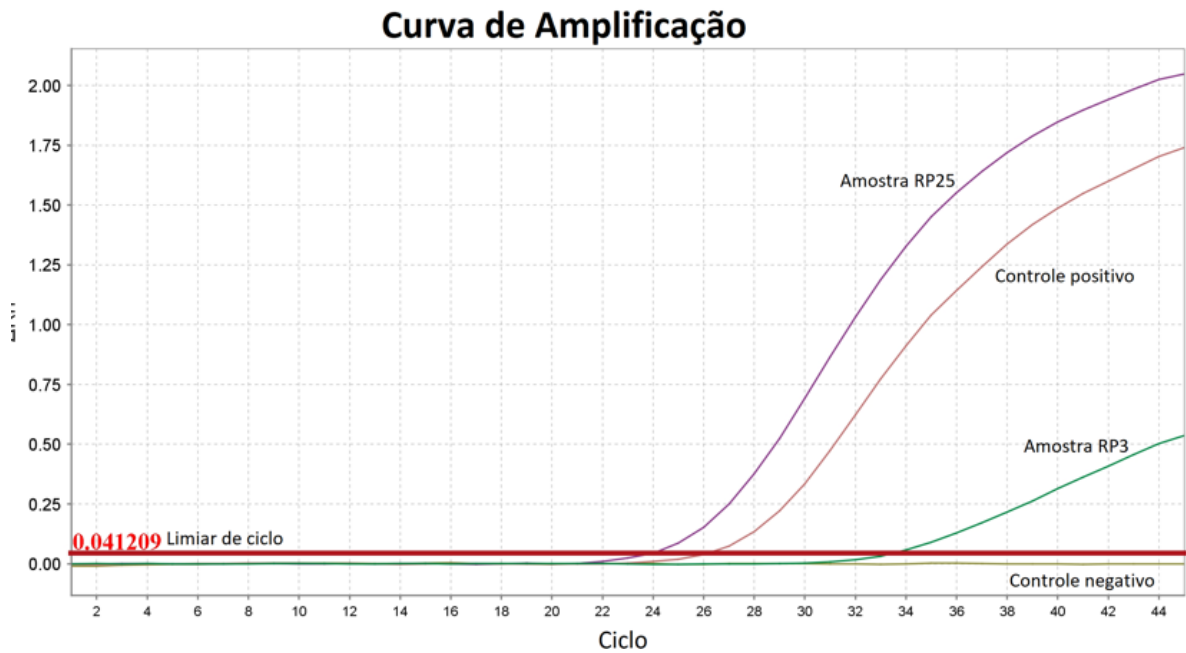


Figura 9. Amplificação de Pegivírus humano do tipo 1 (HPgV-1) em alguns pacientes submetidos ao transplante hematopoiético. Legenda: em verde, está a 1ª coleta (antes do procedimento de transplante) do paciente 2 de Ribeirão Preto (Ct de 33,349); em roxo, há amostra de 3ª coleta do paciente 11 (100 dias após o transplante) de Ribeirão Preto (Ct de 24,629); em rosa, amostra de controle positivo (Ct de 26,104); e em marrom, uma amostra do controle negativo.

5.2.1.3. Nested-PCR para Pegivírus Humano do tipo 1

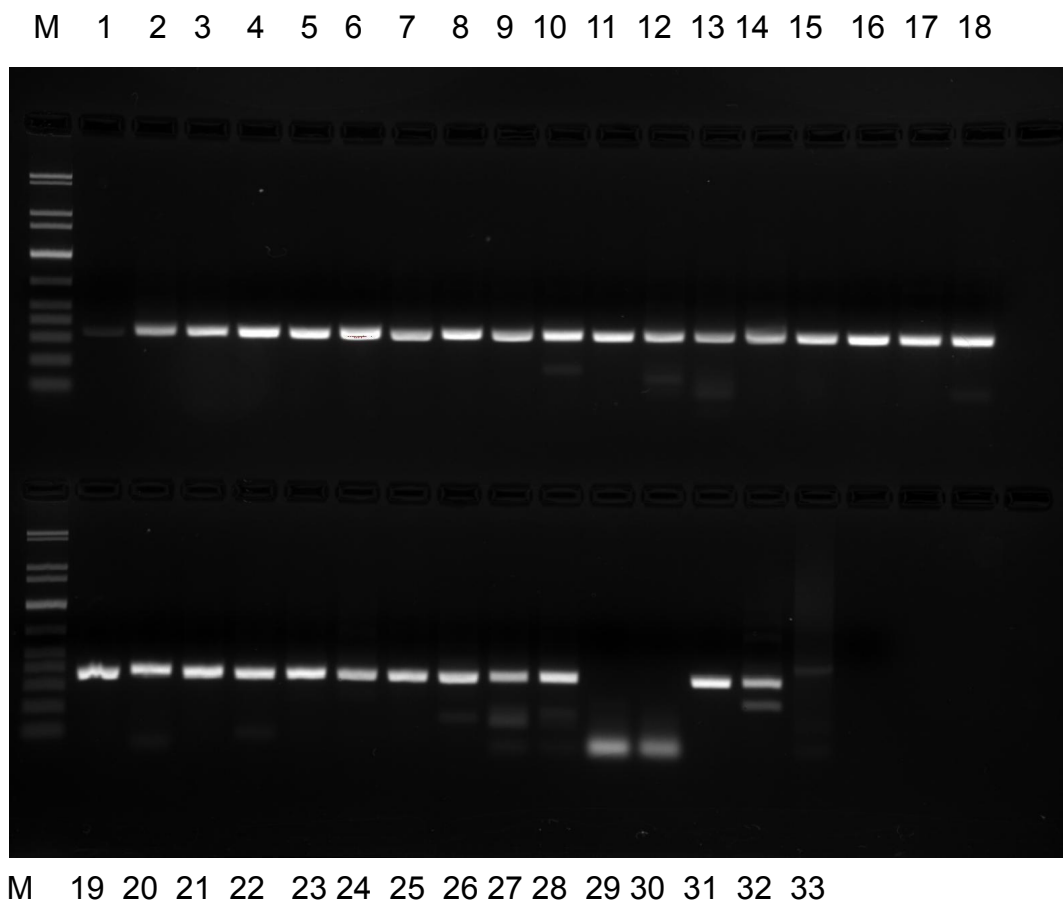


Figura 10. Amplificação de todas as amostras positivas para Pegivírus humano do tipo 1 (HPgV-1) com primers para genotipagem obtidos da literatura (Miao et al., 2017). Como nesse passo utilizamos apenas amostras positivas para RNA de HPgV-1 não foi necessário a adição de controle positivo. Identificação: M: marcador de peso molecular; as amostras representadas por cada número estão indicadas na tabela 13.

5.2.1.4. Análise filogenética de HPgV-1

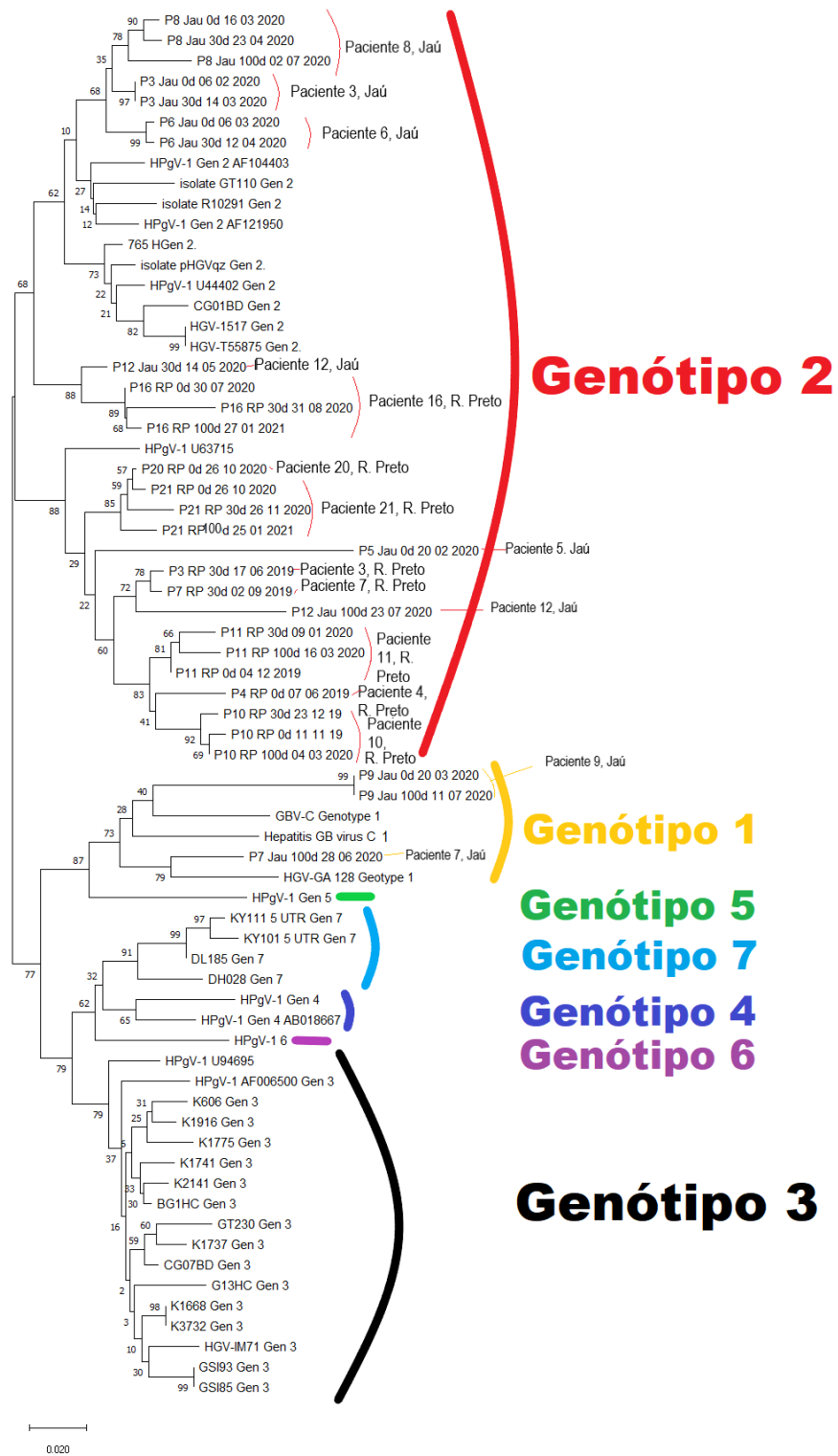


Figura 12. Árvore filogenética para análise dos genótipos de Pegivírus humano do tipo 1 circulantes em pacientes submetidos a transplante de medula óssea. A árvore foi reconstituída utilizando 48 genomas completos de referência de HPgV-1 obtidos do GenBank e o método foi o Neighbour-Joining (NJ) com modelo de substituição nucleotídica Kimura-2-parameter. Como teste de confiabilidade, utilizou-se o suporte bootstrap com 1,000 réplicas. A maioria das sequências pertencia ao genótipo 2, enquanto apenas sequências de dois pacientes pertenciam ao genótipo 1.

5.2.2. Nested-PCR para Detecção de Gemycircularvirus SL3

Foi realizada Nested-PCR para GYC SL3 para todas as 82 amostras de plasma disponíveis. Contudo, nenhuma das amostras foi positiva.

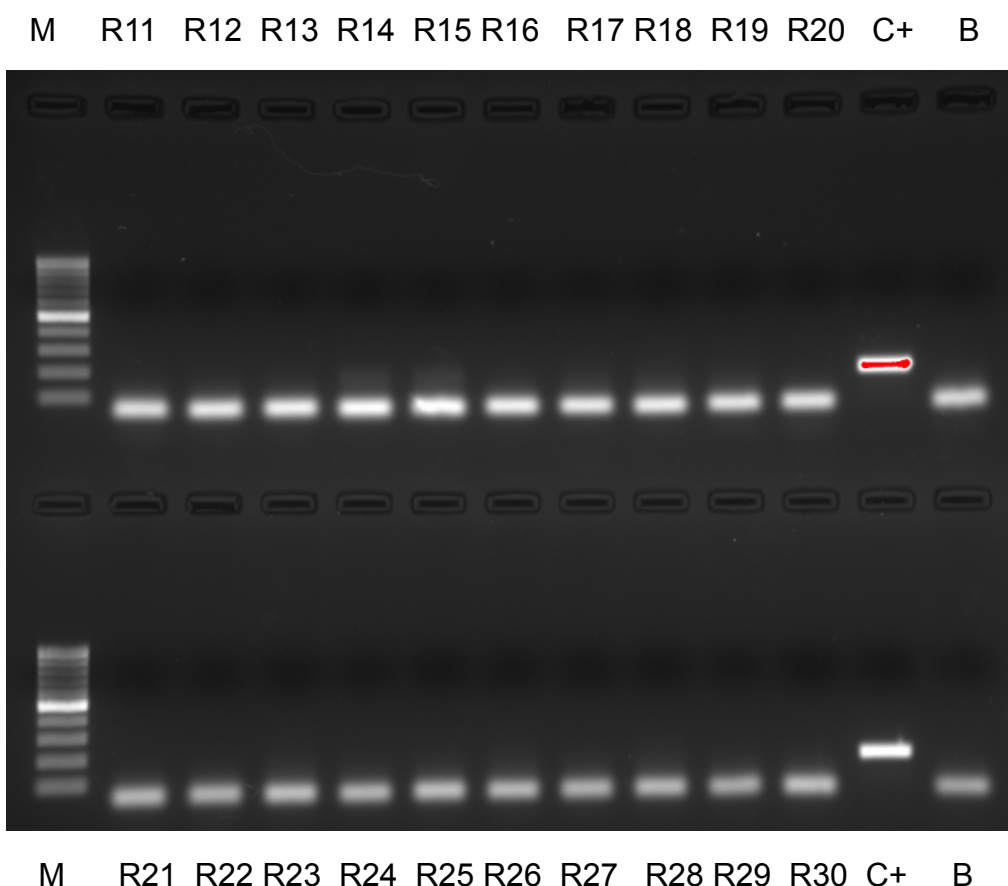


Figura 13. Amplificação de 20 amostras de pacientes de transplante hematopoiético para Gemycircularvirus SL3. Legenda: M: marcador; C+: controle positivo; B:

controle contra contaminação de amostras; R11 a R30: amostras de pacientes de Ribeirão Preto.

6. DISCUSSÃO

As infecções virais que acometem pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas podem possuir impacto clínico conhecido, como as infecções por *herpesvirus* CMV, HHV-6, EBV e AdV (ROVIRA; MENSA; CARRERAS, 2012; TOMBLYN et al., 2009), ou ainda desconhecido, como as infecções por vírus comensais. Devido ao estado de imunossupressão apresentado pelo paciente no período após o transplante hematopoiético, que pode durar até 24 meses caso não haja complicações (DYKEWICZ; JAFFE; KAPLAN, 2000), o paciente está suscetível a infecções por diferentes agentes, inclusive os virais. Contudo, apesar das infecções representarem até 21% das causas de óbito em pacientes submetidos ao transplante hematopoiético nos primeiros 100 dias após o procedimento (AULETTA et al., 2021), frequentemente a causa da infecção é desconhecida (STYCZYŃSKI et al., 2020). Assim, a metagenômica viral, que pode detectar todos os genomas presentes em amostras clínicas (HOULDCROFT: BEALE: BREUER, 2017), apresenta-se como uma ferramenta poderosa para averiguação de infecções desconhecidas ou pouco caracterizadas em pacientes com transplante (FOCOSI et al., 2016). Apesar de que a metagenômica seja um meio de diagnóstico viral em casos complexos, os estudos que envolvem a análise de metagenoma tem diversos desafios, o principal dos quais é a contaminação por múltiplos agentes virais (principalmente oriundos de kits de preparo de amostras), presença de artefatos ou sequências incoerentes que podem levar a uma dificuldade na interpretação (SIMNER e SALZBERG, 2022). Por fim, a metagenômica identifica apenas sequências genéticas sem sequer dar informações sobre quaisquer características dessas infecções, como cargas virais (HOULDCROFT: BEALE: BREUER, 2017), que apresentam suma importância tanto para o tratamento dos pacientes bem como para o manejo clínico dos mesmos.

Portanto, a presença de infecções virais precisa ser confirmada com métodos alternativos, sendo o teste por PCR o padrão ouro (ANNALORO et al., 2021; TRELEAVEN e BARRETT, 2008). Dessa forma, a confirmação molecular através de PCR pode auxiliar na compreensão do contexto em que infecções virais acometem pacientes de TMO, e essas informações futuramente podem auxiliar na busca por melhores estratégias terapêuticas e de prevenção.

A metagenômica viral previamente conduzida em pacientes com transplante hematopoiético em dois centros brasileiros (em Ribeirão Preto e em Jaú) revelou a presença de vírus patogênicos e comensais. No entanto, como o sequenciamento foi realizado em *pools* de amostras de plasma, que reúnem várias amostras e de pacientes distintos, não ficava claro a distribuição destes vírus nessa população, bem como as características virais. Por este motivo, a realização deste trabalho teve papel fundamental para caracterizar as infecções nesses pacientes e possivelmente, no futuro, buscar alternativas para o manejo dos mesmos. Dos vírus patogênicos (ou condicionalmente patogênicos) foram encontrados CMV em maior abundância, mas também EBV, HHV-6 e Adenovírus do tipo B. Dos vírus comensais apontados na análise bioinformática, foram diagnosticados diversos Torque-teno vírus (TTV) e HPgV-1.

A prevalência de infecção por CMV foi de 40,625% no total, ou seja, 13/32 dos pacientes tiveram resultado de PCR positivo para esse vírus em algum momento (desde o pré-transplante até 100 dias após o transplante hematopoiético). As infecções foram também caracterizadas com Cts bastante diversos (algumas com cargas virais mais altas), mas na maioria dos casos (12/13) a infecção foi caracterizada por cargas baixas (média de 37,762). Esta observação demonstra que o CMV é o vírus de impacto clínico bem estabelecido de maior taxa de reativação em pacientes com transplante, visto que foi detectado na maioria dos casos. A soroprevalência de CMV no mundo é bastante alta, variando entre 40% a 80%, porém a porcentagem varia de acordo com o país/localidade (ROVIRA; MENSA; CARRERAS, 2012; ANNALORO et al., 2021). Uma das principais questões em relação ao CMV no transplante hematopoiético é a incompatibilidade sorológica entre doador e receptor (ZUHAIR et al., 2019), uma vez que a infecção por CMV está associada a um pior prognóstico pós-transplante (ROVIRA; MENSA; CARRERAS, 2012). Porém, a maioria dos casos (90%) de infecção por CMV pós-transplante é de origem do próprio receptor (LJUNGMAN et al., 2003). A reativação de CMV frequentemente ocorre no período de até 100 dias após o transplante (LUGTHART et al., 2014; TEY et al., 2013), o que foi observado nos pacientes de Ribeirão Preto e Jaú, uma vez 9/13 ou ≈69,23% dos pacientes que tiveram PCR positiva para CMV o tiveram somente na amostras coletada 30 dias

após o transplante. Dessa forma, na maioria das ocasiões CMV foi detectado após transplante e já não era detectável no plasma 100 dias após o procedimento, o que provavelmente indica a recuperação do sistema imune dos pacientes (ANNALORO et al., 2019). No entanto, cabe ressaltar que em um dos casos a carga viral mais alta do CMV foi detectada em paciente pré-transplante, o que possivelmente indica a fragilidade do sistema imunológico do paciente naquele momento. As cargas mais baixas observadas pós-transplante provavelmente resultaram da vigilância e tratamento contra CMV, que é aplicado de forma profilática após o transplante e até 100 dias depois, com a finalidade de evitar complicações devido a reativação desse vírus (TOMBLYN et al., 2009).

A prevalência total de HHV-6 foi de 6,25% ou 2/32, e ambos eram pacientes do Hospital Amaral Carvalho, de Jaú-SP. A prevalência observada está de acordo com dados reportados na literatura (OGATA; FUKUDA; TESHIMA, 2015), que apontam incidência de HHV-6 entre 0-11,6% após o transplante hematopoiético. Ainda que cada paciente tenha sido submetido a um tipo de transplante distinto (haploidêntico e alogênico não-aparentado), ambos possuíam a mesma doença de base: síndrome mielodisplásica. Há indícios que a infecção por HHV-6 na infância pode causar um quadro de displasia hematopoiética que mimetiza a síndrome mielodisplásica (KAGIALIS-GIRARD et al., 2006), porém a detecção viral nesses estudos foi realizada por meio de anticorpos, e as PCRs realizadas nesses pacientes eram negativas para HHV-6 (KAGIALIS-GIRARD et al., 2006). Como no presente estudo a detecção foi por PCR e a presença do vírus foi confirmada, podemos sugerir que HHV-6 poderia participar também nesse processo. É possível que os dois pacientes, que tiveram resultados positivos somente após o transplante, já estivessem previamente infectados por HHV-6, e o teste PCR positivo é devido a uma reativação resultando do estado de imunossupressão dos mesmos (DE BOLLE; NAESENS; DE CLERCQ, 2005). A possibilidade de uma infecção prévia por HHV-6 é corroborada pelo fato de que até 92% das crianças são sorologicamente positivas para HHV-6 (KANGRO et al., 1994) nos primeiros anos de vida. Especificamente no caso de transplante hematopoiético alogênico, há cerca de 50% de prevalência de reinfecção por HHV-6 (WINESTONE et al., 2017), e o paciente 5, submetido a esse tipo de transplante, teve PCR positiva para HHV-6 tanto 30 dias quanto 100 dias

após o transplante. Já o paciente 4, que foi submetido ao transplante haploidêntico, teve resultado positivo somente 30 dias após o transplante, e com Ct mais elevado do que o apresentado pelo paciente 5. Yoshikawa et al. apontam que o período de pico de reativação de HHV-6 ocorre entre 2 a 4 semanas após o transplante, o que está de acordo com os achados do presente estudo.

A prevalência de EBV foi de 3,125% (1/32) entre os pacientes, estando presente em uma amostra (1/82 ou 1,22%) coletada 100 dias após o transplante do paciente 18, de Ribeirão Preto. Portanto, não houve incidência de EBV entre os pacientes da cidade de Jaú. O período em que o paciente teve PCR positiva para EBV está de acordo com o estabelecido por Treleaven e Barrett, que apontam prevalência maior de infecção por EBV em pacientes de TCTH no período de 100 dias após o transplante. A idade da paciente que teve uma amostra positiva para EBV era de 61 anos no momento da coleta da amostra, o que está de acordo com Landgren et al., que apontam idade acima de 50 anos como fator de risco para desenvolvimento de doença linfoproliferativa pós-transplante (DLPT), condição que poderia decorrer a partir da infecção por esse vírus. O risco de DLPT, doença reconhecida pela Organização Mundial da Saúde como um linfoma (UHLIN et al., 2014), é a principal justificativa para a vigilância acerca da reativação de EBV em pacientes submetidos ao transplante hematopoiético (ANNALORO et al., 2021).

A prevalência de Adenovírus também foi de 3,125% (1/32) entre os pacientes, sendo positiva uma amostra (1/82 ou 1,22%) de Ribeirão Preto. Essa amostra foi coletada 30 dias após o transplante do paciente 19. A doença de base desse paciente era a Leucemia Mielóide Aguda, o que está consoante com o achado de Hale et al., 1999, de que pacientes acometidos por doenças malignas tiveram PCR positiva para Adenovírus após receber um transplante de células-tronco hematopoiéticas com mais frequência do que os acometidos por doenças benignas. O achado mais importante foi que o Adenovírus, embora cause uma infecção respiratória (TOMBLYN et al., 2009), foi detectado com Ct relativamente alto no plasma, o que pode ser correlacionado com estado de profunda imunossupressão desse paciente. Cabe ressaltar, que o mesmo paciente foi submetido a transplante haploidêntico, em que há compatibilidade parcial do fator HLA, o que é um fator de risco para infecção por Adenovírus (FEUCHTINGER; LANG; HANDGRETINGER.

2007) e exige regime de condicionamento com maior intensidade de imunossupressão. Enquanto a incidência de infecção por Adenovírus após transplante autólogo é de 2,5% a 14%, em transplantes alogênicos esse número pode variar entre 5% e 47% em até 100 dias após o transplante (SANDKOVSKY, VARGAS e FLORESCU, 2014).

Em relação às infecções por TTV, a incidência de PCR positiva foi de 4/32 ou 12,5%, sendo que todos os 4 pacientes tiveram somente uma de suas coletas positiva para TTV-16. Tal achado, em conjunto com a ausência de resultados positivos para PCR dos demais subtipos de TTV avaliados (tipos 3, 19, 21 e 22) diverge dos dados obtidos através de metagenômica, que apontavam para abundância de sequências de TTV. A abundância de sequências para diferentes subtipos de TTV apontada pela metagenômica foi, aliás, o que motivou a criação de primers *in house* para os cinco tipos mais recorrentes de TTV na análise metagenômica dos pacientes. A baixa prevalência de TTV na detecção por PCR também diverge das informações fornecidas por De Vlamincx et al., 2013, que apontam os Torque teno vírus como principais componentes do viroma humano. A infecção por TTVs é bastante dinâmica, com grandes variações da carga viral ao longo do tempo, especialmente em pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas: a carga viral de TTVs costuma estar alta antes do início do regime de condicionamento, diminui drasticamente durante regimes mieloablativos, e tende a aumentar novamente após a enxertia (MAGGI et al., 2010). Contudo, somente um indivíduo (1/32 ou 3,125%) teve PCR positiva para TTV-16 100 dias após o transplante, período em que a enxertia já era esperada. Ademais, 2 pacientes (2/3 ou 26,25%) tiveram PCR positiva para TTV-16 antes do transplante, ou seja, durante o regime de condicionamento, associado a menores cargas de TTV. Em relação às co-infecções, cargas elevadas de TTV no plasma estão correlacionadas a infecções por outros tipos virais, incluindo CMV e EBV (GILLES et al., 2017; WOHLFARTH et al., 2018), e de fato, 3/4 dos pacientes positivos para TTV-16 estavam positivos para outro vírus: CMV e HPgV1, sendo que dois desses pacientes apresentavam co-infecção tripla. Esse achado do presente estudo reafirma a utilização de carga viral de TTV como indicador da função imune em indivíduos imunossuprimidos utilizado na literatura (ALBERT et al., 2017; GÖRZER

et al., 2014; WOHLFARTH et al., 2018). Por fim, a descoberta dos TTVs e de sua prevalência no viroma do plasma humano são devidas às técnicas contemporâneas de sequenciamento (VIRGIN; WHERRY; AHMED, 2009), que permitiram a detecção de espécies virais não-patogênicas no organismo humano. No entanto, a causa mais provável para a ausência dos TTV triados é a presença de múltiplos tipos que são classificados erradamente pela análise bioinformática, devido à presença de apenas de genomas de referência dos TTV mais importantes no NCBI. Em função da grande diversidade destes agentes, é necessário que mais genomas sejam depositados nos bancos públicos, para melhorar a identificação destes vírus.

A prevalência de HPgV1 foi bastante alta, de 56,25%, sendo que 18 dos 32 pacientes tiveram pelo menos uma de suas coletas de plasma positivas para esse vírus. A prevalência de HPgV1 no plasma de doadores de sangue saudáveis é de 1% a 5% em países desenvolvidos, e de até 20% em países em desenvolvimento (CHIVERO e STAPLETON, 2015). A prevalência de HPgV-1 em pacientes submetidos ao transplante hematopoiético na China foi de 18,6% (LI et al., 2019), enquanto na Suíça foi de 41,8%, sendo que 32% dos pacientes da Suíça tiveram PCR positiva desde antes do transplante (VU et al., 2019). Entre os pacientes do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto e do Hospital Amaral Carvalho, 18 dos pacientes tiveram PCR positiva para HPgV1, 14 mostraram amplificação positiva de HPgV-1 ainda antes do procedimento do transplante, e mantiveram essa amplificação pós-transplante. Diferentemente do encontrado por Vu et al., 2019, somente 8 pacientes (25% do total) estavam positivos para HPgV1 antes do transplante e assim continuaram após o transplante hematopoiético. No caso de Vu et al., 2019, todos os pacientes, com exceção de um, que eram positivos antes do transplante, continuaram tendo resultados de PCR positivos após o transplante. Vu et al., 2019, também encontraram maior prevalência de HPgV1 em pacientes com doenças malignas mielóides do que em malignas linfóides, sendo a maioria (5/18 ou $\cong 27,8\%$) dos pacientes de Ribeirão e Jaú, eram portadores de anemia aplástica grave. Em relação ao subtipo de HPgV1 circulante, a prevalência varia de acordo com a localidade, sendo que 95% dos indivíduos chineses apresentavam subtipo 3, e 4,2% do tipo 2 (LI et al., 2019), enquanto entre os pacientes de Ribeirão Preto e Jaú, a prevalência era de 86,7% para genótipo 2 e 13,3% para genótipo 1. Esse

achado está de acordo com a prevalência de subtipos de HPgV1 no Brasil (LEVI et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2002; RAMOS FILHO et al., 2004; SLAVOV et al., 2019) e no estado de São Paulo (NISHIYA et al., 2003), sendo o tipo 2 o mais frequente por uma margem significativa, e o subtipo 1 o segundo mais frequente.

No presente estudo, adicionalmente os pacientes submetidos a transplante de medula óssea foram triados para o vírus Gemicircular, o qual é um vírus emergente e do qual pouco se sabe sobre sua disseminação mundial. A prevalência de GemyCV SL3 encontrada nas presentes amostras foi de 0%, pois nenhum paciente teve resultado de PCR positivo para esse tipo de vírus. Esse resultado demonstra duas características importantes: (i) a sensibilidade da metagenômica viral de detecção de agentes virais (não foi identificado vírus Gemicircular SL3 em nenhuma das amostras) e (ii) a ausência deste vírus na população de pacientes com transplante hematopoiético.

O gênero *Gemycircularvirus* foi descrito em 2010 por Yu et al., e sua detecção em amostras humanas é ainda mais recente (PHAN et al., 2015; UCH et al., 2015; ZHOU et al., 2015), porém sua prevalência é considerada relativamente baixa. A detecção por meio de PCR de diferentes subtipos de GemyCV no plasma de pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas e no plasma de doadores de sangue saudáveis foi realizada por Macera et al., 2019, e a prevalência nesses dois grupos foi novamente baixa: 1,5% em pacientes de transplante hematopoiético e 0,3% em doadores de sangue saudáveis. Portanto, mais estudos são necessários para avaliar a prevalência e efeito do vírus GemyCV na população de pacientes com transplante hematopoiético.

7. CONCLUSÕES

O presente estudo, averiguou por meio de PCR as características de diferentes infecções virais em pacientes com transplante hematopoiético. Tais infecções incluíam vírus com impacto clínico conhecido (CMV, EBV, HHV-6 e AdV), mas também foram incluídas infecções pouco conhecidas nessa área da medicina, como HPgV-1, TTV e GemyCV. Todas as infecções triadas (com exceção de GemyCV) foram identificadas previamente por análise de metagenômica viral, porém esse tipo de análise fornece poucas informações sobre as características da infecção. Ademais, a análise metagenômica apresenta diversos desafios, como presença de contaminantes, artefatos e similares, o que torna a confirmação molecular dos vírus identificados de suma importância. Os dados obtidos apontaram a presença elevada de CMV, que é frequentemente observado em pacientes com vários graus de imunossupressão, e em menor prevalência foram observados EBV, HHV-6 e AdV. Também foi avaliada a dinâmica de infecção dos vírus comensais no transplante, para os quais não há ainda grande quantidade de informações na literatura, e são pouco caracterizados na área de transplante. Entre tais agentes, foi possível detalhadamente estudar a infecção por HPgV-1, tanto em relação à sua dinâmica de infecção quanto aos genótipos infectantes. Estes dados podem futuramente contribuir para a prática clínica e podem influenciar as estratégias terapêuticas e o manejo dos pacientes com transplante hematopoiético.

8. REFERÊNCIAS

AGUT, Henri; BONNAFOUS, Pascale; GAUTHERET-DEJEAN, Agnès. Laboratory and clinical aspects of human herpesvirus 6 infections. **Clinical microbiology reviews**, v. 28, n. 2, p. 313-335, 2015.

ALBERT, Eliseo et al. Dynamics of Torque Teno virus plasma DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients. **Journal of Clinical Virology**, v. 94, p. 22-28, 2017.

ALLARD, Annika; ALBINSSON, B. O.; WADELL, Göran. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 2, p. 498-505, 2001.

ANNALORO, Claudio et al. Viral infections in HSCT: detection, monitoring, clinical management, and immunologic implications. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 569381, 2021.

AULETTA J.J. et al. **Current use and outcome of hematopoietic stem cell transplantation: CIBMTR US summary slides, 2021.**

BIASOLO, Maria Angela et al. Case report: Kinetics of Epstein-Barr virus load in a bone marrow transplant patient with no sign of lymphoproliferative disease. **Journal of medical virology**, v. 69, n. 2, p. 220-224, 2003.

CHANG, Cindy M. et al. GBV-C infection and risk of NHL among US adults. **Cancer research**, v. 74, n. 19, p. 5553-5560, 2014.

CHIVERO, Ernest T.; STAPLETON, Jack T. Tropism of human pegivirus (formerly known as GB virus C/hepatitis G virus) and host immunomodulation: insights into a highly successful viral infection. **The Journal of general virology**, v. 96, n. Pt 7, p. 1521, 2015.

COPELAN, Edward A. Hematopoietic stem-cell transplantation. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 17, p. 1813-1826, 2006.

DE BOLLE, Leen; NAESENS, Lieve; DE CLERCQ, Erik. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 1, p. 217-245, 2005.

DE PAGTER, PJ Anne et al. Human herpes virus 6 plasma DNA positivity after hematopoietic stem cell transplantation in children: an important risk factor for clinical outcome. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 14, n. 7, p. 831-839, 2008.

DE VLAMINCK, Iwijn et al. Temporal response of the human virome to immunosuppression and antiviral therapy. **Cell**, v. 155, n. 5, p. 1178-1187, 2013.

DYKEWICZ, Clare A.; JAFFE, Harold W.; KAPLAN, Jonathan E. Guidelines for preventing opportunistic infections among hematopoietic stem cell transplant recipients; recommendations of CDC, the **Infectious Disease Society of America**, and the **American Society of Blood and Marrow Transplantation**. 2000.

FEGHOUL, L. et al. Adenovirus infection and disease in paediatric haematopoietic stem cell transplant patients: clues for antiviral pre-emptive treatment. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 7, p. 701-709, 2015.

FEUCHT, Judith et al. Adoptive T-cell therapy with hexon-specific Th1 cells as a treatment of refractory adenovirus infection after HSCT. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 125, n. 12, p. 1986-1994, 2015.

FEUCHTINGER, Tobias; LANG, Peter; HANDGRETINGER, Rupert. Adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. **Leukemia & lymphoma**, v. 48, n. 2, p. 244-255, 2007.

FOCOSI, Daniele et al. Torquetenovirus: the human virome from bench to bedside. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 7, p. 589-593, 2016.

GALGANO, Letizia; HUTT, Daphna. HSCT: How does it work?. **The European Blood and Marrow Transplantation Textbook for Nurses**, p. 23-36, 2018.

GARIGLIANY, Mutien-Marie et al. Cyclovirus CyCV-VN species distribution is not limited to Vietnam and extends to Africa. **Scientific reports**, v. 4, n. 1, p. 1-7, 2014.

GE, Xingyi et al. Genetic diversity of novel circular ssDNA viruses in bats in China. **Journal of General Virology**, v. 92, n. 11, p. 2646-2653, 2011.

GEORGE, Diane et al. Adenovirus infection in pediatric allogeneic stem cell transplantation recipients is a major independent factor for significantly increasing the risk of treatment related mortality. **British journal of hematology**, v. 156, n. 1, p. 99-108, 2012.

GILLES, Ramona et al. Dynamics of Torque Teno virus viremia could predict risk of complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Medical microbiology and immunology**, v. 206, n. 5, p. 355-362, 2017.

GOMPLES, U. A.; MACAULAY, H. A. Characterization of human telomeric repeat sequences from human herpesvirus 6 and relationship to replication. **Journal of General Virology**, v. 76, n. 2, p. 451-458, 1995.

GÖRZER, Irene et al. Plasma DNA levels of Torque teno virus and immunosuppression after lung transplantation. **The Journal of Heart and Lung Transplantation**, v. 33, n. 3, p. 320-323, 2014.

GRATWOHL, A. et al. Cause of death after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in early leukaemias: an EBMT analysis of lethal infectious complications and changes over calendar time. **Bone marrow transplantation**, v. 36, n. 9, p. 757-769, 2005.

HALE, G. A. et al. Adenovirus infection after pediatric bone marrow transplantation. **Bone marrow transplantation**, v. 23, n. 3, p. 277-282, 1999.

HOLMES, R. D.; SOKOL, R. J. Epstein–Barr virus and post-transplant lymphoproliferative disease. **Pediatric transplantation**, v. 6, n. 6, p. 456-464, 2002.

HOULDCROFT, Charlotte J.; BEALE, Mathew A.; BREUER, Judith. Clinical and biological insights from viral genome sequencing. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 183-192, 2017.

JENQ, Robert R.; VAN DEN BRINK, Marcel RM. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: individualized stem cell and immune therapy of cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 3, p. 213-221, 2010.

KAGIALIS-GIRARD, Sandrine et al. Human herpesvirus 6 infection and transient acquired myelodysplasia in children. **Pediatric blood & cancer**, v. 47, n. 5, p. 543-548, 2006.

KANGRO, H. O. et al. Seroprevalence of antibodies to human herpesviruses in England and Hong Kong. **Journal of medical virology**, v. 43, n. 1, p. 91-96, 1994

KLEINMAN, Steven. Hepatitis G virus biology, epidemiology, and clinical manifestations: implications for blood safety. **Transfusion medicine reviews**, v. 15, n. 3, p. 201-212, 2001.

KONTOYIANNIS, Dimitrios P. et al. Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoietic stem cell transplant recipients, 2001–2006: overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 8, p. 1091-1100, 2010.

LANDGREN, Ola et al. Risk factors for lymphoproliferative disorders after allogeneic hematopoietic cell transplantation. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 113, n. 20, p. 4992-5001, 2009.

LEVI, José Eduardo et al. High prevalence of GB virus C/hepatitis G virus RNA among Brazilian blood donors. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, p. 75-78, 2003.

LJUNGMAN, Per et al. Donor CMV serologic status and outcome of CMV-seropositive recipients after unrelated donor stem cell transplantation: an EBMT megafile analysis. **Blood**, v. 102, n. 13, p. 4255-4260, 2003.

LJUNGMAN, P. et al. Management of CMV, HHV-6, HHV-7 and Kaposi-sarcoma herpesvirus (HHV-8) infections in patients with hematological malignancies and after SCT. **Bone marrow transplantation**, v. 42, n. 4, p. 227-240, 2008.

LI, Linlin et al. Multiple diverse circoviruses infect farm animals and are commonly found in human and chimpanzee feces. **Journal of virology**, v. 84, n. 4, p. 1674-1682, 2010.

LI, Zhanjia et al. Prevalence and risk factors of human pegivirus type 1 infection in hematopoietic stem cell transplantation patients. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 85, p. 111-113, 2019.

LION, Thomas. Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. **Clinical microbiology reviews**, v. 27, n. 3, p. 441-462, 2014.

LUGTHART, Gertjan et al. Early cytomegalovirus reactivation leaves a specific and dynamic imprint on the reconstituting T cell compartment long-term after hematopoietic stem cell transplantation. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 20, n. 5, p. 655-661, 2014.

MACERA, Lisa et al. Low prevalence of Gemycircularvirus DNA in immunocompetent and immunocompromised subjects. **New Microbiol**, v. 42, n. 2, p. 118-20, 2019.

MAERTENS, J. Third European Conference on Infections in Leukemia: European guidelines for antifungal management in leukemia and hematopoietic stem cell transplant recipients: summary of the ECIL 3-2009 update. **Bone Marrow Transplant**, v. 46, n. 5, p. 709-718, 2011.

MAFFINI, Enrico et al. Treatment of CMV infection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Expert review of hematology**, v. 9, n. 6, p. 585-596, 2016.

MAGGI, Fabrizio et al. Role of hematopoietic cells in the maintenance of chronic human torquetenovirus plasma viremia. **Journal of virology**, v. 84, n. 13, p. 6891-6893, 2010.

MARIS, Michael; STORB, Rainer. The transplantation of hematopoietic stem cells after non-myeloablative conditioning. **Immunologic research**, v. 28, n. 1, p. 13-24, 2003

MAZIARZ, Richard T. Overview of Hematopoietic Stem Cell Transplantation. In: Blood and Marrow Transplant Handbook. Springer, Cham, 2015. p. 3-9.

MIAO, Zhijiang et al. Prevalence and clinical impact of human pegivirus-1 infection in HIV-1-infected individuals in Yunnan, China. **Viruses**, v. 9, n. 2, p. 28, 2017.

MICHEL, René P.; BERRY, Gerald J. (Ed.). **Pathology of transplantation: a practical diagnostic approach**. Springer, 2016.

MOHR, Emma L.; STAPLETON, Jack T. GB virus type C interactions with HIV: the role of envelope glycoproteins. **Journal of viral hepatitis**, v. 16, n. 11, p. 757-768, 2009.

MOUTON, William et al. Torque teno virus viral load as a marker of immune function in allogeneic haematopoietic stem cell transplantation recipients. **Viruses**, v. 12, n. 11, p. 1292, 2020.

MUÑOZ-COBO, B. et al. Surveillance for adenovirus DNAemia early after transplantation in adult recipients of unrelated-donor allogeneic stem cell transplants in the absence of clinically suspected infection. **Bone marrow transplantation**, v. 46, n. 11, p. 1484-1486, 2011.

NISHIYA, Anna S. et al. Genotype distribution of the GB virus C in citizens of Sao Paulo City, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, p. 213-216, 2003.

OGATA, M.; FUKUDA, T.; TESHIMA, T. Human herpesvirus-6 encephalitis after allogeneic hematopoietic cell transplantation: what we do and do not know. **Bone marrow transplantation**, v. 50, n. 8, p. 1030-1036, 2015.

ÖHRMALM, L. et al. Evaluation of a surveillance strategy for early detection of adenovirus by PCR of peripheral blood in hematopoietic SCT recipients: incidence and outcome. **Bone marrow transplantation**, v. 46, n. 2, p. 267-272, 2011.

OLIVEIRA, Luciana A. et al. Prevalence and genotypes of GB virus C/hepatitis G virus among blood donors in Central Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 953-957, 2002.

OMRANI, Ali S.; ALMAGHRABI, Reem S. Complications of hematopoietic stem cell transplantation: bacterial infections. **Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy**, v. 10, n. 4, p. 228-232, 2017.

PHAN, Tung Gia et al. Small circular single stranded DNA viral genomes in unexplained cases of human encephalitis, diarrhea, and in untreated sewage. **Virology**, v. 482, p. 98-104, 2015.

RAMOS FILHO, Ramon et al. GB virus C/hepatitis G virus infection in dialysis patients and kidney transplant recipients in Central Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 639-643, 2004.

ROVIRA, Montserrat; MENSA, Josep; CARRERAS, Enric. Infections after HSCT. **The EBMT handbook: hematopoietic stem cell transplantation. 6a ed. Paris (FR): European School of Haematology and European Society for Bone Marrow Transplantation**, p. 196-215, 2012.

SANDKOVSKY, Uriel; VARGAS, Luciano; FLORESCU, Diana F. Adenovirus: current epidemiology and emerging approaches to prevention and treatment. *Current infectious disease reports*, v. 16, n. 8, p. 1-8, 2014.

SCHMITZ, Julia et al. The value of Torque Teno Virus (TTV) as a marker for the degree of immunosuppression in adult patients after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 26, n. 4, p. 643-650, 2020.

SETO, Jason et al. Genomic and bioinformatics analyses of HAdV-14p, reference strain of a re-emerging respiratory pathogen and analysis of B1/B2. **Virus research**, v. 143, n. 1, p. 94-105, 2009.

SLAVOV, Svetoslav Nanev et al. Development and optimization of a sensitive TaqMan® real-time PCR with synthetic homologous extrinsic control for quantitation of Human cytomegalovirus viral load. **Journal of Medical Virology**, v. 88, n. 9, p. 1604-1612, 2016.

SLAVOV, Svetoslav Nanev et al. Human pegivirus-1 (HPgV-1) RNA prevalence and genotypes in volunteer blood donors from the Brazilian Amazon. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 26, n. 4, p. 234-239, 2019.

SIMNER, Patricia J.; SALZBERG, Steven L. The Human “Contaminome” and Understanding Infectious Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 387, n. 10, p. 943-946, 2022.

SMATTI, Maria K. et al. Prevalence and molecular profiling of Epstein Barr virus (EBV) among healthy blood donors from different nationalities in Qatar. **PLoS One**, v. 12, n. 12, p. e0189033, 2017.

STYCZYNSKI, J.; GIL, L. Prevention of infectious complications in pediatric HSCT. **Bone marrow transplantation**, v. 42, n. 2, p. S77-S81, 2008.

STYCZYŃSKI, Jan et al. Death after hematopoietic stem cell transplantation: changes over calendar year time, infections and associated factors. **Bone marrow transplantation**, v. 55, n. 1, p. 126-136, 2020.

TAN, Le Van et al. Identification of a new cyclovirus in cerebrospinal fluid of patients with acute central nervous system infections. **MBio**, v. 4, n. 3, p. e00231-13, 2013.

TEY, Siok-Keen et al. Clinical assessment of anti-viral CD8+ T cell immune monitoring using QuantiFERON-CMV® assay to identify high risk allogeneic hematopoietic stem cell transplant patients with CMV infection complications. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e74744, 2013.

TOMBLYN, Marcie et al. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplant recipients: a global perspective. **Bone marrow transplantation**, v. 44, n. 8, p. 453-455, 2009.

TRELEAVEN, Jennifer G.; BARRETT, A. John. **Hematopoietic stem cell transplantation in clinical practice**. Elsevier Health Sciences, 2008.

UCH, Rathviro et al. Divergent gemycircularvirus in HIV-positive blood, France. **Emerging infectious diseases**, v. 21, n. 11, p. 2096, 2015.

UHLIN, Michael et al. Risk factors for Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. **Haematologica**, v. 99, n. 2, p. 346, 2014.

VIRGIN, Herbert W.; WHERRY, E. John; AHMED, Rafi. Redefining chronic viral infection. **Cell**, v. 138, n. 1, p. 30-50, 2009.

VU, D.-L. et al. Human pegivirus persistence in human blood virome after allogeneic haematopoietic stem-cell transplantation. **Clinical microbiology and infection**, v. 25, n. 2, p. 225-232, 2019.

WATZINGER, F. et al. Real-Time Quantitative PCR Assays for Detection and Monitoring of Pathogenic Human Viruses in Immunosuppressed Pediatric Patients. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 11, p. 5189-5198, 2004.

WOHLFARTH, Philipp et al. Torquetenovirus dynamics and immune marker properties in patients following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a prospective longitudinal study. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 24, n. 1, p. 194-199, 2018.

YOSHIKAWA, Tetsushi et al. Human herpesvirus 6 viremia in bone marrow transplant recipients: clinical features and risk factors. **The Journal of infectious diseases**, v. 185, n. 7, p. 847-853, 2002.

YU, Xiao et al. A geminivirus-related DNA mycovirus that confers hypovirulence to a plant pathogenic fungus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 18, p. 8387-8392, 2010.

ZHOU, Chenglin et al. A novel gemycircularvirus in an unexplained case of child encephalitis. **Virology journal**, v. 12, n. 1, p. 1-4, 2015.

ZUHAIR, Mohamed et al. Estimation of the worldwide seroprevalence of cytomegalovirus: A systematic review and meta-analysis. **Reviews in medical virology**, v. 29, n. 3, p. e2034, 2019.

ZULU, Sara; KENYON, Michelle. Principles of conditioning therapy and cell infusion. **The European Blood and Marrow Transplantation Textbook for Nurses**, p. 89-96, 2018

"Autorizo a reprodução e divulgação total deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte."

"A inclusão deste trabalho na Biblioteca Digital foi aprovada pela Comissão Coordenadora do Curso em sua 63ª Sessão Ordinária, realizada em 31/10/2022"