



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA**

**Juliana Ribeiro do Prado Moreno**

**DIFERENÇA NA RECONSTITUIÇÃO IMUNE ESPECÍFICA PARA O  
Citomegalovírus PÓS TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO-  
HEMATOPOIÉTICAS AUTÓLOGO E ALOGÊNICO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Clárisse Martins Machado

Botucatu  
2019

Juliana Ribeiro do Prado Moreno

DIFERENÇA NA RECONSTITUIÇÃO IMUNE ESPECÍFICA  
PARA O Citomegalovírus PÓS TRANSPLANTE DE CÉLULAS  
TRONCO-HEMATOPOIÉTICAS AUTÓLOGO E ALOGÊNICO

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina, Universidade Estadual Paulista  
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de  
Botucatu, para obtenção do título de  
Mestre em Biotecnologia Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Clarisse Martins Machado

Botucatu  
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Moreno, Juliana Ribeiro do Prado.

Diferença na reconstituição imune específica para o  
Citomegalovírus pós transplante de células  
tronco-hematopoiéticas autólogo e alogênico / Juliana  
Ribeiro do Prado Moreno. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de  
Botucatu

Orientador: Clarisse Martins Machado  
Capes: 21201013

1. Citomegalovirus. 2. Transplante autólogo. 3.  
Transplante homólogo. 4. Imunoensaio.

Palavras-chave: Citomegalovírus; QuantiFERON-CMV;  
Transplante alogênico; Transplante autólogo.

Juliana Ribeiro do Prado Moreno

DIFERENÇA NA RECONSTITUIÇÃO IMUNE ESPECÍFICA  
PARA O Citomegalovírus PÓS TRANSPLANTE DE CÉLULAS  
TRONCO-HEMATOPOIÉTICAS AUTÓLOGO E ALOGÊNICO

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Clarisse Martins Machado

Comissão examinadora

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Clarisse Martins Machado  
Universidade de São Paulo

---

Prof. Dr. Ricardo Augusto Monteiro de Barros Almeida  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

---

Prof. Dr. Rafael Dezen Gaiolla  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Botucatu, 21 de Fevereiro de 2019

**DEDICATÓRIA**

*Aos 133 pacientes deste projeto, pela confiança, respeito, atenção e dedicação.*

*Sem vocês este trabalho não poderia amparar outros pacientes.*

*Muito obrigada!*

**AGRADECIMENTOS**

*A Deus por minha vida, família e amigos.*

*Ao Programa de Pós Graduação em Pesquisa e Desenvolvimento:  
Biotecnologia Médica, corpo docente, direção e administração pela  
oportunidade de aprimoramento profissional e de desenvolver este trabalho.*

*Aos alunos do mestrado, que fizeram parte dessa trajetória, dividindo  
momentos de descontração, estudo e conquistas.*

*À Dra. Clárisse Martins Machado, minha orientadora, pela competência,  
paciência, respeito e generosidade em me ensinar. Agradeço por me guiar e  
proporcionar novas oportunidades.*

*Ao Serviço de Transplante de Medula Óssea de Jaú, por permitir o  
desenvolvimento deste trabalho.*

*Ao Laboratório de Citoquímica em especial a Leila, amiga que sempre me  
ajudou em todas as fases do projeto.*

*A minha amiga Paula, pela paciência, amizade, ajuda na realização e  
conclusão desse trabalho.*

*Aos pacientes e seus familiares, pela colaboração. Agradeço pela dedicação  
e por estarem sempre dispostos a colaborar no que fosse necessário.*

*Aos meus pais, Zeca e Susana, pela dedicação, amor e incentivo.*

*Ao meu noivo, Thiago, pelo companheirismo, paciência, compreensão e  
incentivo.*

*A todos que contribuíram direta ou indiretamente para execução deste estudo.*

**ΕΠΙΓΡΑΦΕ**

“Espero que Deus permita realizar o sonho e conhecer meus netos, leva-los ao parque, carrega-los no colo e conseguir aproveitar cada segundo, pois hoje estamos aqui, amanhã ...”

***Paciente do Serviço de Transplante do Hospital Amaral Carvalho***

**RESUMO**

## Resumo

MORENO, J. P. R. **Diferença na reconstituição imune específica para o Citomegalovírus pós transplante de células tronco-hematopoiéticas autólogo e alogênico**. 2019. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2019.

O citomegalovírus (CMV) é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em receptores de transplante de células tronco hematopoiéticas. As complicações que podem surgir após o transplante são numerosas e diversas, estando o CMV e a doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) entre as mais importantes. A infecção pelo CMV pode afetar qualquer órgão e células do sistema imunitário e os receptores soropositivos para o CMV estão sob risco de reativação. Receptores de transplante alogênico de células tronco-hematopoiéticas têm um risco significativamente maior de infecção por CMV em comparação com receptores de transplante autólogo em função do uso de imunossupressores na profilaxia da DECH. O trabalho teve como objetivo a implantação e a avaliação da reconstituição imune CMV-específica através de uma técnica de dosagem de interferon-gama (Quantiferon-CMV). Observou-se que a reconstituição imune CMV-específica foi diferente em cada tipo de TCTH. Os pacientes autólogos mantiveram a imunidade até o d+120, diferentemente dos alogênicos. Já nos alogênicos, observou-se que os pacientes que realizaram TCTH do tipo aparentado, obtiveram uma recuperação imune CMV-específica melhor que o não-aparentado e o haploidêntico até o D+60. Nenhum paciente do tipo haploidêntico recuperou a imunidade no D+30. No D+90 observou-se que cerca de 60% dos receptores de transplantes alogênicos recuperaram a imunidade CMV-específica, variando entre 55,5% a 67,5.

**Palavras-chave:** Transplante de células tronco hematopoiéticas, Citomegalovírus, Quantiferon.

## **Abstract**

MORENO, J. P. R. **Difference in immune reconstitution specific for cytomegalovirus post-transplantation of autologous and allogenic stem-hematopoietic cells.** 2019. Dissertation (Master degree) – Medical School of Botucatu, State University of São Paulo, Botucatu, 2019.

Cytomegalovirus (CMV) is one of the leading causes of morbidity and mortality in hematopoietic stem cell transplant recipients. The complications that may arise after transplantation are numerous and diverse, with CMV and graft versus host disease (GVHD) being among the most important. CMV infection can affect any organ and cells of the immune system, and CMV seropositive recipients are at risk of reactivation. Allogeneic hematopoietic stem cell transplant (HSCT) recipients have a significantly increased risk of CMV infection compared to autologous HSCT recipients due to the use of immunosuppressive drugs in the prophylaxis of GVHD. The aim of the study was to implement and evaluate CMV-specific immune reconstitution through an interferon-gamma releasing assay (Quantiferon-CMV). It was observed that CMV-specific immune reconstitution was different in each type of HSCT. Autologous patients maintained immunity until D+120, unlike the allogeneic HSCT recipients. Among the allogeneic HSCT, we observed that recipients of matched related donor HSCT showed a faster CMV-specific immune recovery in comparison with the patients receiving unrelated and haploidentical donor HSCT until D+60. No haploidentical HSCT recipients recovery CMV-immunity on D+30. At D+90, approximately 60% of the allogeneic transplant recipients had recovered CMV-specific immunity, ranging from 55.5% to 67.5.

**Keywords:** Hematopoietic stem cell transplantation, Cytomegalovirus, Quantiferon.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

## LISTA DE ABREVIATURAS

**°C:** Graus Celsius

**µL:** Microlitro

**AG:** Antigenemia

**AAS:** Anemia aplástica severa

**CD:** Cluster of differentiation

**CMV:** Citomegalovírus

**CSA:** Ciclosporina

**Cy:** Ciclofosfamida

**D+:** Dias após o transplante

**DECH:** Doença do enxerto contra o hospedeiro

**ELISA:** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

**GCV:** Ganciclovir

**IFN-γ:** Interferon gama

**IU:** Unidade internacional

**LH:** Linfoma de Hodgkin

**LLA:** Leucemia linfóide aguda

**LMA:** Leucemia mielóide aguda

**LMC:** Leucemia mielóide crônica

**mL:** Mililitro

**MM:** Mieloma múltiplo

**MMF:** Micofenolato de mofetila

**MTX:** Metotrexato

**nm:** Nanômetro

**PCR:** Reação em cadeia polimerase

**QTF:** Quantiferon

**RPM:** Rotação por minuto

**SMD:** Doença linfo proliferativa

**TCLE:** Termo de consentimento livre e esclarecido

**TCTH:** Transplante de células tronco-hematopoiéticas

**TMO:** Transplante de Medula Óssea

**USA:** Estados Unidos da América

## SUMÁRIO

## SUMÁRIO

<b>2 ARTIGO .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Introdução .....</b>	<b>18</b>
<b>2.2 Objetivos .....</b>	<b>19</b>
<b>2.3 Métodos .....</b>	<b>19</b>
<b>2.4 Resultados .....</b>	<b>23</b>
<b>2.5 Discussão .....</b>	<b>29</b>
<b>2.6 Conclusão .....</b>	<b>32</b>
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>33</b>
<b>ANEXO A .....</b>	<b>36</b>



## DIFERENÇA NA RECONSTITUIÇÃO IMUNE ESPECÍFICA PARA O Citomegalovírus PÓS TRANSPLANTE DE CÉLULA-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS AUTÓLOGO E ALOGÊNICO

### 1. Introdução

A infecção pelo CMV é uma importante complicação dos receptores de transplantes, especialmente no transplante alogênico de células tronco-hematopoiéticas (TCTH). O uso de terapia pré-emptiva com o ganciclovir (GCV), ou seja, introdução precoce de GCV baseada na positividade de técnicas rápidas de diagnóstico (detecção de antigenemia pp65 ou PCR quantitativo em tempo real) proporcionaram uma diminuição significativa da morbidade e mortalidade relacionada a esse agente (1,2). Com o aumento recente da complexidade dos transplantes, traduzido pelo uso de novos imunossuppressores na profilaxia da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH), e do uso de doadores alternativos (TCTH com doadores não-aparentados e haploidenticos) estima-se que possam ocorrer mudanças no comportamento de certos agentes infecciosos, entre os quais, o CMV (3). Sabe-se que a linfopenia prolongada é um dos principais fatores de risco para a reativação do CMV (4). Tal reativação, ao mesmo tempo em que define o risco de adoecimento e a necessidade de introdução de antiviral, constitui um forte estímulo para a reconstituição da imunidade específica do CMV.

Em circunstâncias favoráveis, a reconstituição da resposta de células T CD4 e CD8 CMV-específicas (imunidade ao CMV) é capaz de controlar a infecção mesmo na ausência de antiviral (5). Por outro lado, o retardo nesta resposta leva a episódios recorrentes de reativação e/ou viremias prolongadas, nos quais o uso de antiviral é indispensável. Até recentemente, apenas ensaios sofisticados *in-house* de dosagem de interferon gama eram disponíveis para avaliação da imunidade específica ao CMV (6). Atualmente, estão disponíveis comercialmente ensaios que dosam a quantidade de IFN- $\gamma$  produzida por linfócitos T CMV-específicos, em resposta a peptídeos imunodominantes de CMV. Um desses ensaios é o QuantiFERON-CMV (QTF-CMV, Qiagen, USA) que pode representar um avanço no manejo das infecções pelo CMV nestas populações.

No presente estudo, avaliamos a dinâmica da reconstituição imunológica de células T CMV-específicas através do QTF-CMV em população de receptores de

TCTH (autólogo e alogênico), para validar na prática clínica o uso de um ensaio comercial de fácil execução e interpretação, com a perspectiva de auxiliar no manejo das infecções pelo CMV.

## 2. Objetivos

2.1. Implantar a técnica de dosagem de Interferon Gama para determinar a resposta T CMV-específica com o kit QuantiFERON-CMV em receptores de TCTH alogênicos e autólogos;

2.2. Avaliar a dinâmica da reconstituição da imunidade celular CMV-específica de acordo com o tempo pós-transplante nesses dois grupos de pacientes.

## 3. Métodos

3.1. Desenho do estudo: estudo prospectivo, unicêntrico, não randomizado.

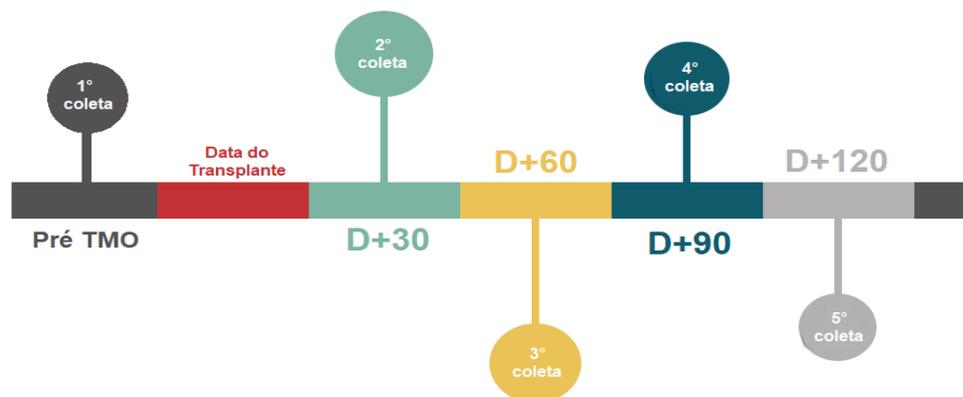
3.2. População: O estudo teve participação de 130 pacientes, procedentes de diversas regiões do Brasil, tratados no Serviço de Transplante de Medula Óssea da Fundação Doutor Amaral Carvalho (Jahu, SP, Brasil), no período de janeiro de 2016 a dezembro de 2017, de maneira aleatória conforme a confirmação de internação para o transplante. No hospital são realizados aproximadamente 15 transplantes mensais, sendo que 65% dos mesmos são do tipo alogênico. Foram excluídos os pacientes que por algum motivo não chegaram a realizar o transplante e menores de 08 anos devido à dificuldade na coleta.

3.3. Política de controle das infecções pelo CMV: As infecções pelo CMV foram definidas como primárias ou reativações de acordo com Ljungman et al., 2017 (7). Doadores e candidatos a TCTH fazem sorologia para CMV (IgG) no período pré-TCTH para detecção de anticorpos específicos. Após o transplante, receptores de TCTH alogênico são submetidos à vigilância semanal do CMV através de detecção de antigenemia pp65 a partir da internação até o dia +120. Frente a positividade da

antigenemia (1 célula positiva) ganciclovir endovenoso foi introduzido na dose de 5mg/kg de 12/12 horas por pelo menos 14 dias. Durante o estudo foram utilizados 3 métodos para detecção de viremia pelo CMV, Antigenemia (CMV Brite Turbo – IQ Products – imunofluorescência indireta), PCR quantitativo Artus (Qiagen – USA) e PCR quantitativo Cobas (Roche – USA), de acordo com as instruções do fabricante. Apenas os dados da Antigenemia foram considerados para a análise.

3.4. Monitoramento da imunidade CMV-específica: As coletas foram iguais para os transplantes autólogos e alogênicos:

- ✓ **1º coleta**: antes do transplante (no dia da assinatura do TCLE);
- ✓ **2º coleta**: 30 dias após o TCTH (D+30);
- ✓ **3º coleta**: 60 dias após o TCTH (D+60);
- ✓ **4º coleta**: 90 dias após o TCTH (D+90);
- ✓ **5º coleta**: 120 dias após o TCTH (D+120).



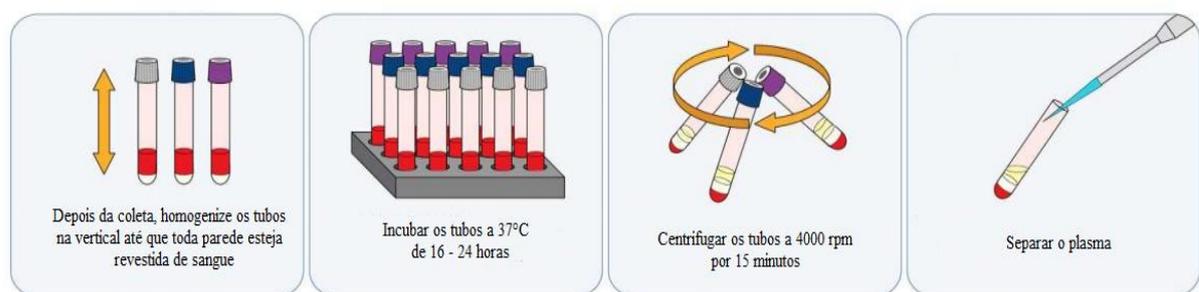
**Figura 1:** Cronograma de coleta para o QTF-CMV

Depois dessas coletas, os pacientes foram acompanhados nos retornos agendados até completar um ano de transplante (D+365). As informações clínicas de interesse foram obtidas no prontuário e transcritas para uma planilha Excel.

3.5. Detecção de IFN gama por Quanti-FERON-CMV: Utilizou-se o kit “QuantiFERON®-CMV Blood Collection Tubes – Single Patient Pack” disponibilizado pela empresa Qiagen. O kit é formado por um conjunto de 3 tubos, Nil (controle negativo), CMV e Mitogen (controle positivo) coletados obrigatoriamente nessa

ordem. Respeitando a orientação do fabricante, as coletas foram realizadas sem a necessidade do paciente estar jejum. Foram coletados 3 mL com um “butterfly” por punção venosa (1 ml por tudo) e imediatamente após a coleta, os tubos foram agitados 10 vezes na vertical para assegurar que toda a superfície interior dos tubos fosse revestida de sangue para solubilizar os antígenos presente em sua parede.

A seguir, os tubos foram imediatamente incubados a 37°C por 16 horas. Após o período de incubação, foram centrifugados a 4000 rpm por 15 minutos, e o plasma foi transferido para um tudo de ensaio previamente identificado e armazenado a -20°C.



**Figura 2:** Tubos para coleta do QuantiFERON-CMV (esquema adaptado do site da Qiagen)

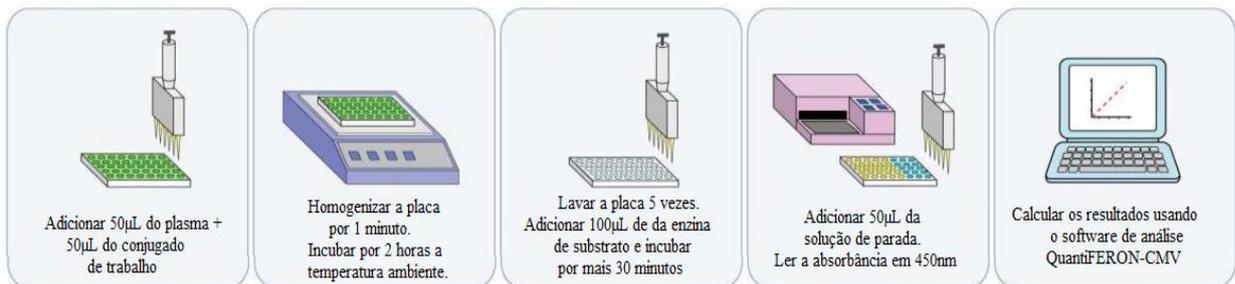
Após a incubação, procedeu-se a detecção de interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) pelo ensaio de imunoabsorção enzimática (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA) para quantificar as respostas dos linfócitos *in vitro* a esses peptídeos antigênicos. Para cada paciente utilizou-se 5 poços da placa de ELISA:

- 1º Nil (controle negativo);
- 2º CMV;
- 3º Mitogen (controle positivo);
- 4º CMV (diluição 1/10);
- 5º Mitogen (diluição 1/10).

No ensaio, as amostras e os controles foram incubados com o conjugado. Após ciclos de lavagens para remoção do excesso de amostras e reagentes, a enzima de substrato foi adicionada aos poços e a reação foi incubada novamente. A enzima de substrato liga-se a qualquer complexo antígeno-anticorpo presente nos poços. A quantidade de enzima ligada na fase sólida indica a quantidade de antígeno presente na amostra. Após incubação e lavagem para retirada da enzima em

excesso, foi adicionada a solução de interrupção da reação. Se uma amostra contiver linfócitos CMV-específicos, haverá produção de interferon frente ao reconhecimento dos peptídeos específicos e a intensidade da coloração pode então ser medida por um espectrofotômetro. As leituras do valor de absorbância para amostra foram comparadas com o valor limite determinado com base na absorbância média do calibrador.

O teste foi considerado reativo para uma resposta IFN- $\gamma$  quando o tubo de antígeno do CMV apresenta uma leitura significativamente superior ao valor Zero IFN- $\gamma$  UI/ml. Uma baixa resposta ao Mitógeno indica um resultado indeterminado quando uma amostra de sangue também tem uma resposta não reativa aos antígenos do CMV. Este padrão poderá ocorrer com linfócitos insuficientes, atividade reduzida dos linfócitos devido a um manuseamento incorreto das amostras, enchimento/mistura incorretas do tubo de mitógeno ou incapacidade dos linfócitos do doente em produzir IFN- $\gamma$ , como acontece na fase inicial do transplante (seguindo as instruções do fabricante - Qiagen).



**Figura 3:** Ensaio imunoenzimático para detecção de INF gama (esquema adaptado do site da Qiagen)

A seguir, as densidades óticas foram transferidas para um software onde foi calculada a curva padrão e o resultado final foi definido de acordo com a tabela 1.

**Tabela 1:** Interpretação dos resultados.

Nil IU/mL	Mitogen	Resultado	Interpretação
<0,2	>-0.5	Não reativo	Imunidade não detectada
>- 0,2	Qualquer valor	Reativo	Imunidade detectada
<0,2	<0.5	Indeterminado	Resposta indeterminada

3.6. Planilha de resultados: Todos os resultados foram passados para uma planilha Excel contendo além dos dados demográficos e clínicos, a data da coleta, D+ e os resultados do QTF-CMV.

3.7. Follow-up: Os pacientes foram acompanhados prospectivamente durante um ano após o transplante por prontuário e pessoalmente nos dias de consulta no Ambulatório de TCTH.

3.8. Questões éticas: O estudo foi analisado pelo Comitê de Ética da Fundação Doutor Amaral Carvalho. Os pacientes foram informados sobre os riscos e benefícios da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com a resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (anexo A).

3.9. Análise estatística: As variáveis contínuas foram expressas como medianas. Comparação das variáveis qualitativas ou categóricas foram analisadas pelo teste do qui-quadrado. (Software SPSS versão 21.0). Com relação à imunidade CMV-específica os resultados indeterminados do QTF-CMV foram excluídos e só as amostras com resultados reativos ou não-reativos foram incluídas na análise. Para determinar o valor do ensaio na predição do risco de reativação, foram avaliados os episódios de viremia detectados no mês subsequente ao teste de QTF-CMV. Assim, o QTF-CMV no D+30 foi analisado com relação a ocorrência de AG positiva entre 30 e 60 dias; no D+60 com relação a AG positiva entre D+60 e D+90, e no D+90, com relação a ocorrência de AG positiva entre D+90 e D+120.

#### **4. Resultados**

Até 16 de dezembro de 2016 foram incluídos 103 receptores de TCTH alogênicos e 30 receptores de TCTH autólogo, totalizando 133 pacientes no período. Três pacientes (2.3%) não realizaram o TCTH por motivos diversos e foram excluídos da análise. Assim, as características de 130 pacientes estão descritas na Tabela 2.

**Tabela 2:** Características dos pacientes (n=130).

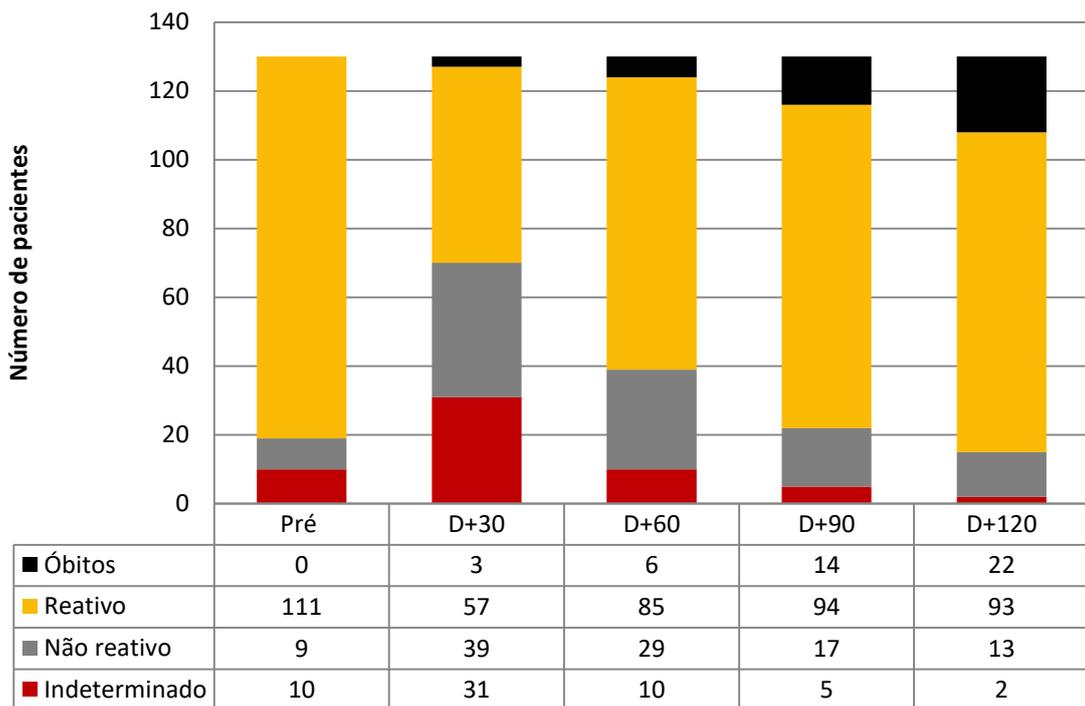
Variável		Número (%)	
Idade	Mediana (variação) em anos	38.5 (08-68)	
Sexo	Masculino / feminino	72/58 (55.4/44.6)	
Sorologia CMV	Doador/Receptor*	Positivo/Positivo	82 (80.4)
		Positivo/Negativo	5 (4.9)
		Negativo/Positivo	14 (13.7%)
		Negativo/Negativo	1 (1)
Tipo TCTH	Autólogo	30 (23.1)	
	Alogênico	Aparentado	54 (41.5)
		Não aparentado	37 (28.5)
		Haploidêntico	09 (6.9)
Fonte CT	Medula óssea	60 (46.2)	
	Sangue periférico	70 (53.8)	
Doença de base	LMA	42 (32.3)	
	MM	20 (15.4)	
	LLA	21 (16.2)	
	AAS	17 (13.1)	
	LMC	9 (6.9)	
	LH	9 (6.9)	
	SMD	7 (5.4)	
	Outras	5 (3.8)	
	Condicionamento**	Mieloablativo	71 (71)
Não-mieloablativo		29 (29)	
Profilaxia DECH**	CSA MTX	87 (87)	
	Cy pós CSA MMF	10 (10)	
	CSA MMF	3 (3)	
Enxertia de neutrófilos	Sim/Não	126/4 (96.9/3.1)	
Enxertia de plaquetas	Sim/Não	116/14 (89.2/10.8)	

\* Informação disponível em 102 pares D/R;

\*\* Informação referente a 100 TCTH alogênicos.

4.1. Infecção pelo CMV nos TCTH alogênicos: Entre os 100 representantes de TCTH alogênico, 74 apresentaram antigenemia positiva com mediana de aparecimento no D+39 (-2 a 136 dias). Três destes pacientes eram soronegativos previamente ao TCTH e, portanto, foram caracterizados como infecção primária pelo CMV. Os demais foram caracterizados como reativação do CMV (7).

4.2. Dinâmica da reconstituição da imunidade específica para o CMV: Foram incluídos 130 receptores de TCTH na análise da reconstituição da imunidade ao CMV pelo QTF-CMV. A coleta do pré-TCTH foi feita com mediana no d-8 (-138 a -1); do D+30 com mediana no D+31 (13 a 53); do D+60 com mediana no D+61 (45 a 85); do D+90 com mediana no D+90 (79 a 115) e a coleta do D+120 foi feita com mediana no D+125 (99 a 182). O gráfico 1 mostra a dinâmica de reconstituição da imunidade CMV-específica em aproximadamente 700 amostras.



**Gráfico 1:** Reconstituição da imunidade CMV-específica durante o seguimento.

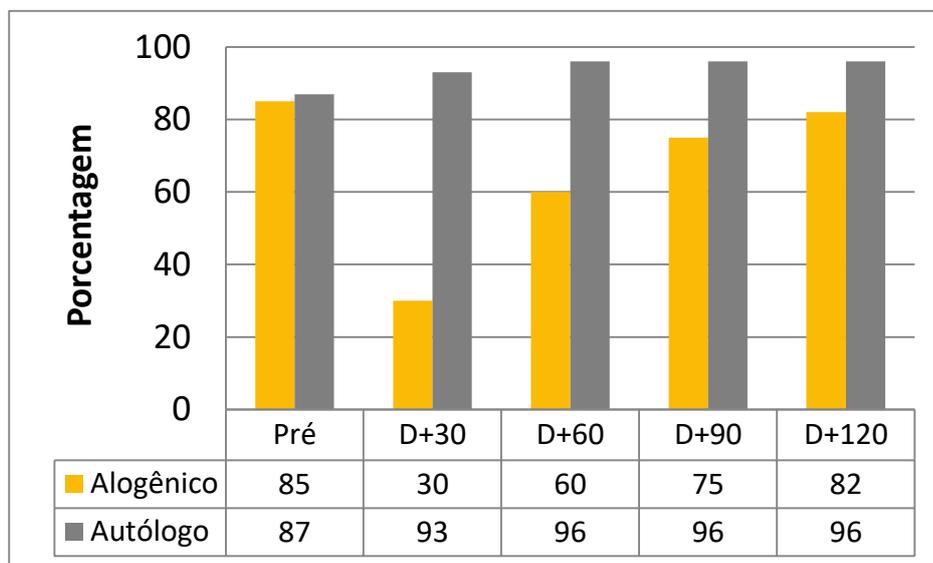
4.3. Diferenças na reconstituição imune no TCTH autólogo e alogênico: Na amostra pré-TCTH, o QTF-CMV foi reativo em 85 dos 100 receptores de TCTH alogênicos (85%) e em 26 dos 30 receptores e TCTH autólogos (86,7%;  $p=NS$ ).

No D+30, amostras de 127 pacientes foram analisadas com relação a imunidade ao CMV. Vinte e nove dos 97 receptores (29,9%) de TCTH alogênicos e

28 de 30 receptores autólogos eram reativos (93,3%;  $p < 0,0001$ ). No D+60, foram analisados 124 pacientes sendo que 56 de 94 alogênicos eram reativos (59,5%) em comparação com 96,6% dos autólogos (29 de 30 pacientes;  $p=0,002$ ).

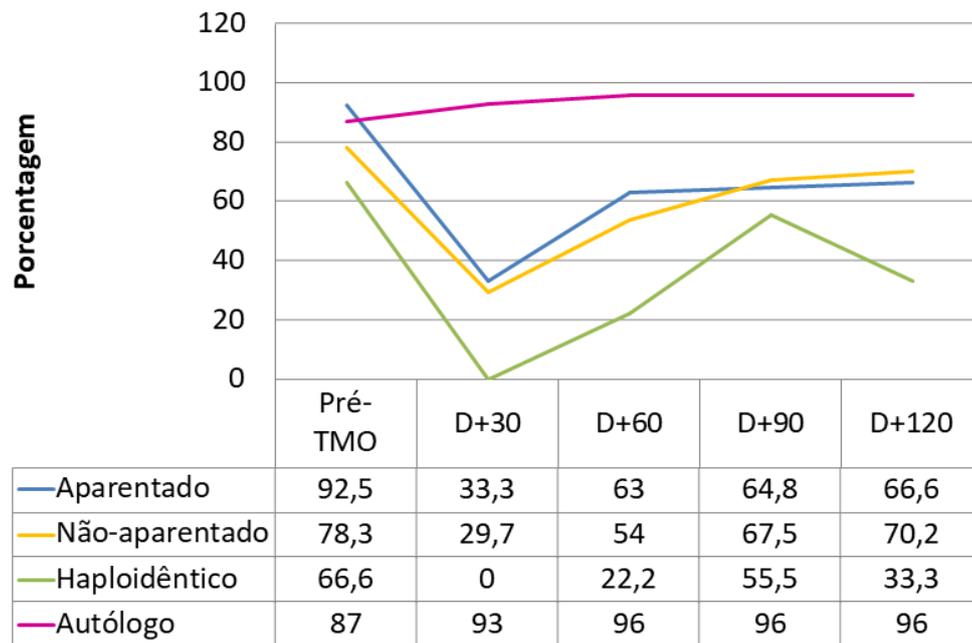
Até o D+90, 116 pacientes foram analisados. Vinte e nove dos 30 receptores (96,6%) de TCTH autólogos analisados nesse período mantiveram a imunidade CMV-específica, e 65 de 86 receptores de TCTH alogênicos recuperaram a imunidade CMV-específica (75,6%;  $p=0,002$ ).

No D+120, 14 pacientes haviam evoluído para óbito, 6 apresentaram recidiva da doença de base e 2 não coletaram a amostra do dia 120. Assim, 108 pacientes foram analisados. Sessenta e quatro dos 78 receptores (82%) de TCTH alogênico recuperaram a imunidade CMV-específica, enquanto que entre os autólogos a imunidade CMV-específica se manteve estável em 29 dos 30 pacientes (96,6%) a partir do D+60 ( $p=0,020$ , Gráfico 2).



**Gráfico 2:** Reconstituição da imunidade ao CMV em TCTH autólogo e alogênico

O gráfico 3 discrimina a reconstituição imune ao CMV no TCTH de acordo com o tipo de doador.



**Gráfico 3:** Diferença na reconstituição da imune de acordo com o tipo de doador

**4.4. Variáveis associadas à recuperação e persistência da imunidade CMV específica:** Analisamos as variáveis associadas à presença de imunidade ao CMV (QTF-CMV reativo) antes do transplante e após 90 dias. Nesta análise, os resultados indeterminados foram excluídos.

No pré-TCTH, a análise univariada mostrou que a presença de imunidade ao CMV se associou significativamente apenas com a soropositividade prévia do receptor (Tabela 3,  $p < 0,0001$ ); mas não com sexo ( $p = 0,15$ ), idade categorizada ( $\leq 18$  anos ou  $> 18$  anos,  $p = 0,64$ ), tipo de TCTH ( $p = 0,078$ ), doença de base ( $p = 0,80$ ) e o tempo de doença ( $p = 0,095$ ).

**Tabela 3:** Imunidade CMV-específica de acordo com status sorológico do receptor

Sorologia do receptor pré-TCTH	QTF-CMV pré-TCTH (%)		Total*
	Não reativo	Reativo	
Negativo	4 (80)	1 (20)	5 (100)
Positivo	5 (4,3)	110 (95,7)	115 (100)
Total*	9 (7,5)	111 (92,5)	120 (100)

\*dados disponíveis para 120 pacientes;  $p < 0,0001$

Já no D+90, a presença de imunidade específica detectada pela reatividade do QTF-CMV associou-se de forma significativa à positividade prévia da antigenemia ( $p=0,002$ ), e a detecção de imunidade ao CMV no D+30 ( $p<0,0001$ ) (tabelas 4 e 5). Entretanto, a recuperação da imunidade ao CMV no D+90 não foi influenciada pela idade ( $p=0,96$ ), sexo ( $p=0,60$ ), detecção de imunidade ao CMV no pré-TMO ( $p=0,18$ ), pelo tipo de condicionamento (mieloablativo ou não-mieloablativo,  $p=0,77$ ), soropositividade do doador ( $p=0,71$ ), do receptor ( $p=0,92$ ), fonte de célula tronco ( $p=0,10$ ), tipo de TCTH ( $p=0,15$ ) ou ocorrência de DECH aguda ( $p=0,28$ ).

**Tabela 4:** Imunidade CMV-específica no D+90 de acordo com antigenemia.

Antigenemia	QTF-CMV D+90 (%)		Total*
	Não reativo	Reativo	
Negativa	7 (50)	7 (50)	14 (100)
Positiva	9 (13,4)	58 (86,6)	67 (100)
Total	16 (19,8)	65 (80,2)	81 (100)

(\*excluídos resultados indeterminados;  $p=0,002$ )

**Tabela 4:** Imunidade CMV-específica no D+90 de acordo com imunidade ao CMV no D+30.

QTF-CMV D+30	QTF-CMV d+90 (%)		Total*
	Não reativo	Reativo	
Não reativo	12 (35,3)	22 (64,7)	34 (100)
Reativo	0 (0)	55 (100)	55 (100)
Total	12 (13,5)	77 (86,5)	89 (100)

(\*excluídos resultados indeterminados;  $p<0,0001$ )

4.5. Avaliação da positividade da antigenemia em função da reconstituição da imunidade ao CMV: O teste QTF-CMV realizado no D+30 mostrou uma diferença estatisticamente significativa com relação ao risco de viremia entre D+30 e D+60, entre pacientes imunes ou não-imunes ao CMV. O risco de viremia entre D+30 e D+60 foi o dobro nos pacientes não-reativos no D+30 como mostra a tabela 6 (80% versus 39%,  $p=0,019$ ).

**Tabela 6:** QTF-CMV no D+30 e ocorrência de viremia pelo CMV no mês subjacente.

QTF-CMV D+30	Antigenemia		Total*
	Negativa	Positiva	
Não reativo	4 (20)	16 (80)	20 (100)
Reativo	11 (61,1)	7 (38,9)	18 (100)
<b>Total</b>	<b>15 (39,5)</b>	<b>23 (60,5)</b>	<b>38 (100)</b>

(\*excluídos resultados indeterminados;  $p = 0,019$ )

A detecção de interferon pelo QTF-CMV no pré-TCTH, D+60 e D+90 não foi capaz de prever o risco de reativação do CMV no mês seguinte ( $p=NS$ ).

## 5. Discussão

A infecção por CMV continua sendo um frequente obstáculo ao sucesso dos transplantes de células tronco-hematopoiéticas. No presente estudo observamos que 74% dos receptores de transplante alogênico apresentaram pelo menos 1 episódio de infecção pelo CMV detectado pela antigenemia.

Historicamente, taxas de infecção por CMV variando de 4% a 80% tem sido descritas na ausência de profilaxia (8). Estudos recentes utilizando a antigenemia como marcador de infecção por CMV relatam taxas que variam de 36.5% a 91% nessa população (9–11). Já pelo PCR alguns estudos demonstram taxas variando entre 55% a 67% (12–14). É importante ressaltar que no cenário do TCTH as taxas variam de acordo com os fatores de risco da população estudada, e em vigência de imunossupressão, o risco de reativação do CMV reflete a soroprevalência local do CMV.

Embora a morbimortalidade das infecções pelo CMV tenham diminuído ao longo das últimas décadas (4,15), as taxas acima mostram que além das estratégias de controle de CMV pela terapia pré-emptiva ou pela profilaxia, outras abordagens diagnósticas necessitam ser implementadas para melhor controle do CMV.

Dentro dessas abordagens destaca-se o papel da reconstituição imune CMV-específica como etapa fundamental no clareamento da infecção.

A população estudada mostrou presença de imunidade ao CMV (QTF-CMV reativo) em 85,4% dos pacientes no pré-tmo. Observamos que apenas a soropositividade prévia do receptor se associou significativamente à presença de imunidade CMV-específica no pré-TMO. Surpreendentemente, a doença de base ou o tempo de duração da mesma no momento do TCTH não influenciaram na presença de imunidade CMV-específica. Uma perda drástica da imunidade ao CMV ocorre nos primeiros 30 dias, caindo a reatividade para 44,8% no D+30, aumentando progressivamente depois até atingir 86% dos pacientes no D+120.

É difícil comparar nossos resultados com dados da literatura uma vez que poucos estudos fizeram o monitoramento com os mesmo intervalos ou usaram a mesma técnica para determinar a imunidade CMV-específica.

Lee et al em estudo incluindo 25 pacientes observou imunidade ao CMV em 25% da população no D+30. Porém, outras dosagens de INF pelo QTF-CMV só foram feitas em pacientes que positivaram a antigenemia (16). Tey et al analisando 41 pacientes com dosagens semanais de INF a partir do D+21 encontrou uma incidência cumulativa de imunidade CMV-específica de 67,7% até o D+90 (17). Outros autores observaram taxas menores de imunidade ao CMV no pré-TMO (13,5%) e após 90 dias (40,5%) em comparação com os nossos resultados (14).

Observamos ainda que a reconstituição imune CMV-específica foi diferente em cada tipo de TCTH. Os receptores de TCTH autólogos mantiveram a imunidade ao longo do seguimento, o que diferiu significativamente dos alogênicos em todos os tempos comparados a partir do D+30. Na coorte dos alogênicos, observou-se que os pacientes que realizaram TCTH do tipo aparentado e não-aparentado, obtiveram uma recuperação imune CMV-específica similar até o D+60 como mostra o gráfico 3.

O pior cenário foi observado nos transplantes haploidênticos onde nenhum paciente recuperou a imunidade no D+30. Embora tenha havido um aumento gradativo na proporção de reativos até o D+90, o pequeno número de pacientes nessa categoria impede uma análise mais precisa.

Utilizando diferente tecnologia para avaliar a imunidade CMV-específica (ensaio de linfoproliferação e dosagem de INF por ELISA no sobrenadante de cultura), estudo realizado em 2002 na universidade São Paulo demonstrou que no D+30, 86% dos receptores de transplante autólogo apresentavam imunidade ao CMV em comparação com apenas 10% dos receptores de transplante alogênico (9). Outros estudos avaliando imunidade CMV-específica incluindo receptores de TCTH autólogo são escassos na literatura, tais como estudo recente realizado no MD Anderson (Houston, Texas, USA) que incluiu apenas 2 pacientes autólogos e, portanto, não permite comparações (18).

Ao término do seguimento, a detecção de imunidade ao CMV no D+30 e a positividade prévia da antigenemia foram fatores significativamente associados a persistência da imunidade no D+90. Observamos que todos os pacientes que estavam reativos no D+30 assim persistiram até o D+90. Por outro lado, quase 90% dos pacientes com QTF-CMV reativo no D+90 tinham apresentado positividade prévia da antigenemia. Krawczyk et al. 2018 também observou recuperação imune CMV-específica em todos os pacientes que apresentaram detecção de DNAemia de CMV com carga viral alta nos primeiros 3 meses pós TMO (19).

Esses dados demonstram que os primeiros 30 dias do transplante são críticos na reconstituição da imunidade ao CMV e na sua persistência até 90 dias. É provável que o QTF-CMV reativo no D+30 seja um bom marcador de persistência da imunidade ao CMV ao longo do seguimento, com conseqüente menor risco de complicações relacionadas ao CMV. Além disso, fica evidente que após o D+30, a reativação da infecção pelo CMV constitui um forte estímulo imunológico para a recuperação da imunidade CMV-específica nos primeiros três meses do TCTH. Estudos anteriores utilizando ensaios sofisticados e não-comerciais observaram resultados semelhantes (6,20,21).

Os ensaios comerciais de dosagem de INF também têm sido utilizados como preditores da reativação do CMV. No presente estudo, observamos que a detecção de antigenemia foi duas vezes mais frequente nos pacientes com QTF-CMV não-reativo no D+30 (80%), em comparação com os pacientes reativos (39%).

Em 2009, Barron et al. utilizando ensaio de linfoproliferação e dosagem intracelular de citocinas observaram que pacientes com reatividade alta ao CMV pelo ensaio de linfoproliferação tinham baixa incidência de viremia (12).

Posteriormente, Tey et al observaram que a reconstituição da imunidade específica se estabilizava por volta do D+60, e que pacientes com QTF-CMV reativo nesse dia apresentavam um chance menor de reativação (27%) em comparação com os pacientes não-reativos (65%) no D+60. Observou ainda que nenhum dos pacientes com QTF-CMV reativo desenvolveu doença pelo CMV enquanto que 13% dos não-reativos desenvolveram doença comprovada pelo CMV (17).

Outros autores encontraram resultados semelhantes. Nesher et al observaram que pacientes com forte reatividade no ensaio ELISPOT apresentavam risco significativamente menor para a reativação de CMV do que os pacientes com fraca reatividade (10). Similarmente, Lee et al observaram que pacientes QTF-CMV reativos após um episódio de reativação não apresentaram reativações recorrentes, ao passo que recidivas da antigenemia foram observadas em 62,5% dos pacientes QTF-CMV não-reativos e em 100% dos indeterminados (16).

Mais recentemente, Krawczyk et al. observaram com uma sensibilidade de 42% e especificidade de 100% que pacientes com dosagem de dosagem de INF maior ou igual a 8.9 UI/ml pelo ELISPOT não apresentaram carga viral alta de CMV no sangue (19).

## **6. Conclusões**

✓ A reconstituição da imunidade CMV específica é diferente entre os autólogos e alogênicos. Nos alogênicos observa-se uma perda transitória da imunidade CMV-específica, enquanto que nos autólogos não ocorre essa perda. Portanto, a imunossupressão pós-transplante é responsável por esses achados.

✓ A reativação do CMV detectada pela antigenemia representa um forte estímulo imunológico para a reconstituição imune CMV-específica.

✓ O ensaio QTF-CMV do D+30 mostrou-se um bom marcador para avaliar a reconstituição e persistência da imunidade celular CMV-específica nos primeiros 3 meses pós-TCTH. A maioria dos pacientes reativos do D+30, persistiram reativos no D+90. No D+30, pacientes não-reativos apresentaram risco duas vezes maior de positividade da antigenemia em comparação com os reativos.

✓ A implantação em laboratórios clínicos dos ensaios comerciais de dosagem de INF gama para avaliação da imunidade CMV-específica é factível e pode representar uma ferramenta valiosa no manejo das infecções pelo CMV.

## Referências Bibliográficas

1. Boeckh M, Gooley TA, Myerson D, Cunningham T, Schoch G, Bowden RA. Cytomegalovirus pp65 antigenemia-guided early treatment with ganciclovir versus ganciclovir at engraftment after allogeneic marrow transplantation: a randomized double-blind study. *Blood*. 1996;88(10):4063–71.
2. Cardeñoso L, Pinsky B a., Lautenschlager I, Aslam S, Cobb B, Vilchez R a., et al. CMV antigenemia and quantitative viral load assessments in hematopoietic stem cell transplant recipients. *J Clin Virol*. 2013;56(2):108–12.
3. Crocchiolo R, Bramanti S, Vai A, Sarina B, Mineri R, Casari E, et al. Infections after T-replete haploidentical transplantation and high-dose cyclophosphamide as graft-versus-host disease prophylaxis. *Transpl Infect Dis*. 2015;17(2):242–9.
4. Boeckh M, Nichols WG, Papanicolaou G, Rubin R, Wingard JR, Zaia J. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: Current status, known challenges, and future strategies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2003;9(9):543–58.
5. Qing M, Yang F, Zhang B, Zou G, Robida JM, Yuan Z, et al. Cyclosporine inhibits flavivirus replication through blocking the interaction between host cyclophilins and viral NS5 protein. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(8):3226–35.
6. Reusser P, Riddell SR, Meyers JD, Greenberg PD. Cytotoxic T-Lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus Infection and Disease. *Blood*. 1991;78(5):1371–80.
7. Ljungman P, Boeckh M, Hirsch HH, Josephson F, Lundgren J, Nichols G, et al. Definitions of CMV infection and disease in transplant patients for use in clinical trials. *Clin Infect Dis*. 2017;64(1):84–91.
8. Ljungman P, Hakki M, Boeckh M. Cytomegalovirus in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Infect Dis Clin North Am*. 2010;24(2):319–37.
9. Mendes AVA, Benard G, Pereira CB, Kallas EG, Duarte AJS, Pannuti CS, et al. Different kinetics in anti-cytomegalovirus immunity reconstitution evaluated by lymphocyte proliferation and IFN- $\gamma$  production in allogeneic and autologous bone marrow transplantation. *Acta Haematol*. 2002;107(4).
10. Neshar L, Shah DP, Ariza-Heredia EJ, Azzi JM, Siddiqui HK, Ghantaji SS, et

- al. Utility of the enzyme-linked immunospot interferon- $\gamma$ - release assay to predict the risk of cytomegalovirus infection in hematopoietic cell transplant recipients. *J Infect Dis.* 2016;213(11):1701–7.
11. Bae S, Jung J, Kim S-M, Kang Y-A, Lee Y-S, Chong YP, et al. The detailed kinetics of cytomegalovirus-specific T cell responses after hematopoietic stem cell transplantation: 1 year follow-up data. *Immune Netw.* 2018;18(2):1–9.
  12. Barron MA, Gao D, Springer KL, Patterson JA, Brunvand MW, McSweeney PA, et al. Relationship of Reconstituted Adaptive and Innate Cytomegalovirus (CMV)–Specific Immune Responses with CMV Viremia in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Clin Infect Dis.* 2009;49(12):1777–83.
  13. Yong MK, Cameron PU, Slavin M, Morrissey CO, Bergin K, Spencer A, et al. Identifying cytomegalovirus complications using the quantiferon-CMV assay after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Infect Dis.* 2017;215(11):1684–94.
  14. Paouri B, Soldatou A, Petrakou E, Theodosaki M, Tsentidis C, Kaisari K, et al. Quantiferon-Cytomegalovirus assay: A potentially useful tool in the evaluation of CMV-specific CD8+ T-cell reconstitution in pediatric hematopoietic stem cell transplant patients. *Pediatr Transplant.* 2018;22(5).
  15. Ljungman P, Hakki M, Boeckh M. Cytomegalovirus in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2011;25(1):151–69.
  16. Lee SM, Kim YJ, Yoo KH, Sung KW, Koo HH, Kang ES. Clinical usefulness of monitoring cytomegalovirus-specific immunity by quantiferon-CMV in pediatric allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients. *Ann Lab Med.* 2017;37(3):277–81.
  17. Tey SK, Kennedy GA, Cromer D, Davenport MP, Walker S, Jones LI, 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.* 2013;8(10):1–7.
  18. Haddad L El, Ariza-heredia E, Shah DP, Jiang Y, Ghantaji SS, Chaer F El, et al. The Ability of a Cytomegalovirus ELISPOT Assay to Predict Outcome of Low-Level CMV Reactivation in Hematopoietic Cell Transplant Recipients. *J Infect Dis.* 2018;
  19. Krawczyk A, Ackermann J, Goitowski B, Trenscher R, Ditschkowski M, Timm J,

- et al. Assessing the risk of CMV reactivation and reconstitution of antiviral immune response post bone marrow transplantation by the QuantiFERON-CMV-assay and real time PCR. *J Clin Virol*. 2018;99–100(January):61–6.
20. Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ, Finch RJ, Watanabe KS, Thomas ED, et al. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med*. 1995 Oct;333(16):1038–44.
21. Hakki M, Riddell SR, Storek J, Carter R a., Stevens-Ayers T, Sudour P, et al. Immune reconstitution to cytomegalovirus after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: Impact of host factors, drug therapy, and subclinical reactivation. *Blood*. 2003;102(8):3060–7.

## ANEXO A

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO Serviço de Transplante de Medula Óssea do Hospital Amaral Carvalho Jahu

#### DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : .....

SEXO : M  F

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO:..... CIDADE:.....

CEP:.....

TELEFONE:.....

2. RESPONSÁVEL LEGAL: .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.):.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....

SEXO: M  F

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO:..... CIDADE:.....

CEP:.....

TELEFONE:(.....).....

#### DADOS SOBRE A PESQUISA

1. **TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:** Dosagem de Interferon gama na avaliação da imunidade celular específica para o Citomegalovírus em receptores de transplante de células tronco-hematopoiéticas.
2. **RESPONSÁVEL:** Profª. Drª. Clarisse M. Machado.
3. **DEPARTAMENTO:** Serviço de Transplante de Medula Óssea.
4. **AVALIAÇÃO DE RISCO DA PESQUISA:**

Risco Mínimo	X	Risco Médio	
Risco Baixo		Risco Alto	

5. **DURAÇÃO DA PESQUISA:** 2 anos.

## **1 – DESENHO DO ESTUDO E OBJETIVO(S):**

O Serviço de TMO do Hospital Amaral Carvalho vai realizar uma pesquisa com um novo teste chamado Quantiferon-CMV que avalia como estão as defesas do transplantado contra o citomegalovírus (CMV). Esse vírus pode causar doença nos pulmões, estômago e intestino, especialmente nos primeiros 100 dias após o transplante. Para evitar essas doenças do CMV, os pacientes têm que fazer semanalmente um exame de sangue chamado Antigenemia que indica se o paciente precisa receber o tratamento antes que ele adoça. No estudo vamos avaliar se o novo teste de imunidade consegue identificar os pacientes que têm mais risco de adoecer pelo CMV. Além disso, nas amostras de sangue que já serão coletadas para realizar o exame da antigenemia vamos comparar um outro teste chamado PCR COBAS que mede a quantidade de CMV no sangue.

Portanto, vamos coletar uma amostra de sangue de 10 mL, uma vez por semana, nos primeiros 3 meses do transplante. Após isso, os médicos irão decidir qual a frequência de coleta que você precisa. Essa quantidade de sangue é suficiente para fazer todos os testes do estudo.

Seu médico assistente poderá fazer outros exames que julgar necessários, independentemente dessa pesquisa.

## **2 – DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS QUE SERÃO REALIZADOS**

O estudo será realizado com amostras de sangue que já são coletadas como parte do seu seguimento pós-transplante. As amostras serão coletadas do cateter se você tiver um cateter implantado ou pela veia do braço, caso você não tenha cateter.

## **3 – DESCRIÇÃO DOS DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS NOS PROCEDIMENTOS DOS ITENS 2 E 3**

Por ser um estudo em amostras de sangue já seriam coletadas para rotina de antigenemia, esse estudo não oferece mais riscos para você e também não vai afetar em nada o seu acompanhamento médico. O risco da coleta de sangue no caso de coleta pela veia é aparecer uma mancha roxa (hematoma) no local da punção.

## **4 – BENEFÍCIOS PARA O PARTICIPANTE**

Você não terá despesas pessoais por participar desse estudo, e nem qualquer obrigação. Também não haverá compensação financeira por sua participação. A princípio, esse estudo não trará nenhum benefício imediato a você. Entretanto, as informações obtidas de sua participação poderão beneficiar no futuro outras pessoas nas mesmas condições que você.

## **5 - AMOSTRAS ARMAZENADAS**

As amostras coletadas de sangue serão armazenadas em freezers no Laboratório de Citoquímica do Hospital Amaral Carvalho. Uma pequena parte de cada amostra de sangue, chamada de alíquota, será guardada para análises futuras de outros vírus também causadores de infecções em pessoas transplantadas ou para comparação com outros testes que surgirem. Se esses futuros estudos acontecerem, deverão ser aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HAC. Você tem a opção de retirar a qualquer momento essa alíquota (amostra armazenada para o futuro) do seu sangue do congelador de armazenamento. Se você não desejar que a equipe o estudo armazene essa alíquota de amostras do sangue, mesmo assim você poderá participar desse estudo.

## **6 – GARANTIA DE ACESSO:**

Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Um deles é Dra. Clarisse M. Machado, que pode ser encontrada na enfermaria do transplante ou na Avenida Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470, 2º andar, SP, ou pelo endereço eletrônico clarimm@usp.br. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Centro de Pesquisas Clínicas da Fundação Hospital Amaral Carvalho pelo telefone (14) 3602 – 1399.

## **7 – DIREITO DE CONFIDENCIALIDADE**

Sua participação neste estudo é confidencial e sigilosa. Você poderá ter acesso aos resultados dos seus exames colhidos durante o estudo, bem como terá acesso, se assim desejar, às publicações científicas dos resultados da pesquisa.

## **8– DESPESAS E COMPENSAÇÕES:**

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Após ter sido esclarecido sobre o estudo, você poderá decidir se deseja ou não participar. Se decidir participar, você será solicitado a assinar esse **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** ou colocar suas impressões digitais em frente a uma testemunha de sua confiança. Nós guardaremos uma cópia desse documento e você receberá o original assinado. Caso você aceite participar, nada em seu tratamento, ou acompanhamento será modificado.

## CONSENTIMENTO

Eu, abaixo assinado, afirmo que li e entendi completamente as informações. Concordo que as informações a respeito de minha condição médica e minhas amostras de sangue podem ser utilizados neste estudo. Concordo também que minhas amostras que serão armazenadas sejam utilizadas em estudos futuros desde que aprovados pelo comitê de ética.

Minha participação é voluntária e livre de qualquer tipo de pressão ou coação. Eu entendo que estas informações serão confidenciais e que meu nome não será mencionado em qualquer publicação deste estudo.

\_\_\_\_\_  
Nome completo do voluntário/representante legal

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Assinatura do voluntário/representante legal

\_\_\_\_\_  
Data

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo

\_\_\_\_\_  
Pesquisadora responsável: Dra. Clarisse M. Machado

\_\_\_\_\_  
Data

\_\_\_\_\_  
Médico responsável: Dr. Vergílio Colturato

\_\_\_\_\_  
Data