

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE PUERICULTURA E PEDIATRIA

Virgínia Mara de Deus Wagatsuma

Reinfecção com diferentes cepas virais em crianças com infecção  
congenita pelo *Citomegalovirus* (CMV)

Ribeirão Preto  
2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Virgínia Mara de Deus Wagatsuma

Reinfecção com diferentes cepas virais em crianças com infecção  
congenita pelo *Citomegalovirus* (CMV)

Tese apresentada ao Departamento de  
Puericultura e Pediatria da Faculdade de  
Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do  
título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Saúde da Criança e do  
Adolescente

Nome do orientador: Profª Drª

Aparecida Yulie Yamamoto

Ribeirão Preto  
2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

#### Catálogo da Publicação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Wagatsuma, Virgínia Mara de Deus Wagatsuma

Reinfecção com diferentes cepas virais em crianças com infecção congênita pelo *Citomegalovirus* (CMV). Ribeirão Preto, 2010

100 f. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente Opção: Investigação em Saúde da Criança e do Adolescente.

Orientador: Yamamoto, Aparecida Yulie

1. Citomegalovírus.
2. CMV.
3. Infecção congênita.
4. Reinfecção.
5. Reativação.
6. Persistência da excreção viral.

## FOLHA APROVAÇÃO

Nome: Virgínia Mara de Deus Wagatsuma

Título: Reinfecção com diferentes cepas virais em crianças com infecção congênita pelo *Citomegalovirus* (CMV).

Tese apresentada ao Departamento de Puericultura e Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Simone Kashima haddad

Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo

Assinatura \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana

Instituição: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo

Assinatura \_\_\_\_\_

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marisa Márcia Mussi-Pinhata

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo

Assinatura \_\_\_\_\_

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Virgínia Paes Leme Ferriani

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo

Assinatura \_\_\_\_\_

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aparecida Yulie Yamamoto

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo

Assinatura \_\_\_\_\_

**Trabalho realizado no Departamento de Pediatria e Puericultura e  
Unidade de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - USP.**

**TRABALHO DESENVOLVIDO COM AUXÍLIO FINANCEIRO DA CAPES-PROAP.**

## *Dedicatória*

*Dedico à minha mãe Neide, minha tia Aparecida e ao meu namorado, Fábio Tadeu, pelo amor, carinho, compreensão, e principalmente pelo apoio ao longo da realização deste trabalho.*

*Agradeço em especial à minha orientadora,  
Dr.<sup>a</sup> Aparecida Yulie Yamamoto, pelo voto de  
confiança e principalmente pelos  
ensinamentos, convivência e amizade, que  
muito contribuíram para o meu crescimento  
pessoal e intelectual, mostrando-me que há  
sempre algo novo para se aprender a cada dia.  
Muito obrigada.*

"É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar;  
é melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder.  
Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver ..."

**Martin Luther King**

"Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode  
começar agora e fazer um novo fim."  
**Chico Xavier**

## AGRADECIMENTOS

- ♣ *À Deus pela vida e por acender a luz da compreensão, paciência e perseverança.*
- ♣ *À minha mãe e minha tia, que muito me amaram e apoiaram incondicionalmente e, a meu namorado, pelo apoio, paciência e amor ao longo destes anos.*
- ♣ *À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Aparecida Yulie Yamamoto, por quem tenho grande admiração, meu sincero agradecimento por sua dedicação em todas as fases deste estudo. Muito obrigada pela orientação e pela paciência durante os anos de desenvolvimento deste trabalho.*
- ♣ *Ao auxílio financeiro CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).*
- ♣ *Aos membros da banca examinadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Simone Kashima Haddad, Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marisa Márcia Mussi-Pinhata, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Virgínia Paes Leme Ferriani, pela disponibilidade e sugestões que muito contribuíram com a fase final deste trabalho.*
- ♣ *Aos colegas do Laboratório de Pediatria pela convivência diária, especialmente a Cleonice (a qualquer dia e a qualquer hora), Evelise (uma pequena de talento), Lúcia (uma grande amiga), Priscilla (tudo azul!!!) e Rosane (“uso capeão”!!!).*
- ♣ *À Valkíria pelo carinho e amizade, por muitas vezes me fazer sentir em casa, amada e bem alimentada.*
- ♣ *À Vanessa, minha irmã de coração.*
- ♣ *À Patrícia Frizo de Carvalho e Oliveira pela amizade e companheirismo em todos os momentos.*
- ♣ *Às amigas Tatiana Camila Matsubara, Érica Okushiro e Luciana Maria Teixeira Rodrigues, meu muito obrigada pela amizade, carinho e companheirismo durante este período.*
- ♣ *À Camila dos Santos Alvim e Aline Rafaela da Silva Rodrigues pela dedicação na aplicação do termo de consentimento e coleta de amostras para triagem neonatal, possibilitando a identificação das crianças com infecção congênita pelo CMV incluídas neste estudo.*

- ✦ Aos colegas que contribuíram em diferentes períodos com este estudo: Lauro Juliano Marin (o mais novo docente da UESC), Thalita Bonadio Coelho, Edgar Carlos Rey, Karina Castellano e Hevelyn Beordo.
- ✦ À equipe do Ambulatório de Infecções Congênitas e Perinatais (ICOP) especialmente à Dr.<sup>a</sup> Cristina Gardonyi Carvalheiro e à Dr.<sup>a</sup> Fabiana Rezende Amaral que em conjunto com a Dr.<sup>a</sup> Aparecida Yulie Yamamoto, participaram do seguimento clínico destas crianças.
- ✦ Às assistentes sociais Magda Barbí Scavazzini e Sílvia Luiz Antônio pelo contato permanente com os responsáveis das crianças, possibilitando seu retorno ao ambulatório.
- ✦ Aos docentes do Departamento de Puericultura e Pediatria da FMRP pelos ensinamentos básicos durante o curso de pós-graduação e incentivo a pesquisa.
- ✦ Ao Davi Casale Aragon, estatístico do Departamento de Puericultura e Pediatria da FMRP, pela análise estatística dos resultados obtidos.
- ✦ Aos funcionários do Departamento de Puericultura e Pediatria da FMRP, em especial a secretária de pós-graduação Sandra Eugênio Oliveira, que se dedicam para deixar tudo em ordem para desempenharmos nosso trabalho.
- ✦ Aos colegas do Grupo NEIMPI, especialmente Mariluiza, Marisa e Sílvia Ríldolfo e, à Aparecida Helena Druzile Quirino pelo apoio técnico na aquisição dos reagentes para a realização dos testes laboratoriais.
- ✦ Aos amigos dos laboratórios da área da pesquisa, Adriana, Anemari, Andrielle, Camila, Carmem, Daiane (a “linda” do turquinho), Danielle, Danilo, Fernanda, Gislane, Kelen, Lucas, Nathália e Patrícia, pelo apoio e carinho.
- ✦ Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular, Aline (Xuxu), Bruno (mineirinho da gema, o “terror” da imuno e futuro cidadão manauara), Evandra (a “chefinha”), Katia (minha “filhota” e grande amiga), Mariana (segundo MF “a Barbie da Biomol” e a pessoa que mais sente frio), Maria Fernanda (agora do NIH - chique!!!), Maurício (organizador oficial da “costela de chão”), Rochele (agora do NAT, mas biomol de coração), Rodrigo (agora da hemato, mas pra sempre turquinho), Simone (uma pessoa extremamente competente), Slav (um búlgaro perdido em Ribeirão) e Tathiane (senhora “iPS”), que me receberam de “braços abertos” e tornam todos os dias de trabalho mais alegres.
- ✦ E especialmente a todas as crianças e seus respectivos pais que consentiram em participar do estudo e acreditaram na seriedade e importância deste estudo.

## RESUMO

Wagatsuma, V. M. D. **Reinfecção com diferentes cepas virais em crianças com infecção congênita pelo Citomegalovírus (CMV)**. 2010; 100 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2010.

O *Citomegalovirus* (CMV) é o agente causal mais frequente de infecção congênita no homem, constituindo importante problema de saúde pública em decorrência da gravidade das sequelas em longo prazo na infância. É conhecido que crianças congenitamente infectadas pelo CMV apresentam excreção viral prolongada com grande contribuição no ciclo natural da infecção pelo CMV. Entretanto, não é conhecido se estas crianças albergam uma única cepa do CMV ou se a reinfecção com novas cepas contribui para manutenção da excreção viral prolongada. Para determinar a frequência de reinfecção e da mistura de genótipos (excreção simultânea de duas ou mais cepas do CMV no mesmo sítio de excreção), amostras seriadas de urina e saliva de 85 crianças com infecção congênita pelo CMV foram coletadas prospectivamente até pelo menos quatro anos de vida. As diferentes cepas foram classificadas por meio da análise do tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP) em uma das quatro principais variantes genotípicas da glicoproteína B (gB) e, a confirmação da mistura de cepas foi realizada pela PCR *primer*-específica para as quatro variantes da glicoproteína N (gN). A caracterização genotípica da glicoproteína B (gB) em amostras de urina e saliva de crianças com infecção congênita no presente estudo demonstrou que 44% das crianças haviam adquirido uma nova cepa ao final do quarto ano de vida. Entretanto, uma parcela destas crianças apresentou evidências moleculares de reinfecção por uma nova variante genotípica, sendo a de maior incidência de reinfecção por uma nova cepa do CMV (20%), a faixa etária dos dois anos de vida. A mistura de cepas na mesma amostra foi confirmada em 19% das crianças que adquiriram uma nova cepa do CMV. Corroborando com este achado, após períodos de intermitência da excreção viral observou-se que a maioria das crianças permanece excretando uma cepa com as mesmas características daquela adquirida intraútero, ou seja, a reativação da cepa latente é mais frequente quando comparada à reinfecção por uma nova cepa do CMV [4/30 (13%) vs. 26/30 (87%);  $p < 0,0001$ ]. Ainda com relação à ocorrência de reinfecção, com exceção da idade de início do convívio em creches (média de 2 anos  $\pm$  1 ano; OR = 11,92; IC95% 1,21-285,72) e do número de pessoas na mesma casa no período do nascimento (média de 4 pessoas; OR = 4,33; IC95% 1,24 – 15,21), nenhum dos fatores de risco avaliados mostrou associação com a aquisição de uma nova cepa do CMV. A elevada frequência de reinfecção associada à média da idade de início do convívio em creche e/ou instituição e o número de pessoas na mesma casa ao nascimento implicam que a reinfecção está associada à frequente exposição a um grande número de cepas circulantes. Entretanto, a prevalência de um maior número de crianças que apresentaram reativação da cepa endógena sugere que a excreção viral por longos períodos em crianças congenitamente infectadas pelo CMV pode estar associada persistência da infecção da cepa adquirida no período intraútero.

Palavras chave: Citomegalovírus, CMV, infecção congênita, reinfecção, reativação, persistência da excreção viral.

## ABSTRACT

Wagatsuma, V. M. D. **Reinfection with different strains in congenitally Cytomegalovirus (CMV) infected children.** 2010; 100 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2010.

Cytomegalovirus is the major cause of congenital infection, constituting an important public health problem due to long term sequel gravidity during infancy. It is known that congenitally CMV infected children present a prolonged viral shedding contributing to the natural cycle of the infection by CMV. However, it is not known whether these children are infected with one strain or if the reinfection with new strains contributes to prolonged viral shedding maintenance. To determine the frequency of reinfection as well as the frequency of mixture of genotypes (one or more CMV strains at the same excretion site simultaneously), serial urine and saliva samples of 85 congenitally CMV infected children with at least four years of life were prospectively collected. Different strains were classified through restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis in one of the four major glycoprotein B (gB) variants and, confirmation of mixture genotypes was performed by a specific *primer* PCR for four glycoprotein N (gN) variants. In this study the glycoprotein B (gB) genotypic characterization in urine and saliva samples from congenitally infected children showed that at the end of fourth year of life 44% of children had acquired a new CMV strain. However, part of these children presented molecular evidences of reinfection by a new genotypic CMV variant, being the two years of life, the age range of higher incidence by a new CMV strain (20%). The mixture of strains in the same sample was confirmed in 19% of children who had acquired a new CMV strain. Corroborating with this finding, after viral excretion intermittent periods it was observed that most of children persisted in excreting the same strain acquired during pregnancy, indicating that the reactivation of latent strain is more frequent when compared to reinfection with a new CMV strain [4/30 (13%) vs. 26/30 (87%);  $p < 0,0001$ ]. Regarding the reinfection occurrence, except for the starting age a child goes to day care center (mean of  $2 \pm 1$  year; OR = 11,92; IC95% 1,21-285,72) and number of individuals at home at birth (média de 4 pessoas; OR = 4,33; IC95% 1,24 – 15,21), none of the risk factors evaluated were associated to the acquisition of a new CMV strain. The high frequency of reinfection with a new CMV strain associated with the average age at a day care center and number of individuals ath home at birth implies that reinfection is associated to the frequent exposure to a large number of different circulating strains. However, the prevalence of a greater number of children who presented reactivation of endogenous strain suggests that prolonged viral shedding in congenitally CMV infected children may be associated with the persistent infection caused by the acquired strains during gestational age.

Key words: Cytomegalovirus, CMV, congenital infection, reinfection, reactivation, persistence of viral excretion.

## LISTA DE FIGURAS APRESENTADAS NO TEXTO

- Figura 1** – Estrutura viral. Representação esquemática da partícula viral do CMV e seus componentes..... 21
- Figura 2** – Representação esquemática do processo de isomerização entre as duas regiões que compõem o genoma do CMV, levando à formação de quatro formas isoméricas equimolares..... 22
- Figura 3** – Representação esquemática do mapa genético da cepa AD169 do *Citomegalovirus* humano ..... 24
- Figura 4** – Gel de agarose 1000 a 1,8%, demonstrando a excreção simultânea de mais de uma cepa do CMV. Ao nascimento, esta criança excretava o genótipo gB1 e, em amostra coletada aos 18 meses, podemos observar a presença de um genótipo gB diferente do identificado ao nascimento. Posteriormente, aos 2 anos e 11 meses, a mesma variante genotípica do nascimento foi identificada e, aos 4 anos e seis meses, a excreção simultânea destas duas variantes - gB1/gB2. Mpb – marcador de pares de bases (25bp) .... 42
- Figura 5** – Gel de agarose a 2%. Ensaio confirmatório da excreção simultânea de diferentes genótipos. Mpb – marcador de pares de bases (100bp); 1 – amostra de urina caracterizada com o genótipo gB1; 2 – amostra de urina caracterizada com os genótipos gB1/gB2; 3 – controle positivo da reação: amostras de leite previamente caracterizadas para cada uma das variantes genotípicas da gN; 4 – controle negativo. (A) – PCR cepa específica para os genótipos gN1 e gN2. (B) – PCR cepa específica para os genótipos gN3 e gN4..... 43
- Figura 6** - Determinação genotípica das cepas virais identificadas em amostras de urina e saliva através da análise do polimorfismo dos diferentes fragmentos de restrição, em gel de agarose 1000 1,8%. Adaptado do estudo de Chou e Dennison (1991)..... 47

## LISTA DE TABELAS APRESENTADAS NO TEXTO

<b>Tabela 1</b> – Sequência nucleotídica dos <i>primers</i> utilizados na semi-nested PCR.....	46
<b>Tabela 2</b> – <i>Primers</i> utilizados para amplificação gênica da gN, como ensaio confirmatório da ocorrência de coinfeção por diferentes cepas do CMV.....	48
<b>Tabela 3</b> – Número total de crianças avaliadas e que perderam o seguimento por faixa etária.....	53
<b>Tabela 4</b> – Ocorrência de reinfeção pela aquisição de novas cepas do CMV pelo uso da tabua de sobrevivência de Kaplan-Meier).....	55
<b>Tabela 5</b> - Confirmação da excreção simultânea de múltiplas cepas do CMV, baseado na variabilidade das glicoproteínas B e N .....	58
<b>Tabela 6</b> - Manutenção da excreção viral e ocorrência de reinfeção em crianças com infecção congênita pelo CMV.....	59
<b>Tabela 7</b> - Fatores de risco associados à ocorrência de reinfeção por uma nova cepa do CMV .....	62

## LISTA DE FLUXOGRAMAS APRESENTADOS NO TEXTO

**Fluxograma 1** – Representação esquemática do acompanhamento longitudinal das 85 crianças com infecção congênita pelo CMV, salientando o número de crianças que se mantiveram e que perderam o seguimento, por faixa etária ..... 52

## LISTA DE GRÁFICOS APRESENTADOS NO TEXTO

- Gráfico 1** - Frequência relativa da ocorrência de reinfecção (número de novos casos) por uma nova cepa do CMV nas diferentes faixas etárias..... 54
- Gráfico 2** - Gráfico de sobrevivência proposto por Kaplan-Meier mostrando a frequência de reinfecção e os dados censurados durante o período de seguimento..... 57

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
1.1 Histórico.....	19
1.2 Características virais .....	20
1.2.1 Estrutura viral e genômica.....	22
1.2.2 Variabilidade genética .....	26
1.3 Replicação viral.....	29
1.4 Patogênese da infecção pelo CMV .....	31
1.5 Infecção congênita pelo CMV .....	32
<b>2 JUSTIFICATIVAS DO ESTUDO .....</b>	<b>35</b>
<b>3 OBJETIVOS DO ESTUDO .....</b>	<b>38</b>
3.1 Objetivo geral .....	38
3.2 Objetivos específicos .....	38
<b>4 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
4.1 População de estudo .....	40
4.2 Aspectos Éticos .....	40
4.3 Critérios para definição da infecção congênita pelo CMV .....	40
4.4 Critérios de inclusão .....	40
4.5 Coleta e preparo das amostras.....	41
4.6 Critérios para determinação de reinfecção.....	42
4.7 Critérios para definição da frequência de reinfecção e da frequência de reativação após um período de intermitência da excreção viral.....	44
4.8 Identificação de possíveis fatores de risco associados à ocorrência de reinfecção em crianças com infecção congênita pelo CMV .....	44
4.8.1 Métodos laboratoriais .....	45
4.8.1.1 PCR de duas etapas para detecção do DNA do CMV (semi-nested-PCR) .....	45
4.8.1.2 Detecção dos produtos amplificados .....	46
4.9 Caracterização molecular das cepas do CMV baseado na variabilidade genética da glicoproteína B (gB) .....	46
4.10 Caracterização molecular das variantes genotípicas da glicoproteína N (gN).....	47
4.11 Análise Estatística .....	49

<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>51</b>
5.1 Caracterização da população de estudo .....	51
5.2 Determinação da frequência de reinfecção por uma nova cepa do CMV baseado na variabilidade genética da glicoproteína B (gB) .....	53
5.3 .....	57
Confirmação da ocorrência de mistura de cepas distintas do CMV na mesma amostra de urina e/ou saliva .....	57
5.4 Frequência de reativação e de reinfecção em crianças com infecção congênita pelo CMV, após intermitência da excreção viral .....	60
5.5 Fatores de risco associados à ocorrência de reinfecção por uma nova cepa do CMV em crianças congenitamente infectadas .....	61
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>65</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>77</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>92</b>
ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	92
ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	93
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>97</b>
APÊNDICE A – Questionário utilizado para obtenção de informações referentes aos caracteres sociodemográficos.....	97
APÊNDICE B - Dados referentes às 85 crianças que compõem esta casuística. ....	98

## ***INTRODUÇÃO***

---

## **1 INTRODUÇÃO**

### **1.1 Histórico**

A primeira descrição do Citomegalovirus Humano (CMV) foi realizada por Jesionek em 1904 a partir da observação de alterações morfológicas representadas pelo aumento do volume celular devido à formação de inclusões intranucleares e citoplasmáticas em células de pulmão, rim e fígado durante a biópsia de um feto prematuro morto (JESIONEK, 1904), caracterizadas pela formação de um halo perinuclear branco e condensamento da cromatina nuclear (Figura 1). No mesmo ano, Ribbert declarou ter observado células morfológicamente similares em amostras de fígado de um recém-nascido durante exames anatomopatológicos no ano de 1881 (RIBBERT, 1904). Apesar de Goodpasture e Talbot terem proposto o termo “citomegalia” em 1921 para caracterizar as alterações morfológicas observadas nas células infectadas (GOODPASTURE; TALBOT, 1921), o relacionamento destas alterações como etiológicas da infecção viral foi realizado por Von Glahn e Pappenheimer em 1925. Neste estudo, os autores descreveram células semelhantes às observadas em lesões cutâneas devidas ao Herpes Zoster e Herpes Genital em um paciente do sexo masculino, sendo esta a primeira evidência de que estas alterações morfológicas estariam relacionadas a um dado grupo de vírus, hoje conhecido como Família Herpesvírus (VON GLAHN; PAPPENHEIMER, 1925).

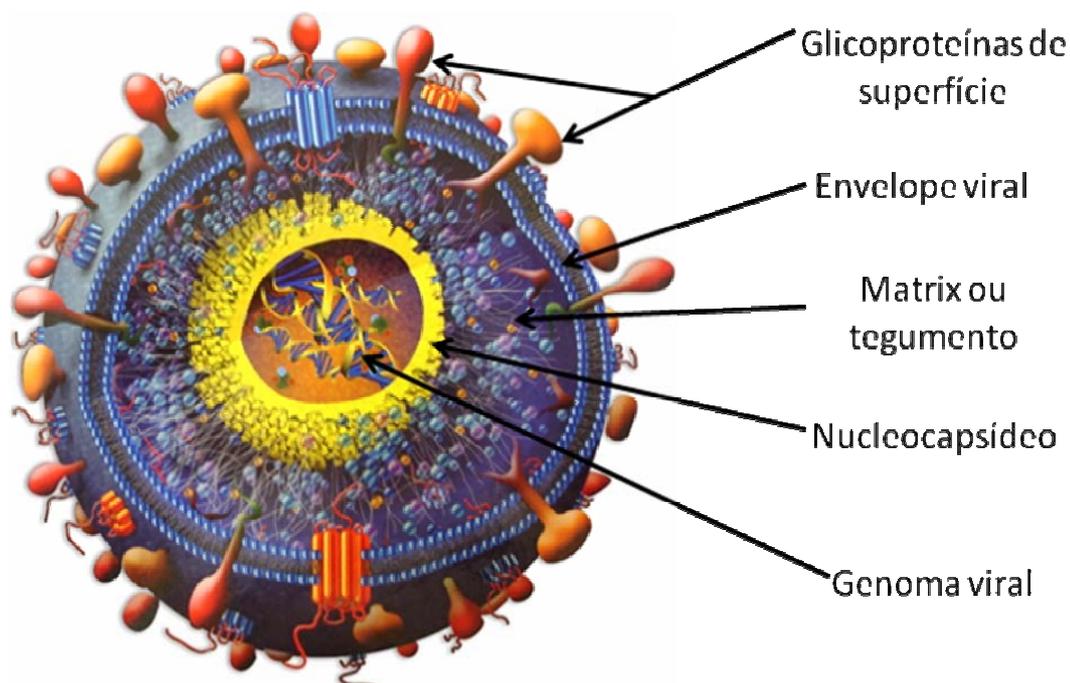
No início da década de 50, o termo “doença de inclusão citomegálica generalizada” (CID) foi utilizado para descrever crianças com envolvimento sistêmico (WYATT et al., 1950). A identificação de células citomegálicas *pré-mortem* na urina de uma criança e subsequentemente em diversos órgãos foi demonstrada por Fetterman (FETTERMAN, 1952). Em meados da década de 50, o uso da técnica de microscopia eletrônica permitiu a descrição de partículas virais livres no citoplasma e nas proximidades da inclusão intranuclear em células de pâncreas (MINDER, 1953). Apesar de inúmeras vezes terem sido identificadas células apresentando alterações morfológicas características da infecção pelo CMV, até meados da década de 50 não era possível realizar o isolamento do CMV humano em cultura celular. Entretanto, o isolamento do poliovírus humano por Enders et al. (1949)

em cultura de células embrionárias humanas trouxe novas expectativas. O CMV foi primeiramente isolado em células humanas por Margareth Smith, em 1955, a partir de glândulas salivares de um paciente que havia evoluído para óbito.

Posteriormente, em 1956, o CMV foi novamente isolado a partir do tecido renal de uma criança diagnosticada com CID (SMITH, 1956). Casualmente, o primeiro vírus isolado a partir de um hospedeiro vivo ocorreu durante a tentativa de isolamento do parasita *Toxoplasma gondii* a partir de uma biópsia de fígado de um recém-nascido com hepatoesplenomegalia, calcificações cerebrais e coriorretinite. A cultura celular quando analisada demonstrou a presença de células “inchadas”, “gigantes”, características da citopatologia ocasionada pelo CMV. A continuidade de estudos envolvendo esta cepa – denominada Davis – levou os pesquisadores a concluir a descoberta do agente causal da doença de inclusão citomegálica, o Citomegalovirus (WELLER, 1957; 1970). A propagação do CMV em cultura de células propiciou o preparo e desenvolvimento de métodos diagnósticos, bem como seu estudo *in vitro*.

## **1.2 Características virais**

O Herpesvírus Humano tipo 5 (HHV-5) ou *Citomegalovirus* (CMV) está amplamente distribuído, podendo ser encontrado em qualquer área geográfica mundial, sendo considerado o maior membro da família *Herpesviridae*, com um diâmetro variável entre 120 e 200 nanômetros (nM). A família *Hesperviridae* compreende mais de 100 diferentes espécies de vírus de DNA, dos quais oito são responsáveis por causar infecções em humanos (van LINT; KNIPE, 2009). Dentre as características comuns aos membros desta família podemos destacar a estrutura viral, cujo genoma compõe-se de um DNA linear de fita dupla, envolto por capsídeo icosaédrico recoberto por uma substância amorfa denominada tegumento e, um envelope viral contendo glicoproteínas em sua superfície (MOCARSKI; SHENK; PASS, 2007), como mostra a Figura 1.

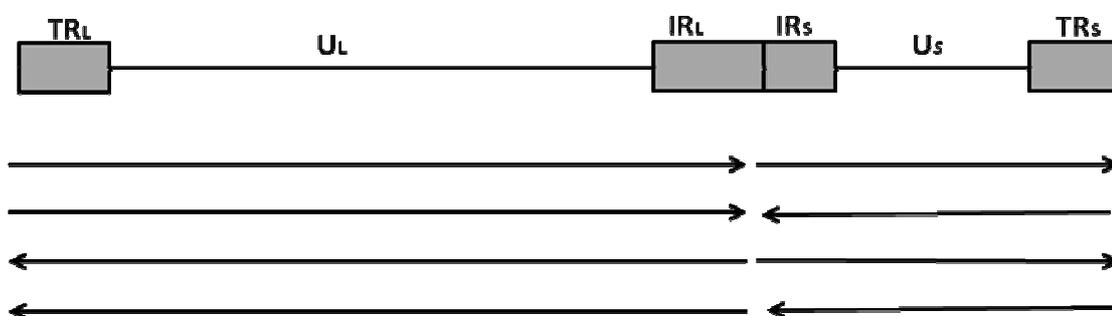


**Figura 1** – Estrutura viral. Representação esquemática da partícula vira do CMV e seus componentes. Adaptado de Reddehase (2006).

Com relação à classificação desta família, os herpesvírus humanos estão subdivididos em três grandes grupos denominados subfamílias: *Alfaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae*. Segundo o Comitê Internacional de Taxonomia viral (ICTV, 2006), o CMV pertence à subfamília *Betaherpesviridae*, que por sua vez é composta pelos gêneros *Citomegalovirus* (HCMV), *Muromegalovirus* (MCMV), *Roseolovirus* (HHV-6) e pelo proposto *Proboscivirus* (EIHV-1). Todos os membros desta subfamília caracterizam-se por seu conteúdo e organização genômica, pelo ciclo replicativo relativamente longo, pela formação de alterações morfológicas típicas na célula infectada, caracterizadas pelo aumento do volume celular além de possuírem uma gama restrita de hospedeiros, ou seja, são altamente espécie-específicos. Devido esta peculiar característica, os únicos membros capazes de causar doença ao homem são o CMV e HHV-6. Assim como os demais membros desta família, após a infecção primária, o CMV é capaz de estabelecer latência em diferentes tecidos do organismo, tais como glândulas salivares, tecido renal, pulmão, glândulas mamárias e células sanguíneas, em especial monócitos, macrófagos e células precursoras hematopoéticas presentes na medula óssea. Entretanto, ainda não está claro de que forma o genoma viral em sua forma latente mantém sua capacidade proliferativa (PELLET; ROIZMAN, 2007; REVELLO; GERNA, 2010).

### 1.2.1 Estrutura viral e genômica

A partícula viral do CMV possui estrutura complexa e característica dos Herpesvírus cujo diâmetro varia entre 200 e 300 nM. A organização do genoma inclui duas regiões distintas, sendo a de maior extensão denominada seguimento longo ( $U_L$ ), e a menor, seguimento curto ( $U_S$ ), flanqueadas por repetições internas e terminais ( $IR_L/TR_L$ ), como mostra a Figura 2. A recombinação entre estas duas regiões durante o ciclo replicativo promove a formação de quatro formas isoméricas equimolares e independentemente infecciosas, como mostra a Figura 2 (MOCARSKI; SHENK; PASS, 2007). O genoma viral possui aproximadamente 235 mil pares de bases (pb) e mais de 200 sequências abertas de leitura (ORF) conservadas nos cinco diferentes isolados clínicos já sequenciados (MURPHY et al., 2003; DOLAN et al., 2004). As cepas laboratoriais já sequenciadas, Towne (CHA et al., 1996) e AD169 (DOLAN et al., 2004), são compostas por mais de 140 genes sendo 80 essenciais para os mecanismos de replicação em fibroblastos humanos (Figura 3).



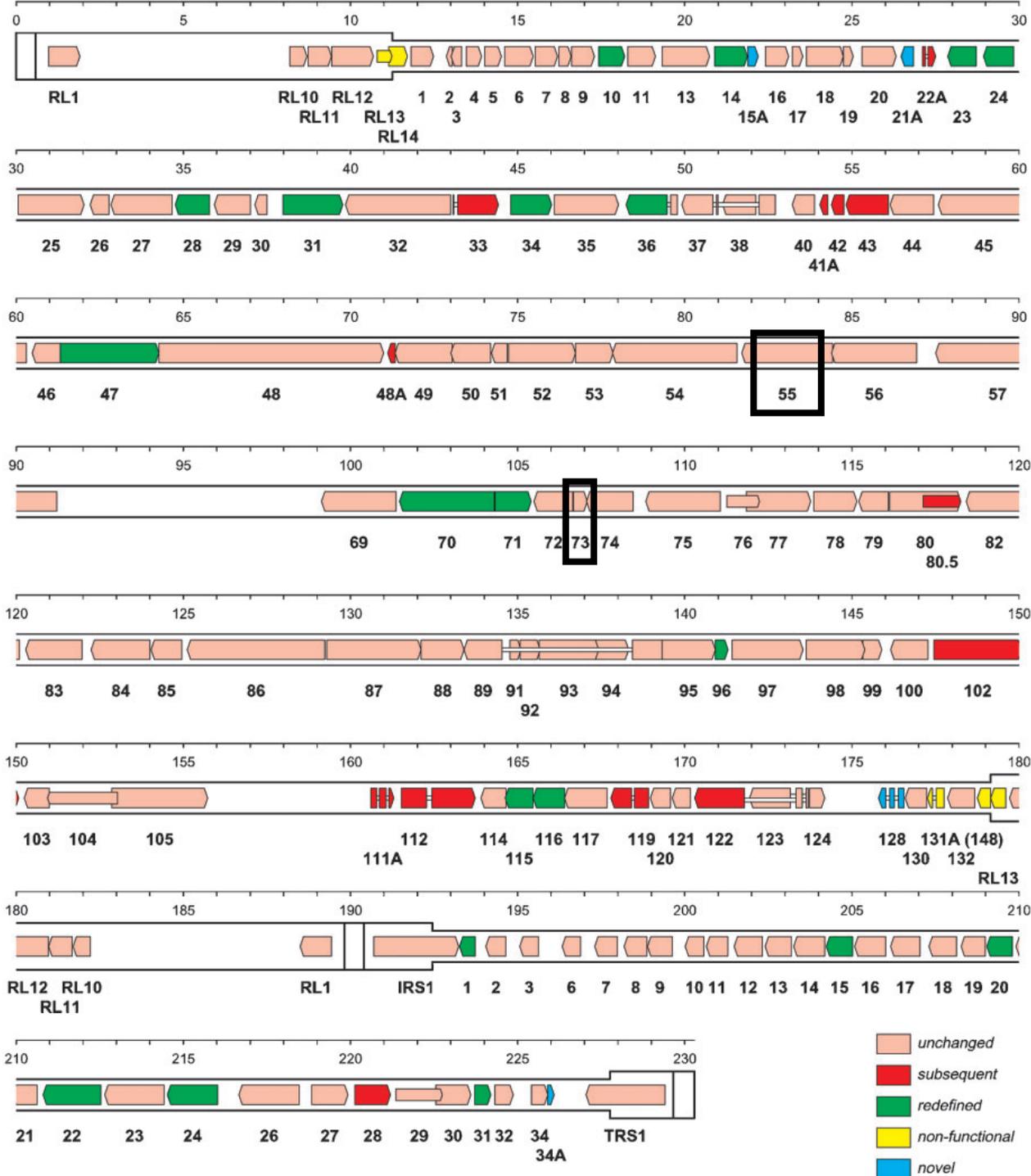
**Figura 2** – Representação esquemática do processo de isomerização entre as duas regiões que compõem o genoma do CMV, levando à formação de quatro formas isoméricas equimolares.

O genoma do CMV encontra-se envolto por um nucleocapsídeo icosaédrico formado por 162 capsômeros com aproximadamente 130 nM de diâmetro. Uma substância amorfa denominada tegumento ou matriz está localizada entre o cápside e o envelope viral mantendo a ligação entre estas estruturas (MOCARSKI; SHENK; PASS, 2007). Cerca de 20 a 25 proteínas constituem o tegumento, muitas das quais ainda não possuem funções definidas (MOCARSKI, COURCELLE, 2001). Aproximadamente 12 proteínas estruturais estão contidas no tegumento viral, sendo a mais abundante entre elas a pp65, também conhecida

como ppUL83 (produto gênico da ORF UL83), utilizada como marcador nos ensaios de antigenemia, com a finalidade de promover um rápido diagnóstico da infecção pelo CMV, especialmente em indivíduos imunocomprometidos tais como transplantados renais e pacientes com AIDS. Outros constituintes do tegumento incluem as proteínas pp71 (UL82), atua como transativador da expressão gênica e a pp150 (UL32), uma das mais abundantes do envelope viral, altamente imunogênica, muito utilizada como marcador antigênico em ensaios imunoenzimáticos (Elisa) para detecção de anticorpos contra este vírus. Adicionalmente, esta substância amorfa apresenta em sua constituição proteínas que estão presentes menos representativamente tais como actinas, tubulinas e anexinas e, em pequenas quantidades, RNA viral e celular (MOCARSKI; SHENK; PASS, 2007).

As proteínas do tegumento desempenham papel importante durante a entrada do vírus na célula e maturação da partícula viral e estão subdivididas em duas classes funcionais. A primeira classe de proteínas desempenha importante papel estrutural na montagem e desmontagem da partícula viral durante o mecanismo de entrada do vírus da célula hospedeira. Estas proteínas podem, ainda, estar envolvidas nos primeiros passos dos processos de desmontagem do capsídeo e liberação do genoma viral no núcleo da célula bem como no término da montagem do capsídeo e sua liberação para o citoplasma da célula hospedeira. O segundo grupo de proteínas atua na modulação da resposta imune celular à infecção viral, inativando os mecanismos de repressão transcricional da célula hospedeira levando a alterações no ciclo replicativo da célula infectada, promovendo uma adaptação do microambiente celular para a replicação viral (MOCARSKI, 2004).

# AD169



**Figura 3** – Representação esquemática do mapa genético da cepa AD169 do *Citomegalovirus* humano (Adaptado de Davison et al., 2003a). As inversões que se repetem nas sequências terminais (TR) e internas (IR) dos segmentos longo (UL) e curto (US) destacam-se em porções mais espessas que os segmentos. Regiões que codificam proteínas estão indicadas por setas e, os nomes dos respectivos genes estão listados abaixo. As diferentes cores indicam o “status” das diferentes famílias de genes. Retângulos pretos indicam as duas regiões aqui estudadas, UL55 e UL73, situados na região denominada segmento longo.

Recentemente foram identificados duas diferentes classes de RNA associadas à partícula viral. A primeira classe de RNA identificados é composta por dois segmentos de aproximadamente 300 e 500 nucleotídeos cada que, por sua vez, podem estar relacionados ao início da replicação do material genético viral, independentemente dos eventos relacionados à transcrição gênica (PRICHARD et al., 1998). A segunda classe de RNA inclui RNA mensageiro (RNAm) viral e celular. Utilizando-se da tecnologia de *microarray*, Bresnahan e Shenk (2000) identificaram um subgrupo de transcritos virais que são “empacotados” juntamente com a partícula viral e liberados na célula hospedeira logo após a infecção. Os autores observaram que a liberação deste RNAm na célula recém-infectada imediatamente após a entrada do vírus, favorece o início da expressão gênica mesmo na ausência de transcrição. Com relação à sua função e localização na partícula viral, ainda não é possível afirmar ao certo. Aparentemente, estes RNA estão relacionados à manifestação de funções relativamente precoces no ciclo replicativo viral, antes mesmo de o genoma do CMV tornar-se um transcrito ativo. Adicionalmente, estes RNAm podem desempenhar papel estrutural contribuindo para a montagem e organização das proteínas do tegumento viral (BRESNAHAN; SHENK, 2000).

Uma dupla camada lipídica associada a moléculas de glicoproteínas em sua superfície compõem o envelope viral. Estas glicoproteínas dão origem a três complexos distintos denominados gCI, gCII e gCIII. As proteínas que compõem estes três complexos são comumente conhecidas como glicoproteína B (gB), gH/gL, gM/gN, respectivamente (BRITT; BOPPANA, 2004; COMPTON, 2004). Os genes que codificam estas proteínas são essenciais para a replicação viral (DUNN et al., 2003; YU; SILVA; SHENK, 2003). O gene UL55 codifica a gB, que por sua vez é o único constituinte do complexo gCI. Esta glicoproteína é uma das mais conservadas, desempenhando importante papel nos mecanismos de entrada do vírus na célula hospedeira, transmissão célula-célula, na fusão das células infectadas e, possivelmente como sinalizador no direcionamento da progênie viral para a superfície apical da célula (GRUNDY et al., 1987), além de ser o principal alvo dos anticorpos neutralizantes. Assim como a gB, o complexo formado pelas glicoproteínas M e N também se liga à célula hospedeira via heparan sulfato, atuando na interação do vírus com a superfície da célula hospedeira (MACH et al., 2000). Da mesma maneira, o complexo gCIII atua no mecanismo de fusão do envelope viral com a membrana da célula hospedeira (COMPTON, 2004; VANARSDALL et al., 2008).

### 1.2.2 Variabilidade genética

Cepas de isolados clínicos e cepas laboratoriais do CMV apresentam polimorfismo em diversas regiões do genoma (CHOU, 1990; WALKER et al., 2001; CHOU; DENNINSON, 1991). Previamente ao desenvolvimento de métodos moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), a identificação das diferentes cepas era realizada pela análise dos padrões de restrição enzimática de todo o genoma viral, o que tornava o método muito laborioso (HUANG et al., 1980b). O uso da hibridização com sondas subclonadas do CMV reduziu a quantidade de DNA viral necessário (DREW et al., 1984; SPECTOR et al., 1984; ADLER, 1985; CHOU, 1986; 1989). Entretanto, estes métodos eram dependentes da propagação *in vitro* do vírus. Diferentes métodos utilizados em biologia molecular tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR), a determinação dos padrões de restrição enzimática ou a análise do sequenciamento nucleotídico, têm permitido a diferenciação das cepas em um grande número de isolados clínicos e propiciado a realização de diferentes estudos, para propósitos epidemiológicos, verificação de reinfecções ou coinfeções por múltiplas cepas ou para a busca de associações potenciais com a patogênese da reinfecção. Estudos com indivíduos imunocomprometidos envolvendo genes descritos como conservados demonstraram a existência de grande variação nucleotídica em regiões específicas destas ORFs, que propiciam da diferenciação entre cepas, porém sem alterações em relação à capacidade replicativa e ao reconhecimento antigênico (ZWEYGBERG WIRGART et al., 1998; LURAIN et al., 1999). O avanço no desenvolvimento das técnicas de biologia molecular associado ao polimorfismo de diferentes regiões do genoma viral permitiu a classificação das diferentes cepas dentro de uma mesma espécie, por meio da observação de padrões baseados em pequenas diferenças na sequência de DNA. Entretanto, algumas regiões apesar de não apresentarem estas diferenças demonstram uma natureza altamente polimórfica, o que permite a determinação das variantes genotípicas, denominadas genótipos.

A hipervariabilidade do gene UL55, que codifica a glicoproteína B (gB), tem sido o foco de diferentes estudos epidemiológicos moleculares (BALE et al., 2001; LUKÁCSI et al., 2001; RASMUSSEN et al., 2003; HUMAR et al., 2003). Através do sequenciamento nucleotídico, Chou e Dennison (1991) determinaram a sequência codificadora da gB, localizada entre os códons 384 e 717 (sequência de bases 1150-2151). A área de maior

variabilidade compreende os códons 448-481, onde as diferentes cepas do CMV adotam uma das quatro principais variantes genóticas. Nesta região está contido o sítio de clivagem da gp55 (códon 461), os epítomos reconhecidos pelos anticorpos neutralizantes virais (códons 461-480) e a região transmembrana (códon 715). Após análise da sequência de 12 cepas de isolados clínicos e duas cepas laboratoriais, Towne e AD169, observou-se que a identidade molecular entre as cepas de um mesmo grupo variou entre 98,6% a 99,9%, e entre grupos diferentes de 88% a 95%. Desta forma, baseado na variabilidade genética desta região, as diferentes cepas virais podem ser classificadas em quatro principais variantes genóticas (gB1, gB2, gB3 e gB4), através da análise de seus polimorfismos (RFLP). Um quinto genótipo gB foi identificado por Shepp et al. (1998) em oito cepas isoladas de cinco pacientes com AIDS, apresentando uma homologia de 79 a 91% com os genótipos já conhecidos. Posteriormente, Trincado et al. (2000) identificaram outras duas variantes genóticas da glicoproteína B (gB6 e gB7) também pelo método da endonuclease de restrição, a partir de cepas isoladas de 18 crianças com infecção congênita e 49 com infecção perinatal. Após análise do sequenciamento nucleotídico, os genótipos gB6 e gB7 mostraram uma identidade de 97% com os genótipos gB3 e gB1 respectivamente, sugerindo serem variantes destes.

A comparação entre diferentes cepas do CMV já sequenciadas demonstrou que apesar destas apresentarem alto grau de identidade, de aproximadamente 95%, grandes variações nucleotídicas foram observadas ao longo de todo o genoma viral (CHANDLER et AL., 1986). Embora diferentes regiões já tenham sido descritas como polimórficas, pouco se conhece sobre seus papéis na patogênese, no tropismo celular, na reinfeção e nos mecanismos de latência e persistência da infecção viral.

Baseado no polimorfismo do gene que codifica a glicoproteína B, a análise sequencial de diferentes cepas do CMV isoladas de crianças jovens e que frequentavam creches por Bale et al. (1996), demonstraram que 19% (7/37) das crianças apresentaram evidências de reinfeção por uma nova cepa, apesar do predomínio de uma única cepa ter sido observado. Destas, cinco apresentavam coinfeção e duas, cepas com genótipos diferentes foram identificadas em sítios de excreção distintos, sugerindo que a reinfeção com novas cepas virais pode ser um evento comum em crianças que frequentam creches. Em Ribeirão preto, estudo prévio realizado por nosso grupo (YAMAMOTO et al., 2007) demonstrou que a reinfeção por diferentes genótipos gB do CMV não ocorre frequentemente em lactentes

jovens com infecção congênita por CMV durante o primeiro ano de vida. Entretanto, a análise de apenas uma região do genoma do CMV para verificação de reinfecção com cepas diferentes pode ter subestimado a real frequência, uma vez que não foi possível determinar se uma criança infectada pela cepa gB2, por exemplo, reinfecou-se com outra cepa gB2, diferente daquela que foi adquirida intraútero. Outro aspecto seria a proteção conferida à ocorrência de uma nova infecção pelos altos níveis de anticorpos específicos contra o CMV, recebidos da mãe ou naturalmente produzidos pela criança infectada no primeiro ano de vida. Desta maneira, o estudo de uma única região do genoma viral e o monitoramento por apenas um ano pode não permitir a determinação da real frequência de reinfecção em crianças com infecção congênita (DAL MONTE et al., 2004; TANAKA et al., 2005).

Outra ORF que tem recebido especial atenção em estudos epidemiológicos e sobre a patogênese da infecção pelo CMV é a UL73. Esta por sua vez apresenta homologia estrutural em relação aos demais membros da família *Herpesviridae* e é responsável por codificar uma proteína glicosilada de aproximadamente 138 aminoácidos, presente no envelope viral, denominada glicoproteína N (gN) ou pp73. Estudo prévio desenvolvido por Dunn et al. (2003) demonstrou que este gene desempenha papel essencial no mecanismo de replicação viral *in vitro*, em associação com a gM. A gN é uma glicoproteína transmembrana expressa durante a fase tardia do ciclo replicativo do CMV, no retículo endoplasmático da célula e, está presente nas membranas da célula infectada, assim como no envelope das novas partículas virais (DAL MONTE et al., 2001; PIGNATELLI et al., 2002) e, capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes virais no hospedeiro (MACH et al., 2000; DAL MONTE et al., 2001). A maioria das substituições, que compreendem os polimorfismos mais frequentes, ocorre na porção N terminal desta proteína, que se encontra externamente ao envelope viral (PIGNATELLI; DAL MONTE; LANDINI, 2001; PIGNATELLI et al., 2002). As porções transmembrana e C terminal são altamente conservadas entre as diferentes cepas do CMV, o que sugere sua importância para a replicação e manutenção da integridade da partícula viral.

Em 2001, a ORF 73 foi totalmente sequenciada a partir de quatro cepas laboratoriais (AD169, Towne, Davis e Toledo) e 38 amostras clínicas de urina, saliva, sangue e líquido amniótico, obtidas a partir de diferentes grupos de pacientes (PIGNATELLI; DAL MONTE; LANDINI, 2001). Após comparação entre as diferentes cepas, os autores observaram que a porção 5' terminal desta ORF (nucleotídeos 1-261) é altamente polimórfica e que as variantes identificadas estão agrupadas em quatro grupos principais: gN1, gN2, gN3 e gN4, sendo estes

dois últimos subagrupados em gN3a e gN3b e gN4a, gN4b e gN4c, respectivamente (PIGNATELLI et al., 2003). Apesar da grande identidade molecular (80 - 100%) observada entre os grupos, um alto grau de divergência entre eles, de aproximadamente 50% (ZWEYGBERG WIRGART et al., 1998; RASMUSSEN et al., 2002) foi observado, sugerindo que a gN é mais variável que as demais glicoproteínas de superfície presentes no envelope do CMV. Adicionalmente, nenhuma associação filogenética entre os genótipos gB e gN foi observada.

A hipótese de que a gN é mais polimórfica que as demais glicoproteínas presentes no envelope viral pode representar uma ferramenta útil para diferenciação de cepas e identificação da infecção por múltiplas cepas do CMV.

### **1.3 Replicação viral**

Apesar do CMV ter a capacidade de replicar-se em um vasto número de células do organismo hospedeiro, seu ciclo replicativo é relativamente lento, com liberação da progênie viral aproximadamente 48 a 72 horas após a infecção da célula hospedeira. A replicação viral inicia-se com a ligação das glicoproteínas do envelope viral a receptores específicos presentes na superfície celular. Algumas evidências sugerem a importância dos três complexos glicoproteicos presentes do envelope viral (gCI, gCII e gCIII) durante a adesão e entrada do vírus na célula hospedeira. Dentre elas, a glicoproteína B destaca-se durante o processo de adsorção do vírus à célula hospedeira ao ligar-se a uma proteoglicana heparan sulfato presente na superfície celular. Apesar de diferentes estudos identificarem outros possíveis candidatos a receptores celulares específicos tais como a  $\beta$ 2 microglobulina (MOCARSKI; SHENK; PASS, 2007), a anexina II (PIETROPAOLO; COMPTON, 1999), a aminopeptidase N – CD13 (GREDMARK et al., 2004), a glicosil-fosfatidilinositol – GPI (RAHBAR; SODERBERG-NAUCLER, 2005), o receptor do fator de crescimento epidermal (WANG et al., 2003), as integrinas (FEIRE; KOSS; COMPTON, 2004), ainda não existem trabalhos comprovando a existência de outros receptores específicos do CMV. A entrada o vírus na célula hospedeira se dá por duas vias: a primeira delas e melhor caracterizada, por meio da fusão da membrana celular com o envelope viral e, a segunda, por endocitose. Esta segunda via de entrada foi demonstrada apenas em sistemas *in vitro*, em diferentes

linhagens celulares. No entanto, a importância desta via na infecção natural ainda não foi elucidada (van LINT; KINPE, 2009).

A fusão do envelope viral com a membrana celular célula promove a liberação do nucleocapsídeo do vírus no citoplasma da célula hospedeira. Já no citoplasma, o nucleocapsídeo viral associa-se a uma rede de microtúbulos citoplasmáticos facilitando sua translocação ao núcleo da célula (DOHNER; SODEIK, 2004), onde o DNA viral é inserido por meio de poros presentes na membrana nuclear, assumindo sua forma circular. Uma vez no núcleo, a RNA polimerase II celular inicia o processo de transcrição do genoma viral, resultando na expressão de mais de 80 proteínas virais. As proteínas do tegumento permanecem no citoplasma da célula e, aquelas que compõem o capsídeo viral, são transportadas para o núcleo da célula, promovendo uma desestabilização do RNA mensageiro (mRNA) do hospedeiro e consequente interrupção da síntese de proteínas celulares, seguida pela tradução preferencial das proteínas virais (van LINT; KINPE, 2009).

Assim como outros Herpesvírus, o CMV regula sua expressão gênica de forma coordenada. Os diferentes genes são classificados como precoce imediato, precoce e tardio, de acordo com a cinética de expressão e condições sob as quais são transcritos. O ciclo replicativo do CMV pode ser dividido em três fases sendo que na fase  $\alpha$  ou precoce ocorre a transcrição dos genes precoce imediato (IE), responsáveis pela regulação da expressão gênica do CMV (SWEET, 1999; LANDOLFO et al., 2003). A expressão das proteínas da fase precoce ocorre de duas a quatro horas após a infecção, sendo necessárias para a ativação de genes das fases precoce e tardia da infecção. A fase  $\beta$  ou precoce depende dos transcritos da fase precoce imediata para dar início à replicação do DNA viral, bem como a síntese de proteínas estruturais do tegumento e de proteínas envolvidas na evasão do sistema imunológico. Na fase  $\gamma$  ou tardia, ocorre a síntese da maioria das proteínas estruturais que contribuem para a montagem da nova partícula viral. Consecutiva à expressão dos genes tardios, ainda no núcleo da célula hospedeira, ocorre a montagem do nucleocapsídeo viral, composto pelo cápside e pelo material genético do vírus (van LINT; KINPE, 2009).

Em seguida, o nucleocapsídeo viral é liberado para o citoplasma da célula, contido por um envelope primário, adquirido durante sua travessia pela membrana nuclear. Uma vez no citoplasma, desencadeia-se o processo de desnudamento, liberando o nucleocapsídeo diretamente no citoplasma da célula infectada. Neste momento, proteínas do tegumento tais como a pp150 associam-se a este complexo, assim como pequenas

quantidades de proteínas e RNA celulares. Após o “envelopamento final”, a partícula viral madura é carregada no interior de uma vesícula até a superfície celular, sendo liberada para o exterior da célula pelo mecanismo de exocitose.

#### ***1.4 Patogênese da infecção pelo CMV***

A transmissão do CMV para indivíduos susceptíveis está associada ao contato direto com secreções contendo o vírus e a longos períodos de excreção observados em crianças congenitamente infectadas ou que adquiriram a infecção logo após o nascimento (MOCARSKI; SHENK; PASS, 2007). A doação de sangue e hemoderivados, o transplante de medula óssea e órgãos sólidos e, a transmissão sexual também constituem fontes de transmissão horizontal do CMV. Com relação à transmissão vertical, esta pode ocorrer ainda no período intrauterino, durante o parto mediante contato com secreções do cérvix uterino contendo o vírus ou após o nascimento, pelo aleitamento materno.

A infecção primária inicia-se após a replicação viral na mucosa epitelial devido contato prévio com secreções contendo o vírus. A fase sistêmica da infecção caracteriza-se pela ocorrência de viremia seguida pela disseminação viral para diversos órgãos e tecidos do hospedeiro, acompanhada de uma persistente excreção viral na urina, saliva, leite e em secreções genitais que perdura por longos períodos, mesmo após o estabelecimento da resposta imune adaptativa. Esta persistência pode ser observada por meses em adultos e durante anos em crianças jovens, supostamente devido a uma resposta imune celular menos efetiva nestes indivíduos (van LINT; KNIPE, 2009). Modelos animais envolvendo o CMV murino (MCMV) demonstram que o vírus utiliza-se de monócitos bem como células leucocitárias imaturas da medula óssea como veículos para facilitar sua disseminação sistêmica, principalmente para as glândulas salivares, rins e outros tecidos. A fase sistêmica da infecção está associada à excreção viral na saliva, urina, leite e secreções genitais por longos períodos após o início da resposta imune adaptativa, persistindo por meses em adultos e anos, em crianças (MOCARSKI; SHENK; PASS, 2007; van LINT; KNIPE, 2009).

A patogênese da doença causada pelo CMV está diretamente relacionada ao estado imunológico do hospedeiro. Os mecanismos da resposta imunológica inata e adaptativa controlam

a infecção viral aguda, mantendo o CMV em latência e modulando a reativação (HENGEL; BRUNE; KOSZINOWSKI, 1998). Um prolongado período de infecção primária sugere um equilíbrio entre a resposta imunológica do hospedeiro e o vírus, o que caracteriza o quadro geral da patogênese da infecção pelo CMV. É conhecido que a imunidade prévia ao CMV não protege contra a reinfecção por uma nova cepa e que, apesar de pouco frequente em indivíduos imunocompetentes, a doença causada pelo CMV pode ocorrer em decorrência da infecção primária ou da reinfecção, seja pela reativação da cepa endógena ou pela aquisição de uma nova variante genotípica. Indivíduos imunologicamente comprometidos tais como portadores do vírus da imunodeficiência humana - HIV, imunossuprimidos ou com resposta imune imatura são mais susceptíveis à infecção pelo CMV (MOCARSKI, 2004).

A habilidade do CMV em evadir-se dos mecanismos de resposta imune do hospedeiro é devida em parte a expressão de genes que interferem nesta resposta (PASS, 2002). Cerca de 25 produtos gênicos estão envolvidos na modulação do sistema imunológico em resposta à infecção pelo CMV, seja inibindo a apoptose ou interferindo nos mecanismos de processamento e apresentação de antígenos pelas moléculas de MHC classe I, degradação de moléculas de MHC classe II, inibição da ação de células *natural killer* (NK), inibição do processo de lise mediada pelo complemento e interferência no processo de degradação proteossomal (HENGEL; BRUNE, KOSZINOWSKI, 1998; MOCARSKI, 2002; SISSONS et al., 2002; VOSSEM et al., 2002).

### **1.5 Infecção congênita pelo CMV**

O CMV é considerado o principal agente causador de infecção congênita em diferentes países (KENNESON; CANNON, 2007; SEALE; BOOY; MacINTYRE, 2009, com uma prevalência entre 0,5 e 2% (DEMMLER, 1996). A infecção congênita pelo CMV resulta da disseminação viral por via hematogênica ou transplacentária, na qual o vírus infecta as células da decídua e conseqüentemente, da placenta e do útero podendo ocasionar alterações vasculares nesta região. Estas alterações podem levar ao aparecimento de sinais e sintomas em diferentes níveis, desde a restrição do crescimento intrauterino até mesmo a morte (ISTAS et al., 1995; PEREIRA; MAIDJII, 2008). Diferentes vias de transmissão podem levar o vírus até o feto. Utilizando-se das células sanguíneas maternas, principalmente

leucócitos, o vírus alcança o citotrofoblasto (conjunto de células responsáveis pela ancoragem da placenta ao útero) e por disseminação retrógrada, o CMV infecta as células presentes no líquido amniótico, que subsequentemente podem ser deglutidas pelo feto (FISCHER et al., 2000). Desta forma, o CMV inicia sua replicação na orofaringe fetal e posteriormente, alcança a circulação fetal (RAYNOR et al., 1993).

A infecção congênita pode resultar tanto de infecção materna primária ou recorrente, seja pela reativação ou pela reinfeção por uma nova cepa viral (BOPPANA et al., 2001). A importância da recorrência materna na transmissão ao feto foi proposta inicialmente pela ocorrência da infecção congênita em gestações consecutivas de uma mesma mãe (SCHOPFER; LAUBER; KRECH, 1978). Mais tarde, a transmissão congênita do CMV foi confirmada em mulheres previamente imunes ao vírus em gestações anteriores (STAGNO et al., 1982). No entanto, a ocorrência de infecção congênita em filhos de mulheres previamente imunes ao CMV foi atribuída, nestes estudos, à reativação da cepa latente. Recentemente, Boppana et al. (2001) demonstraram que a reinfeção por uma nova cepa pode resultar na transmissão ao feto, uma vez que mulheres já imunes ao CMV e com evidências de reinfeção durante a atual gestação, transmitiram o vírus a seus filhos.

Aproximadamente 5% a 10% das crianças identificadas com infecção congênita pelo CMV apresentam-se sintomáticas ao nascimento, podendo manifestar um ou mais dos seguintes sintomas: icterícia, hepatoesplenomegalia, petéquias, microcefalia, calcificações intracranianas, hipotonia e letargia. No período neonatal, cerca de 85% a 90% das crianças congenitamente infectadas são assintomáticas (BOPPANA et al., 1992; AHLFORS; IVARSSON; HARRIS, 1999; NOYOLA et al., 2001; JONES, 2003; STAGNO; BRITT, 2006; MUSSI-PINHATA et al., 2009). A parcela entre 10% e 20% das crianças com infecção congênita, sintomáticas ou assintomáticas no período neonatal, poderão desenvolver algum tipo de seqüela neurológica durante a infância (AHLFORS; IVARSSON; HARRIS, 1999; NOYOLA et al., 2001; ROSS et al., 2006; STAGNO; BRITT, 2006). Uma das seqüelas tardias mais importantes em decorrência da infecção congênita pelo CMV é a surdez neurossensorial. O comprometimento auditivo pode ser observado em até 10% a 15% das crianças congenitamente infectadas; já entre as sintomáticas, estes índices podem alcançar até 65% (WILLIAMSON et al., 1992; FOWLER; BOPPANA, 2006), sendo que a manifestação da surdez ocorre mais precocemente e com maior gravidade entre as sintomáticas (PASS et al., 2006).

## ***JUSTIFICATIVAS DO ESTUDO***

---

## **2 JUSTIFICATIVAS DO ESTUDO**

O Citomegalovirus (CMV) é considerado a causa mais frequente de infecção congênita no homem e um importante problema de saúde pública devido à gravidade das sequelas em longo prazo na infância (PANNUTI et al., 1985; DEMMLER et al., 1994; FOWLER et al., 1999; YAMAMOTO et al., 2001). Ao contrário do observado em indivíduos adultos imunocompetentes, cuja excreção viral cursa geralmente de forma intermitente e com curta duração (SMITH et al, 1993; SHEN et al., 1993; REVELLO et al, 1998), crianças com infecção congênita pelo CMV excretam o vírus por longos períodos na urina e saliva (STAGNO et al., 1983; NOYOLA et al., 2000).

A virúria e a excreção viral salivar, observadas em todos os lactentes jovens com infecção congênita, representam um importante papel no ciclo natural da transmissão do CMV, especialmente para mulheres em idade fértil e indivíduos portadores de alguma deficiência imunológica. É conhecido que a replicação do CMV na saliva e/ou urina ocorre por tempo prolongado, a despeito da resposta imunológica contra o vírus produzida naturalmente pelas crianças com infecção congênita. Entretanto, não é conhecido se estas crianças albergam uma única cepa do CMV ou se a reinfecção com novas cepas contribui para manutenção da excreção viral prolongada.

Existem relatos de coinfeção por múltiplas cepas do CMV em pacientes imunocomprometidos tais como portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), pacientes submetidos a transplante de órgãos e mulheres portadoras de doenças sexualmente transmissíveis (DSTs) (CHANDLER et al., 1987; COAQUETTE et al., 2004; AQUINO; FIGUEIREDO, 2000; SOWMYA; MADHAVAN, 2009; MANUEL et al., 2009), indicando que a infecção prévia não proteja contra novas infecções com cepas distintas. Da mesma maneira, estudo mais recente demonstrou a ocorrência de infecção congênita pelo CMV em filhos de mulheres imunocompetentes e previamente imunes ao vírus que adquiriram uma nova cepa durante a gestação (BOPANA et al., 2001). Entretanto, a frequência deste evento em lactentes infectados congenitamente não é conhecida. Estudos prévios envolvendo crianças atendidas por creches demonstraram que a reinfecção possa estar relacionada à exposição constante a diferentes cepas virais (BALE et al., 1996), no entanto, a excreção

simultânea de diferentes cepas não é comumente observada (ADLER et al., 1988; ADLER et al., 1991).

Considerando-se que crianças portadoras da infecção congênita pelo CMV apresentam imunidade prévia à cepa adquirida intraútero e, comumente excretam o vírus por longos períodos na urina e na saliva, esta população de indivíduos caracteriza-se como modelo ideal para estimar a frequência de reinfecção por novas cepas virais. Adicionalmente, a identificação de possíveis fatores de risco associados à reinfecção por novas cepas do CMV podem contribuir para o desenvolvimento de estudos epidemiológicos.

O estudo da reinfecção por novas cepas do CMV em indivíduos previamente imunes tais como crianças com infecção congênita, poderá fornecer evidências que possam contribuir para novos estudos sobre a patogênese da infecção e sobre o desenvolvimento de vacinas. Considerando-se que a imunização possa ser um meio potencial de controlar e prevenir casos de doenças associadas ao CMV, da transmissão congênita e prevenir suas consequências, seria de grande importância documentar a extensão e consequências da reinfecção por diferentes cepas do CMV em indivíduos previamente imunes.

## ***OBJETIVOS DO ESTUDO***

---

### **3 OBJETIVOS DO ESTUDO**

#### **3.1 Objetivo geral**

- Verificar a ocorrência de reinfecção por diferentes cepas do CMV em crianças com infecção congênita

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Verificar a frequência de reinfecção com novas cepas virais do CMV em crianças com infecção congênita, do nascimento até pelo menos quatro anos de vida.
- Verificar a frequência da excreção simultânea de mais de uma cepa do CMV, em crianças com infecção congênita, durante os primeiros quatro anos de vida.
- Verificar se a excreção viral prolongada, frequentemente observada em crianças com infecção congênita pelo CMV, decorre da reativação da cepa endógena ou se é secundária à ocorrência de reinfecção por uma nova cepa.
- Identificar possíveis fatores de risco associados à ocorrência de reinfecção por uma nova cepa do CMV.

## ***CASUÍSTICA E MÉTODOS***

---

## **4 CASUÍSTICA E MÉTODOS**

### **4.1 População de estudo**

Neste estudo foram incluídas 85 crianças com infecção congênita pelo CMV, identificadas por meio de triagem neonatal, contemplando o período de Março de 2003 a Dezembro de 2007. Todas as crianças foram acompanhadas prospectiva e longitudinalmente por uma equipe médica, no Ambulatório de Infecções Congênitas e Perinatais (ICOP) do HCFMRP-USP.

### **4.2 Aspectos Éticos**

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do HCFMRP-USP, processos número: 4782/2002 e 9145/2004 (Anexo 1).

### **4.3 Critérios para definição da infecção congênita pelo CMV**

Foram consideradas portadoras da infecção congênita pelo CMV aquelas crianças nas quais foi confirmada a detecção do DNA viral em pelo menos duas amostras distintas de saliva e urina. Confirmou-se o diagnóstico de infecção congênita pelo isolamento viral em cultura de fibroblastos humanos imortalizados, em pelo menos uma amostra de urina e saliva, obtidas nas primeiras três semanas de vida destas crianças.

### **4.4 Critérios de inclusão**

Foram incluídos recém-nascidos portadores da infecção congênita pelo CMV, os quais mães e/ou responsáveis concordaram em participar do acompanhamento médico no ICOP,

possibilitando a coleta seriada de amostras de urina e saliva e, que apresentassem adesão ao seguimento (Anexo 2).

#### **4.5 Coleta e preparo das amostras**

Durante as visitas de acompanhamento destas crianças no ICOP, programou-se a coleta seriada de amostras de urina e saliva a cada três meses durante o primeiro ano de vida e a cada seis meses, a partir do primeiro ano de vida destas crianças, com uma variação de mais ou menos um mês. Nos casos de não comparecimento às consultas de acompanhamento no ICOP, uma nova data para o retorno da criança era agendada por um dos membros da equipe médica e, enviado correspondência para informar a família.

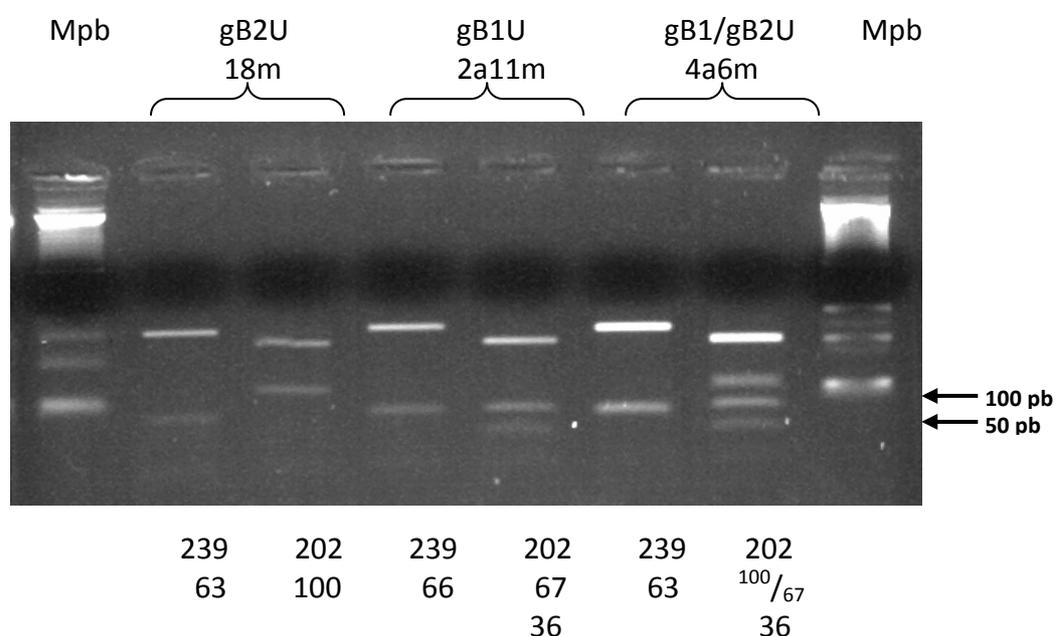
As amostras de urina foram coletadas com cuidados de assepsia, utilizando-se sacos coletores hipoalergênicos. As amostras de saliva foram obtidas com auxílio de *swab* estéril, colocado na face interna da bochecha destas crianças. Após umidificação, os *swabs* foram transferidos para tubos contendo meio de transporte (MEM Earle, Cultilab). Todas as amostras eram mantidas e transportadas até o laboratório sob refrigeração e, processadas imediatamente após seu recebimento. Após processamento e identificação com o número da criança no protocolo de estudo, todas as amostras foram armazenadas a -20°C.

As amostras de urina e saliva foram submetidas a PCR, sem tratamento prévio, apenas fervidas a 94°C durante seis minutos e resfriadas imediatamente a 4°C. Todas as amostras de urina e saliva coletadas durante o período de seguimento destas crianças foram submetidas à PCR de duas etapas com *primers* que amplificam parte do gene codificador da gB (AQUINO; FIGUEIREDO, 2001; CHOU; DENNISON, 1991; TOROK-STORB et al., 1997). Amostras sem tratamento prévio e que não apresentassem amplificação do material genético do CMV pela PCR, foram submetidas à extração de DNA utilizando um kit comercial (QIAmp DNA Blood Mini Kit, Qiagen, Alemanha), seguindo as especificações do fabricante. Após extração do DNA genômico, estas amostras foram novamente submetidas a PCR para verificação da presença do DNA do CMV.

Todas as amostras que apresentaram amplificação gênica pela gB, foram posteriormente submetidas à determinação genotípica pela gB.

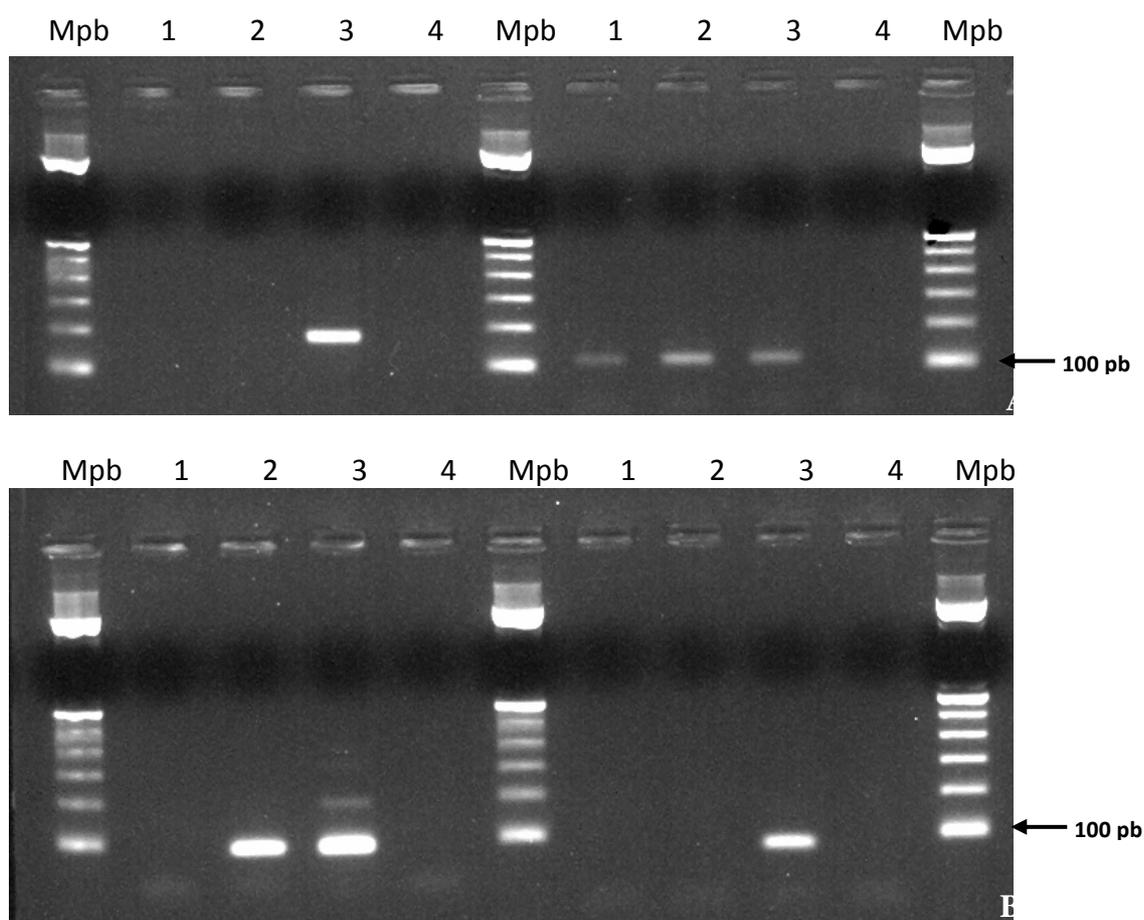
#### 4.6 Critérios para determinação de reinfecção

Uma vez identificado um genótipo gB diferente do observado ao nascimento, uma segunda amostra de saliva e urina eram coletadas, no intervalo de aproximadamente um mês após a identificação de nova cepa, para confirmar a ocorrência de reinfecção. A reinfecção foi definida pela identificação de um novo genótipo gB, quando comparado à última detecção genotípica idêntica a do nascimento, em amostras diferentes de urina e/ou saliva coletadas subsequentemente. Para definir o momento da ocorrência de reinfecção por uma nova cepa do CMV, calculou-se a média entre as idades da última detecção com o mesmo genótipo identificado ao nascimento e, da primeira detecção com o novo genótipo gB. O encontro de uma mistura de genótipos, ou seja, a identificação de dois padrões diferentes de restrição foi interpretada como excreção simultânea de mais de uma cepa viral, como mostra a Figura 4.



**Figura 4** – Gel de agarose 1000 a 1,8%, demonstrando a excreção simultânea de mais de uma cepa do CMV. Ao nascimento, esta criança excretava o genótipo gB1 e, em amostra coletada aos 18 meses, podemos observar a presença de um genótipo gB diferente do identificado ao nascimento. Posteriormente, aos 2 anos e 11 meses, a mesma variante genotípica do nascimento foi identificada e, aos 4 anos e seis meses, a excreção simultânea destas duas variantes - gB1/gB2. Mpb – marcador de pares de bases (25bp).

Amostras de urina e/ou saliva identificadas com excreção simultânea de diferentes genótipos gB foram submetidas à PCR cepa específica para variantes genotípicas da gN, buscando confirmar a presença de mais de uma cepa viral. A Figura 5 exemplifica a confirmação da excreção simultânea de diferentes genótipos gN naquelas amostras que apresentaram mais de uma variante genotípica da gB.



**Figura 5** – Gel de agarose a 2%. Ensaio confirmatório da excreção simultânea de diferentes genótipos. Mpb – marcador de pares de bases (100bp); 1 – amostra de urina caracterizada com o genótipo gB1; 2 – amostra de urina caracterizada com os genótipos gB1/gB2; 3 – controle positivo da reação: amostras de leite previamente caracterizadas para cada uma das variantes genotípicas da gN; 4 – controle negativo. (A) – PCR cepa específica para os genótipos gN1 e gN2. (B) – PCR cepa específica para os genótipos gN3 e gN4.

#### ***4.7 Critérios para definição da frequência de reinfeção e da frequência de reativação após um período de intermitência da excreção viral***

O período de intermitência foi definido pela interrupção da excreção viral, identificada pela ausência de amplificação gênica em amostras de urina e/ou saliva, seguida da uma nova excreção viral detectável.

A reinfeção, após um período de intermitência, foi definida pela identificação de um genótipo gB diferente do identificado no período do nascimento, em pelo menos duas amostras diferentes e consecutivas de urina e/ou saliva.

A reativação após intermitência foi definida pela identificação de um genótipo gB idêntico à cepa adquirida no período intrauterino.

#### ***4.8 Identificação de possíveis fatores de risco associados à ocorrência de reinfeção em crianças com infecção congênita pelo CMV***

Informações sociodemográficas foram coletadas por meio de questionário (APÊNDICE A), buscando identificar fatores de risco que possam estar contribuindo para a ocorrência de reinfeção por diferentes cepas. Estas informações foram comparadas entre crianças que apresentaram reinfeção por uma nova cepa do CMV e aquelas que mantiveram a excreção da cepa adquirida intraútero. Os fatores de risco avaliados foram: frequentar ou não creche e/ou instituição, com que frequência (em dias) e por quanto tempo (em horas) a criança permanecia na creche, idade de início do convívio em creches, o número de crianças e de cuidadores na mesma sala, por quanto tempo a criança recebeu aleitamento materno, com relação ao uso de chupeta e mamadeira, a idade de início e término de uso, a ocupação materna atual e no período do nascimento e, o número de ocupantes na mesma casa no período do nascimento, considerando-se adultos e crianças menores e maiores de dois anos. Estas informações foram coletadas de 46 crianças com infecção congênita pelo CMV inseridas em banco de dados elaborado no programa Epi Info™ 2008, *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*, versão 3.5.1, de acesso

gratuito (<http://www.cdc.gov/epiinfo>). A coleta das informações ocorreu mediante entrevista realizada pela própria pesquisadora às mães e/ou responsáveis por cada criança, durante as visitas de acompanhamento realizadas no ICOP.

#### **4.8.1 Métodos laboratoriais**

##### **4.8.1.1 PCR de duas etapas para detecção do DNA do CMV (semi-nested-PCR)**

Todas as amostras foram analisadas pela *semi-nested* PCR com o objetivo de verificar a persistência da excreção viral, bem como realizar a caracterização das variantes genotípicas da gB.

Na primeira etapa da reação, foram utilizados os iniciadores externos gB-1319 (CHOU; DENNISON, 1991) e gB-1676 (TOROK-STORB et al., 1997). Um microlitro ( $\mu\text{L}$ ) do produto amplificado foi submetido a uma segunda etapa com os iniciadores internos gB-1319 e gB-1604 (CHOU; DENNISON, 1991). Para a realização da PCR, foi feita uma mistura de reação contendo solução tampão 50mM de KCl e 20mM de Tris HCl, com pH 8,5 ; 1,5mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 150 $\mu\text{M}$  de cada um dos trifosfatos de desoxinucleotídeos; 15 picomoles de cada um dos iniciadores e 1U de Taq DNA-polimerase (Invitrogen Life Technologies). A esta mistura de reação foram adicionados individualmente 5  $\mu\text{L}$  de saliva e 2  $\mu\text{L}$  de urina, com volume final de reação de 50 $\mu\text{L}$ . A mistura de reação foi submetida a 94 °C por 2 min, 55 °C por 90 seg e 72 °C por 2 min seguido por 34 ciclos de 94 °C por 60 seg, 55 °C por 90 seg e 72 °C por 120 seg, com uma extensão final de 10 min a 72 °C. Uma alíquota de 1  $\mu\text{L}$  do produto amplificado nesta primeira etapa foi submetida a uma segunda reação com os *primers* internos gB-1319 e gB-1604, com produto final de 296 pares de bases (pb). A mistura de reação foi submetida a 30 ciclos de 94 °C por 60 seg, 55 °C por 60 seg e 72°C por 60 seg, seguidos ao final por 3 min a 72 °C.

Em todas as reações foram utilizados como controles positivos amostras de urina de crianças identificadas em estudos anteriores como tendo infecção congênita pelo CMV através do isolamento viral em cultura de fibroblastos humanos. Amostras de água deionizada foram utilizadas como controles negativos. Todas as reações foram

critérios realizadas segundo o protocolo de KWOK; HIGUCHI, 1989, para evitar eventual contaminação e resultados falso-positivos.

**Tabela 1** – Sequência nucleotídica dos *primers* utilizados na semi-nested PCR.

Nome do primer	Seqüência	Região gênica que amplifica	Tamanho
gB-1319 <sup>1</sup>	5'TGGAACTGGAACGTTTGGC3'	ORF UL55 (gB)	350pb
gB-1676 <sup>2</sup>	5'TGACGCTGGTTTGGTTGAATG3'		
gB-1319 <sup>1</sup>	5'TGGAACTGGAACGTTTGGC3'	ORF UL55 (gB)	296pb
gB-1604 <sup>1</sup>	5'GAAACGCGCGGCAATCGG3'		

gB – glicoproteína B . pb – pares de bases.<sup>1</sup> CHOU; DENNISON, 1991. <sup>2</sup> TOROK-STORB et al., 1997.

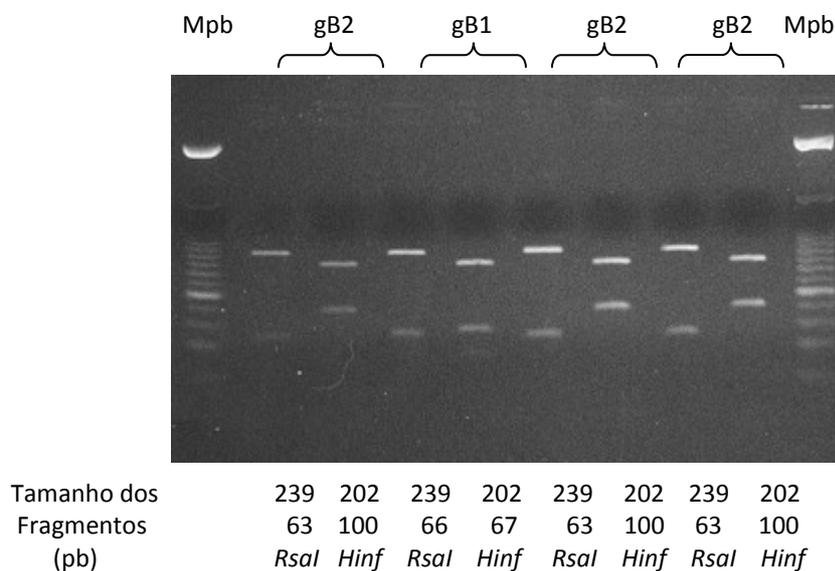
#### 4.8.1.2 Detecção dos produtos amplificados

Para a detecção dos produtos amplificados, 10µL do produto de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2% e corado com brometo de etídio 0,5µg/mL, visualizados à luz ultravioleta e fotografados utilizando-se equipamento de foto documentação MiniBis Pro (DNR Bio-Imaging Systems, Israel).

#### 4.9 Caracterização molecular das cepas do CMV baseado na variabilidade genética da glicoproteína B (gB)

Uma alíquota de 10 µL do produto amplificado obtida na semi-nested PCR, com aproximadamente 296 pares de bases (pb), foi submetida à digestão com as enzimas *RsaI* e *Hinfi* (Invitrogen, EUA) a 37°C por pelo menos duas horas, segundo especificações do fabricante. Os respectivos genótipos foram determinados através da análise do tamanho dos fragmentos de

restrição (RFLP), segundo o esquema de Chou e Dennison (1991). Os perfis dos diferentes padrões de restrição enzimática foram analisados em gel de agarose 1000 a 1,8% (Invitrogen, EUA).



**Figura 6** - Determinação genotípica das cepas virais identificadas em amostras de urina e saliva através da análise do polimorfismo dos diferentes fragmentos de restrição, em gel de agarose 1000 a 1,8%. Adaptado do estudo de Chou e Dennison (1991).

#### 4.10 Caracterização molecular das variantes genotípicas da glicoproteína N (gN)

Aquelas amostras com presença simultânea de mais de uma variante genotípica no mesmo sítio de excreção, com base na caracterização genotípica da gB, foram submetidas a uma segunda PCR com *primers* específicos para cada uma das quatro variantes genotípicas da glicoproteína N, para confirmar a presença simultânea de mais de uma cepa.

Na primeira etapa da reação, foram utilizados *primers* consensuais para amplificação de um fragmento de aproximadamente 427 pares de bases. A partir do produto amplificado na primeira etapa da reação, realizou-se uma diluição na proporção 1: 50. Dois  $\mu\text{L}$  desta diluição foram submetidos a quatro novos ciclos de reações, independentes, com *primers* específicos para cada uma das quatro variantes genotípicas da gN.

Para realização da PCR foi elaborada uma mistura de reação contendo solução tampão 50 mM de KCl e 20 mM de Tris HCl, com pH 8,5; 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>; 10mM de cada um dos trifosfatos de desoxinucleotídeos; 15 picomoles de cada um dos iniciadores e 0,75U de Taq DNA-

polimerase (Invitrogen Life Technologies). A esta mistura de reação foram adicionados individualmente 2,5 µL de saliva (ou DNA extraído) e um µL de urina, com volume final de reação de 20 µL. A mistura de reação foi submetida a 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 55 °C por 30 seg e 72 °C por 1 min, com uma extensão final de 7 min a 72 °C. Uma alíquota de 1 µL do produto amplificado nesta primeira etapa foi submetida à diluição 1/50 em água e 2 µL desta diluição foram adicionados à uma segunda reação com os *primers* específicos para cada uma das variantes genotípicas. A mistura de reação foi submetida a 30 ciclos de 94 °C por 30 seg, 66 °C por 30 seg e 72°C por 60 seg, seguidos ao final por 3 min a 72 °C.

Foram utilizadas como controles positivos, DNA extraído a partir de amostras de positivas de leite materno de mulheres transmissoras da infecção congênita pelo CMV, identificadas em estudo prévio. Amostras de água deionizada foram utilizadas como controles negativos. Todas as reações foram criteriosamente realizadas segundo o protocolo de KWOK; HIGUCHI, 1989, para evitar eventual contaminação e resultados falso-positivos.

**Tabela 2** – *Primers* utilizados para amplificação gênica da gN, como ensaio confirmatório da ocorrência de coinfeção por diferentes cepas do CMV.

<b>Nome do Primer</b>	<b>Sequência</b>	<b>Região gênica que amplifica</b>	<b>Tamanho do fragmento</b>
<u><i>Primers Consensuais</i></u>			
gNC-F	5'GGC GGT GGT GTG ATG GAG TG3'	ORF UL73 (gN)	427pb
gNC-R	5'AAT AGC CTT TGG TGG TGG TTG C3'		
<u><i>Primers Específicos</i></u>			
gN1-F	5'GTC AAC CTC TGC AAC TAC ATC AAA G3'	ORF UL73 (gN)	187pb
gN1-R	5'CGC CTT GTA AAA ATC ATC GTT C3'		
gN2-F	5'CCT TTT GAT TAT ATC GGC GGT A3'	ORF UL73 (gN)	119pb
gN2-R	5'TTG TTA CGC TCG TAG TTG GTT TAC TC3'		
gN3-F	5'CAA CCT CCG CAA CTA CGT TAA AA3'	ORF UL73 (gN)	98pb
gN3-R	5'GGT CGT ACT CAT CGT AGT TGT CGT AGT3'		
gN4-F	5'TTC CAA CAA TAC GTC GAC TGC T3'	ORF UL73 (gN)	83pb
gN4-R	5'CAA CAG TGC TTG CCT TCA CG3'		

gN – glicoproteína N. F – sequência forward. R – sequência reverse. pb – pares de bases.

#### **4.11 Análise Estatística**

Para a análise dos resultados elaborou-se um banco de dados no programa Epi Info 2001, versão 6.04d, *Public Health Practice Program Office, Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), de acesso gratuito (<http://www.cdc.gov/epiinfo/Epi6/ei6.htm>).

A associação entre os diferentes fatores de risco e a ocorrência de reinfecção por uma nova cepa do CMV foi verificada pelo modelo de regressão logística univariada. Foram calculadas as razões de chances (*odds ratio*) e os respectivos intervalos de confiança.

Para análise da ocorrência de reinfecção construiu-se uma tabua de vida com dados analisados pelo método produto limite ou de Kaplan-Meier.

## ***RESULTADOS***

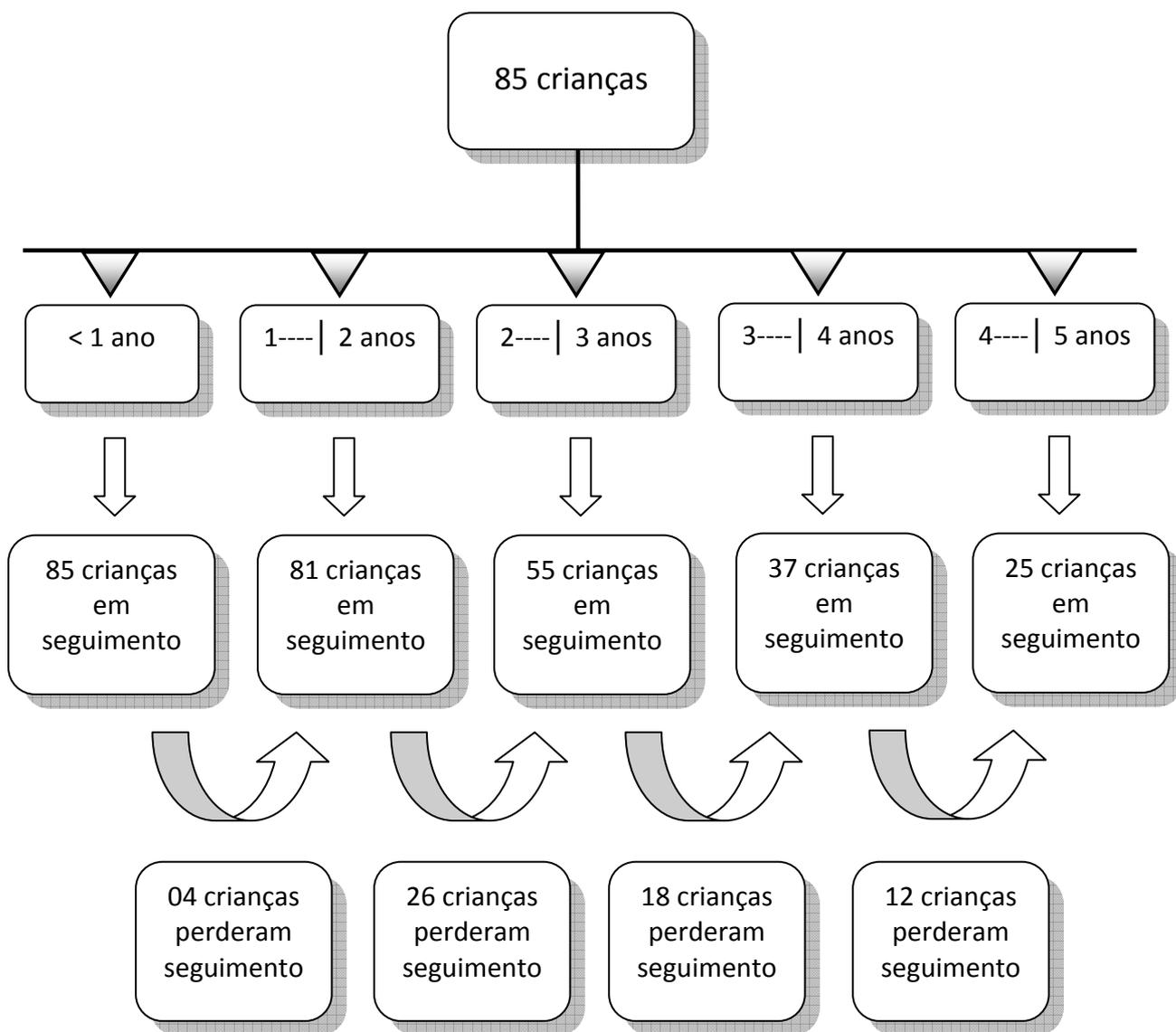
---

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Caracterização da população de estudo**

Do total de 85 crianças portadoras da infecção congênita pelo CMV, 51 eram do sexo masculino e 34 do sexo feminino. As médias de peso ao nascer e idade gestacional determinada pelo *Capurro Somático* foram 2678 gramas ( $\pm 733$  gramas) e 38 semanas ( $\pm 3$  semanas), variando entre 28 e 43 semanas, respectivamente. Com relação à idade gestacional, 62 crianças foram consideradas a termo e 23 pretermo. Analisando-se o desenvolvimento intrauterino, 62 foram consideradas adequadas para a idade gestacional (AIG), 2 grandes para a idade gestacional (GIG) e 21, pequenas para a idade gestacional (PIG) como mostra o Apêndice B.

Todas as 85 crianças foram acompanhadas por pelo menos 12 meses de vida e 25 continuaram em seguimento até o final do quarto ano, como pode ser observado no Fluxograma 1. A Tabela 3 ilustra o número total de crianças avaliadas por período e o número de crianças que perderam o seguimento em cada uma das faixas etárias, bem como a mediana do número de avaliações (número de amostras coletadas e processadas pela PCR) e mediana da idade da criança (baseado no momento da última detecção genotípica).



**Fluxograma 1** – Representação esquemática do acompanhamento longitudinal das 85 crianças com infecção congênita pelo CMV, salientando o número de crianças que se mantiveram e que perderam o seguimento, por faixa etária.

**Tabela 3** – Número total de crianças avaliadas e que perderam o seguimento por faixa etária.

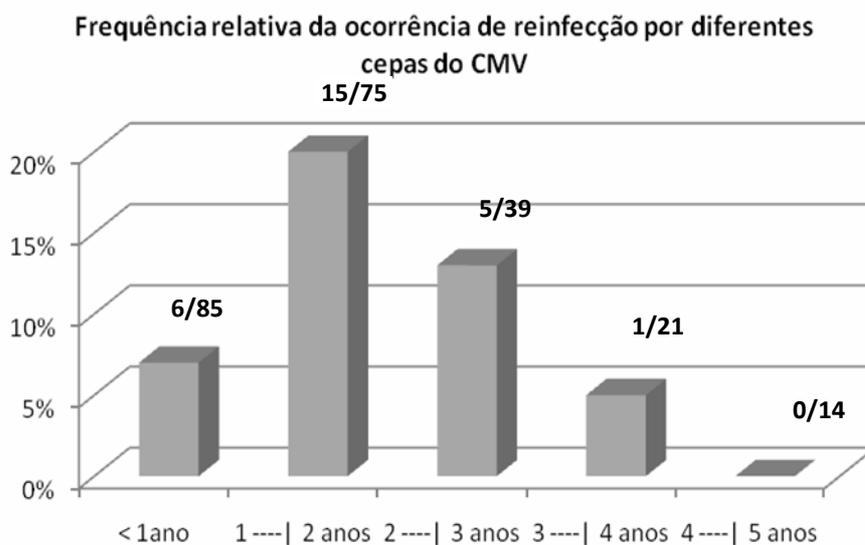
Faixa etária	Número de crianças avaliadas	Número de crianças que perderam o seguimento	Mediana do número de avaliações da excreção viral/criança (variação)	Mediana da idade da criança (variação)
< 1ano	85	4	6 (3-11)	30 (8-59)
1 ----   2 anos	81	26	2 (1-10)	30 (12-59)
2 ----   3 anos	55	18	2 (1-8)	45 (24-59)
3 ----   4 anos	37	12	2 (1-10)	51 (36-59)
4 ----   5 anos	25	15	2 (1-4)	54 (48-59)

< 1 ano: compreende todas as crianças com idades entre zero e 11 meses e 29 dias de vida; 1---- | 2 anos: contempla aquelas crianças com idades entre 12 meses e 23 meses e 29 dias de vida, e assim sucessivamente.

\* - a mediana da idade da criança avaliada foi baseada na idade da última detecção genotípica.

### ***5.2 Determinação da frequência de reinfecção por uma nova cepa do CMV baseado na variabilidade genética da glicoproteína B (gB)***

A ocorrência de reinfecção por uma nova cepa do CMV por faixa etária foi observada durante o primeiro ano em 6/85 (7%) das crianças seguido por um aumento para 20% (15/75) na faixa etária de um ano até  $\leq$  2 anos. Após este período, 13% (5/39) das crianças na faixa etária dos dois anos até  $\leq$  3 anos adquiriram uma nova cepa do CMV, diminuindo para 5% (1/21) das crianças aos três anos de vida até  $\leq$  4 anos, como mostra o Gráfico 1. A mediana da idade no momento de aquisição de uma nova cepa do CMV foi de 16,5 meses (variação de 1,5 a 47,5 meses de vida).



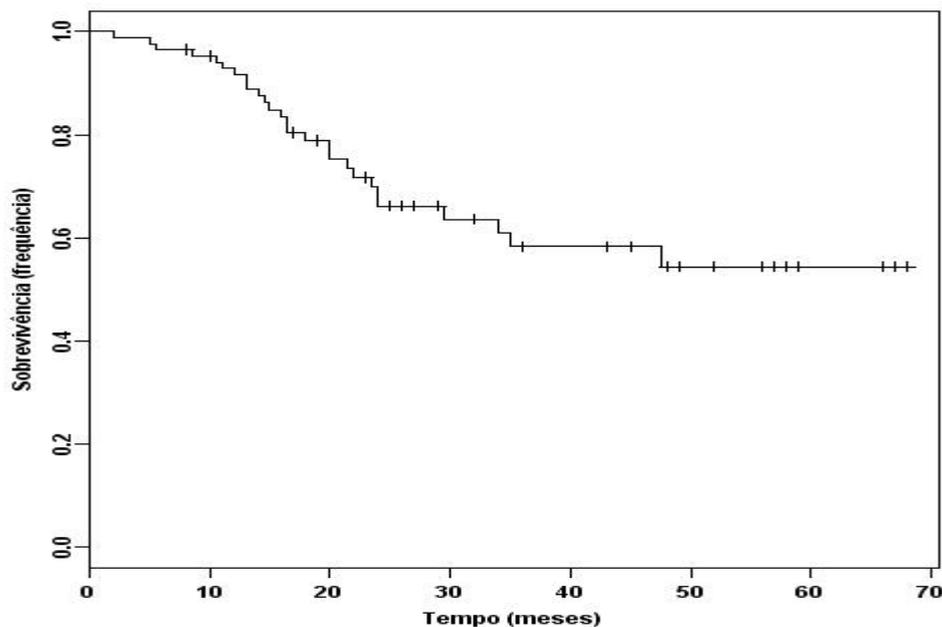
**Gráfico 1** - Frequência relativa da ocorrência de reinfecção (número de novos casos/ano) por uma nova cepa do CMV nas diferentes faixas etárias.

A aquisição de uma nova cepa do CMV foi observada em 27 crianças durante o período de seguimento até a idade de quatro anos. A frequência de reinfecção observada neste período foi de 46% como mostra a Tabua de sobrevida abaixo, onde o percentual de falhas representa as crianças que adquiriram uma nova cepa e o percentual de sobrevida representa o percentual de crianças que mantiveram o mesmo genótipo do CMV. O tempo estimado da ocorrência do evento de interesse, ou seja, a reinfecção foi determinado pela media da idade da criança no momento da ultima detecção do mesmo genótipo do CMV e da idade no momento da primeira detecção do novo genótipo do CMV. Os dados marcados com “\*” são referentes às crianças que não tiveram reinfecção, mas que não continuaram o seguimento até à idade de quatro anos, sendo considerados como censurados.

**Tabela 4** - Ocorrência de reinfecção pela aquisição de novas cepas do CMV pelo uso da tabua de sobrevida de Kaplan-Meier).

Tempo (idade em meses)	Censuras	% de Sobrevida (sem reinfecção)	% de Falhas (% de reinfecção)	Número de falhas (Número de crianças que tiveram reinfecção)	Numero de crianças seguidas
0		1	0	0	85
2		0,9882	0,0118	1	84
5		0,9765	0,0235	2	83
5,5		0,9647	0,0353	3	82
8	*	,	,	3	81
8,5		0,9528	0,0472	4	80
10	*	,	,	4	79
10	*	,	,	4	78
10,5		0,9406	0,0594	5	77
11		0,9284	0,0716	6	76
11	*	,	,	6	75
11	*	,	,	6	74
12		0,9158	0,0842	7	73
12	*	,	,	7	72
12	*	,	,	7	71
12	*	,	,	7	70
12	*	,	,	7	69
12	*	,	,	7	68
13		,	,	8	67
13		0,8889	0,1111	9	66
14		0,8754	0,1246	10	65
14	*	,	,	10	64
14,5		0,8617	0,1383	11	63
15		0,8481	0,1519	12	62
15	*	,	,	12	61
15	*	,	,	12	60
16		0,8339	0,1661	13	59
16	*	,	,	13	58
16	*	,	,	13	57
16,5		,	,	14	56
16,5		0,8047	0,1953	15	55
17	*	,	,	15	54
17	*	,	,	15	53
17	*	,	,	15	52
17	*	,	,	15	51
17	*	,	,	15	50

Tempo (idade em meses)	Censuras	% de Sobrevida (sem reinfeção)	% de Falhas (% de reinfeção)	Número de falhas (Número de crianças que tiveram reinfecção)	Numero de crianças seguidas
18		0,7886	0,2114	16	49
18	*	,	,	16	48
18	*	,	,	16	47
18	*	,	,	16	46
18	*	,	,	16	45
19	*	,	,	16	44
20		,	,	17	43
20		0,7527	0,2473	18	42
21,5		0,7348	0,2652	19	41
22		0,7169	0,2831	20	40
23	*	,	,	20	39
23,5		0,6985	0,3015	21	38
24		,	,	22	37
24		0,6617	0,3383	23	36
24	*	,	,	23	35
24	*	,	,	23	34
25	*	,	,	23	33
26	*	,	,	23	32
26	*	,	,	23	31
26	*	,	,	23	30
27	*	,	,	23	29
29	*	,	,	23	28
29	*	,	,	23	27
29	*	,	,	23	26
29,5		0,6363	0,3637	24	25
32	*	,	,	24	24
34		0,6098	0,3902	25	23
35		0,5833	0,4167	26	22
35	*	,	,	26	21
35	*	,	,	26	20
35	*	,	,	26	19
36	*	,	,	26	18
43	*	,	,	26	17
45	*	,	,	26	16
45	*	,	,	26	15
47,5		0,5444	<b>0,4556</b>	27	14
48	*	,	,	27	13



**Gráfico 2** - Gráfico de sobrevivência proposto por Kaplan-Meier mostrando a frequência de reinfeção e os dados censurados durante o período de seguimento.

### **5.3 Confirmação da ocorrência de mistura de cepas distintas do CMV na mesma amostra de urina e/ou saliva**

Amostras clínicas de urina e/ou saliva de 8/27 (30%) crianças com mistura de genótipos foram submetidas a uma nova PCR com *primers* específicos para cada uma das quatro variantes genotípicas da gN. A mistura de cepas foi confirmada em 5/27 crianças (19%), sendo quatro na urina e uma, na saliva. Em outras três crianças, uma única variante genotípica gN foi identificada. Dentre as cinco crianças em que foi possível confirmar a presença de mais de uma cepa do CMV, observamos que quatro excretavam os genótipos gB1/gB2 na urina e uma, os genótipos gB2/gB3 na saliva. Com relação à diferenciação de cepas pela gN, quatro das cinco crianças que excretavam as variantes genotípicas gB1/gB2 apresentaram os genótipos gN2/gN3 e uma, as variantes gN1/gN2/gN3/gN4. Outra criança excretando os genótipos gB2/gB3 apresentou excreção das variantes gN2/gN4 da glicoproteína N, como mostra a Tabela 5.

**Tabela 5** - Confirmação da excreção simultânea de múltiplas cepas do CMV, baseado na variabilidade das glicoproteínas B e N.

Id cç	Nascimento		Excreção simultânea de mais de uma cepa do CMV			
	Urina	Saliva	Urina	Saliva	Idade	Genótipos gN
M457	gB2	gB2	gB1/gB2	NA	2a7m, 4a6m	gN2/gN3
908	gB3	gB3	NO	gB2/gB3	6m, 1a6m	gN2/gN4
3746	gB1	gB1	gB1/gB2	gB1	4m, 6m, 8m	gN2/gN3
4056	gB2	gB2	gB1/gB2	gB1	1a2m, 1a5m	gN1/gN2/gN3/gN4
806	gB2	gB2	gB1/gB2	gB2	1a4m, 1a7m	gN2/gN3

NO – não obtido; NA – não amplificação gênica..

Com relação ao grupo de crianças que mudaram de genótipo, 19/27 (70%) crianças apresentaram mudança de genótipo apenas na urina, 7/27 (26%) crianças na urina e na saliva e, 1/27 (4%), apenas na saliva. Dentre as 27 crianças que demonstraram evidências de reinfecção por nova cepa do CMV, oito apresentaram mistura de genótipos na mesma amostra (cinco casos gB1/gB2, sendo quatro na urina e um na saliva; três casos gB2/gB3, sendo um na urina, um na saliva e um na urina e na saliva). Dez crianças excretavam as duas cepas concomitantemente, porém em amostras distintas. Estas crianças passaram a excretar a nova cepa apenas na urina e mantiveram a excreção da cepa adquirida intraútero na saliva. As sete crianças remanescentes mantiveram apenas a excreção da cepa adquirida recentemente tanto na urina quanto na saliva (Tabela 6).

**Tabela 6** - Manutenção da excreção viral e ocorrência de reinfecção em crianças com infecção congênita pelo CMV.

Caso	Genótipo gB Nascimento		Mudança de genótipo gB		Última Detecção	
	Urina	Saliva	Urina	Saliva	Urina	Saliva
3746	gB1	gB1	gB1/gB2	gB1	gB1/gB2	gB1
4056	gB2	gB2	gB1/gB2	gB2	gB1/gB2	gB2
806	gB2	gB2	gB1/gB2	gB2	gB2	gB2
M457	gB2	gB2	gB1/gB2	gB2	gB1/gB2	NA
60	gB1	gB1	gB2	gB1	gB2	NA
1150A	gB1	gB1	gB2	NA	gB1/gB2	NA
908	gB3	gB3	gB2/gB3	gB3	gB2	gB2
2593	gB3	gB3	gB2/gB3	gB2/gB3	gB2/gB3	gB3
M1271	gB3	gB3	gB3	gB2/gB3	gB3	gB2
2519	gB3	gB3	gB2	NA	gB2	NA
2467	gB2	gB2	gB4	gB4	gB4	gB2
2761	gB3	gB3	gB1	gB1	gB1	gB3
M1467	gB1	gB1	gB2	gB2	gB2	gB1
M680	gB1	gB1	gB2	gB2	gB2	gB1
2367	gB3	gB3	gB1	gB1	gB1	gB3
1150B	gB1	gB1	gB2	gB1	gB2	gB1
164	gB3	gB3	gB2	gB2	gB2	gB3
3647	gB4	gB4	gB1	gB4	gB1	gB1
3424	gB4	gB4	gB3	gB4	gB3	gB3
1637	gB3	gB3	gB2	gB3	gB2	gB2

	Genótipo gB Nascimento		Mudança de genótipo gB		Última Detecção	
1899	gB1	gB1	gB2	gB1	gB2	gB2
1152	gB3	gB3	gB1	gB3	gB1	gB1
2775	gB1	gB1	gB2	gB1	gB2	gB2
2226	gB1	gB1	gB2	gB1	gB2	gB2
M1106	gB3	gB3	gB2	gB3	gB2	gB2
2244	gB2	gB2	gB1	gB2	gB1	gB1
956B	gB2	gB2	gB1	gB2	gB1	gB1

#### ***5.4 Frequência de reativação e de reinfeção em crianças com infecção congênita pelo CMV, após intermitência da excreção viral***

A intermitência da excreção viral foi observada em 30 crianças com infecção congênita pelo CMV. Em 4/30 (13%) crianças com idade inferior a dois anos de vida, a presença de uma nova cepa do CMV foi identificada após um período de intermitência, caracterizando a ocorrência de reinfeção. Em outras 26/30 (87%) crianças, a reativação da cepa adquirida intraútero foi observada. Dentre estas crianças, 17/26 eram menores de dois anos e outras 9/26, maiores de dois anos. Estes achados sugerem que a reativação da cepa latente é mais frequente quando comparado à reinfeção por uma nova cepa do CMV [4/30 (13%) vs. 26/30 (87%);  $p < 0,0001$ ]. A média da idade no momento da ocorrência da intermitência da excreção viral foi de 1,5 anos  $\pm$  1 ano. Ao término da coleta das amostras para esta casuística, todas as crianças avaliadas mantinham a excreção viral.

### ***5.5 Fatores de risco associados à ocorrência de reinfecção por uma nova cepa do CMV em crianças congenitamente infectadas***

Dados sociodemográficos de 46 crianças congenitamente infectadas pelo CMV foram obtidos com auxílio de questionário. Dentre os questionários obtidos, 36 referem-se a crianças com pelo menos três anos completos de seguimento (17 crianças com reinfecção confirmada e 19 crianças que mantiveram a excreção do mesmo genótipo) e outros 10, a crianças que adquiriram uma nova cepa do CMV, porém sem terem completado o seguimento até três anos, seja por abandono de seguimento ou por ainda não possuírem idade suficiente.

Dentre todas as variáveis analisadas, apenas a idade de início do convívio em creches e o número de pessoas na mesma casa no período do nascimento mostraram associação com a ocorrência de reinfecção por uma nova cepa do CMV. Desta forma, crianças que iniciaram o convívio em creches antes de completarem dois anos de vida podem ter 11,92 vezes mais chances (IC95% 1,21 – 285,72) de adquirirem uma nova variante genotípica do CMV do que aquelas que iniciaram o convívio em creches após os dois anos de idade. Adicionalmente, crianças residentes em lares constituídos por quatro ou mais pessoas podem ter 4,33 vezes mais chances (IC95% 1,05 – 10,75) de se reinfecarem por uma nova cepa do CMV do que aquelas que convivem com um menor número de pessoas na mesma casa, como mostra a Tabela 6.

**Tabela 7** - Fatores de risco e associação com a ocorrência de reinfecção por uma nova cepa do CMV

Fatores de Risco	Mudança de genótipo gB		OR	IC 95%
	Sim N = 27	Não N = 19		
<b>Frequente creche/instituição</b>				
Não	4 (15%)	3 (16%)	1	
Sim	23 (85%)	16 (84%)	0.93	0.14 - 6.21
<b>Início de convívio em creche/instituição</b>				
< 2 anos	11 (48%)	1 (7%)	1	
≥ 2 anos	12 (52%)	13* (93%)	<b>11.92</b>	<b>1.21 - 285.72</b>
<b>Tempo de permanência diária em creche/instituição</b>				
< 6 horas	14 <sup>§</sup> (64%)	15 (94%)	1	
≥ 6 horas	8 (36%)	1 (6%)	8,57	(0,95; 77,57)
<b>Número de crianças no mesmo ambiente da creche/instituição</b>				
< 19 crianças	9 <sup>¥</sup> (41%)	6 (38%)	1	
≥ 19 crianças	13 (59%)	10 (62%)	1.15	0.25 - 5.31
<b>Número de cuidadores por ambiente na creche/instituição</b>				
< 2 cuidadores	10 (43%)	11 (69%)	1	
≥ 2 cuidadores	13 (56%)	5 (31%)	2,86	(0,75; 10,93)
<b>Tempo de aleitamento (meses)</b>				
< 6 meses	10 (37%)	12 (63%)	1	
≥ 6 meses	17 (63%)	7 (37%)	2,91	(0,86; 9,83)
<b>Uso de chupeta</b>				
Não	13 (48%)	8 (42%)	1	
Sim	14 (82%)	11 (58%)	1.28	0.33 - 4.93
<b>Idade que interrompeu o uso da chupeta (anos)</b>				
<3a	8 (57%)	4 (36%)	1	
≥3a	6 (43%)	7 (64%)	2.33	0.35 - 16.49
<b>Uso de mamadeira</b>				
Não	2 (7%)	1 (5%)	1	
Sim	25 (93%)	18 (95%)	1.44	0.09 - 43.64

<b>Fatores de Risco</b>	<b>Mudança de genótipo gB</b>		<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>
	<b>Sim N = 27</b>	<b>Não N = 19</b>		
<b>Período de uso de mamadeira (anos)?</b>				
< 2 anos	6 (24%)	3 (17%)	1	
≥ 2 anos	19 (76%)	15 (83%)	1.58	0.28 - 9.73
<b>Cuidados maternos com crianças menores de 2 anos</b>				
Não	27 (100%)	17 (89%)		
Sim	0	2 (11%)		
<b>Número de pessoas na mesma casa (nascimento)</b>				
< 4 pessoas	9 (33%)	13 (68%)	1	
≥ 4 pessoas	18 (67%)	6 (32%)	4,33	(1,24; 15,21)
<b>Número de crianças na casa (nascimento)</b>				
< 2 crianças	18 (67%)	15 (79%)	1	
≥ 2 crianças	9 (33%)	4 (21%)	0.53	0.11 – 2.47

\* Convívio em creche e/ou instituição – informação não obtida para duas crianças. § Tempo de permanência diária – informação não obtida para uma criança. ¥ Número de crianças no mesmo ambiente – informação não obtida para uma criança.

## ***DISCUSSÃO***

---

## **6 DISCUSSÃO**

Estudos prévios têm demonstrado que a reinfecção ocorre não apenas em indivíduos imunocomprometidos (HUANG et al., 1980b; SPECTOR et al., 1984; AQUINO, FIGUEIREDO, 2000; COAQUETTE et al., 2004), mas também em adultos e crianças imunologicamente competentes (BALE et al., 1996; MEYR-KÖNIG et al., 1998a; BOPPANA et al., 2001). Entretanto, a frequência deste evento nestes grupos não é conhecida.

Em nosso estudo, observamos uma incidência cumulativa de reinfecção por novas cepas do CMV em 44% das crianças com infecção congênita, acompanhadas por pelo menos quatro anos de vida. Esta frequência de reinfecção é alta quando comparada à encontrada no estudo de Adler et al. (1991) que, ao avaliarem 34 crianças atendidas por três diferentes creches, observaram que 6% delas haviam adquirido uma nova cepa do CMV. Da mesma maneira, Bale et al. (1996) avaliando a ocorrência de reinfecção em crianças jovens atendidas por seis diferentes creches, demonstraram que 19% destas haviam adquirido uma nova cepa do CMV em um período médio de 11 meses, variando entre um e 21 meses de acompanhamento. Achados similares aos observados em nosso estudo foram descritos por Chandler et al. (1987), ao demonstrarem que quatro entre oito mulheres (50%) atendidas em clínicas para o tratamento de DSTs apresentaram reinfecção por diferentes cepas virais do CMV, em amostras seriadas de urina, saliva e secreção de cérvix uterino obtidas durante um período de aproximadamente seis semanas a 17 meses de acompanhamento. Posteriormente, Aquino e Figueiredo (2000) observaram que aproximadamente 70% dos 34 pacientes submetidos a transplante renal acompanhados por pelo menos três meses, apresentaram reinfecção por uma nova cepa do CMV.

Recentemente, a reinfecção por novas cepas virais foi demonstrada em mulheres previamente imunes, com transmissão e acometimento fetal semelhante aos observados nos casos de infecção primária materna (BOPPANA et al., 2001). Em estudo realizado pelo nosso grupo, observou-se que 4,6% (3/65) das puérperas (considerando-se mulheres transmissoras e não transmissoras da infecção congênita pelo CMV) apresentaram reinfecção por uma nova cepa viral (YAMAMOTO et al.; 2007). Posteriormente, este mesmo grupo demonstrou que aproximadamente 29% (43/149) das mulheres avaliadas apresentaram evidências de reinfecção por diferentes cepas do CMV. Apesar de apenas uma

região do genoma viral ter sido avaliada e o número de crianças ao final de quatro anos de seguimento ser relativamente pequeno, estes resultados sugerem que a reinfeção por diferentes cepas do CMV ocorre frequentemente em crianças com infecção congênita, com resultados semelhantes aos observados em estudos envolvendo indivíduos imunocomprometidos (BALDANTI et al., 1998; AQUINO; FIGUEIREDO, 2000; COAQUETTE et al., 2004).

Embora a excreção concomitante de mais de uma cepa do CMV tenha sido inicialmente caracterizada em pessoas com algum tipo de comprometimento imunológico tais como pacientes com AIDS (DREW et al., 1984; GERNA et al., 1992), hemofílicos (SPECTOR et al., 1984), submetidos a transplante de órgãos (CHOU, 1986) e gestantes (HUANG et al., 1980a; SHEN et al., 1993; ARAV-BOGER et al., 2002), a excreção simultânea de mais de uma cepa tem sido observada em indivíduos imunocompetentes. Em nosso estudo, a presença simultânea de mais de um genótipo gB foi identificada em 19% (5/27) dos casos de reinfeção. Estes resultados são semelhantes aos observados em estudo envolvendo pacientes portadores do HIV-1 (COAQUETTE et al. em 2004). Em 1998(a), Meyer-König et al. ao avaliarem a distribuição genotípica da gB em diferentes tecidos corporais obtidos de 25 pacientes submetidos à necropsia para esclarecimento do óbito, demonstraram que indivíduos imunocompetentes podem apresentar-se infectados por múltiplas cepas do CMV. Dentre estes, foi possível identificar mais de uma cepa do CMV simultaneamente em sete amostras de pacientes, sugerindo que diferentes variantes genotípicas podem estar latentes em diversos tecidos do hospedeiro. A excreção de mais de uma cepa do CMV foi observada em três de quatro pacientes que apresentaram reinfeção por uma nova variante genotípica (CHANDLER et al., 1987). Entretanto, nenhuma destas mulheres apresentou excreção simultânea de diferentes cepas em um mesmo sítio de excreção.

Ao contrário do observado em nosso trabalho em que 19% das crianças excretavam simultaneamente duas cepas diferentes em uma mesma amostra de urina e/ou saliva, estudos baseados na variabilidade da gB por meio de RFLP demonstram a presença de apenas uma variante genotípica ou um número limitado de amostras contendo mistura de cepas (BALE et al., 1996; CARRARO; GRANATO. 2003). Entretanto, estudo realizado por Coaquette et al. (2004) utilizando a técnica de hibridização com sondas cepa específicas, demonstrou a excreção simultânea de duas ou mais cepas do CMV no mesmo sítio de

excreção, em 38% dos pacientes avaliados. Recentemente, Ross et al. (2005) observaram que 31% (15/48) das mulheres atendidas apresentavam excreção simultânea de múltiplas variantes da gN em amostras de secreção cervical obtidas de mulheres atendidas em clínicas para o tratamento de DSTs. Da mesma maneira, a excreção simultânea de mais de uma cepa do CMV foi observada em 93% das amostras de urina e sangue obtidas de mulheres previamente imunes e sadias (NOVAK et al., 2008). Estes achados sugerem que a excreção simultânea de diferentes cepas do CMV ocorre frequentemente.

Da mesma maneira, outros estudos sobre a diversidade genética da gN reportaram a presença de uma única variante genotípica nas amostras testadas. Em estudo realizado em 1996 por Shen e cols., nenhum caso de reinfecção pelo CMV em crianças entre três e cinco anos de vida, ao longo de 12 meses, foi observado apesar de pequenas diferenças nos padrões de restrição ter sido identificada. Pignatelli et al. (2003) ao avaliarem 223 isolados virais obtidos a partir de diferentes populações incluindo transplantados, pacientes com AIDS, crianças com infecção congênita e pós-natal, de quatro áreas geográficas distintas, observaram que apesar de cinco diferentes sítios de excreção terem sido avaliados e todas as quatro variantes genotípicas terem sido descritas, apenas um genótipo gN foi identificado. Entretanto, em nosso estudo, a excreção simultânea de mais de uma cepa do CMV foi confirmada em 19% das crianças avaliadas. Neste estudo foram utilizadas duas técnicas distintas, RFLP e PCR cepa-específica, sendo uma para identificar a excreção simultânea de mais de uma cepa do CMV e a outra, para confirmar a mistura de genótipos em uma mesma amostra de urina e/ou saliva. Considerando-se que Pignatelli et al. (2003) utilizaram apenas da técnica de RFLP para caracterização e diferenciação de cepas, é possível que a não identificação de misturas de cepas esteja subestimado. Outros fatores que poderiam ter contribuído para a não identificação de mistura de cepas no estudo de Pignatelli et al. (2003) são a propagação viral em cultura celular, que pode levar à seleção de uma única variante genotípica e, a diferenciação de cepas por meio de RFLP. Esta técnica baseia-se na habilidade em visualizar e diferenciar os fragmentos obtidos após a digestão enzimática, bem como na qualidade e quantidade do DNA presente nestas amostras. Outro ponto quanto a esta técnica seria a identificação apenas da cepa predominante. Assim como na diferenciação de cepas da gN em Pignatelli et al. (2003), a caracterização das diferentes cepas da gB por meio de RFLP em nosso estudo, possibilitou a identificação de uma ou duas variantes genotípicas presentes em cada amostra. Isto pode se dar devido as enzimas *HinfI* e

*Rsal* produzirem padrões de restrição indistinguíveis em certas combinações contendo três ou quatro variantes genóticas. Já a ausência de confirmação de todos os casos em que foi identificada a excreção simultânea de mais de uma cepa do CMV baseado no polimorfismo da gB pela PCR cepa específica para os diferentes genótipos da gN, sugere que este método não seja capaz que identificar duas variantes diferentes em uma mesma amostra de urina e/ou saliva.

Outro fator limitante para a não identificação de um maior número de crianças com excreção simultânea de mais de uma cepa do CMV em nosso estudo, seria o intervalo entre as amostras coletadas. Inicialmente propusemos a coleta seriada de amostras de urina e saliva trimestralmente no primeiro ano de vida e a cada seis meses após este período. Considerando-se que a mediana da idade no momento da identificação de uma nova variante genótica foi de 16,5 meses e que na maioria dos casos de reinfecção não foi possível observar a mistura de cepas, um intervalo menor para a obtenção de amostras seriadas poderia contribuir para responder tal questionamento. Ainda com relação ao intervalo entre as amostras, se consideramos que em alguns casos a mudança de genótipo foi identificada após um período superior a seis meses da última coleta com detecção do mesmo genótipo identificado ao nascimento, a idade por nós determinada como sendo da aquisição de uma nova variante genótica, possa não refletir o momento exato da ocorrência da reinfecção por uma nova cepa do CMV.

Um aumento significativo no número de novos casos de reinfecção por uma nova cepa do CMV foi observado na faixa etária de um ano. Estudos prévios em adultos sugerem que a imunossupressão, o transplante de órgãos e o comportamento sexual de risco, contribuem para a reinfecção com novas cepas virais do CMV (DREW et al., 1984; SPECTOR et al., 1984; CHANDLER et al., 1987; CHOU, 1987; LEACH et al., 1994). Assim como indivíduos com comportamento sexual de risco estão frequentemente expostos a múltiplas cepas do CMV, crianças que frequentam creches são mais susceptíveis ao contato com diferentes cepas virais, o que poderia contribuir para a ocorrência de reinfecção (PASS et al.; 1982; MURPH et al.; 1986; ADLER et al.; 1988). Adicionalmente, Bale et al. (1996) sugerem que a idade possa ser um fator contribuinte, uma vez que crianças que adquiriram uma nova cepa do CMV em seu estudo eram mais jovens quando comparado àquelas que mantiveram a excreção da cepa previamente adquirida. Concordando com os achados de Bale et al. (1996), crianças que apresentaram reinfecção por uma nova cepa do CMV em nosso estudo, eram

mais jovens quando comparado àquelas que mantiveram a excreção do mesmo genótipo identificado ao nascimento. Embora estes estudos apresentem algumas especulações, pouco se conhece acerca dos mecanismos envolvidos na reinfecção por nova cepa. A ação dos anticorpos neutralizantes virais cepa específicos como moduladores da reinfecção por novas cepas do CMV em indivíduos previamente imunes e expostos a diferentes cepas virais tem sido sugerida (BRITT; VUGLER, 1990; BURKHARDT et al., 2009). Estudo envolvendo mulheres com infecção primária pelo CMV na gestação demonstrou associação entre a transmissão viral e os níveis de anticorpos neutralizantes, sugerindo a determinação de um limiar imunológico que limite a transmissão intrauterina em mulheres previamente imunes e que adquiriram uma nova cepa viral durante a gestação (BOPPANA; BRITT, 1995). Conhecer a contribuição dos diferentes fatores apresentados nestes estudos, em especial sobre os mecanismos envolvidos na imunidade protetora contra o CMV, poderia auxiliar no desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a transmissão deste vírus.

Durante o período perinatal, entre oito e 60% das crianças adquirem uma cepa do CMV por fontes maternas (PASS, 1985), sendo a principal fonte transmissora neste período, o aleitamento materno (DWORSKY et al., 1983). Após o período perinatal, podemos destacar dois outros momentos relacionados ao aumento da frequência de infecção pelo CMV. O primeiro deles ocorre no início da infância, ou seja, nos primeiros três anos de vida da criança, geralmente em decorrência do contato com outros membros da família. O segundo período associado ao aumento da frequência da infecção pelo CMV está relacionado ao início da vida sexual. Informações epidemiológicas relacionadas à prevalência de anticorpos têm demonstrado que a prevalência da infecção pelo CMV em relação à idade varia de acordo com a área geográfica e condições socioeconômicas do indivíduo (PASS, 1985). Ainda não está clara a razão pela qual estas diferenças ocorrem entre populações distintas, porém cuidados relacionados às crianças podem influenciar na incidência da infecção pelo CMV em crianças. Da mesma maneira, o início do convívio em creches parece ter grande influência na incidência da infecção pelo CMV, uma vez que a prevalência da excreção viral em crianças que frequentam creches é maior quando comparado àquelas na população em geral (ADLER, 1985; PASS et al., 1984; PASS, 1985). Recentemente, estudo realizado por Kaye et al. (2008) demonstrou que 85% das crianças não infectadas haviam adquirido o CMV ao final do primeiro ano de vida. Os autores sugerem que a elevada soroprevalência materna (100% entre as mães avaliadas) possa estar diretamente relacionada à alta taxa de infecção

observada ao longo do primeiro ano de vida destas crianças. Estes achados corroboram com o pico de reinfecção por uma nova cepa do CMV na faixa etária de um ano de vida observado em nosso estudo, sugerindo que a ação dos anticorpos maternos recebidos durante a gestação e por meio do aleitamento materno desempenhe papel protetor contra a reinfecção, durante os primeiros 12 meses de vida.

A identificação de mais de uma cepa viral em indivíduos imunocompetentes, frente a uma resposta imune efetora, demonstra que a imunidade prévia não protege contra a reinfecção por uma nova cepa (CHANDLER et al., 1987; BALE et al., 1996; SCHOPPEL et al., 1997; BOPPANA et al., 2001). Entretanto, pouco se conhece a respeito das consequências da reinfecção por uma nova cepa e qual o seu papel na persistência da excreção viral. Em nosso estudo, observamos que 30 crianças apresentaram períodos de intermitência da excreção viral. Ao analisarmos a ocorrência de excreção viral detectável após um período de intermitência, observamos que a maioria das crianças manteve a excreção da cepa adquirida intraútero, sugerindo que a persistência da excreção viral por longos períodos observada em crianças com infecção congênita seja decorrente da reativação da cepa endógena. Entretanto, Bale et al. (1996) sugerem que a reinfecção por diferentes cepas do CMV tem grande importância na transmissão e manutenção da excreção viral por longos períodos.

Em 1989, Adler et al. demonstraram que a persistência da excreção do CMV na urina e saliva de crianças menores de dois anos contribui para a transmissão a indivíduos susceptíveis, principalmente mulheres em idade fértil. Em 1996, Shen et al. observaram que crianças entre três e cinco anos de vida excretam o CMV de forma persistente ou intermitente, por aproximadamente nove meses, sugerindo que esta persistência seja decorrente da frequente reativação da cepa endógena. O papel da imunidade humoral como fator limitante na persistência da excreção viral em crianças com infecção congênita pelo CMV foi proposto por Noyola et al. (2000). Os autores observaram que crianças com desenvolvimento de surdez neurossensorial permaneciam excretando o CMV por um período de tempo menor quando comparado àquelas que não apresentaram nenhum tipo de seqüela. Estudo realizado por Pass et al. (1983) sugere que o desenvolvimento da imunidade celular específica contra o CMV esteja relacionada à interrupção da excreção viral. Mais recentemente, Kloover et al. (2002) utilizando modelos animais em camundongos para avaliar a persistência da excreção viral por longos períodos na saliva, observaram que a

excreção viral persistente nestes animais é sugerida como sendo fonte principal para transmissão horizontal deste vírus e como fator protetor para sucessivos episódios de recorrência, seja pela reativação de cepa endógena ou pela reinfecção por uma nova cepa devido ao estímulo da resposta imune mediada por anticorpos.

Ao contrário do observado em adultos imunocompetentes com infecção primária, os quais apresentam excreção viral de curta duração e de forma intermitente (JONJIC et al., 1989; REVELLO et al., 1998), crianças com infecção congênita pelo CMV ou que adquiriram o vírus no período neonatal apresentam excreção contínua por longos períodos na urina e na saliva (ADLER, 1992; STAGNO et al., 1994). Ainda não se conhecem as razões para esta diferença na persistência da excreção viral em indivíduos de diferentes idades. Estudos prévios sugerem que a imunidade celular mediada por células T possa representar importante papel na manutenção do CMV em estado de latência (GREENBERG, RIDDELL, 2000) e que, a produção de IFN- $\gamma$  por células T CD4<sup>+</sup> esteja relacionada ao controle da excreção e replicação viral em sítios de origem epitelial (LUCIN et al., 1992; ZANGHELLINI et al., 1999). Recentemente, Tu et al., (2004) observaram que crianças jovens e imunocompetentes, apresentam quantidades menores de células T CD4<sup>+</sup> específicas contra o CMV produtoras de IFN- $\gamma$  quando comparado a indivíduos adultos. Entretanto, a resposta mediada por células T CD8<sup>+</sup> específicas contra o CMV nestas crianças apresenta-se semelhante à observada em adultos. Esta diferença no número de células T CD4<sup>+</sup> específicas contra o CMV persiste por um período superior a um ano após a infecção viral, sugerindo uma relação inversa com a persistência da excreção viral. Estudos prévios em crianças com infecção congênita demonstram que interrupção da excreção viral está associada ao aumento da resposta proliferativa das células T CD4<sup>+</sup> específicas contra o CMV (PASS et al.; 1983) e, que uma resposta mediada por células T CD8<sup>+</sup> efetora, não é suficiente para controlar a persistência da excreção viral (MARCHANT et al., 2003). Estes achados sugerem a necessidade do desenvolvimento de estudos abordando os mecanismos de resposta imunológica do CMV e de persistência da excreção viral, ou seja, da patogênese desta infecção, contribuindo assim para futuras abordagens epidemiológicas e para o desenvolvimento de uma vacina efetora contra a transmissão do CMV.

Buscando-se identificar possíveis fatores de risco associados à ocorrência de reinfecção por uma nova cepa do CMV, fatores sociodemográficos e hábitos inerentes ao hospedeiro foram analisados. Nossos dados demonstram uma possível associação entre a idade de início do convívio em creches e/ou instituições e o número de pessoas residentes

na mesma casa no período do nascimento com a ocorrência de reinfecção por uma cepa distinta do CMV. Estudos prévios demonstram que até 80% das crianças atendidas por creches apresentam excreção viral prolongada na saliva e na urina (PASS et al., 1982; ADLER, 1985; SHEN et al., 1993). Da mesma maneira, diferentes estudos relatam que crianças congenitamente infectadas ou que adquiram a infecção primária pelo CMV no período neonatal permanecem excretando o vírus na urina e na saliva por longos períodos (STAGNO et al., 1983; ADLER et al., 1989; ADLER et al., 1992; STAGNO; CLOUD, 1994; SHEN et al., 1996) contribuindo para a transmissão horizontal e manutenção desta infecção na população em geral. Estes achados sugerem que o convívio em creches possa contribuir para a reinfecção por novas cepas virais. Outro ponto a salientar está relacionado ao impacto da persistência da excreção viral nestas crianças, como um problema de saúde pública, na transmissão horizontal para indivíduos susceptíveis, em especial gestantes. Em 2001, Boppana et al. observaram que a reinfecção por uma nova cepa durante a gestação, em mulheres previamente imunes, pode resultar na ocorrência de infecção congênita sintomática, com sequelas ao feto semelhante às observadas em casos de infecção primária. Recentemente, Yamamoto et al. (2010) observaram um número maior de mães de crianças congenitamente infectadas pelo CMV entre aquelas mulheres que realizaram práticas de cuidados em crianças com idade menor ou igual a três anos de vida, sugerindo que a frequente exposição a um grande número de cepas pode contribuir para a reinfecção por uma nova cepa viral nestas mulheres com conseqüente transmissão ao feto.

A reinfecção por diferentes cepas do CMV têm sido descrita em crianças atendidas por creches e em mulheres que frequentam clínicas para o tratamento de DSTs (BALE et al., 1996; CHANDLER et al., 1987). Adicionalmente, Adler et al. (1991), ao avaliarem a frequência de reinfecção em crianças atendidas por creches, observaram que 6% delas haviam adquirido uma nova cepa do CMV. Considerando-se que a idade do início do convívio em creches coincidiu com o pico de excreção de 20% demonstrado pela frequência relativa na faixa etária de um ano, ou seja, com o maior número de novos casos de reinfecção, nossos dados sugerem que a frequente exposição a um grande número de cepas contribui para a ocorrência de reinfecção por uma nova cepa do CMV. Da mesma maneira, Adler et al. (1991) sugerem que a idade seja um fator que possa contribuir para a ocorrência de reinfecção. Os autores observaram que os maiores índices de infecção em diferentes creches, foram observados na faixa etária de um ano, sugerindo que a transmissão esteja mais relacionada

ao contato criança-criança, sem intervenção dos cuidadores. Isto se deve ao fato de que crianças nesta faixa etária possuem certa independência quanto à locomoção, porém necessitam de cuidados para alimentação e higiene. Corroborando com estes achados, Pass et al. (1984) demonstraram que a prevalência da infecção pelo CMV pode estar associada à idade uma vez que, 78% das crianças adquiriram a infecção pelo CMV durante o segundo ano de vida (faixa etária de um ano de vida). Novamente, o contato criança-criança é mencionado como essencial no mecanismo de infecção viral, bem como na reinfecção por uma nova cepa do CMV.

Apesar da tendência da excreção de uma única variante genotípica ter sido observada por Bale et al. (1996) nos diferentes centros para o cuidado de crianças avaliados, um grande número de cepas circulantes tem sido demonstrada na população em geral. Estudos prévios em nossa população de estudo, demonstram a presença de um grande número de cepas circulantes em nossa região, sendo possível a identificação das quatro principais variantes genotípicas da gB (AQUINO, FIGUEIREDO, 2000; YAMAMOTO et al., 2007). Estudos prévios têm demonstrado a transmissão de diferentes cepas do CMV entre indivíduos numa mesma família (ADLER, 1988; REVELLO et al., 2008). Considerando-se a alta taxa de soroprevalência em nossa região, de aproximadamente 98% (YAMAMOTO et al., 2007) e o grande número de cepas circulantes, nossos dados sugerem que o contato frequente com um grande número de pessoas na mesma casa ( $\geq 4$  pessoas) no período do nascimento, pode estar associada à ocorrência de reinfecção por diferentes cepas do CMV.

Sendo assim, os resultados deste estudo sugerem que a reinfecção por diferentes cepas do CMV ocorre frequentemente em crianças com infecção congênita pelo CMV, alcançando 44% das crianças ao final do quarto ano de vida, apesar da imunidade prévia desenvolvida contra a cepa adquirida intraútero. Assim como na infecção perinatal, a reinfecção por diferentes cepas pode estar relacionada com a idade, uma vez que um número maior de crianças adquiriu uma nova variante genotípica do CMV na faixa etária de um ano de vida. Apesar da elevada frequência de reinfecção observada, a persistência da excreção viral comumente observada em crianças com infecção congênita pelo CMV, decorre da reativação da cepa endógena. Considerando-se todos os possíveis fatores de risco avaliados, a idade do início do convívio em creche e o número de pessoas que residiam na mesma casa no período do nascimento podem estar associados a ocorrência de reinfecção por uma nova cepa do CMV.

***CONCLUSÕES***

---

## **7 CONCLUSÕES**

- 7.1 A incidência cumulativa de reinfecção demonstra que ao final do quarto ano de vida, 44% das crianças haviam adquirido uma nova cepa do CMV.
- 7.2 A mistura de genótipos, ou seja, a excreção simultânea de mais de uma cepa do CMV foi em 19% (5/27) das crianças que apresentaram reinfecção por uma nova variante genotípica do CMV.
- 7.3 Considerando-se que a maioria das crianças que apresentaram períodos de intermitência da excreção viral mantiveram a excreção da cepa adquirida no período intraútero, a excreção viral prolongada geralmente observada em crianças congenitamente infectadas pelo CMV pode ser decorrente da reativação da cepa endógena.
- 7.4 Uma associação entre a idade de início do convívio em creches e o número de pessoas que residiam na mesma casa no período do nascimento com a ocorrência de reinfecção por uma nova cepa do CMV foi observada.

## ***REFERÊNCIAS***

---

**REFERÊNCIAS\***

ADLER, S. P. Molecular epidemiology of cytomegalovirus: a study of factors affecting transmission among children at three day care centers. **Pediatr Infect Dis J**, v. 10, p. 5844-5900, 1991.

ADLER, S. P. Molecular epidemiology of cytomegalovirus: viral transmission among children attending a day care center, their parents, and caretakers. **J Pediatr**, v. 112, n. 3, p. 366-72, 1988.

ADLER, S. P. Cytomegalovirus and child day care. **Adv Pediatr Infect Dis**, v. 7, p. 109, 1992.

ADLER, S. P. Cytomegalovirus and child day care. Evidence for an increased infection rate among day-care workers. **N Engl J Med**, v. 321, n. 19, p. 1290-1296, 1989.

ADLER, S. P. Molecular epidemiology of cytomegalovirus: viral transmission among children attending a day care center, their parents, and caretakers. **J Pediatr**, v. 112, n. 3, p. 366-372, 1988.

ADLER, S.P. The molecular epidemiology of cytomegalovirus transmission among children attending a day care center. **J Infect Dis**, v. 152, n. 4, p. 760-8, 1985.

AHLFORS, K.; IVARSSON, S. A.; HARRIS, S. Report on a long-term study of maternal and congenital cytomegalovirus infection in Sweden. Review of prospective studies available in the literature. **Scand J Infect Dis**, v. 31, p. 443-57, 1999.

AQUINO, V. H.; FIGUEIREDO, L. T. M. Cytomegalovirus infection in renal transplant recipients diagnosed by nested-PCR. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, p. 93-101, 2001.

AQUINO, V. H.; FIGUEIREDO, L. T. M. Prevalence of renal transplant recipients infected with more than one cytomegalovirus glycoprotein B genotype. **J Med Virol**, v. 61, p. 138-142, 2000.

ARAV-BOGER, R.; WILLOUGHBY, R. E.; PASS, R. F.; ZONG, J. C.; JANG, W. J.; ALCENDOR, D.; HAYWARD, G. S. Polymorphisms of the cytomegalovirus (CMV)-encoded tumour necrosis

---

\* Referências elaboradas segundo "Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: documento eletrônico e impresso", versão 2009.

factor-a and b-chemokine receptors in congenital CMV disease. **J Infect Dis**, v. 186, p. 1057-1064, 2002.

BALDANTI, E.; SARASINI, A.; FURIONE, M.; GANI, M.; COMOLLI, G.; REVELLO, M. G.; GERNA, G. Coinfection of the immunocompromised but not the immunocompetent host by multiple human cytomegalovirus strains. **Arch Virol**, v. 143, p. 1701-1709, 1998.

BALE JF, J. R.; PETHERAM, S. J.; ROBERTSON M.; et al. Human cytomegalovirus a sequence and UL144 variability in strains from infected children. **J Med Virol**, v. 65(1), p. 90-96, 2001.

BALE, J. F. Jr.; PETHERAM, S. J.; SOUZA, I. E.; MURPH, J. R. Cytomegalovirus reinfection in young children. **J. Pediatr**, v. 128, p. 347-352, 1996.

BOPPANA, S. B.; RIVERA, L. B.; FOWLER, K. B.; MACH, M.; BRITI, W. J. Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. **N Engl J Med**, v. 344 (18), p. 1366-1371, 2001.

BOPPANA, S.B.; PASS, R.F.; BRITT, W.J.; STAGNO, S.; ALFORD, C.A. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality. **Pediatr Infect Dis J**, v. 11, p. 93-9, 1992.

BOPPANA, S. B.; BRITT, W. J. Antiviral antibody responses and intrauterine transmission after primary maternal cytomegalovirus infection. **J Infect Dis**, v. 171, n. 5, p. 1115-21, 1995.

BRESNAHAN, W. A.; SHENK, T. A Subset of Viral Transcripts Packaged Within Human Cytomegalovirus Particles. **Science**, v. 288, p. 2373, 2000.

BRITT, W. J.; BOPPANA, S. Human cytomegalovirus virion proteins. **Hum Immunol**, v. 65(5), p. 395-402, 2004.

BRITT, W. J.; VUGLER, L. G. Antiviral antibody responses in mothers and their newborn infants with clinical and subclinical congenital cytomegalovirus infections. **J Infect Dis**, v. 161, p. 214-9, 1990.

BURKHARDT, C.; HIMMELEIN, S.; BRITT, W.; MACH, M. The glycoprotein N of human cytomegalovirus induce a strain specific antibody response during natural infection. **J Gen Virol**, v. 90, p. 1951-61, 2009.

CARRARO, E.; GRANATO, C. F. Single human cytomegalovirus gB genotype shed in multiple sites at the time of diagnosis in renal transplant recipients. **J Med Virol**, v. 70, n. 2, p. 240-3, 2003.

CHA, T. A.; TOM, E.; KEMBLE, G. W.; et al. Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. **J Virol**, v. 70(1), p. 78-83, 1996.

CHANDLER, S. H.; HANDSFIELD, H. H.; MCDUGALL, J. K. Isolation of multiple strains of cytomegalovirus from women attending a clinic for sexually transmitted disease. **J Infect Dis**, v. 155, p. 655-660, 1987.

CHANDLER, S. H.; MCDUGALL, J. K. Comparison of restriction site polymorphisms among clinical isolates and laboratory strains of human cytomegalovirus. **J Gen Virol**, v. 67, p. 2179-92, 1986.

CHOU, S. Acquisition of donor strains of cytomegalovirus by renal transplant recipients. **N Engl J Med**, v. 314, p. 1418-1423, 1986.

CHOU, S. Differentiation of cytomegalovirus strains by restriction analysis of DNA sequences amplified from clinical specimens. **J Infect Dis**, v. 162, p. 738-742, 1990.

CHOU, S.; DENNISON, K. M. Analysis of interstrain variation in cytomegalovirus glycoprotein B sequences encoding neutralization-related epitopes. **J Infect Dis**, v. 163, p. 1229-1234, 1991.

CHOU, S.; KIM, D. Y.; SCOTT, K. M.; SEWELL, D.L. Immunoglobulin M to cytomegalovirus in primary and reactivation infections in renal transplant recipients. **J Clin Microbiol**, v. 25, n. 1, p. 52-5, 1987.

CHOU, S. W. Reactivation and recombination of multiple cytomegalovirus strains from individual organ donors. **J Infect Dis**, v. 160, n. 1, p. 11-5, 1989.

COAQUETTE, A.; BOURGEOIS, A.; DIRAND, C.; VARIN, A.; CHEN, W.; HERBEIN, G. Mixed cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in immunocompromised patients. **Clin Infect Dis**, v. 39, p. 155-161, 2004.

COMPTON, T. Receptors and immune sensors: the complex entry path of human cytomegalovirus. **Trends Cel Biol**, v. 14(1), p. 5-8, 2004.

DAL MONTE, P.; PIGNATELLI, S.; MACH, M.; LANDINI, M. P. The product of human cytomegalovirus (HCMV) UL73 is a new polymorphic structural glycoprotein (gpUL73). **J Hum Virol**, v. 4, p. 26-33, 2001.

DAL MONTE, P.; PIGNATELLI, S.; ROSSINI, G.; LANDINI M. P. Genomic variants among human cytomegalovirus (HCMV) clinical isolates: the glycoprotein N (gN) paradigm. **Human Immunol**, v. 65, p. 387-394, 2004.

DAVISON, A. J.; DOLAN, A.; AKTER, P.; ADDISON, C.; DARGAN, D. J.; ALCENDOR, D. J.; MCGEOCH, D. J.; HAYWARD, G. S. The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. **J Gen Virol**, v. 84, p. 17-28, 2003.

DEMMLER, G. J. Congenital cytomegalovirus infection. **Semin Pediatr Neurol**, v. 1, n. 1, p. 36-42, 1994.

DEMMLER, G. J. Congenital cytomegalovirus infection: epidemiology and treatment. **Adv Pediatr Infect Dis**, v. 11, p. 135-162, 1996.

DOHNER, K.; SODEIK, B. The role of the cytoplasm during viral infection. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 285, p. 67 - 108, 2004.

DOLAN, A.; CUNNINGHAM, C.; HECTOR, R. D.; et al. Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. **J Gen Virol**, v. 85(5), p. 1301-1312, 2004.

DREW, W. L.; SWEET, E. S.; MINER, R. C.; MOCARSKI, E. S. Multiple infections by cytomegalovirus in patients with acquired immunodeficiency syndrome. **J Infect Dis**, v. 150, p. 952-953, 1984.

DUNN, W.; CHOU, C.; LI, H.; et al. Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, p. 14223 -14228, 2003.

DWORSKY, M. E.; YOW, M.; STAGNO, S.; PASS, R. F.; ALFORD, C. A. Cytomegalovirus infection of breast milk and transmission in infancy. **Pediatr**, v. 72, p. 295-299, 1983.

ENDERS, J. F.; WELLER, T. H.; ROBBINS, F. C. Cultivation of the lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues. **Science**, v. 109, p. 85-87, 1949.

FEIRE, A. L.; KOSS, H.; COMPTON, T. Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 101 (43), p. 15470-15475, 2004.

FETTERMAN, G. H. A new laboratory aid in the clinical diagnosis of inclusion disease of infancy. **Am J Clin Pathol**, v. 22, p. 424-425, 1952.

FISCHER, S.; GENBACEV, O.; MAIDJI, E.; PEREIRA, L. Human cytomegalovirus infection of placenta I cytotrophoblasts *in vitro* and *in utero*: implications for transmission and pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 74 (15), p. 6808-6820, 2000.

FOWLER, K. B.; BOPANA, S. B. Congenital cytomegalovirus (CMV) infection and hearing deficit. **J Clin Virol**, v. 2, p. 226-31, 2006.

FOWLER, K. B.; DAHLE, A. J.; BOPANA, S. B.; PASS, R. F. Newborn hearing screening: will children with hearing loss caused by congenital cytomegalovirus infection be missed? **J Pediatr**, v. 135, n. 1, p. 60-4, 1999.

GERNA, G.; BALDANTI, F.; ZAVATIONI, M.; SARASINI, A.; PERCIVALLE, E.; REVELLO, M. G. Monitoring of ganciclovir sensitivity of multiple human cytomegalovirus strains coinfecting blood of an AIDS patient by an immediate-early antigen plaque assay. **Antiviral Res**, v. 19, p. 333-345, 1992.

GOODPASTURE, E. W.; TALBOT, F. B. Concerning the nature of "protozoan-like" cells in certain lesions of infancy. **Am J Dis Child**, v. 21, p. 415-425, 1921.

GREDMARK, S.; BRITI, W. B.; XIE, X.; et al. Human cytomegalovirus induces inhibition of macrophage differentiation by binding to human aminopeptidase NjCD13. **J Immunol**, v. 173 (8), p. 4897-4907, 2004.

GREENBERG, P. D.; RIDDELL, S. T-cell therapy of cytomegalovirus and human immunodeficiency infection. **J Antimicrob Chemother**, v. 45, p. 35, 2000.

GRUNDY, J. E.; MCKEATING, J. A.; WARD, P. J.; SANDERSON, A. R.; GRIFFITHS, P. D. Beta 2 microglobulin enhances the infectivity of cytomegalovirus and when bound to the virus enables class I HLA molecules to be used as a virus receptor. **J Gen Virol**, v. 68 (3), p. 793-803, 1987.

HENGEL, H.; BRUNE, W.; KOSZINOWSKI, U. H. Immune evasion by cytomegalovirus a survival strategies of a highly adapted opportunist. **Trends in Microbiology**, v. 6 (5), p. 190-197, 1998.

HUANG, E. S.; ALFORD, C. A.; REYNOLDS, D. W.; STAGNO, S.; PASS, R. F. Molecular epidemiology of cytomegalovirus infections in women and their infants. **N Engl J Med**, v. 303, p. 958-962, 1980a.

HUANG, E. S.; HUONG, S. M.; TEGTMEIER, G. E.; ALFORD, C. Cytomegalovirus: genetic variation of viral genomes. **Ann NY Acad Sci**, v. 354, p. 332-346, 1980.

HUMAR, A. KUMAR, D.; GILBERT, C.; BOICIN, G. Cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B genotypes and response to antiviral therapy, in solid-organ-transplant recipients with CMV disease. **J Infect Dis**, v. 188, p. 581-584, 2003.

ICTVdB Management (2006). 00.031.2.01.001. Human herpesvirus 5. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 4. Büchen-Osmond, C. (Ed), **Columbia University**, New York, USA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>) Images in clinical medicine. Owl's-eye cells.

ISTAS, A.; DEMMLER, G.; DOBBINS, J.; STEWART, J. Surveillance for congenital cytomegalovirus disease: a report from the National Congenital Cytomegalovirus Disease Registry. **Clin Infect Dis**, v. 20(3), p. 665-70, 1995.

JESIONEK, K. Ueber einen befund vom protozen-artigen gebilden in den organen eines hereditärlluetischen foetus. **Munch Med Wochenschr**, v. 51, p. 1905-1907, 1904.

JONES, C. A. Congenital cytomegalovirus infection. **Curr Prob Pediatr Adolesc Health Care**, v. 33, p.65-100,2003.

JONJIC, S.; MUTTER, W.; WEILAND, F.; REDDEHASE, M. J.; KOSZINOWSKI, U. K. Site-restricted persistent cytomegalovirus infection after selective long-term depletion of CD4+ T lymphocytes. **J Exp Med**, v. 169, p. 1199, 1989.

KAYE, S.; MILES, D.; ANTOINE, P.; BURNY, W.; OJUOLA, B.; KAYE, P.; ROWLAND-JONES, S.; WHITTLE, H.; VAN DER SANDE, M.; MARCHANT, A. Virological and immunological correlates of mother-to-child transmission of cytomegalovirus in The Gambia. **J Infect Dis**, v. 197, n. 9, p. 1307-14, 2008.

KENNESON, A.; CANNON, M. J. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. **Rev Med Virol**, v. 17(4), p. 253-76, 2007.

KLOOVER, J. S.; VAN DEN BOGAARD, A. E.; VAN DAM, J. G.; GRAULS, G. E. L. M; VINK, C.; BRUGGEMAN, C. A. Persistent rat cytomegalovirus (RCMV) infection of the salivary glands

contributes to the anti-RCMV humoral immune response. **Virus Research**, v. 85, p. 163-172, 2002.

KWOK, S.; HIGUCHI, R. Avoiding false positives with PCR. **Nature**, v. 19, n. 339 (6224), p. 237-238, 1989.

LANDOLFO, S.; GARIGLIO, M.; GRIBAUDO, G.; LEMBO, D. The human cytomegalovirus. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 98, p. 269-297, 2003.

LEACH, C. T.; DETELS, R.; HENNESSEY, K.; LIU, Z.; VISSCHER, B. R.; DUDLEY, J. P.; CHERRY, J. D. A longitudinal study of cytomegalovirus infection in human immunodeficiency virus type 1-seropositive homosexual men: molecular epidemiology and association with disease progression. **J Infect Dis**, v. 170, n. 2, p. 293-8, 1994.

LUKAÁCSI, A.; TAROÁDI, B.; ENDREFFY, E.; BINSZKI, A. G. B.; PAÁL, A.; PUSZTAI, R. Human Cytomegalovirus gB Genotype 1 is Dominant in Congenital Infections in South Hungary. **Journal of Medical Virology**, v. 65, p. 537-542, 2001.

LURAIN, N. S.; KAPPELL, K. S.; HUANG, D. D.; SHORT, J. A.; PAINTSIL, J.; WINKFIELD, E.; BENEDICT, C. A.; WARE, C. F.; BREMER, J. W. Human Cytomegalovirus UL144 Open Reading Frame: Sequence Hypervariability in Low-Passage Clinical Isolates. **Journal of Virology**, v. 73, n. 12, p. 10040-10050, 1999.

LUCIN, P.; PAVIĆ, I.; POLIĆ, B.; JONJIĆ, S.; KOSZINOWSKI, U. H. Gamma interferon-dependent clearance of cytomegalovirus infection in salivary glands. **J Virol**, v. 66, n. 4, p. 1977-84, 1992.

MACH, M.; KROPFF, B.; DAL MONTE, P.; et al. Complex formation by human cytomegalovirus glycoproteins M (gpUL100) and N (gpUL73). **J Virol**, v. 74, n. 24, p. 11881-11892, 2000.

MANUEL, O. et al. An assessment of donor-to-recipient transmission patterns of human cytomegalovirus by analysis of viral genomic variants. **J Infect Dis**, v. 199, n. 11, p. 1621-1628, 2009.

MARCHANT, A.; APPAY, V.; VAN DER SANDE, M.; DULPHY, N.; LIESNARD, C.; KIDD, M.; KAYE, S.; OJUOLA, O.; GILLESPIE, G. M.; et al. Mature CD8+ T lymphocyte response to viral infection during fetal life. **J Clin Invest**, v. 111, p. 1747, 2003.

MEYER-KÖNIG, U.; EBERT, K.; SCHRAGE, B.; POLLAK, S.; HUFERT, F. T. Simultaneous infection of healthy people with multiple human cytomegalovirus strains. **Lancet**, v. 352, p. 1280-1281, 1998a.

MINDER, W. H. Die aetiologie der cytomegalia infantium. **Schweiz Med Wochenschr**, v. 83, p. 1180-1182, 1953.

MOCARSKI E. S. Immunomodulation by cytomegaloviruses: manipulative strategies beyond evasion. **Trends Microbiol**, v. 10, p. 332-339, 2002.

MOCARSKI, E. S. Jr. Immune escape and exploitation strategies of cytomegaloviruses: impact on and imitation of the major histocompatibility system. **Cell Microbiol**, v. 6(8), p. 707-717, 2004.

MOCARSKI, E. S. JR.; COURCELLE, C. T. Cytomegaloviruses and their replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M.; GRIFFIN, D.E.; et al., Editors. **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p. 2629-2673, 2001.

MOCARSKI, E. S.; SHENK, T.; PASS, R. F. Cytomegaloviruses. 5. ed. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields Virology**, Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins, 2007.

MUSSI-PINHATA, M. M.; YAMAMOTO, A. Y.; MOURA BRITO, R. M.; DE LIMA ISAAC, M.; DE CARVALHO E OLIVEIRA, P. F.; BOPPANA, S.; BRITT, W. J. Birth prevalence and natural history of congenital cytomegalovirus infection in a highly seroimmune population. **Clin Infect Dis**, v. 49, n. 4, p. 522-8, 2009.

MURPHY, E.; RIGOUTSOS, L.; SHIBUYA, T.; et al. Reevaluation of human cytomegalovirus coding potential. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100(23), p. 13585-13590, 2003.

MURPH, J. R.; BALE, J. F. JR.; MURRAY, J. C.; STINSKI, M. F.; PERLMAN, S. Cytomegalovirus transmission in a Midwest day care center: possible relationship to child care practices. **J Pediatr**, v. 109, n. 1, p. 35-9, 1986.

NOVAK, Z.; ROSS, S. A.; PATRO, R. K.; PATI, S. K.; KUMBLA, R. A.; BRICE, S.; BOPPANA, S. B. Cytomegalovirus strain diversity in seropositive women. **J Clin Microbiol**, v. 46 (3), p. 882-886, 2008.

NOYOLA, D. E.; DEMMLER, G. J.; WILLIAMSON, W. D.; GRIESSER, C.; SELLERS, S.; LLORENTE, A.; LITTMAN, T.; WILLIAMS, S.; JARRETT, L.; YOW, M. D. Cytomegalovirus urinary excretion and long term outcome in children with congenital cytomegalovirus infection. Congenital CMV Longitudinal Study Group. **Pediatr Infect Dis J**, v. 19, n. 6, p. 505-10, 2000.

NOYOLA, D.E.; DEMMLER, G.J.; NELSON, C.T.; GRIESSER, C.; WILLIAMSON, W.D.; ATKINS, J.T.; et al. Early predictors of neurodevelopmental outcome in symptomatic congenital cytomegalovirus infection. **J Pediatr**. v. 138, p. 325-331, 2001.

PANNUTI, C. S.; VILAS-BOAS, L. S.; ANGELO, M. J. O.; CARVALHO, R. P. S.; SEGRE, C. M. Congenital cytomegalovirus infection. Occurrence in two socioeconomically distinct populations of a developing country. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 27, p. 105-107, 1985.

PASS, R. Cytomegalovirus Infection. **Pediatrics in Review**, v. 23, n. 5, p. 163, 2002.

PASS, R. F. Epidemiology and transmission of cytomegalovirus. **J Infect Dis**, v. 152, p. 243-248, 1985.

PASS, R. F.; STAGNO, S.; DWORSKY, M. E.; SMITH, R. J.; ALFORD, C. A. Excretion of cytomegalovirus in mothers: observations after delivery of congenitally infected and normal infants. **J Infect Dis**, v. 146, n. 1, p. 1-6, 1982.

PASS, R. F.; STAGNO, S.; BRITT, W. J.; ALFORD, C. A. Specific cell-mediated immunity and the natural history of congenital infection with cytomegalovirus. **J Infect Dis**, v. 148, p. 953, 1983.

PASS, R. F.; FOWLER, K. B.; BOPPANA, S. B.; et al. Congenital cytomegalovirus infection following first trimester maternal infection: symptoms at birth and outcome. **J Clin Virol**, v. 35(2), p. 216-220, 2006.

PASS, R. F.; HUTTO, C.; REYNOLDS, D. W.; POTHILL, R. B. Increased frequency of cytomegalovirus in children in group day care. **Pediatrics**, v. 74, p. 121-126, 1984.

PELLET, P.E.; ROIZMAN, B. The family Herpesviridae: A brief introduction. 5. ed. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. (eds.) **Fields Virology**, Philadelphia: Lippincot Williams Wilkins, 2007.

PEREIRA, L.; MAIDJI, E. Cytomegalovirus infection in the human placenta: maternal immunity and developmentally regulated receptors on trophoblasts converge. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 325, p. 383-95, 2008.

PIETROPAOLO, R.; COMPTON, T. Interference with annexin 11 has no effect on entry of human cytomegalovirus into fibroblast cells. **J Gen Virol**, V. 80 (7), p. 1807-1816, 1999.

PIGNATELLI, S.; DAL MONTE, P.; LANDINI, M. P. gpUL73 (gN) genomic variants of human cytomegalovirus isolates are clustered into four distinct genotypes. **J Gen Virol**, v. 82, p. 2777-84, 2001.

PIGNATELLI, S.; DAL MONTE, P.; ROSSINI, G.; et al. Human cytomegalovirus glycoprotein N (gpUL73-gN) genomic variants: identification of a novel subgroup, geographical distribution and evidence of positive selective pressure. **J Gen Virol**, v. 84, p. 647-655, 2003.

PIGNATELLI, S.; DAL MONTE, P.; ZINI, N.; VALMORI, V.; MARALDI, N. M.; LANDINI, M. P. Immunoelectron microscopy analysis of HCMV gpUL73 (gN) localization. Brief Report. **Arch Virol**, v. 147, p. 1247-1256, 2002.

PRICHARD, M. N.; JAIRATH, S.; PENFOLD, M. E.; et al. Identification of persistent RNA-DNA hybrid structures within the origin of replication of human cytomegalovirus. **J Virol**, v. 72(9), p. 6997-7004, 1998.

RAHBAR, A.; SODERBERG-NAUCLER, C. Human cytomegalovirus infection of endothelial cells triggers platelet adhesion and aggregation. **J Virol**, v. 79 (4), p. 2211-2220, 2005.

RASMUSSEN, L.; GEISLER, A.; COWAN, C.; CHASE, A.; WINTERS, M. The genes encoding the gCII complex of human cytomegalovirus exist in highly diverse combinations in clinical isolates. **J Virol**, v. 76, p. 10841-10848, 2002.

RASMUSSEN, L.; GEISLER, A.; WINTERS, M. Inter- and intragenic variations complicate the molecular epidemiology of human cytomegalovirus. **J Infect Dis**, v. 187 (1), p. 809-819, 2003.

RAYNOR, B. D. Cytomegalovirus infection in pregnancy. **Semin Perinatol**, v. 17, p. 394-402, 1993.

REDDEHASE, M. J. *Cytomegaloviruses: Molecular Biology and Immunology*. **Caister Academic Press, Germany, 2006**.

REVELLO, M. G.; ZAVATTONI, M.; SARASINI, A.; PERCIVALLE, E.; SIMONCINI, L.; GERNA, G. Human cytomegalovirus in blood of immunocompetent persons during primary infection: prognostic implications for pregnancy. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 177, p. 1170-5, 1998.

REVELLO, M, G.; GERNA, G. Human cytomegalovirus tropism for endothelial/epithelial cells: scientific background and clinical implications. **Rev Med Virol**, Jan 18, 2010.

RIBBERT, H. Ueber prozoanartige zellen in der niere eines syphilitischen neugeborenen und in der paotis von kinder. **Zentralbl Allg Pathol**, v. 15, p. 945-948, 1904.

ROSS, S. A.; NOVAK, Z.; ASHRITH, G.; RIVERA, L. B.; BRITT, W. J.; HEDGES, S.; SCHWEBKE, J. R.; BOPPANA, A. S. Association between genital tract cytomegalovirus infection and bacterial vaginosis. **J Infect Dis**, v. 192, n. 10, p. 1727-30, 2005. Epub 2005 Oct 7.

ROSS, S. A.; ARORA, N.; NOVAK, Z.; FOWLER, K. B.; BRITT, W. J.; BOPPANA, S. B. Cytomegalovirus Reinfections in Healthy Seroimmune Women. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 201:000-000, 2010.

ROSS, S. A.; FOWLER, K. B.; ASHRITH, G.; STAGNO, S.; BRITI, W. J.; PASS, R. F.; BOPPANA, S. B. Hearing loss in children with congenital cytomegalovirus infection born to mothers with preexisting immunity. **J Pediatr**, v. 148 (3), p. 332-336, 2006.

SCHOPFER, K.; LAUBER, E.; KRECH, U. Congenital cytomegalovirus infection in newborn infants of mothers infected before pregnancy. **Arch Dis Child**, v. 53, p. 536-539, 1978.

SCHOPPEL, K.; KROPFF, B.; SCHMIDT, C.; et al. The humoral immune response against human cytomegalovirus is characterized by a delayed synthesis of glycoprotein-specific antibodies. **J Infect Dis**, v. 175, p. 533-544, 1997.

SEALE, H.; BOOY, R.; MACINTYRE, C. Trends in hospitalisations for diagnosed congenital cytomegalovirus in infants and children in Australia. **BME Pediatr**, v. 9, p. 7, 2009.

SHEN, C. Y.; CHANG, B. L.; CHANG, S. F.; YANG, S. L.; TSENG, S. L.; CHEN, C. Y.; WU, C. Molecular Epidemiology of Cytomegalovirus Infection in Kindergarten Children. **Journal of Medical Virology**, v. 48, p. 33-37, 1996.

SHEN, C. Y.; CHANG, S. F.; YEN M, S.; NG, H. T.; HUANG, E. S.; WU, C. W. Cytomegalovirus excretion in pregnant and nonpregnant women. **J Clin Microbiol**, v. 31 (6), p. 1635-1636, 1993.

SHEPP, D. H.; MATCH, M. E.; LIPSON, S. M. A fifth human cytomegalovirus glycoprotein B genotype. **Institut Pasteur Elsevier Res. Virol**, v. 149, p. 109-114, 1998.

SISSONS, J. G.; CARMICHAEL, A. J. Clinical aspects and management of cytomegalovirus infection. **J Infect**, v. 44, p. 78-83, 2002.

SMITH, K.; KULKI, J. K.; COBAIN, T.; DUSNTAN, R. A. Detection of cytomegalovirus infection in blood donors by the polymerase chain reaction. **Transfusion**, v. 33, n. 6, p. 497-503, 1993.

SMITH, M. G. Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland vírus (SVG) disease. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 92, p. 424-430, 1956.

SOWMYA, P.; MADHAVAN, H. N. Analysis of mixed infections by multiple genotypes of human cytomegalovirus in immunocompromised patients. **J Med Virol**, v. 81, n. 5, p. 861-869, 2009.

SPECTOR, S. A.; HIRATA, K. K.; NEUMAN, T. R. Identification of multiple cytomegalovirus strains in homosexual men with acquired immunodeficiency syndrome. **J Infect Dis**, v. 150, p. 953-956, 1984.

STAGNO S.; PASS R. F.; DWORSKY M. E.; ALFORD C. A. Congenital and perinatal cytomegalovirus infections. **Semin Perinatol**, v. 7, p. 31-42, 1983.

STAGNO, S.; BRITT, B. Cytomegalovirus. In: REMINGTON, J.S.; KLEIN, J.O.; WILSON, C.B.; BAKER, C.J.; editors. Infectious diseases of the fetus and newborn infant. 6th ed. Philadelphia: **Elsevier Saunders**, P. 740-81, 2006.

STAGNO, S.; CLOUD, G.A. Working parents: the impact of day care and breast-feeding on cytomegalovirus infections in offspring. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 91, p. 2384, 1994.

STAGNO, S.; PASS, R. F.; DWORSKY, M. E.; et al. Maternal cytomegalovirus infection and perinatal transmission. **Clin Obstet Gyneol**, v. 25, p. 563-576, 1982.

SWEET, C. The pathogenicity of cytomegalovirus. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, p. 457-482, 1999.

TANAKA, K.; NUMAZAKI, K.; TSUTSUMI, H. Human cytomegalovirus genetic variability in strains isolated from Japanese children during 1983-2003. **J Med Virol**, v. 76, p. 356-360, 2005.

TOROK-STORB, B.; BOECKH, M.; HOY, C.; LEISENRING, W.; MYERSON, D.; GOOLEY, T. Association of specific cytomegalovirus genotypes with death from myelosuppression after marrow transplantation. **Blood**, v. 90 (5), p. 2097-2102, 1997.

TRINCADO, D. E.; SCOTT, G. M.; WHITE, P. A.; HUNT, C.; RASMUSSEN, L.; RAWLINSON, W. D. Human Cytomegalovirus Strains Associated With Congenital and Perinatal Infections. **Journal of Medical Virology**, v. 61, p. 481-487, 2000.

TU, W.; CHEN, S.; SHARP, M.; et al. Persistent and selective deficiency of CD4<sup>+</sup> T cell immunity to cytomegalovirus in immunocompetent young children. **J Immunol**, v. 172(5), p. 3260-3267, 2004.

VAN LINT, A.L.; KNIPE, D.M. Herpesviruses. 2. Ed. In: Moselio Schaechter. Encyclopedia of Microbiology, Boston: **Elsevier**, 2009.

VANARSDALL, A. L.; RYCKMAN, B. J.; CHASE, M. C.; JOHNSON, D. C. Human Cytomegalovirus Glycoproteins gB and gH/gL Mediate Epithelial Cell-Cell Fusion When Expressed either in *cis* or in *trans*. **Journal of Virology**, v. 82, n. 23, p. 11837–11850, 2008.

VON GLAHN, W. C.; PAPPENHEIMER, A. M. Intranuclear inclusions in visceral disease. **Am J Pathol**, v. 1, p. 445-465, 1925.

VOSSEM, M. T.; WESTERHOUT, E. M.; SODERBERG-NAUCLER, C.; WIERTZ, E. J. Viral immune evasion: a masterpiece of evolution. **Immunogenetics**, v. 54 (8), p. 527-545, 2002.

WALKER, A.; PETHERAM, S. J.; BALLARD, L.; MURPH, J. R.; DEMMLER, G. J.; BALE Jr., J. F. Characterization of human cytomegalovirus strains by analysis of short tandem repeat polymorphisms. **J Clin Microbiol**, v. 39, p. 2219-2226, 2001.

WANG, X.; HUONG, S. M.; CHIU, M. L.; et al. Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus. **Nature**, v. 424 (6947), p. 456-461, 2003.

WELLER, T. H. Cytomegaloviruses: the difficult years. Review. **J Infect Dis**, v. 122, n. 6, p. 532-9, 1970.

WELLER, T.H.; MACAULEY, J.C.; CRAIG, J.M.; WIRTH, P. Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 94, p. 4-12, 1957.

WILLIAMSON, W. D.; DEMMLER, G.; PERCY, A. K.; CATLIN, F. I. Progressive hearing loss in infants with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection. **Pediatrics**, v. 90, p. 862-6, 1992.

WYATT, J. P.; SAXTON, J.; LEE, R. S.; PINKERTON, H. Generalized cytomegalic inclusion disease. **J Pediatr**, v. 36, p. 271-294, 1950.

YAMAMOTO, A. Y.; MUSSI-PINHATA, M. M.; BOPANA, S. B.; NOVAK, Z.; WAGATSUMA, V. M.; OLIVEIRA, P. F.; DUARTE, G.; BRITT, W. J. Human cytomegalovirus reinfection is

associated with intrauterine transmission in a highly cytomegalovirus-immune maternal population. **Am J Obstet Gynecol**, v. 202, p. x-ex-x-ex, 2010.

YAMAMOTO, A. Y.; MUSSI-PINHATA, M. M.; DE DEUS WAGATSUMA, V. M.; MARIN, L. J.; DUARTE, G.; FIGUEIREDO, L. T. Human cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in Brazilian mothers and their congenitally infected infants. **J Med Virol.**, v. 79(8), p.1164-8, 2007.

YAMAMOTO, A. Y.; MUSSI-PINHATA, M. M.; PINTO, P. C. G.; FIGUEIREDO, L. T. M.; JORGE, S. M. Usefulness of blood and urine samples collected on filter paper in detecting cytomegalovirus by polymerase chain reaction technique. **Journal Virological Methods**, v. 97, p. 159-164, 2001.

YU, D.; SILVA, M. C.; SHENK, T. Functional map of human cytomegalovirus AD169 defined by global mutational analysis. **PNAS**, v. 100, n. 21, p. 12396-12401, 2003.

ZANGHELLINI, F.; BOPPANA S. B.; EMERY, V. C.; GRIFFITHS, P. D.; PASS, R. F. Asymptomatic primary cytomegalovirus infection: virologic and immunologic features. **J Infect Dis**, v. 180, p. 702, 1999.

ZWEYGBERG WIRGART, B.; BRYTIING, M.; LINDE, A.; WAHREN, B.; GRILLNER, L. Sequence variation within three important cytomegalovirus gene regions in isolates from four different patient populations. **J Clin Microbiol**, v. 36, p. 3662 - 3669, 1998.

***ANEXOS***

---

## ANEXOS

## ANEXO 1 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA  
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAMPUS UNIVERSITÁRIO - MONTE ALEGRE  
FONE: 602-1000 - FAX (016) 633-1144

Ribeirão Preto, 29 de julho de 2002

Ofício nº 1979/2002  
CEP/SPC

**Prezada Senhora:**

O trabalho intitulado **"INFECÇÃO CONGÊNITA POR CITOMEGALOVÍRUS EM POPULAÇÃO DE ELEVADA SOROPOSITIVIDADE: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS CEPAS VIRAIS E AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DA REINFECÇÃO MATERNA"**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 135ª Reunião Ordinária realizada em 22/07/2002, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, de acordo com o Processo HCRP nº 4782/2002.

Aproveito a oportunidade para apresentar a Vossa Senhoria protestos de estima e consideração.



**PROF. DR. SÉRGIO PEREIRA DA CUNHA**  
Coordenador do Comitê de Ética  
em Pesquisa do HCFMRP-USP e da FMRP-USP

Ilustríssima Senhora  
**DRª APARECIDA YULIE YAMAMOTO**  
Depto. de Puericultura e Pediatria  
Em mãos

## **ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

### **HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SAO PAULO**

CAMPUS UNIVERSITÁRIO - MONTE ALEGRE – FONE: 602- 1000

FAX: 633-1144 - CEP: 14048-900-RIBEIRÃO PRETO - SP

#### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E INFORMADO**

##### **NOME DA PESQUISA:**

Infecção congênita por citomegalovírus em população de elevada soropositividade : caracterização molecular das cepas virais e avaliação da ocorrência de reinfecção materna.

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL : Aparecida Yulie Yamamoto**

CRM Nº: 49769

**PROMOTOR DA PESQUISA:** Departamento de Puericultura e Pediatria da FMRP-USP

Patrocinador que apóia financeiramente a pesquisa: FAPESP (Auxílio Pesquisa)

Gostaria de convidar a Sra e o seu filho para participem de um estudo de pesquisa.

Esta pesquisa é sobre uma infecção causada por um vírus chamado Citomegalovirus. Esta infecção é muito comum. Quando uma mulher pega este vírus durante a gravidez, a infecção pode passar para o bebê ainda dentro da barriga da mãe. Se o medico ficar sabendo logo que o bebê tem esta infecção, pode começar um tratamento e estes problemas não ficarem muito graves e também acompanhar a criança desde pequeno e fazer todos os exames para saber se a criança vai ter problemas.

Essa pesquisa quer saber quantas crianças nascem com essa infecção e o por que algumas crianças nascem com essa infecção e outras não. Além disso, existem muitos tipos destes vírus chamado citomegalovirus e a pesquisa também quer descobrir quais tipos deste vírus que causam mais esta infecção e também como a mãe pode reagir contra este vírus para não passar esta infecção para o bebe.

Se a senhora concordar em participar, do seu filho, será preciso colher um pouco de urina e um pouco de saliva logo ao nascimento, para fazermos exame que vai mostrar se ele está com a infecção por este vírus ou não. Será colocado um saquinho de plástico para colher um pouco de urina de seu filho e a saliva será coletada com um tubinho de plástico, sem machucar a boca do bebê. Se a quantidade de saliva for pouca, será pingada uma gotinha para aumentar a saliva naquele momento da coleta. Serão feitos exames na urina e na saliva. Ele vai receber todos os cuidados necessários no berçário.

***Página 2 de 3***

Se seu filho estiver com esta infecção ou se ele não estiver com infecção, poderá ser necessário repetir o exame e nesse caso a Sra será avisada e convidada para uma consulta. Também solicitaremos que a Sra responda a um questionário e nos doe um pouco de sua urina e de seu leite para fazermos exames para a pesquisa e ver como está a defesa do seu corpo contra este vírus. Será fornecido auxílio-transporte para comparecer a essa consulta. Se o seu filho não tiver infecção e vocês forem convidados a vir ao hospital, será necessário vir ao hospital uma única vez.

Também, para fazer exames que mostrarão se você teve a infecção por este vírus antes ou durante a sua gravidez, será aproveitado um pouco do sangue que você colheu durante a gravidez nos postos de saúde ou nesse hospital (se você tiver feito pré-natal) e o que sobrou do sangue que você colheu no dia que internou nesse hospital para dar a luz e que estavam guardados no Laboratório.

Se o seu filho estiver com esta infecção e se você concordar, ele será acompanhado nesse hospital e serão feitos exames para saber se ele tem alguma consequência da infecção e para planejarmos o tratamento. Nesse caso, nas duas primeiras consultas de retorno, solicitaremos que você colha um pouco de sua urina e de seu leite, se estiver amamentando.

A coleta destes exames não irá atrapalhar ou atrasar os cuidados que seu filho precisa ou mesmo a sua alta do Hospital, que serão feitos normalmente.

A participação nesse estudo não lhe trará nenhum gasto. Não haverá nenhuma despesa para você, além daquela de transporte para o retorno, que normalmente você teria que ter para trazer o seu filho para o acompanhamento.

O único desconforto esperado é o saquinho de plástico que ficará colado na pele da criança somente o tempo necessário para ele urinar e o tubinho de plástico que será colocado no canto da boca para colher um pouco de saliva. Não é esperado que o seu filho corra risco algum ao participar desta pesquisa.

Para você os únicos desconfortos será o de coleta de um pouco de urina e um pouco de seu leite, o que não causa nenhuma complicação.

O seu filho pode se beneficiar ao participar deste estudo, pois, se soubermos que ele tem infecção pelo citomegalovírus, podemos planejar o seu tratamento e acompanhamento. Não haverá nenhuma despesa para você com relação ao tratamento da criança. Este será realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

O resultado dessa pesquisa pode ajudar outras crianças nascidas com esta infecção. Mesmo que o seu filho não esteja infectado, a sua participação nesse estudo pode nos ajudar a compreender o porquê algumas crianças adquirem esse vírus e outras não e, assim, no futuro, poderemos tentar ajudar a prevenir a infecção em grande número de crianças, por meio do desenvolvimento de vacinas contra este vírus. Seu nome e o nome de seu filho nunca serão identificados.

**Página 3 de 3**

Como foi descrito acima, não há riscos importantes em participar deste estudo, tanto para você como para o seu filho. Caso você ou seu filho sofram algum tipo de lesão como resultado deste estudo, o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo dará a ele o tratamento necessário e imediato. Este estudo não modificará o tratamento de rotina que o seu médico fornecerá a você e seu filho, nas questões relacionadas à sua saúde e a de seu filho.

A sua participação é voluntária, o tratamento e todos os cuidados de seu filho estarão garantidos em qualquer tempo, mesmo que você não concorde em participar. Você pode desistir de participar dessa pesquisa em qualquer momento.

Não há nenhum programa de compensação monetária por meio desta Instituição, mas você e seu filho não estarão renunciando a nenhum direito legal ao assinar este formulário de consentimento.

**ASSINATURAS**

Se tiver lido o consentimento livre e esclarecido (ou se ele tiver sido explicado para você) e tiver entendido a informação, e concorda voluntariamente em permitir que seu filho recém-nascido participe deste estudo, por favor assine abaixo:

_____	_____	Data
Nome do voluntário	Assinatura do voluntário	
(datilografado ou em letra de fôrma)		

_____	_____	Data
Nome da testemunha	Assinatura da testemunha	
Datilografado ou em letra de forma		

Eu expliquei o motivo deste estudo à voluntária. Estou certo de que ela entendeu o propósito, os procedimentos, riscos e benefícios deste estudo.

**Nome do pesquisador :** Aparecida Yulie Yamamoto

Assinatura \_\_\_\_\_ Data:

**Telefone de contato:** 602-2674

## ***APÊNDICES***

---

## APÊNDICES

### **APÊNDICE A – Questionário utilizado para obtenção de informações referentes aos caracteres sociodemográficos.**

Data da entrevista

Idade do paciente em meses no momento da entrevista

Seu filho frequenta creche e/ou escolinha? Sim/não

Qual a idade dele no momento que ele iniciou o convívio na creche?

Onde permanece a maior parte do dia?

Quando não está na escola, onde permanece?

Com que frequência vai à creche e/ou escolinha?

Quanto tempo permanece lá? Em horas.

Quantas crianças ficam na mesma sala que seu filho?

Quantas são menores de dois anos? E maiores de dois anos?

Quantas pessoas “cuidam” de seu filho enquanto está na creche e/ou escolinha?

Local onde a criança permanece nos demais dias da semana?

Número de pessoas que conviviam juntas, na mesma casa ao nascimento? E atualmente?

Quantas eram/são crianças? Quantas menores de dois anos? E maiores de dois anos?

Ordem cronológica do parto?

Por quanto tempo você amamentou seu filho? Exclusivo? Misto?

Seu filho usa/já usou chupeta? Quando começou? Se não usa mais, quando parou?

Seu filho usa/já usou mamadeira? Quando começou? Se não usa mais, quando parou?

Procedência no parto? Atual?

Você trabalhava quando seu filho nasceu? O que fazia? Tinha contato com crianças? De que idade?

Hoje você trabalha? O que faz? Tem contato com crianças? De que idade?

Seu filho já recebeu transfusão de sangue?

Seu filho escova os dentes? Com que frequência?

Seu filho já ficou internado alguma vez? Qual o motivo? Quando?

**APÊNDICE B - Dados referentes às 85 crianças que compõem esta casuística.**

<b>Nº RN</b>	<b>Sexo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Idade Gestacional (semanas) – Capurro Somático</b>	<b>Idade gestacional do parto</b>	<b>Crescimento intra-uterino (CIU)</b>
59A	Masculino	1775	33	Pré-termo	AIG
164A	Masculino	2670	38	Termo	AIG
183A	Masculino	2665	37	Termo	AIG
292A	Feminino	1925	36	Pré-termo	PIG
511A	Masculino	2620	39	Termo	PIG
513A	Masculino	2870	36	Pré-termo	AIG
533A	Masculino	2935	40	Termo	AIG
853A	Masculino	1330	32	Pré-termo	AIG
956B	Masculino	3005	40	Termo	AIG
1016A	Feminino	1220	36	Pré-termo	PIG
1063A	Feminino	2630	38	Termo	AIG
1150A	Feminino	2490	36	Pré-termo	AIG
1150B	Feminino	1970	36	Pré-termo	PIG
1175A	Feminino	2955	38	Termo	AIG
1195B	Feminino	2685	39	Termo	AIG
1254A	Masculino	1165	33	Pré-termo	PIG
1380A	Feminino	3850	41	Termo	AIG
1468A	Masculino	2690	39	Termo	AIG
1587A	Masculino	3120	39	Termo	AIG
1727A	Masculino	2970	37	Termo	AIG
1749A	Feminino	3020	41	Termo	AIG
1951A	Masculino	2490	40	Termo	PIG
2205A	Masculino	1485	32	Pré-termo	AIG
2226A	Masculino	4270	39	Termo	GIG
2244A	Masculino	2625	39	Termo	PIG
2292A	Masculino	3080	40	Termo	AIG
2367A	Masculino	2650	41	Termo	PIG
2467A	Feminino	3125	39	Termo	AIG
2519A	Masculino	2990	41	Termo	AIG
2593A	Masculino	3465	40	Termo	AIG
2761A	Masculino	1760	35	Pré-termo	PIG
2775A	Masculino	1045	30	Pré-termo	PIG
M74A	Masculino	3210	39	Termo	AIG
M339A	Masculino	2605	38	Termo	AIG

<b>Nº RN</b>	<b>Sexo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Idade Gestacional (semanas) – Capurro Somático</b>	<b>Idade gestacional do parto</b>	<b>Crescimento intra-uterino (CIU)</b>
M457A	Masculino	2825	37	Termo	AIG
M680A	Masculino	3010	38	Termo	AIG
M781A	Feminino	3120	40	Termo	AIG
M798A	Masculino	3110	38	Termo	AIG
M804A	Feminino	1670	38	Termo	PIG
M1039A	Feminino	4645	39	Termo	GIG
M1106A	Feminino	2805	41	Termo	AIG
M1271A	Masculino	2495	39	Termo	PIG
M1467A	Feminino	3540	40	Termo	AIG
M1562A	Feminino	3180	39	Termo	AIG
60A	Masculino	2770	38	Termo	AIG
110A	Masculino	3510	40	Termo	AIG
558A	Feminino	1075	28	Pré-termo	AIG
656A	Feminino	1680	38	Termo	PIG
806A	Masculino	2890	38	Termo	AIG
908A	Masculino	3110	39	Termo	AIG
947A	Masculino	2700	36	Pré-termo	AIG
1006A	Feminino	2830	38	Termo	AIG
1012A	Masculino	1900	41	Termo	PIG
1089A	Feminino	3660	40	Termo	AIG
1152A	Feminino	2535	38	Termo	PIG
1253A	Masculino	2550	37	Termo	AIG
1254A	Masculino	1715	34	Pré-termo	AIG
1254B	Masculino	1825	34	Pré-termo	AIG
1588A	Feminino	2655	39	Termo	AIG
1615A	Feminino	2450	35	Pré-termo	AIG
1636A	Masculino	2935	39	Termo	AIG
1637A	Feminino	3020	39	Termo	AIG
1662A	Masculino	3100	35	Pré-termo	AIG
1672A	Masculino	2290	39	Termo	PIG
1689A	Feminino	3500	40	Termo	AIG
1899A	Masculino	2640	37	Termo	AIG
2235A	Feminino	2610	38	Termo	AIG
2336A	Masculino	2405	36	Pré-termo	PIG
2475A	Feminino	2425	36	Pré-termo	AIG

<b>Nº RN</b>	<b>Sexo</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Idade Gestacional (semanas) – Capurro Somático</b>	<b>Idade gestacional do parto</b>	<b>Crescimento intra-uterino (CIU)</b>
2631A	Feminino	3820	38	Termo	AIG
2848A	Masculino	2880	39	Termo	AIG
2858A	Masculino	3600	41	Termo	AIG
3030A	Masculino	1795	36	Pré-termo	AIG
3424A	Masculino	3660	39	Termo	AIG
3647A	Feminino	2340	37	Termo	PIG
3655A	Feminino	2850	37	Termo	AIG
3746A	Feminino	2000	35	Pré-termo	AIG
3808A	Masculino	3020	43	Termo	AIG
3893A	Feminino	2985	37	Termo	AIG
3918A	Feminino	2000	37	Termo	PIG
3954A	Feminino	3980	39	Termo	AIG
4014A	Masculino	3065	37	Termo	AIG
4056A	Masculino	3370	39	Termo	AIG
4088A	Masculino	1090	31	Pré-termo	PIG
4140A	Masculino	2110	36	Pré-termo	PIG

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)