



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

TAYLON FELIPE SILVA

**AVALIAÇÃO DA REATIVAÇÃO DO CITOMEGALOVÍRUS EM
PACIENTES COM SEPSE**

Londrina
2018

TAYLON FELIPE SILVA

**AVALIAÇÃO DA REATIVAÇÃO DO CITOMEGALOVÍRUS EM
PACIENTES COM SEPSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ivete Conchon-Costa

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

S586a Silva, Taylon Felipe.
Avaliação da reativação do citomegalovírus em pacientes com sepse / Taylon Felipe Silva. - Londrina, 2018.
66 f. : il.

Orientador: Ivete Conchon-Costa.
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2018.
Inclui bibliografia.

1. Citomegalovirus - Reativação - Tese. 2. Sepse - Tese. 3. Disfunção orgânica - Tese. 4. Marcadores imunológicos - Tese. I. Conchon-Costa, Ivete. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616

TAYLON FELIPE SILVA

**AVALIAÇÃO DA REATIVAÇÃO DO CITOMEGALOVÍRUS EM
PACIENTES COM SEPSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ivete Conchon-Costa
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Andréa Name Colado Simão
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Eliandro Reis Tavares
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 17 de outubro de 2018.

Dedico este trabalho a minha mãe, por
ser meu alicerce

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual de Londrina, por proporcionar um ambiente do saber e um espaço acolhedor para evolução do ser humano.

Ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental, pela qualidade de ensino.

A minha amada Mãe, Fátima, por sempre me apoiar em tudo e ser a base sólida da minha vida.

A minha querida orientadora Prof^a Dr^a Ivete Conchon-Costa, por me acolher, me entender e me guiar neste árduo caminho.

Ao Diego, por todo amor, apoio e compreensão.

Aos companheiros de laboratório, pelas confidências e amizades.

Aos meus amigos Bruno e Ricardo, pelas primorosas conversas advindas de nossas perturbadas mentes e pela amizade que mesmo ao longe permanece a mesma.

Aos professores Dr. Wander Pavanelli, Dr^a. Idessânia Nazareth, Dr^a. Milena Menegazzo, Dr^a Zuleica Naomi Tano e Dr^a Cintia Magalhães Carvalho Grion, Dr^a Lucy Megumi Yamauchi Lioni e a todos os docentes do Programa e aos que contribuíram à este trabalho de alguma maneira, por serem fontes do saber e proporcionar a mim uma formação de qualidade.

Ao CNPq, CAPES e Fundação Araucária, por acreditar na ciência e fazê-la acontecer.

Ao Laboratório de Imunopatologia das Doenças Negligenciadas e Câncer, pela oportunidade.

A Banca, Dr^a Ivete Conchon-Costa, Dr^a Andréa Name Colado Simão e Dr Eliandro Reis Tavares, por proporcionarem o crescimento deste trabalho.

A mim mesmo, por que não, pelo esforço e luta contínua.

Fico na esperança de não ter esquecido ninguém. Entretanto, antecipo o pedido de perdão para o caso de lapsos de memória, e mesmo que a lista fosse infundável não contemplaria a todos que sou grato.

“E agora — agora só me resta acender um cigarro e ir para casa.

Meu Deus, só agora me lembrei que a gente morre.

Mas — mas eu também?!

Não esquecer que por enquanto é tempo de morangos.

Sim.”

Clarice Lispector

SILVA, Taylon Felipe. **Avaliação da reativação do citomegalovírus em pacientes com sepse**. 2018. 66 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

A sepse é uma síndrome patológica com anormalidades bioquímicas induzida por infecção. É definida como uma disfunção orgânica com ameaça iminente a vida desencadeada por uma resposta do hospedeiro desregulada frente a uma infecção. É caracterizada por uma resposta heterogênea do hospedeiro frente a um patógeno, amplificada por diversos fatores endógenos que ativam precocemente respostas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias de forma compensatória. O Citomegalovírus Humano (CMV) ou Betaherpesvirus Humano tipo 5, pode ser transmitido por diversas secreções corporais. A infecção pelo CMV acomete 0,5 a 1,0% de todos os recém-nascidos e a soroprevalência em algumas regiões desenvolvidas, como França e Alemanha, variam de 40 a 60%, enquanto as populações em desenvolvimento podem variar de 80 a 100%. A reativação do CMV tem sido amplamente associada à sepse bacteriana, e provavelmente resulta do processo inflamatório característico desse quadro. A reativação ocorre em aproximadamente 30% dos indivíduos com sepse sem imunossupressão. Está associada com uma maior permanência de pacientes nas UTIs, prolongamento da necessidade de ventilação mecânica e aumento de mais de 80% da taxa de mortalidade. Além disso, a reativação de CMV em pacientes com quadro de sepse já foi descrita como sendo fator de pior prognóstico clínico, com aumento significativo de morbimortalidade, estando diretamente associado com disfunção orgânica severa e desequilíbrio hemodinâmico. Os objetivos deste trabalho foram identificar quais fatores imunobiológicos e clínicos relacionados a reativação do citomegalovírus que poderiam estar envolvidos na disfunção orgânica presente na sepse e sua relação com o prognóstico e desfecho clínico destes pacientes. Este é um estudo de coorte prospectivo observacional realizado no Hospital Universitário de Londrina, Paraná, Brasil (HU-UEL) entre maio e outubro de 2017, que avalia a reativação do CMV em pacientes diagnosticados com sepse. Os pacientes diagnosticados com sepse a no máximo sete dias e que eram sorologicamente positivos para IgG anti-CMV foram incluídos para participarem do estudo. No período do estudo 168 pacientes foram diagnosticados com sepse e avaliados quanto aos critérios de inclusão e exclusão, 56 fizeram parte deste estudo e destes 10 (17,58%) apresentavam carga viral condizente com o processo de reativação do CMV. Verificamos aumento nos níveis plasmáticos de óxido nítrico e interleucina 10 ($p < 0,001$) no grupo reativado. Houve ainda aumento significativo de creatinina sérica e redução do débito urinário de 24 horas correlacionados com IL-10 e carga viral do CMV, demonstrando uma associação entre o processo de reativação e insuficiência renal presente na sepse. O grupo reativado ainda apresentou 2,1 vezes mais risco de desenvolver choque séptico e até 2,5 vezes mais risco em 28 dias de mortalidade. A reativação do CMV pode aumentar as taxas de mortalidade entre pacientes com sepse e nossos dados sugerem que IL-10 e NO possam estar envolvidos neste processo.

Palavras-chave: Citomegalovirus. Reativação. Sepse. Disfunção orgânica. Marcadores imunológicos.

SILVA, Taylon Felipe. **Evaluation of cytomegalovirus reactivation in sepsis patient**. 2018. 66 p. Dissertation (Master's degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Sepsis is a pathological syndrome with biochemical abnormalities induced by infection. It is defined as an organic dysfunction with imminent threat to life triggered by a dysregulated host response to an infection. It is characterized by a heterogeneous host response to a pathogen, amplified by several endogenous factors that pre-activate pro-inflammatory and anti-inflammatory responses in a compensatory manner. Human Cytomegalovirus (CMV) or Human Betaherpesvirus type 5 can be transmitted by various bodily secretions. CMV infection affects 0.5 to 1.0% of all newborns and seroprevalence in some developed regions, such as France and Germany, range from 40 to 60%, while developing populations can range from 80 to 100%. CMV reactivation has been widely associated with bacterial sepsis, and probably results from the inflammatory process characteristic of this condition. Reactivation occurs in approximately 30% of individuals with sepsis without immunosuppression. It is associated with a longer stay in ICU patients, prolongation of the need for mechanical ventilation and an increase of more than 80% in the mortality rate. In addition, CMV reactivation in patients with sepsis has been described as a factor of worse clinical prognosis, with a significant increase in morbidity and mortality, being directly associated with severe organ dysfunction and hemodynamic imbalance. This work aims to identify which immunobiological and clinical factors related to the reactivation of cytomegalovirus that could be involved in the organic dysfunction present in sepsis and its relation with the prognosis and clinical outcome of these patients. This is a prospective observational cohort study conducted at the University Hospital of Londrina, Paraná, Brazil (HU-UEL) between May and October 2017, which evaluates the reactivation of CMV in patients diagnosed with sepsis. Patients diagnosed with sepsis no longer than 7 days and who were serologically positive for anti-CMV IgG were included to participate in the study. In the study period 168 patients were diagnosed with sepsis and evaluated for inclusion and exclusion criteria, 56 were part of this study and 10 (17.58%) presented viral load consistent with the CMV reactivation process. We observed an increase in plasma levels of nitric oxide and interleukin 10 ($p < 0.001$) in the reactivated group. There was also a significant increase in serum creatinine and reduction of 24-hour urine output correlated with IL-10 and CMV viral load, demonstrating an association between the reactivation process and renal insufficiency present in sepsis. The reactivated group still had 2.1 times the risk of developing septic shock and up to 2.5 times the risk in 28 days of mortality. CMV reactivation may increase mortality rates among sepsis patients and our data suggest that IL-10 and NO may be involved in this process.

Key words: Cytomegalovirus. Reactivation. Sepsis. Organ dysfunction. Immunological mediators.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais vias patogênicas da sepse.....	14
Figura 2. Estrutura viral do CMV	17
Figura 3. Distribuição mundial da soroprevalência do CMV em indivíduos adultos saudáveis.....	21
Figura 4. Patogênese do CMV	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5LOX	5-lipoxigenase
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ALT	Alanina transaminase
AP-1	Proteína ativadora 1
APC	Célula apresentadora de antígeno
ASC	Proteína adaptadora
AST	Aspartato transaminase
CASP-1	Pró-caspase 1
CD	Cluster of differentiation
CMV	Citomegalovírus
COX2	Cicloxigenase
CRP	Proteína C-reativa
CTL	Linfócito T CD8+
CTLA-4	Proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos
DC	Célula dendrítica
eNOS	Oxido nítrico sintase endotelial
g	Glicoproteína
IFN	Interferon
I κ B α	Inhibitor of kappa B alpha
JNK	c-Jun N-terminal kinases
LPS	Lipopolissacarídeo
LTB4	Leucotrieno B4
MAPK	Mitogen activated protein kinases
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MIP-1 β	Proteína Inflamatória dos macrófagos tipo 1 beta
MyD88	Fator de diferenciação mielóide 88
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
NK	Célula natural killer
NLR	NOD-like receptor
PAM	Pressão arterial média
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PaO ₂ /FiO ₂	Índice de oxigenação

PCR	Reação em cadeia da polimerase
PD-1	Proteína de morte celular programada 1
PDGF- α	Fator de crescimento derivado de plaquetas alfa
PGE2	Prostaglandina E2
pp65	Fosfoproteína 65
PRR	Receptores de Reconhecimento de Padrões
RIG-I	RIG-like receptor
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SOFA	Sequential organ failure assessment
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
Th	Linfócito T helper
TLR	Toll-like receptor
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	Linfócitos T reguladores
UL	Unique long
US	Unique short
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VCAM-1	Molécula de adesão do endotélio vascular 1
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. A Sepsis	12
1.1.1. Resposta imune na sepsis	13
1.2. O Citomegalovírus	17
1.2.1. Epidemiologia do CMV	20
1.3. A reativação do CMV durante a sepsis	22
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
3. OBJETIVOS	36
3.1. Objetivo Geral.....	36
3.2. Objetivos Específicos	36
4. PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	37
4.1. Artigo: Reactivation of cytomegalovirus in patients with sepsis: relationship between immunological mediators and clinical manifestations	38
5. CONCLUSÃO	61
6. ANEXOS	62
6.1. Anexo 1. Sequential organ failure assessment (SOFA).....	62
6.2. Anexo 2. Parecer do CEP-UEL	63

1. INTRODUÇÃO

1.1. A Sepses

A sepsis é uma síndrome patológica com anormalidades bioquímicas induzida por infecção. É definida como uma disfunção orgânica com ameaça iminente a vida, desencadeada por uma resposta desregulada do hospedeiro frente a uma infecção. Permanece como um dos maiores problemas de saúde pública do mundo e sua incidência tem crescido ao longo dos anos. Só nos Estados Unidos, no ano de 2011, a sepsis representou um gasto de mais de US\$ 20 bilhões de dólares, cerca de 5,2% do total de gastos hospitalares do país no ano (SINGER et al., 2016).

Um estudo multicêntrico realizado no Brasil no ano de 2013, com 21 unidades de terapia intensiva (UTIs) de todo o país, avaliou que o custo diário de um paciente com sepsis pode chegar a mais de 2 mil reais (CONDE et al., 2013). As taxas de incidência de sepsis no Brasil podem chegar 36,3 casos por 1000 pacientes-dia, resultando em uma estimativa de mais de 200 mil mortes em pacientes adultos por ano (MACHADO et al., 2017).

A sepsis é caracterizada por uma resposta heterogênea do hospedeiro frente a um patógeno, amplificada por diversos fatores endógenos que ativam precocemente respostas pró e anti-inflamatórias compensatórias, com alterações em diversos processos fisiológicos, como o funcionamento dos sistemas cardiovascular, neurológico, endócrino, metabólico e de coagulação. Essa ampla gama de alterações definem a significância biológica e heterogeneidade clínica dos indivíduos afetados (SINGER et al., 2016).

Em 2016, foi deliberado o terceiro consenso internacional para definição de sepsis e choque séptico bem como seus critérios de identificação, SOFA (do inglês: *score sequential organ failure assessment*), como a melhor estratégia para diagnóstico e manejo do paciente séptico. O SOFA avalia diversos parâmetros clínicos e bioquímicos, como respiração, através do índice de oxigenação (PaO_2/FiO_2); coagulação, pelos níveis de plaquetas; fígado, através da bilirrubina sérica; sistema cardiovascular, pela pressão arterial média (PAM), e utilização de drogas vasoativas como dopamina, epinefrina e norepinefrina; sistema nervoso central, pela escala de coma de Glasgow; e função renal, pela

avaliação dos níveis de creatinina e débito urinário. Nesta diretriz, todos critérios são dispostos em um esquema de pontuação de 0 a 4 para cada variável, sendo 0 a pontuação para funções orgânicas que permanecem inalteradas ou em perfeita homeostasia, e 4 o critério de maior gravidade. Considera-se portanto como sepse, qualquer paciente que apresente infecção confirmada ou suspeita e uma pontuação no SOFA ≥ 2 (SINGER et al., 2016) (**Anexo 1**).

O choque séptico é definido como um subtipo de sepse com anormalidades circulatórias e metabólicas suficientes para aumentar consideravelmente a taxa de mortalidade, podendo ser identificada clinicamente com hipotensão severa, que necessita da utilização de vasopressores para manter a PAM ≥ 65 mmHg e apresentar lactato sérico superior a 2 mmol/L, mesmo após ressuscitação volêmica (SINGER et al., 2016).

1.1.1. Resposta imune na sepse

A resposta imune inata é a primeira linha de defesa do organismo contra diferentes tipos de infecções, sejam elas bacterianas, fúngicas ou virais, e é mediada por diferentes tipos celulares, como mastócitos, eosinófilos, basófilos e principalmente linhagens fagocíticas (macrófagos, neutrófilos e células dendríticas) (CRUZ-ADALIA; VEIGA, 2016; HOUSCHYAR et al., 2018).

Durante infecções, células do sistema imune, como macrófagos e neutrófilos, reconhecem estruturas presente em microrganismos, chamadas de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), por meio de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), ativando a resposta imune (HOUSCHYAR et al., 2018; MOGENSEN, 2009). Dentre os receptores, têm-se os *RIG-like receptors 1* (RIG-I), que reconhecem RNA citoplasmático e peptidoglicanos de células bacterianas, e os TLRs, os quais reconhecem lipídios e ácidos nucleicos (MOGENSEN, 2009; TANG et al., 2012). A partir da ativação desses receptores, ocorre o recrutamento de várias proteínas intracelulares que desencadeiam a ativação das vias JNK (do inglês: *c-Jun N-terminal kinases*), MAPK (do inglês: *Mitogen Activated Protein Kinases*) e dos fatores de transcrição proteína ativadora 1 (AP-1) e fator nuclear kappa B (NF- κ B), levando à produção de mediadores pró-inflamatórios, afim de controlar a infecção (REDONDO et al., 2014).

A ativação de TLRs por produtos microbianos induz a liberação de TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 e outros mediadores inflamatórios como EROS. Prostaglandinas e fatores de ativação plaquetária, além disso, a ativação endotelial resulta no aumento da expressão de moléculas de adesão estabelecendo um estado geral pró-coagulatório. No mesmo sentido, a ativação de células endoteliais resulta em trombose, vasodilatação e aumento na permeabilidade vascular. O estado pró-inflamatório na sepse ainda pode ativar mecanismos imunossupressores de contraregulação, com mudança no fenótipo de células T, liberação de citocinas e intensa apoptose leucocitária (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2015) (**Figura 1**).

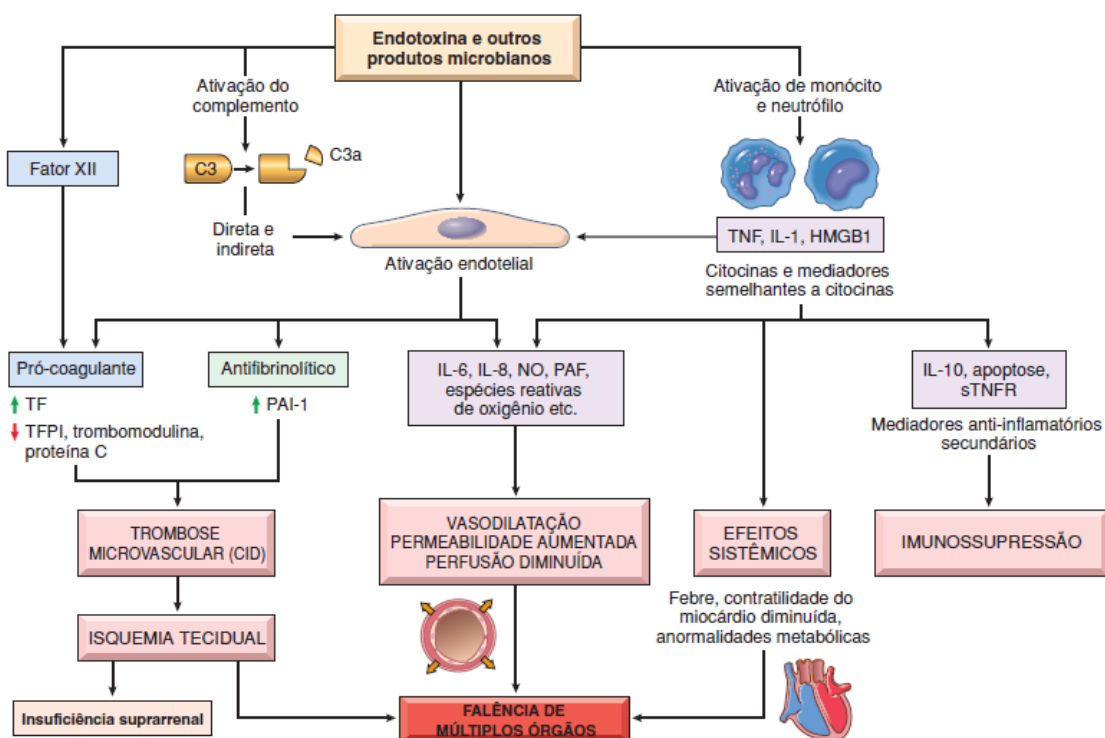


Figura 1. Principais vias patogênicas da sepse. Os produtos microbianos podem ativas células endoteliais e do sistema imune inato iniciando uma cascata de eventos que desencadeiam em manifestações clínicas características da sepse como hipotensão, alteração nos fatores de coagulação e dissonância imunológica (adaptado de: KUMAR; ABBAS; ASTER, 2015).

A presença de infecções descontroladas no organismo e uma resposta inflamatória exacerbada não regulada pelo balanço pró e anti-inflamatório, resulta no quadro clínico da sepse. O desenvolvimento da sepse depende das relações estabelecidas entre o microrganismo e o hospedeiro, destacando-se que muitos dos elementos relativos ao desencadeamento desta entidade nosológica permanecem obscuros, provavelmente pela falta de uma

compreensão mais adequada das interseções entre imunidade, inflamação e coagulação (SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011).

No desenvolvimento da sepse, a inflamação é iniciada em resposta à infecção. Assim, o infiltrado inflamatório de neutrófilos presentes no local da infecção, normalmente é eficaz, pois elimina micro-organismos, no entanto, sua presença constante e desregulada resulta em danos teciduais severos (HEALY et al., 2018; KUMAR, 2018).

Os macrófagos, além do papel fundamental na fagocitose de microrganismos, têm ainda função imunorreguladora, atuando no processo inflamatório. Com isso, a sua ativação desregulada durante a sepse pode afetar diretamente a homeostase imunológica (KUMAR, 2018). Macrófagos são ativados durante a sepse principalmente por IFN- γ (DELANO et al., 2007), e secretam grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6, IL-1 β e espécies reativas de oxigênio (EROS). Esta resposta pode acarretar, posteriormente, no estabelecimento do choque séptico e à lesão e/ou falência de múltiplos órgãos (VANONI et al., 2017; ZHENG et al., 2018).

Com a ativação de genes pró-inflamatórios, as diversas citocinas que participam da sepse são cada vez mais produzidas em resposta à inflamação em um curto período de tempo (CHOUSTERMAN; SWIRSKI; WEBER, 2017; SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011), promovendo assim, a chamada “tempestade de citocinas” (DELANO et al., 2007; ISKANDER et al., 2013).

Neste fenômeno, destacam-se algumas citocinas, como a IL-6, que é uma interleucina pleiotrópica, que promove o aumento de proteínas inflamatórias, como a proteína C-reativa (CRP) (CHOUSTERMAN; SWIRSKI; WEBER, 2017; TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014). A presença persistente e recorrente da IL-6 na sepse, cria um ambiente favorável para o desenvolvimento de distúrbios metabólicos como hiperglicemia, hipertensão, dislipidemia. Já IL-1 β e TNF- α , são citocinas liberadas por macrófagos ativados e atuam como mediadores dos processos inflamatórios (CHOUSTERMAN; SWIRSKI; WEBER, 2017; ISKANDER et al., 2013; JING et al., 2014; KUDLOW et al., 2013). O aumento destas citocinas resulta em dano tecidual e comprometimento celular, visto que induzem à vasodilatação, edema, *burst* respiratório, além de facilitar a adesão e migração de leucócitos (ZELOVÁ; HOŠEK, 2013). Em adição, níveis elevados destes mediadores estão

relacionados à falência de diversos órgãos no indivíduo com sepse (RITTIRSCH; FLIERL; WARD, 2008; XU et al., 2018).

Após liberação de mediadores pró-inflamatórios, o ácido araquidônico é metabolizado para formar as prostaglandinas, principalmente a E2 (PGE2), a qual está estritamente relacionada com todos os processos que levam aos sinais clássicos da inflamação (dor, calor, rubor, tumor e perda de função) (BONE, 1991; CHENG et al., 2018; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011; SREERAMKUMAR; FRESNO; CUESTA, 2012). As prostaglandinas são potentes ácidos graxos vasoativos distribuídos no organismo e atuam nas respostas inflamatórias, assim como IL-1 β e TNF- α . Em pacientes com infecções severas ou choque séptico, os níveis de prostaglandinas encontram-se elevados, amplificando ainda mais o processo inflamatório, acarretando em desequilíbrio hemodinâmico e consequente choque séptico (RITTIRSCH; FLIERL; WARD, 2008).

As DCs são células apresentadoras de antígenos (APCs) com capacidade de processar e apresentar epítopos aos linfócitos T e B a partir de agentes invasores fagocitados. Segundo Strother e colaboradores (2016), pacientes com sepse tem redução do número de DCs no sangue e extinção total no baço, além disso, as DCs que permanecem, apresentam redução na capacidade de produção de citocinas pró-inflamatórias.

As células NK, por sua vez, atuam como reguladoras de funções imunológicas complexas. Durante a sepse, NKs, induzem a inflamação exacerbada, devido à rápida resposta, com produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ . IFN- γ , por sua vez, leva à ativação de células mielóides, como os macrófagos, facilitando assim, a resposta inflamatória local e consequentemente a sistêmica, e desta forma contribui para o agravamento do quadro séptico (DE GRACIA-GUINDO et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2017; SOUZA-FONSECA-GUIMARAES et al., 2017)

A continuidade do padrão de resposta pró-inflamatória de forma exacerbada gera uma reposta compensatória anti-inflamatória e polarização imune parcial para fenótipo T helper (Th) 2, com intensa liberação de IL-4 e IL-10. Quando o equilíbrio não é alcançado, surge um estado de dissonância e anergismo imunológico e isso está estritamente relacionado com pior desfecho clínico (KALIL; FLORESCU, 2011; SINISTRO et al., 2008).

Desta forma, a imunopatogênese da sepse é um processo complexo que envolve tanto a superativação, quanto a supressão da resposta imune. Durante a imunossupressão, ocorre o comprometimento dos sistemas imune inato e adaptativo, com redução das citocinas pró-inflamatórias e aumento das regulatórias, como IL-10, a qual suprime a produção de IFN- γ e estimula a produção de receptor inibidor de TNF, favorecendo assim, à persistência do microrganismo e o desenvolvimento de complicações infecciosas (PATIL et al., 2017; SHIN; JIN, 2017).

1.2. O Citomegalovírus

O Citomegalovírus Humano (CMV) ou Betaherpesvirus Humano tipo 5, é membro da família *Herpesviridae*, subfamília *Betaherpesvirinae* (KING et al., 2012). É um DNA-vírus de fita dupla, com um genoma de ~235 kpb, encapsulado em um capsídeo icosaédrico, envolvido em uma matriz proteica amorfa, denominada de tegumento, sob uma bicamada lipídica crivada de glicoproteínas (CROUGH; KHANNA, 2009). Dentro desta mesma família encontram-se outros vírus amplamente conhecidos, como Varicela-Zoster, Epstein-Barr Vírus, Herpes Vírus Simples tipos 1 e 2 (KING et al., 2012) (**Figura 2**).

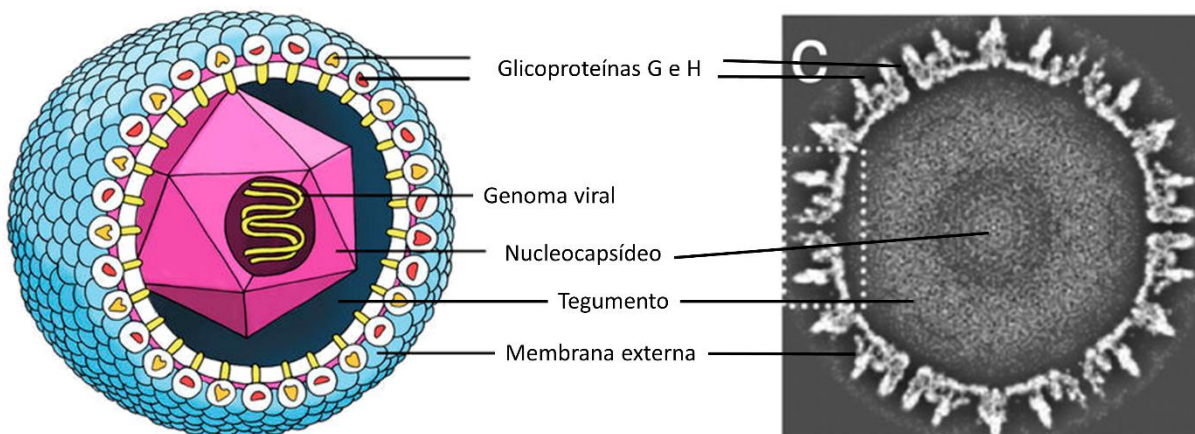


Figura 2. Estrutura viral do CMV. Comparação entre um vírus esquemático e a imagem de criomicroscopia eletrônica do vírus. (Adaptado de: THE UNIVERSITY OF CHICAGO, 2018; YU et al., 2005).

Alocadas no tegumento, estão a maioria das proteínas virais, como aquelas envolvidas em processos do ciclo replicativo viral e moduladoras do

sistema imune. O tegumento ainda acolhe moléculas de RNA celular e viral (CROUGH; KHANNA, 2009).

As proteínas presentes no tegumento podem ser separadas de maneira geral em dois grandes grupos: as que desempenha papel estrutural e aquelas que modulam a resposta celular do hospedeiro frente a infecção. Já na bicamada lipídica estão presentes pelo menos 20 glicoproteínas virais que exercem papel importante na ancoragem e adsorção viral na célula hospedeira, como glicoproteína B (gB), gH, gL, gM, gN e gO. Uma infecção eficiente é o resultado de uma síntese proteica coordenada que é dividida em três estágios: (1) início imediato, até 2 horas após a infecção; (2) início tardio, até 24 horas após a infecção, e (3) tardio, 24 horas após infecção (CROUGH; KHANNA, 2009).

O CMV é capaz de entrar na célula alvo através de fusão direta ou por endocitose. No processo de fusão direta, os vírus se ligam a célula pela interação entre as glicoproteínas gB e gH e receptores específicos, como fator de crescimento derivado de plaquetas alfa (PDGF- α), que desencadeia a fusão do envelope viral com a membrana citoplasmática, liberando o capsídeo no citosol. O capsídeo, por sua vez, é então transportado para o núcleo, liberando o DNA viral. Ao mesmo tempo, proteínas do tegumento são direcionadas para diferentes localizações subcelulares, interferindo nas etapas iniciais da resposta imune, regulando a expressão gênica pela ativação de fatores de transcrição e modulando vias de sinalização e metabolismo. Inicia-se, então, a expressão de genes de início imediato, que promoverão a replicação genômica e a síntese proteica necessária para montagem de novas estirpes. As cópias de DNA viral são, então, encapsuladas e exportadas para o citoplasma, para montagem e exportação das novas partículas virais por exocitose (MALITO; CHANDRAMOULI; CARFI, 2018).

O CMV pode ser transmitido por diversas secreções corporais e fluidos, como saliva, contato sexual, transfusão sanguínea e transplante de órgãos sólidos ou medula óssea. A infecção primária em indivíduos imunocompetentes é geralmente assintomática, mas pode gerar um quadro semelhante à mononucleose. A partir disso, se estabelece um quadro de infecção latente que pode permanecer durante toda a vida ou sofrer reativação em determinadas situações, como na imunossupressão (CROUGH; KHANNA, 2009).

A reativação do CMV é um importante aspecto relacionado à sua patogênese. A imunossupressão, inflamação, infecção e estresse oxidativo são importantes fatores de risco e podem desencadear a reativação. O exato mecanismo necessário ainda não foi completamente elucidado, mas estudos sugerem o papel do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) como importante mediador desse processo (FORTE et al., 2018).

O sistema imune inato desempenha um importante papel defensivo contra CMV, o reconhecimento do vírus através de *toll-like receptors* (TLR), ativa a transdução de sinais que levam à secreção de citocinas pró-inflamatórias, que recrutam células do sistema inato e induzem a expressão de moléculas coestimulatórias, responsáveis pela mediação entre as respostas inatas e adaptativas. O TLR2 possui capacidade de reconhecer gB/gH e desencadear resposta inflamatória (MARQUES; FERREIRA; RIBEIRO, 2018). Além disso, TLR9 e TLR3 tem sido descritos como componentes críticos na defesa contra CMV, induzindo a produção de interferons do tipo alfa e beta (IFN α - β) por células dendríticas (DCs) e macrófagos, que recrutam e ativam células natural killers (NK), que, por sua vez, atuam na eliminação do vírus e resistência à infecção (GOODWIN; CIESLA; MUNGER, 2018).

O estabelecimento de uma resposta imune eficaz durante a infecção primária do CMV serve como importante controle de uma subsequente reativação, e prevenção de replicação viral descontrolada. O vírus atua como um potente desencadeador de imunidade humoral, sendo que o principal alvo dos anticorpos produzidos são as glicoproteínas de superfície como gH e gB. Apesar de não prevenir a infecção, esse tipo de resposta é capaz de amenizá-la, reduzindo a letalidade e morbidades associadas (VARANI; LANDINI, 2011).

O CMV induz a diferenciação de populações específicas de CD4⁺ e CD8⁺ durante a fase aguda da infecção que permanecem mesmo após a resolução da infecção primária. A população de células citotóxicas não declina normalmente, como ocorre em infecções por vírus influenza por exemplo, e a porcentagem destas células aumentam progressivamente com a idade. A proporção destas células no sangue periférico é consideravelmente grande, chegando a 10% para CD4⁺ e 70% para CD8⁺ em indivíduos soropositivos saudáveis. Linfócitos T CD8⁺ de memória apresentam alta expressão de receptores para IL-7 e IL-15 e são mantidas em taxas de proliferação

homeostática, no entanto células CD8⁺ de memória específicas para CMV não apresentam receptores de IL-7, sugerindo que a estimulação proliferativa nestas células ocorre de maneira independente de citocinas e isso pode ter relação com aumento persistente desta população de células efetoras (VIEIRA BRAGA et al., 2015).

Assim como outras viroses, incluindo a maioria dos herpesvírus, o CMV possui diversos mecanismos de evasão a resposta imune, visto que um dos principais meios é a inibição da apresentação de antígeno por meio do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I. Inicialmente, a atividade de linfócitos citotóxicos é direcionada a peptídeos antigênicos derivados dos transcritos da fase de início imediato, entretanto a fosfoproteína de matriz 65 (pp65), que possui atividade quinase, impede este reconhecimento. Além disso, o genoma viral codifica outras cinco proteínas, Unique Short (US) 2, US3, US6, US10 e US11, que bloqueiam a geração e exportação de MHC-I. US2 ainda pode marcar e encaminhar moléculas de MHC-II para degradação proteasomal, além de interferir na via de sinalização induzida por IFN- γ , bloqueando a síntese de MHC-II (CROUGH; KHANNA, 2009).

Na maioria das infecções virais, as células NK são capazes de reconhecer a redução da exposição de MHC-I, eliminando as células infectadas. No entanto, CMV é capaz de induzir a exposição de moléculas virais homólogas ao MHC-I, que agem como falsas proteínas, que são reconhecidas pelo receptor inibitório CD94/NKG2A de células NK, suprimindo a resposta citotóxica. O CMV ainda possui uma diversidade de outras proteínas virais homólogas às humanas que mimetizam a função original e desviam a resposta imune do hospedeiro (VIEIRA BRAGA et al., 2015).

1.2.1. Epidemiologia do CMV

A infecção pelo CMV acomete 0,5 a 1,0% de todos os recém-nascidos (EMERY; LAZZAROTTO, 2017) e a soroprevalência em algumas regiões desenvolvidas, como França e Alemanha, variam de 40 a 60%, enquanto as populações em desenvolvimento podem variar de 80 a 100% (ANTONA et al., 2017; BATES; BRANTSÆTER, 2016; LACHMANN et al., 2018; LI et al., 2017). Por outro lado, um estudo realizado na Suécia verificou uma prevalência sorológica de 82,3% em adultos saudáveis, assim, mesmo que a disseminação

viral seja um fator diretamente relacionado ao nível socioeconômico da população, a soroprevalência pode variar de forma independente (**Figura 3**) (OLSSON et al., 2017).

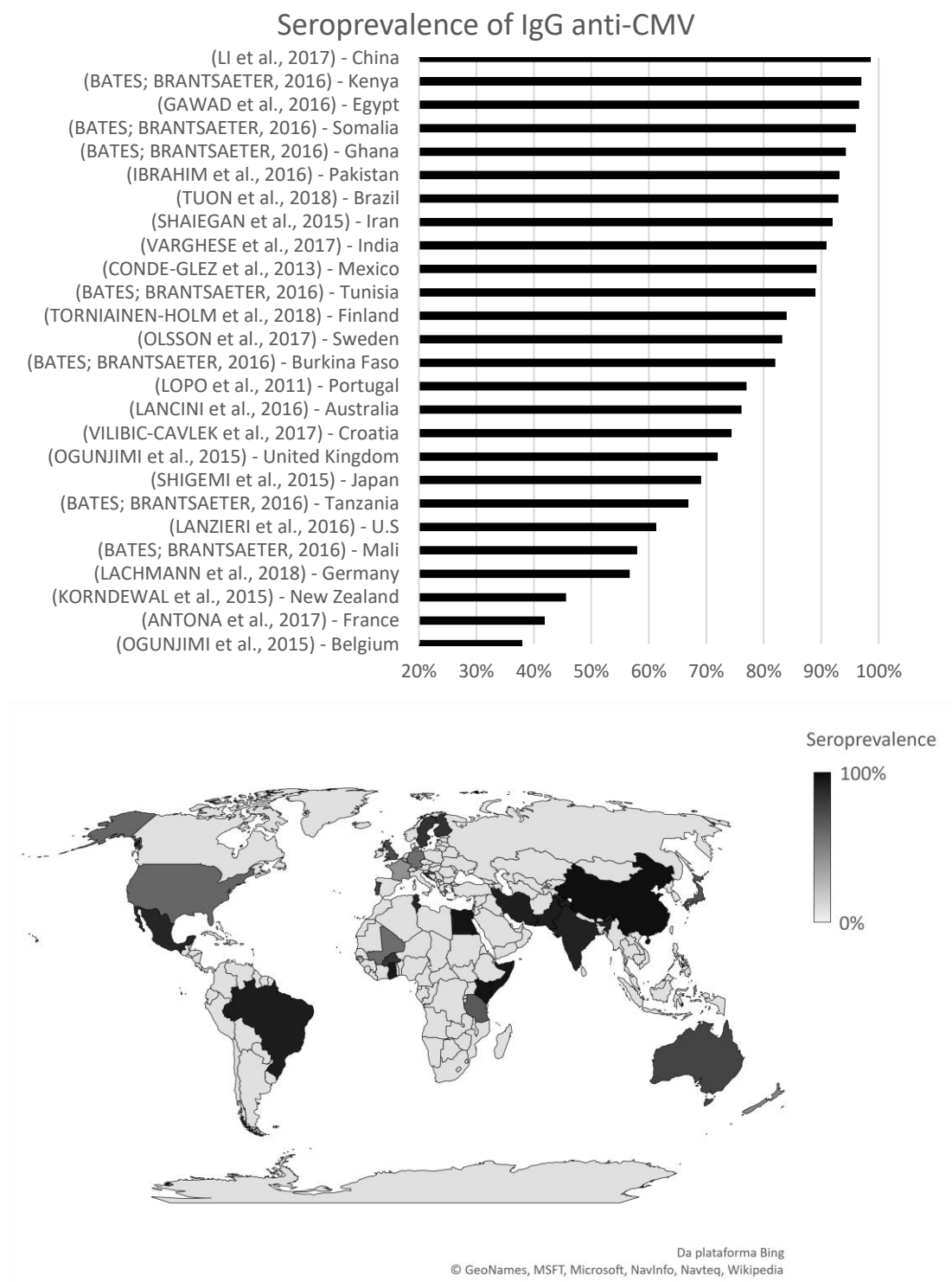


Figura 3. Incidência mundial do CMV. Distribuição da soroprevalência do CMV em indivíduos adultos saudáveis.

No Brasil, as taxas de indivíduos soropositivos para o CMV são altas desde os primeira infância, chegando a 89% entre adolescentes e 98% em pacientes adultos jovens. As taxas ainda podem variar de acordo com a região do país, variando de 94% nos estados do Paraná e Rio Grande do Norte a 100% no Ceará e Pará (TUON et al., 2018).

O CMV raramente causa complicações em indivíduos saudáveis, entretanto, em fetos, neonatos e pacientes imunossuprimidos pode desencadear diversas complicações clínicas, se tornando uma importante infecção oportunista. Indivíduos transplantados que recebem medicamentos imunossupressores ou portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) podem sofrer de graves complicações decorrentes da reativação, como carioretinite, enterocolite, gastrite, esofagite, hepatite, encefalite, pneumonia, leucopenia, nefrite, miocardite, pancreatite, entre outros. Aproximadamente 50% dos pacientes de transplante de órgãos sólidos demonstram evidências de infecção e cerca de 35% desenvolvem infecção sintomática e manifestações e complicações clínicas (DE GRACIA-GUINDO et al., 2018; SELVEY et al., 2017).

O CMV tem sido descrito também como uma infecção recorrente em pacientes imunocompetentes em estado crítico de saúde. As taxas de reativação do CMV neste contexto chegam a mais de 30%, com associação no aumento da mortalidade, necessidade de ventilação e aumento no tempo de permanência na UTI, quando comparados com pacientes sem reativação, entretanto como essa reativação contribui para aumento nas taxas de mortalidade permanecem pouco entendidas (LI et al., 2018).

1.3. A reativação do CMV durante a sepse

A reativação do CMV tem sido amplamente associada à sepse bacteriana, e provavelmente resulta do processo inflamatório característico desse quadro (MANSFIELD et al., 2015). A reativação ocorre em aproximadamente 25% dos indivíduos com sepse sem imunossupressão. Está associada com uma maior permanência de pacientes nas UTIs, prolongamento da necessidade de ventilação mecânica (OSAWA; SINGH, 2009) e aumento de mais de 80% da taxa de mortalidade (KALIL; FLORESCU, 2011).

Além disso, a reativação de CMV em pacientes com quadro de sepse já foi descrita como sendo fator de pior prognóstico clínico, com aumento significativo de morbimortalidade, estando diretamente associado com disfunção orgânica severa e desequilíbrio hemodinâmico (FRANTZESKAKI et al., 2015).

A imunomodulação desencadeada pela reativação é capaz de aumentar a disseminação bacteriana durante quadros de sepse (HRAIECH et al., 2017), os níveis de TNF- α e IL-1 β tendem a estar mais elevados na sepse na presença de reativação do CMV e diversos estudos têm demonstrado o papel central destas citocinas na reativação viral. Rauwel e colaboradores (2015) demonstraram que o aumento de fatores que ativam a translocação do NF- κ B para o núcleo e induzem a expressão de TNF- α , promovem a reativação do CMV. Além disso, o vírus ainda é capaz de estimular a expressão de TNF- α em macrófagos teciduais e monócitos, essa estimulação autócrina pode ser a fonte da ampla disseminação viral na sepse (ALMANAN et al., 2017).

De forma similar, a expressão de IL-1 β ativa vias de transcrição do NF- κ B, que por sua vez ativa a transcrição de genes pró-inflamatórios, o CMV possui regiões promotoras inseridas no genoma do hospedeiro que são facilmente reconhecidas e transcritas por essa via, levando a uma associação entre mediadores pró-inflamatórios dependentes de NF- κ B e o vírus (GOODWIN; CIESLA; MUNGER, 2018).

O CMV pode induzir a expressão de cicloxigenase 2 (COX2), e consequente PGE2, além de estimular 5-lipoxigenase (5LO), fundamental na síntese de leucotrieno B4 (LTB4), que age como potente quimioatrativo e atua na ativação da resposta inflamatória por células musculares lisas e fibroblastos. A indução da liberação de PGE2 durante a sepse, é capaz de estimular macrófagos, através da ativação dos receptores EP2 e EP4 a produzirem IL-10, uma importante citocina reguladora. Essa imunomodulação pode servir como forma de escape do vírus no sistema imunológico (VARANI; LANDINI, 2011).

A infecção de células endoteliais pelo CMV, promove uma disfunção celular através da regulação da expressão de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e IL-8, além disso, estimula a expressão de moléculas de adesão como E-selectina e da molécula de adesão do endotélio vascular 1 (VCAM-1), propiciando um estado pró-coagulatório no tecido endotelial, desta forma induzindo a aderência e agregação plaquetária. Como o vírus é capaz de

interagir diretamente e ativar plaquetas através da ligação via TLR-2, há indução da expressão de P-selectina rapidamente, formando agregados plaquetoleucocitários pela ligação com CD169 das células, o que induz a expressão de mediadores pró-angiogênicos, como fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), envolvido na proliferação celular e aumento da permeabilidade vascular. Entretanto, a interação plaquetas ativadas/leucócitos não induz eventos trombolíticos imediatos, mas intensificam a formação de aglomerados celulares, regulação neutrofílica e a angiogênese (ASSINGER et al., 2014; FRANTZESKAKI et al., 2015; HAYAKAWA, 2018) (**Figura 4**).

No mesmo sentido, o CMV pode se ligar as plaquetas via TLR2, desencadeando a liberação de CD40L, que induz a resposta inflamatória no endotélio, aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, liberação de quimiocinas atrativas, moléculas de adesão e fatores teciduais, além da produção de IL-1 β . Esta condição leva a um aumento sistêmico de agregados leucócitos-plaquetários, que pode culminar no desencadeamento do quadro de coagulação intravascular disseminada (CID), e conseqüente diminuição do nível de sobrevivência em pacientes sépticos (ASSINGER et al., 2014; HAYAKAWA, 2018).

Além disso, pacientes reativados possuem maiores níveis de alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST) e bilirrubina séricos. Como CMV também é hepatotrófico, a reativação pode estar relacionada com a disfunção hepática presente em pacientes graves (FRANTZESKAKI et al., 2015).

A reativação de CMV durante episódios de sepse ainda está associada com a diminuição da polifuncionalidade em linfócitos T CD8⁺ e aumento de expressão de proteínas de morte celular do tipo PD-1. O aumento na expressão destas proteínas foi correlacionado com a diminuição do número de células CD8⁺ polifuncionais e com o aumento da carga viral. A perda das características polifuncionais, como produção de INF- γ , TNF- α , proteína Inflamatória dos macrófagos tipo 1 beta (MIP-1 β) e CD107a, ocasiona na supressão da sua capacidade citotóxica, iniciada primeiramente pela incapacidade de expressar IL-2 e levando progressivamente à exaustão e desgaste celular. Esta indução se torna uma importante ferramenta de escape imunológico, uma vez que linfócitos T CD8⁺ são um dos principais tipos celulares especializados em reconhecer

células infectadas por vírus e exercer atividade citotóxica (CHOI et al., 2017; TOMINO et al., 2017).

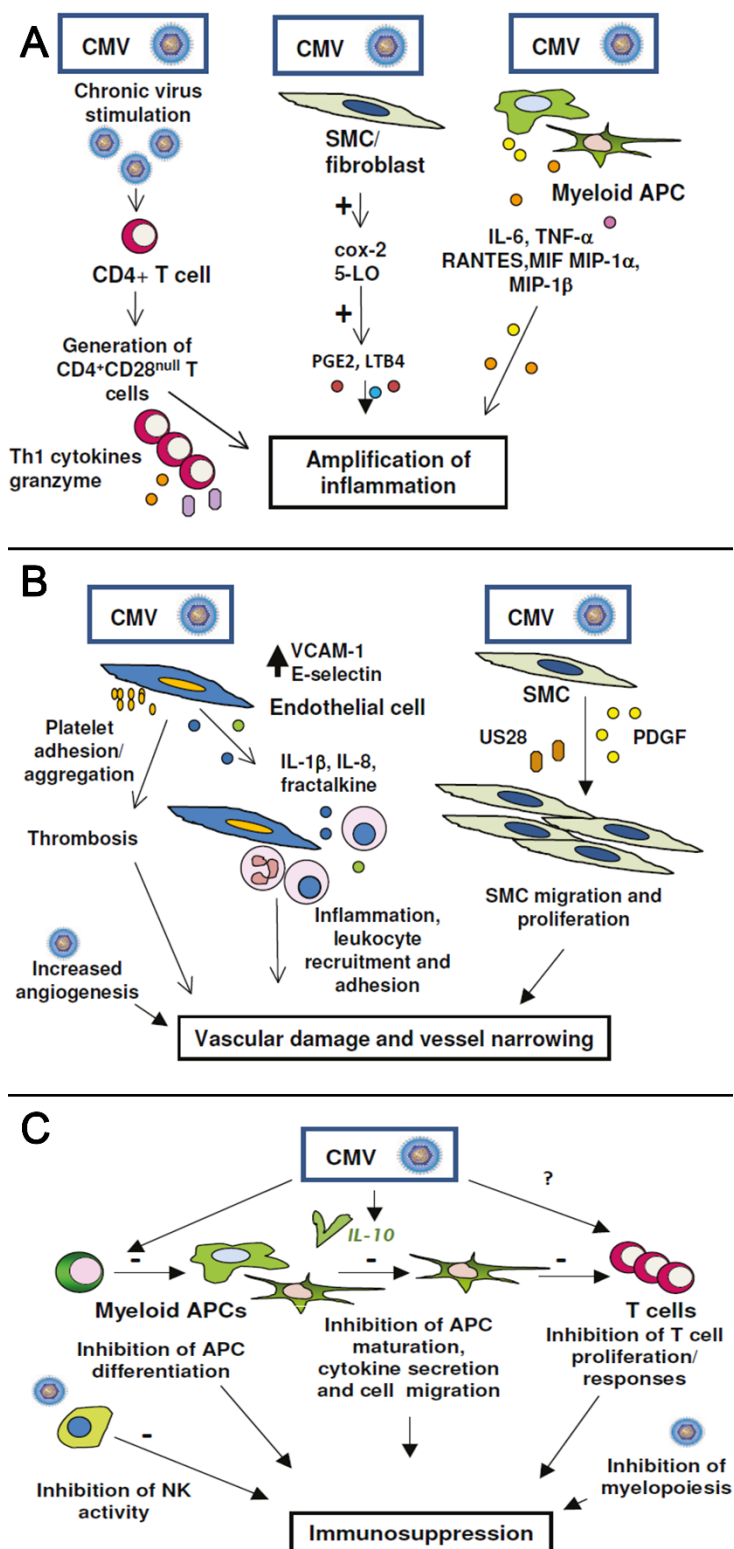


Figura 4. Patogênese do CMV. A, exacerbação da resposta inflamatória mediada pelo vírus; B, lesão vascular induzida pelo CMV e C, imunossupressão e mecanismos de escape do sistema imunológico.

Monócitos infectados pelo CMV migram para os tecidos, se diferenciando em macrófagos residentes. Estas células, quando estimuladas por antígenos bacterianos, induzem uma resposta inflamatória mais acentuada que normal, aumentando significativamente a expressão de TNF- α , IL-6 e IL-8, por ativação de TLR-4 e 5 (SMITH et al., 2014).

A infecção por CMV promove a manutenção da expressão de PRRs, como TLR-4 e TLR-5, além de co-receptores como CD14 que auxiliam no reconhecimento de lipopolissacarídeos (LPS) e outros PAMPs. A super-expressão e manutenção destes receptores na superfície celular, desencadeia excessivas ativações que promovem a resposta exacerbada frente a infecções. Além disso, ainda promove o aumento da expressão do fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), que atua como proteína adaptadora na via de ativação de NF- κ B mediada por TLRs, induzindo a produção de mediadores pró-inflamatórios. Ainda, o vírus é capaz de induzir a fosforilação de I κ B α (do inglês: *inhibitor of kappa B alpha*), liberando a translocação do NF- κ B para núcleo. Essa ativação cumulativa de vias pró-inflamatórias pode explicar como CMV influencia no desfecho clínico e pior prognóstico durante o quadro de sepse (SMITH et al., 2014).

Já foi demonstrado que LPS é capaz de induzir a reativação viral por estimular células infectadas que estão em estado latente e induzir a expressão de regiões promotoras virais, como início imediato e início tardio, que possuem sítios de ligação específicos para NF- κ B e outros fatores de transcrição. Além disso, a ativação desta via, ainda induz a expressão de TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8, que podem atuar de forma autócrina e parácrina, estimulando ativação de NF- κ B e, assim, agindo de forma independente como promotores da reativação viral (SMITH et al., 2014).

Dentro deste contexto inflamatório, temos o grupo de PRRs intracelulares, NOD-like receptors (NLR), especializados no reconhecimento de patógenos e demais sinais de perigo citosólicos. Algumas destas proteínas estão envolvidas na formação de um complexo multiproteico denominado inflamassoma, comumente formado por uma pró-caspase-1 (CASP-1) e um NLR, unidos por uma proteína adaptadora (ASC). A principal atividade do inflamassoma é clivar pró-IL-1 β e pró-IL-18 em suas versões ativas, IL-1 β e IL-18, que possuem ampla atividade pró-inflamatória. Assim, a CASP-1 foi

associada com altos níveis de carga viral em pacientes com sepse, no entanto a regulação positiva desta proteína ocorre antes da reativação, indicando um possível envolvimento da atividade pró-inflamatória do inflamassoma no desencadeamento do evento de reativação (SINGH et al., 2017).

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMANAN, M. et al. Tissue-specific control of latent CMV reactivation by regulatory T cells. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 8, 2017.

ANTONA, D. et al. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in France in 2010. **Epidemiology and Infection**, v. 145, n. 07, p. 1471–1478, 7 maio 2017.

ASSINGER, A. et al. Human cytomegalovirus-platelet interaction triggers toll-like receptor 2-dependent proinflammatory and proangiogenic responses. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 34, n. 4, 2014.

BATES, M.; BRANTSÆTER, A. B. Human cytomegalovirus (CMV) in Africa: a neglected but important pathogen. *Journal of virus eradication*, v. 2, n. 3, p. 136–42, 1 jul. 2016. ca: a neglected but important pathogen. **Journal of virus eradication**, v. 2, n. 3, p. 136–42, 1 jul. 2016.

BONE, R. C. The pathogenesis of sepsis. **Annals of Internal Medicine**, v. 115, n. 6, 1991.

CHENG, Y. et al. Gallic Acid-L-Leucine Conjugate Protects Mice against LPS-Induced Inflammation and Sepsis via Correcting Proinflammatory Lipid Mediator Profiles and Oxidative Stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, n. 1, 2018.

CHOI, Y. J. et al. Impaired polyfunctionality of CD8⁺ T cells in severe sepsis patients with human cytomegalovirus reactivation. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 49, n. 9, 2017.

CHOUSTERMAN, B. G.; SWIRSKI, F. K.; WEBER, G. F. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. **Seminars in Immunopathology**, v. 39, n. 5, 2017.

CONDE-GLEZ, C. et al. Seroprevalences of varicella-zoster virus, herpes simplex virus and cytomegalovirus in a cross-sectional study in Mexico. **Vaccine**, v. 31, n. 44, p. 5067–74, 17 out. 2013.

CONDE, K. A. P. et al. Differences in Sepsis Treatment and Outcomes between

Public and Private Hospitals in Brazil: A Multicenter Observational Study. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.

CROUGH, T.; KHANNA, R. Immunobiology of Human Cytomegalovirus: from Bench to Bedside. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, 2009.

CRUZ-ADALIA, A.; VEIGA, E. Close encounters of lymphoid cells and bacteria. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. 1, 2016.

DE GRACIA-GUINDO, M. D. C. et al. Cytomegalovirus Infection Monitoring Based on Interferon Gamma Release Assay in Kidney Transplantation. **Transplantation Proceedings**, v. 50, n. 2, p. 578–580, mar. 2018.

DELANO, M. J. et al. MyD88-dependent expansion of an immature GR-1 + CD11b + population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 6, 2007.

EMERY, V. C.; LAZZAROTTO, T. Cytomegalovirus in pregnancy and the neonate. **F1000Research**, v. 6, p. 138, 14 fev. 2017.

FORTE, E. et al. Tumor Necrosis Factor Alpha Induces Reactivation of Human Cytomegalovirus Independently of Myeloid Cell Differentiation following Posttranscriptional Establishment of Latency. **mBio**, v. 9, n. 5, 11 set. 2018.

FRANTZESKAKI, F. G. et al. Cytomegalovirus reactivation in a general, nonimmunosuppressed intensive care unit population: Incidence, risk factors, associations with organ dysfunction, and inflammatory biomarkers. **Journal of Critical Care**, v. 30, n. 2, 2015.

GAWAD, A. A. et al. Cytomegalovirus Immunoglobulin G Avidity Index among Blood Donors in Alexandria, Egypt. **Central European Journal of Public Health**, v. 24, n. 4, p. 314–320, 1 dez. 2016.

GOODWIN, C.; CIESLA, J.; MUNGER, J. Who's Driving? Human Cytomegalovirus, Interferon, and NFκB Signaling. **Viruses**, v. 10, n. 9, p. 447, 21 ago. 2018.

HAYAKAWA, M. Management of disseminated intravascular coagulation: Current insights on antithrombin and thrombomodulin treatments. **Open Access Emergency Medicine**, v. 10, n. 1, 2018.

HEALY, L. D. et al. Regulation of immune cell signaling by activated protein C. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 103, n. 6, p. 1197–1203, 30 jun. 2018.

HOUSCHYAR, K. S. et al. Role of Wnt signaling during inflammation and sepsis: A review of the literature. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 41, n. 5, p. 247–253, 21 maio 2018.

HRAIECH, S. et al. Cytomegalovirus reactivation enhances the virulence of *Staphylococcus aureus* pneumonia in a mouse model. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 23, n. 1, 2017.

IBRAHIM, S. et al. Sociodemographic factors associated with IgG and IgM seroprevalence for human cytomegalovirus infection in adult populations of Pakistan: a seroprevalence survey. **BMC Public Health**, v. 16, n. 1, p. 1112, 22 dez. 2016.

ISKANDER, K. N. et al. Sepsis: Multiple Abnormalities, Heterogeneous Responses, and Evolving Understanding. **Physiological Reviews**, v. 93, n. 3, 2013.

JING, X. et al. Diagnostic Potential of Differentially Expressed Homer1, IL-1 β , and TNF- α in Coronary Artery Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 1, 2014.

KALIL, A. C.; FLORESCU, D. F. Is cytomegalovirus reactivation increasing the mortality of patients with severe sepsis? **Critical care (London, England)**, v. 15, n. 2, 2011.

KING, A. et al. **Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses**. [s.l.] International Committee on Taxonomy of Viruses, 2012.

KORNDEWAL, M. J. et al. Cytomegalovirus infection in the Netherlands: Seroprevalence, risk factors, and implications. **Journal of Clinical Virology**, v. 63, p. 53–58, fev. 2015.

KUDLOW, P. A. et al. Sleep architecture variation: A mediator of metabolic disturbance in individuals with major depressive disorder. **Sleep Medicine**, v. 14, n. 10, 2013.

KUMAR, V. Targeting macrophage immunometabolism: Dawn in the darkness

of sepsis. **International Immunopharmacology**, v. 58, n. 1, 2018.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; ASTER, J. C. **Robbins & Cotran Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. [s.l: s.n.].

LACHMANN, R. et al. Cytomegalovirus (CMV) seroprevalence in the adult population of Germany. **PLOS ONE**, v. 13, n. 7, p. e0200267, 25 jul. 2018.

LANCINI, D. V. et al. Cytomegalovirus in Australian blood donors: seroepidemiology and seronegative red blood cell component inventories. **Transfusion**, v. 56, n. 6pt2, p. 1616–1621, jun. 2016.

LANZIERI, T. M. et al. Influence of parity and sexual history on cytomegalovirus seroprevalence among women aged 20-49 years in the USA. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 135, n. 1, p. 82–85, out. 2016.

LI, T. -D. et al. Baseline antibody level may help predict the risk of active human cytomegalovirus infection in a HCMV seropositive population. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 36, n. 5, p. 863–868, 28 maio 2017.

LI, X. et al. Cytomegalovirus infection and outcome in immunocompetent patients in the intensive care unit: a systematic review and meta-analysis. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 289, 28 dez. 2018.

LOPO, S. et al. Seroprevalence to cytomegalovirus in the portuguese population, 2002-2003. **Eurosurveillance**, v. 16, n. 25, 2011.

MACHADO, F. R. et al. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): An observational study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, 2017.

MALITO, E.; CHANDRAMOULI, S.; CARFI, A. From recognition to execution- the HCMV Pentamer from receptor binding to fusion triggering. **Current opinion in virology**, 1 jun. 2018.

MANSFIELD, S. et al. Sepsis and cytomegalovirus: foes or conspirators? **Medical Microbiology and Immunology**, v. 204, n. 6, 2015.

MARQUES, M.; FERREIRA, A.; RIBEIRO, D. The Interplay between Human

Cytomegalovirus and Pathogen Recognition Receptor Signaling. **Viruses**, v. 10, n. 10, p. 514, 20 set. 2018.

MOGENSEN, T. H. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 2, 2009.

OGUNJIMI, B. et al. Cytomegalovirus seropositivity is associated with herpes zoster. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 11, n. 6, p. 1394–9, 2015.

OLIVEIRA, L. M. et al. Reduced frequency of two activating KIR genes in patients with sepsis. **Human Immunology**, v. 78, n. 4, 2017.

OLSSON, J. et al. Herpes virus seroepidemiology in the adult Swedish population. **Immunity & Ageing**, v. 14, n. 1, p. 10, 10 dez. 2017.

OSAWA, R.; SINGH, N. Cytomegalovirus infection in critically ill patients: a systematic review. **Critical Care**, v. 13, n. 3, p. R68, 2009.

PATIL, N. K. et al. Targeting immune cell checkpoints during sepsis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 11, 2017.

RAUWEL, B. et al. Release of human cytomegalovirus from latency by a KAP1/TRIM28 phosphorylation switch. **eLife**, v. 4, 7 abr. 2015.

REDONDO, A. C. C. et al. TLR-2 and TLR-4 expression in monocytes of newborns with late-onset sepsis. **Jornal de Pediatria**, v. 90, n. 5, 2014.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 5, 2011.

RITTIRSCH, D.; FLIERL, M. A.; WARD, P. A. Harmful molecular mechanisms in sepsis. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 10, 2008.

SELVEY, L. A. et al. Cytomegalovirus viraemia and mortality in renal transplant recipients in the era of antiviral prophylaxis. Lessons from the western Australian experience. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 501, 17 dez. 2017.

SHAIEGAN, M. et al. Meta-analysis of cytomegalovirus seroprevalence in volunteer blood donors and healthy subjects in Iran from 1992 to 2013. **Iranian journal of basic medical sciences**, v. 18, n. 7, p. 627–34, jul. 2015.

SHIGEMI, D. et al. Seroprevalence of cytomegalovirus IgG antibodies among pregnant women in Japan from 2009-2014. **American Journal of Infection Control**, v. 43, n. 11, p. 1218–1221, nov. 2015.

SHIN, J.; JIN, M. Potential immunotherapeutics for immunosuppression in sepsis. **Biomolecules and Therapeutics**, v. 25, n. 6, 2017.

SINGER, M. et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 315, n. 8, 2016.

SINGH, N. et al. Inflammasome expression and cytomegalovirus viremia in critically ill patients with sepsis. **Journal of Clinical Virology**, v. 93, n. 1, 2017.

SINISTRO, A. et al. Downregulation of CD40 ligand response in monocytes from sepsis patients. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 12, 2008.

SIQUEIRA-BATISTA, R. et al. Sepse: atualidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n. 2, p. 207–216, jun. 2011.

SMITH, P. D. et al. Cytomegalovirus Enhances Macrophage TLR Expression and MyD88-Mediated Signal Transduction To Potentiate Inducible Inflammatory Responses. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 11, 2014.

SOUZA-FONSECA-GUIMARAES, P. et al. Natural killer cell assessment in peripheral circulation and bronchoalveolar lavage fluid of patients with severe sepsis: A case control study. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 3, 2017.

SREERAMKUMAR, V.; FRESNO, M.; CUESTA, N. Prostaglandin E2 and T cells: friends or foes? **Immunology and Cell Biology**, v. 90, n. 6, 2012.

STROTHER, R. K. et al. Polymicrobial Sepsis Diminishes Dendritic Cell Numbers and Function Directly Contributing to Impaired Primary CD8 T Cell Responses In Vivo. **The Journal of Immunology**, v. 197, n. 11, 2016.

TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. Il-6 in inflammation, Immunity, And disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 10, 2014.

TANG, D. et al. PAMPs and DAMPs: Signal 0s that spur autophagy and

immunity. **Immunological Reviews**, v. 249, n. 1, 2012.

THE UNIVERSITY OF CHICAGO. **Cytomegalovirus (CMV)**. Disponível em: <<https://pedclerk.bsd.uchicago.edu/page/cytomegalovirus-cmv>>. Acesso em: 2 out. 2018.

TOMINO, A. et al. Increased PD-1 expression and altered T cell repertoire diversity predict mortality in patients with septic shock: A preliminary study. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, 2017.

TORNIAINEN-HOLM, M. et al. Association of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus with cognitive functioning and risk of dementia in the general population: 11-year follow-up study. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 69, p. 480–485, mar. 2018.

TUON, F. F. et al. Seroprevalence of Toxoplasma gondii , cytomegalovirus and Epstein Barr virus in 578 tissue donors in Brazil. **Journal of Infection and Public Health**, 18 jul. 2018.

VANONI, S. et al. Myeloid-derived NF- κ B negative regulation of PU.1 and c/EBP- β -driven pro-inflammatory cytokine production restrains LPS-induced shock. **Innate Immunity**, v. 23, n. 2, 2017.

VARANI, S.; LANDINI, M. Cytomegalovirus-induced immunopathology and its clinical consequences. **Herpesviridae**, v. 2, n. 1, 2011.

VARGHESE, J. et al. Seroprevalence of cytomegalovirus in donors & opportunistic viral infections in liver transplant recipients. **The Indian journal of medical research**, v. 145, n. 4, p. 558–562, abr. 2017.

VIEIRA BRAGA, F. A. et al. Molecular characterization of HCMV-specific immune responses: Parallels between CD8⁺ T cells, CD4⁺ T cells, and NK cells. **European Journal of Immunology**, v. 45, n. 9, p. 2433–2445, set. 2015.

VILIBIC-CAVLEK, T. et al. Seroepidemiology of cytomegalovirus infections in Croatia. **Wiener klinische Wochenschrift**, v. 129, n. 3–4, p. 129–135, 6 fev. 2017.

XU, J. et al. Schizandrin b protects lps-induced sepsis via tlr4/nf-kb/myd88 signaling pathway. **American Journal of Translational Research**, v. 10, n. 4,

2018.

YU, X. et al. Dissecting human cytomegalovirus gene function and capsid maturation by ribozyme targeting and electron cryomicroscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 20, p. 7103–8, 17 maio 2005.

ZELOVÁ, H.; HOŠK, J. TNF- α signalling and inflammation: Interactions between old acquaintances. **Inflammation Research**, v. 62, n. 7, 2013.

ZHENG, Y. et al. Effect of bone marrow mesenchymal stem cells on the polarization of macrophages. **Molecular Medicine Reports**, v. 17, n. 3, 2018.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- Analisar os principais aspectos clínicos e fisiopatológicos associados à reativação do CMV em paciente com sepse e sua associação com o desfecho clínico.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a reativação do CMV e sua associação com os parâmetros clínicos da sepse;
- Estabelecer um perfil de morbimortalidade que articule o quadro de sepse com a reativação de CMV;
- Analisar os níveis plasmáticos de citocinas pró e anti-inflamatória presentes na reativação do CMV durante os eventos de sepse;
- Correlacionar os mediadores imunológicos e inflamatórios com as variáveis clínicas características da sepse;
- Verificar se a reativação do CMV está associada ao prognóstico e desfecho clínico dos pacientes sépticos.

4. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

- 4.1. Artigo: Reactivation of cytomegalovirus in patients with sepsis: association of immunological mediators, laboratory parameters, and clinical manifestations.**

Submetido à revista: Scientific Reports (fator de impacto: 4,122)

Reactivation of cytomegalovirus in patients with sepsis: association of immunological mediators, laboratory parameters, and clinical manifestations

Taylon Felipe Silva, MSc^{1*}; Virgínia Márcia Concato¹, Fernanda Tomiotto-Pellissier, MSc^{1,6}; Manoela Daiele Gonçalves, MSc², Bruna Taciane da Silva Bortoleti, MSc^{1,6}; Eliandro Reis Tavares, PhD³; Lucy Megumi Yamauchi Lioni, PhD³; Cintia Magalhães Carvalho Grion, PhD, MD⁴; Andréa Name Colado Simão, PhD⁵; Milena Menegazzo Miranda-Sapla, PhD¹; Idessania Nazareth Costa, PhD¹; Wander Rogério Pavanelli, PhD¹; Ivete Conchon-Costa, PhD¹.

¹ Laboratory of Immunoparasitology of neglected diseases and cancer - LIDNC, Department of Pathological Sciences, Center of Biological Sciences, State University of Londrina, Paraná, Brazil.

² Laboratory of Biotransformation and Phytochemistry, Department of Chemistry, Center of Exact Sciences, State University of Londrina, Paraná, Brazil.

³ Department of Microbiology, Center of Biological Sciences. State University of Londrina, Paraná, Brazil.

⁴ Department of Clinical Medicine, Health Sciences Center, State University of Londrina, Paraná, Brazil.

⁵ Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicology, State University of Londrina, Paraná, Brazil.

⁶ Biosciences and Biotechnology Postgraduate Program, Carlos Chagas Institute (ICC), Fiocruz, Curitiba, Brazil,

The authors declare no conflicts of interest.

*Corresponding author: Taylon Felipe Silva, Department of Pathological Sciences, Center of Biological Sciences, State University of Londrina, Celso Garcia Cid Highway - Pr 445 Km 380 Cx. Postal 10.011 - Campus Universitário, 86057-970, Paraná, Brazil. E-mail: taylonfelipe@hotmail.com. phone: +5543998307750.

Reactivation of cytomegalovirus in patients with sepsis: association of immunological mediators, laboratory parameters, and clinical manifestations

ABSTRACT

The CMV reactivation has been widely associated with bacterial sepsis and occurs in approximately 30% of these individuals, is associated with a longer stay in ICU, prolongation of the need for mechanical ventilation, and over 80% increase in the mortality rate, being directly associated with severe organ dysfunction and hemodynamic imbalance. Thus, the aim of this study was to evaluate the role of CMV reactivation in sepsis progression. The overall occurrence of cytomegalovirus reactivation in the cohort was 17.58%. Was observed an increase in plasma levels of NO, reduction of percentage of free days of mechanical ventilation and arterial pH, as well as changes in coagulation parameters, reduction of platelet count and increase of activated partial thromboplastin time in the reactivated group when compared with non-reactivated group. There was also a significant increase in IL-10, creatinine, urea levels and reduction of 24-hour urine output. These variables still correlated with viral load, demonstrating an association between the reactivation process and kidney failure present in sepsis. The reactivated group still had 2.1 times the risk of developing septic shock and an increase in the mortality rates. CMV reactivation may increase mortality rates among septic patients and our data suggest that IL-10 and NO are involved in this process.

Key words: Cytomegalovirus; Reactivation; Sepsis; Kidney failure; IL-10; Nitric oxide; Mortality.

INTRODUCTION

Sepsis is a pathological syndrome with biochemical abnormalities induced by infection. It is defined as an organic dysfunction with imminent threat to life triggered by a deregulated host response to an infection. It persists among the most serious worldwide public health issues with a growing incidence over the years. It is characterized by a heterogeneous host response to a pathogen amplified by several endogenous factors, leading to alterations in several physiological processes, such as cardiovascular, neurological, endocrine, metabolic, and coagulation. This broad perspective of changes define the biological significance and clinical heterogeneity of the affected individuals ¹.

Human Cytomegalovirus (CMV) is a double-stranded DNA virus that can be transmitted by various bodily secretions and fluids, such as saliva, sexual contact, blood transfusion, and transplantation of solid organs or bone marrow. Primary infection in immunocompetent individuals is generally asymptomatic and, as a result, a latent long-term infection condition is established, which may be reactivated in certain situations ².

CMV reactivation is an important aspect related to the pathogenesis of this viral infection. Immunosuppression, inflammation, infection and oxidative stress are important risk factors that may trigger reactivation. The exact mechanism required is yet to be fully elucidated, but studies have suggested the role of TNF- α as an important mediator of this process ³.

The CMV reactivation has been widely associated with bacterial sepsis and is likely to result from the inflammatory process which is peculiar to such a condition ⁴. Reactivation occurs in approximately 30% of individuals with sepsis without immunosuppression and is associated with a longer stay in ICU patients,

prolongation of the need for mechanical ventilation ⁵, and over 80% increase in the mortality rate ⁶. In addition, CMV reactivation in patients with sepsis has been described as a worsening factor for clinical prognosis, with a significant increase in morbidity and mortality, directly associated with severe organ dysfunction and hemodynamic imbalance ⁷. Thus, our aim was to evaluate the role of CMV reactivation and its association with immunological mediators, laboratory parameters, and clinical manifestations related to the prognosis and clinical outcome of patients with sepsis.

RESULTS

None of the patients in the reactivated group had detectable plasma levels of anti-CMV IgM, which confirms reactivation and rules out primary infection. **Table 1** describes the baseline characteristics of the groups. No statistically significant difference was revealed regarding age ($p=0.646$), gender ($p=1.000$) or length of hospital stay (0.586) from the comparison between groups. In contrast, the SOFA index presented higher values ($p=0.020$) and the Glasgow coma scale had lower values ($p=0.037$) in the reactivated group.

Plasma levels of NO metabolites were very high in the reactivated in relation to the non-reactivated group ($p<0.001$) (**Fig 2A**). In addition, arterial pH ($p=0.036$) reduced as well as the percentage of free days from mechanical ventilation ($p=0.008$). Partial pressure of arterial carbon dioxide (pCO_2) levels between the groups did not differ, but a tendency to be higher in the reactivated group appeared ($p=0.086$) (**Fig 2B-D**).

A considerable reduction in total platelet count ($p=0.008$) and hematocrit percentage ($p=0.025$) also occurred with increased activated partial thromboplastin time (APTT) ($p=0.002$) only in the reactivated group (**Fig 2E-G**).

Additionally, the inflammatory status in the reactivated group was accentuated by the significant increase of C-reactive protein (CRP) ($p=0.004$) (**Fig 2H**).

Subsequently, was evaluated whether CMV reactivation has immunomodulatory activity in sepsis and its interaction in the clinical evolution of these patients. The levels of TNF, IFN- γ , IL-2, and IL-4 remained below the detection limits for the most patients (data not shown). IL-6 and IL-17a did not differ statistically between the groups ($p=0.922$ and $p=0.231$ respectively). In addition, a significant increase in IL-10 levels was observed in the reactivated group ($p<0.001$) with a very strong correlation with CMV viral load ($r=0.910$ and $p<0.001$) (**Fig. 3A**). The groups also differed significantly from the creatinine level and 24-hour urine output (24hUO) ($p<0.001$), which were directly and inversely correlated to the viral load ($r=0.652/p=0.056$, and $r=-0.763/p=0.010$), respectively (**Fig. 3B and C**). Urea levels also differed between groups ($p=0.027$) with a significant increase among patients with CMV reactivation. A direct correlation appeared between IL-10 and creatinine or urea ($r=0.709/p=0.026$ and $r=0.738/p=0.045$, respectively) in addition to an inverse correlation between IL-10 and 24hUO that occurred only in the reactivated group ($r=-0.846$ and $p<0.001$) (**Fig. 3E**).

Regarding the severity of the clinical condition due to the presence of septic shock, the group with CMV reactivation had a higher incidence (90%) than the non-reactivated group (57%) (RR 2,1; 95% CI1.4-3.1; $p=0.012$). When patients with or without CMV reactivation were compared for mortality rates, a tendency for statistical difference in 28 was found (RR 2.5; 95%CI1.2-5.2; $p=0.052$), but not in 180 days (RR 1.5; 95%CI1.01-2.3; $p=0.161$) post sepsis diagnosis. However, Kaplan-Meier's mortality curves differed between groups for both 28 (log-rank $p=0.026$) and 180 days (log-rank $p=0.039$) (**Fig 4A and B**).

DISCUSSION

Several studies have clinically demonstrated the effect of CMV reactivation during sepsis, increasing the need for mechanical ventilation and the in-hospital stay of these patients ¹². However, few studies have evaluated the biochemical and immunological variables associated with viral reactivation which may influence prognosis and clinical outcome ⁷. Our study demonstrated that CMV reactivation changes a variety of laboratory parameters that promote a more intense decompensation than that observed in patients with sepsis without reactivation, in addition to worsening the general clinical condition evaluated through increased SOFA score and reduced level of consciousness according to the Glasgow coma scale.

Our data show an increase in NO and IL-10 levels during CMV reactivation in sepsis, corroborating with several studies which point out that CMV infection is able to stimulate NO production in several cell types, but this mediator does not act as a microbicidal molecule on this virus. Zhu et al. ¹³ demonstrated the role of nitric oxide in the escape of the immune system by differentiating hematopoietic progenitor cells into a subtype of long-lived IL-10 producing monocytes that act as both viral reservoir as a potent immunosuppressant.

CMV is able to stimulate the expression of excessive amounts of NO in the lungs through bronchial epithelial cells, which results in cytotoxicity and injury of adjacent tissue, inducing pneumonitis ¹⁴ and pulmonary fibrosis ¹⁵. Thus, high NO levels observed during reactivation in patients in our study could be implicated in increased respiratory failure and need for mechanical ventilation. Alveolar injury and reduced gas diffusion as well as balance could induce acid-base imbalance,

resulting in an acidotic state, as demonstrated in our study, by the reduction of arterial pH and tendency for increase of pCO₂ in the group with CMV reactivation.

The reactivated group had a higher prevalence of septic shock than the control group, suggesting a role of CMV-mediated NO in sepsis severity. CMV has proved to activate NAD(P)H oxidase from arterial smooth muscle cells and deregulate the eNOS expression in endothelial cells, thus contributing to arteriolar vasodilation. In addition, CMV can stimulate venous inflammation and thrombogenic responses¹⁶⁻¹⁸. CMV, in this way, may be related to the circulatory abnormalities of septic shock. However, new studies should be performed to elucidate possible mechanisms to be involved in this process.

Our study found a considerable decrease in total platelet count and hematocrit percentage, in addition to higher APTT only in the reactivated group. CMV is capable to directly interact and activate platelets through TLR-2 binding, inducing P-selectin expression and formation of aggregates between platelets and leukocytes via CD169, which stimulates the expression of pro-angiogenic cytokines involved in increased vascular permeability^{19,20}.

Hemodynamic disturbances in sepsis may range from a simple subclinical change in blood coagulation to a severe disseminated intravascular coagulation (ICD), characterized by the formation of microthrombi in vessels that contribute significantly to dysfunction of various organs and consequent consumption of platelets and coagulation factors that may contribute to hemorrhagic manifestations^{21,22}. This context suggests that CMV may be able to contribute to the thrombogenic events of sepsis through the direct interaction of platelets and extrinsic pathway activation of blood coagulation due to endothelial damage.

Additionally, increased CRP levels are also an indication exacerbated inflammatory response to the reactivation process.

The reactivated group IL-10 levels had significantly higher concentrations and also revealed the association between high levels of IL-10 with increasing creatinine and urea levels as well as reduced 24hUO only in the reactivated group, with correlation between the levels of these parameters and the viral load, except urea, indicating the presence of CMV-mediated renal damage.

IL-10 is a key component of the immune system that regulates and suppresses the expression of proinflammatory cytokines during the recovery phases of infections and consequently reduces the damage caused by inflammatory cytokines ²³. The IL-10 family comprises a set of nine human cytokines and four viral homologs, one of them synthesized by CMV. The cmvIL-10 is secreted by infected cells and binds to cellular IL-10 receptors in a manner similar to the natural ligand, leading to suppression of inflammation ^{24,25}.

In addition, CMV is still capable to induce IL-10 expression by virus-specific CD4⁺T cells upon recognizing MHC-II exhibiting viral antigens. These mechanisms could induce immunosuppression and regulate the inflammatory response, contributing to immune system escape, resistance, and maintenance of CMV infection ^{24,26}.

Among the diversity of IL-10 functions, this cytokine plays an important role in renal physiology for being related to the development of acute renal diseases and progression to chronic failure ^{27,28}. The major producers of IL-10 in the kidneys are the mesangial cells, whose abnormal proliferation structurally alters the glomeruli and interstitial tubules and may result in renal failure. IL-10 is a mesangial growth factor with important autocrine activity, promoting cell proliferation. *In vivo*

administration of IL-10 in normal rats resulted in a considerable increase in the number of intraglomerular cells and consequent reduction in creatinine clearance. In addition, IL-10 further promotes the deposition of immune complexes that contribute to glomerular injury ²⁵. Our results represent the first record of CMV-mediated expression of IL-10 induction correlated to kidney failure in sepsis.

Sepsis is assumed to progress from a primary hyperinflammatory early stage to a predominantly immunosuppressive state, with extreme production of pro-inflammatory and anti-inflammatory mediators responsible for a state of immunological dissonance responsible for refractory shock, multiple organ failure and death ²⁹.

The overall occurrence of cytomegalovirus reactivation in the cohort ranged 17.58% and the patients had worsening of organ dysfunction, with a 2.1-fold increased risk of developing septic shock, and 2.5-fold increased mortality risk in relation to the group without reactivation within 28 days, in addition to a 33.4% increase in the need for mechanical ventilation, and our data suggest the occurrence of an influence on CMV reactivation and the clinical outcome of these patients. Nonetheless, the number of patients evaluated in this study could lead to a sample bias, so we suggest that further studies should be conducted to analyze this association.

We demonstrated that CMV is reactivated in septic patients and may promote a higher risk of developing septic shock and higher mortality rates, especially along the first weeks after reactivation, and our data suggest that IL-10 and NO may be involved in this process. The development of IL-10-mediated kidney failure and NO-mediated respiratory and cardiovascular alterations, as well as changes in the coagulation system and exacerbation of the inflammatory profile,

can explain how CMV reactivation influences the prognosis and clinical outcome of patients with sepsis. Therefore, the development of a better understanding on CMV reactivation in sepsis and possible new strategies to prevent it may contribute significantly to the clinical outcome of these patients.

PATIENTS AND METHODS

Subjects and design

This is a cohort study conducted at the Hospital Universitario de Londrina, Brazil, between May and October 2017. Inclusion criteria: patients of both sexes, aged 18 years, and over diagnosed with sepsis or septic shock according to sepsis-3 protocol proposed by Singer et al. ¹ for a maximum of seven days and serologically positive for anti-CMV IgG. Exclusion criteria: having presented another sepsis within a period of less than three months of the diagnosis used in the study, known immunosuppression, patients suffering from extensive burns and pregnancy. This study was approved by the Committee of Ethics in Research Involving Human Beings of the State University of Londrina (CAAE-61406216.4.0000.5231). All patients who participated in the study or their legal guardians signed a free and informed consent form and were fully informed about all aspects related to the research. All methods performed in the study were conducted following all ethical and legal regulations.

During the study period, 168 patients were diagnosed with sepsis and evaluated regarding the inclusion and exclusion criteria. 110 patients were excluded for not meeting the established criteria. Two out of the 58 patients who were still hospitalized on the seventh day after diagnosis of sepsis did not present positive CMV serology and were excluded, which led us to a final sample of 56

patients, including 10 (reactivated group) who had detectable CMV viral load compatible with the reactivation process as described by Blasquez-Navarro et al.⁸ and 46 (non-reactivated group) without detectable viral load. Cowley et al.⁹ described the reactivation time and appearance of detectable viral load, which enabled to establish the seventh day after diagnosis of sepsis as the time of analysis for all study variables (**Fig 1**).

Venous blood was collected in two 5 mL tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and the samples were aliquoted for DNA extraction and centrifuged for separation of the plasma which was stored in a freezer at -80 ° C until the time of use.

Determination of plasma levels of anti-CMV IgM and IgG

The detection and quantification of anti-CMV IgM levels were determined by chemiluminescent microparticle immunoassay (Abbott Laboratory, IL, USA) and IgG followed the enzyme immunoassay (ELISA) by using the BIOLISA CMV IgG kit (Bioclin, Belo Horizonte, Brazil).

DNA extraction

The DNA extraction was performed the method described by Green and Sambrook¹⁰ the aliquots of 200 µL of whole blood were submitted to the classical method of DNA extraction by Phenol-Chloroform. Samples were incubated in lysis buffer (50mM-TrisHCl-pH8.0, 50mM-NaCl, 50mM-EDTA and 0.5%SDS) with proteinase-K (20mg/mL) and incubated at 56°C for 1-hour. Extraction of the organic phase was performed with buffer containing Phenol-Chloroform-Isoamyl Alcohol solution (25:24:1 respectively). The DNA was precipitated in absolute ethanol, eluted in TrisHCl buffer (25 mM-pH8.0) and stored in a freezer at -20°C

until use. DNA concentrations were quantified using NanoVue Plus (Biochrom, Holliston, USA) and integrity was assessed by 2% agarose gel electrophoresis.

Design of oligonucleotide primers and amplification of CMV UL55

Eighty-six DNA sequences from the UL55 region of cytomegalovirus were obtained from the GenBank database available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. The sequences obtained were analyzed using the BioEdit v.7.2.0 software aligned by the ClustalW and a consensus sequence was deduced. From this the primer oligonucleotides were designed and evaluated using the software OligoAnalyzer 3.1. available at <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>. The delineated oligonucleotides (UL55forward 5'-CTGGCATTGCGATTGGTTC-3' and UL55reverse 5'-CTGTAATCTGAACTGTATGCTGAC-3') were used in a PCR with a final volume of 20 µl containing 1XPCR buffer, 2.5mM-MgCl₂, 1.25µM each dNTP, 0.65U-Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA), 20pM of each oligonucleotide and 100ng of viral genomic DNA. Reactions without the addition of template DNA were performed as negative control. PCR conditions were: 3 minutes at 95°C, 40-cycles of 94°C for 15 seconds, 52°C for 30 seconds and 72°C for 45 seconds and a final extension of 10 minutes at 72°C in a Veriti 96-well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, USA). PCR products were evaluated by 2% agarose gel electrophoresis and compared to 100bp molecular weight marker (Ludwig Biotec, Alvorada, Brazil).

Cloning and Sequencing

To confirm the specificity of the primers, the PCR product was cloned into plasmid using the vector pGEM®-T Easy (Promega, Madison, USA) according to the manufacturer's instructions. The cloned plasmids were purified using QIAprep

Spin Miniprep kit (Qiagen, Germany) and sequenced using the T7 (forward) and SP6 (reverse) oligonucleotides with ABI BigDye Terminator Kit on an ABI 3500xl Genetic Analyzer Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, USA). Electropherograms were analyzed manually in the BioEdit v.7.2.0 software and compared to GenBank sequences using the BLAST algorithm, confirming the primer specificity in the amplification of the 126 base pair fragments.

Quantification of Cytomegalovirus by real-time PCR

For absolute quantification of viral load, a calibration curve was developed based on a 10-fold dilution from 1.6×10^6 and after the real-time PCR (qPCR) assay a linear regression curve was calculated and used to determine the sample viral load, expressed in number of viral copies.

The qPCR was performed on a Rotor-Gene Q 2PlexHRM (Qiagen, USA) thermocycler using QuantiNova SYBR Green PCR kit (Qiagen, USA) and confirmed by Cytomegalovirus (CMV) SYBR Green PCR Kit (Norgen Biotek, Thorold, Canada) with 100 ng/genomic DNA reaction overall, using the forward primer reverse UL55 and UL55 in the concentrations described above. The samples were amplified under the following PCR conditions: an initial step of 2 minutes at 50 ° C, 10 minutes at 95 ° C and 40 cycles of 30 seconds at 95 ° C, 30 seconds at 57 ° C and 30 seconds at 72 ° C, followed by a test for analyzing the dissociation curve (55 ° C to 99 ° C, with a heating of 0.5 ° C/second).

Plasma cytokine and nitric oxide analysis

Cytometric Bead Array Human Th1/Th2 Cytokine kit (BD Biosciences, San Jose, USA) was used to determine the plasma levels of TNF, IFN- γ , IL-10, IL-6, IL-2, and the IL-17A quantification by Human IL-17A Platinum ELISA (eBioscience,

Vienna, Austria). The determination of Nitrite levels as an estimate to produced NO was performed according to Miranda et al. ¹¹.

Statistical analyzes

Statistical analyses were performed using SPSS software (version 20) (IBM Corp, Armonk, USA) and graphs created with Graphpad Prism 7 (GraphPad Software, USA). Data were submitted to the Shapiro-Wilk and Levene tests and those with normal distribution and homogeneity of the variances were evaluated according to the Student's t-test. Data without normal distribution underwent transformation through natural logarithm; those that nevertheless continued to show no normality and homogeneity were evaluated through the Mann Whitney's *U*-test. Correlation analyses were performed through the Pearson or Spearman tests, as appropriate. Categorical data were analyzed through Fisher's exact test and relative risk (RR) with 95% confidence interval (CI). Survival curves followed the Kaplan-Meyer's method considering 28 and 180 days as cutoff points. Statistical significance was set at $p < 0.05$ for all analyses.

REFERENCES

1. Singer, M. *et al.* The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **315**, (2016).
2. Crough, T. & Khanna, R. Immunobiology of Human Cytomegalovirus: from Bench to Bedside. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, (2009).
3. Forte, E. *et al.* Tumor Necrosis Factor Alpha Induces Reactivation of Human Cytomegalovirus Independently of Myeloid Cell Differentiation following Posttranscriptional Establishment of Latency. *MBio* **9**, (2018).

4. Mansfield, S., Grießl, M., Gutknecht, M. & Cook, C. H. Sepsis and cytomegalovirus: foes or conspirators? *Med. Microbiol. Immunol.* **204**, (2015).
5. Li, X. *et al.* Cytomegalovirus infection and outcome in immunocompetent patients in the intensive care unit: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect. Dis.* **18**, 289 (2018).
6. Kalil, A. C. & Florescu, D. F. Is cytomegalovirus reactivation increasing the mortality of patients with severe sepsis? *Crit. Care* **15**, (2011).
7. Frantzeskaki, F. G. *et al.* Cytomegalovirus reactivation in a general, nonimmunosuppressed intensive care unit population: Incidence, risk factors, associations with organ dysfunction, and inflammatory biomarkers. *J. Crit. Care* **30**, (2015).
8. Blazquez-Navarro, A. *et al.* BKV, CMV, and EBV Interactions and their Effect on Graft Function One Year Post-Renal Transplantation: Results from a Large Multi-Centre Study. *EBioMedicine* **34**, 113–121 (2018).
9. Cowley, N. J. *et al.* Safety and Efficacy of Antiviral Therapy for Prevention of Cytomegalovirus Reactivation in Immunocompetent Critically Ill Patients: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern. Med.* **177**, 774–783 (2017).
10. Green, M. R. & Sambrook, J. Isolation of High-Molecular-Weight DNA Using Organic Solvents. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2017**, pdb.prot093450 (2017).
11. Miranda, M. M. *et al.* Kaurenoic Acid Possesses Leishmanicidal Activity by Triggering a NLRP12/IL-1 β /cNOS/NO Pathway. *Mediators Inflamm.* **2015**,

- 392918 (2015).
12. Papazian, L. *et al.* Cytomegalovirus reactivation in ICU patients. *Intensive Care Med.* **42**, 28–37 (2016).
 13. Zhu, D. *et al.* Human cytomegalovirus reprogrammes haematopoietic progenitor cells into immunosuppressive monocytes to achieve latency. *Nat. Microbiol.* **3**, 503–513 (2018).
 14. Tanaka, K., Noda, S., Sawamura, S., Kabir, A. M. & Koga, Y. Nitric oxide targets bronchiolar epithelial cells in murine cytomegalovirus-associated disease in lungs that are free of the virus. *Arch. Virol.* **146**, 1499–515 (2001).
 15. Li, Y., Gao, J., Wang, G. & Fei, G. Latent cytomegalovirus infection exacerbates experimental pulmonary fibrosis by activating TGF- β 1. *Mol. Med. Rep.* **14**, 1297–301 (2016).
 16. Leskov, I. L., Whitsett, J., Vasquez-Vivar, J. & Stokes, K. Y. NAD(P)H oxidase and eNOS play differential roles in cytomegalovirus infection-induced microvascular dysfunction. *Free Radic. Biol. Med.* **51**, 2300–2308 (2011).
 17. Batwa, S. A. *et al.* Prevalence of cytomegalovirus, and its effect on the expression of inducible and endothelial nitric oxide synthases in Fallopian tubes collected from women with and without ectopic pregnancy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **35**, 103–110 (2016).
 18. Gombos, R. B. & Hemmings, D. G. Differential effects on nitric oxide-mediated vasodilation in mesenteric and uterine arteries from

- cytomegalovirus-infected mice. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **299**, H1124–H1134 (2010).
19. Assinger, A. *et al.* Human cytomegalovirus-platelet interaction triggers toll-like receptor 2-dependent proinflammatory and proangiogenic responses. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34**, (2014).
 20. Hayakawa, M. Management of disseminated intravascular coagulation: Current insights on antithrombin and thrombomodulin treatments. *Open Access Emerg. Med.* **10**, (2018).
 21. Tsao, C.-M., Ho, S.-T. & Wu, C.-C. Coagulation abnormalities in sepsis. *Acta Anaesthesiol. Taiwanica* **53**, 16–22 (2015).
 22. Ceccarelli, M., Venanzi Rullo, E. & Nunnari, G. Risk factors of venous thrombo-embolism during cytomegalovirus infection in immunocompetent individuals. A systematic review. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **37**, 381–390 (2018).
 23. Rojas, J. M., Avia, M., Martín, V. & Sevilla, N. IL-10: A Multifunctional Cytokine in Viral Infections. *J. Immunol. Res.* **2017**, 1–14 (2017).
 24. Mason, G. M. *et al.* Human cytomegalovirus latency-associated proteins elicit immune-suppressive IL-10 producing CD4⁺ T cells. *PLoS Pathog.* **9**, e1003635 (2013).
 25. Sinuani, I., Beberashvili, I., Averbukh, Z. & Sandbank, J. Role of IL-10 in the progression of kidney disease. *World J. Transplant.* **3**, 91 (2013).
 26. Jackson, S. E., Sedikides, G. X., Mason, G. M., Okecha, G. & Wills, M. R. Human Cytomegalovirus (HCMV)-Specific CD4⁺ T Cells Are Polyfunctional

and Can Respond to HCMV-Infected Dendritic Cells In Vitro. *J. Virol.* **91**, (2017).

27. Herbein, G. The Human Cytomegalovirus, from Oncomodulation to Oncogenesis. *Viruses* **10**, 408 (2018).
28. Picarda, G. & Benedict, C. A. Cytomegalovirus: Shape-Shifting the Immune System. *J. Immunol.* **200**, 3881–3889 (2018).
29. Conway-Morris, A., Wilson, J. & Shankar-Hari, M. Immune Activation in Sepsis. *Crit. Care Clin.* **34**, 29–42 (2018).

ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to thank the University Hospital of Londrina (HU-UEL) for their collaboration. This work was carried out with the support of the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES, Brazil) and *Conselho Nacional de Pesquisa* (CNPq, Brazil).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

TFS: study design, literature review, data collection and manuscript writing. VMC, FTP, MDG, BTSB: data collection and manuscript writing. ERT, LMYL, CMCG: data collection and study design. ANCS, MMMS, INC, WRP: text correction and organization. ICC: study design, text correction and organization.

COMPETING INTERESTS

The author(s) declare no competing interests.

TABLES

TABLE 1. Characteristics of 56 patients seven days after diagnosis of sepsis with or without cytomegalovirus reactivation.

Variables	All patients N=56	Non-Reactivated N=46	Reactivated N=10	p- value
Age (years) ^a	72 (52-81)	70 (50-83)	74 (69-78)	0.646
Gender ^b				1.000
Male	31 (55)	25 (54)	6 (60)	
Female	25 (45)	21 (46)	4 (40)	
Length of stay in hospital (dias) ^a	17 (13-30)	17 (14-30)	16 (11-34)	0.586
SOFA ^a	6 (4-10)	6 (3-9)	10 (7-11)	0.020
APACHE II ^a	20 (17-25)	20 (17-24)	25 (21-26)	0.124
Glasgow scale ^a	10 (7-15)	10 (7-15)	8 (3-8)	0.037
Sodium (mEq/dL) ^a	139 (136-142)	140 (136-143)	138 (136-141)	0.414
Potassium (mEq/dL) ^c	3.82±0.78	3.77±0.75	4.06±0.91	0.298
Serum bilirubin (mg/dL) ^a	0.4 (0.26-0.7)	0.5 (0.27-0.75)	0.39 (0.24-0.68)	0.656
WBC (mm ³) ^c	12833±6574	13163±6940	11345±4562	0.537
IL-6 (pg/mL) ^a	10.2 (5.7-19.3)	10.5 (5.8-19.4)	9.9 (5.5-35.2)	0.922
IL-17a (pg/mL) ^a	52.9 (35.5-61.5)	48.7 (32.6-61.6)	55.7 (46.4-62.7)	0.231
Septic shock ^b	35 (63)	26 (57)	9 (90)	0.012
28-days of mortality ^b	17 (30)	11 (24)	6 (60)	0.052
180-days of mortality ^b	32 (57)	24 (52)	8 (80)	0.161

SOFA - Sequential organ failure assessment

APACHE II - Acute physiology and chronic health evaluation II

WBC – White blood cells

IL- interleukin

^a Mann Whitney's U-test, data show as median (25th and 75th percentile)^b Fisher's exact test, absolute number (*n*) (percentage of the group)^c Student's t-test data show as mean±standart desviation

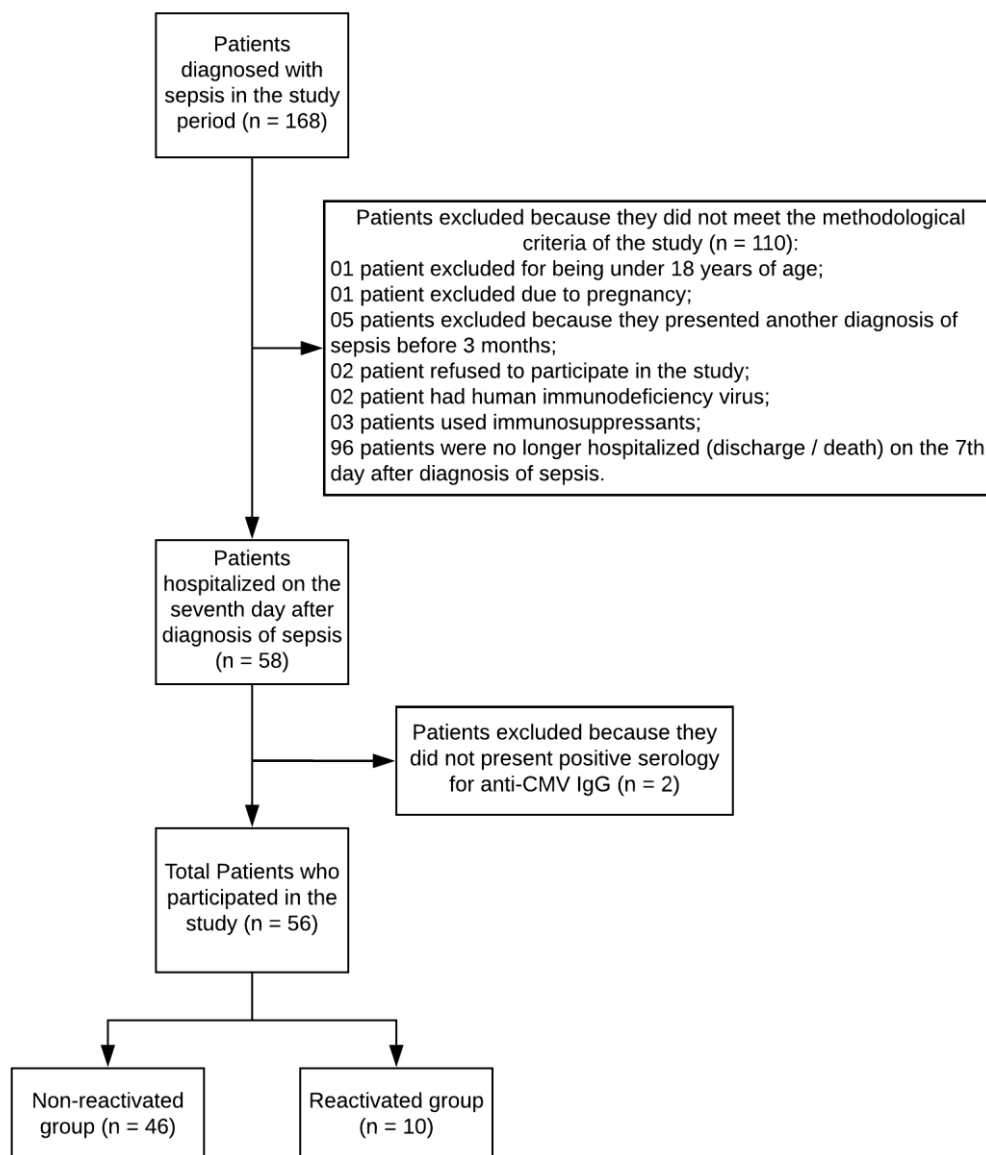
FIGURE LEGENDS

Figura 1. Methodological flow chart. Demonstration of patients excluded/included in the study and distribution of the groups evaluated.

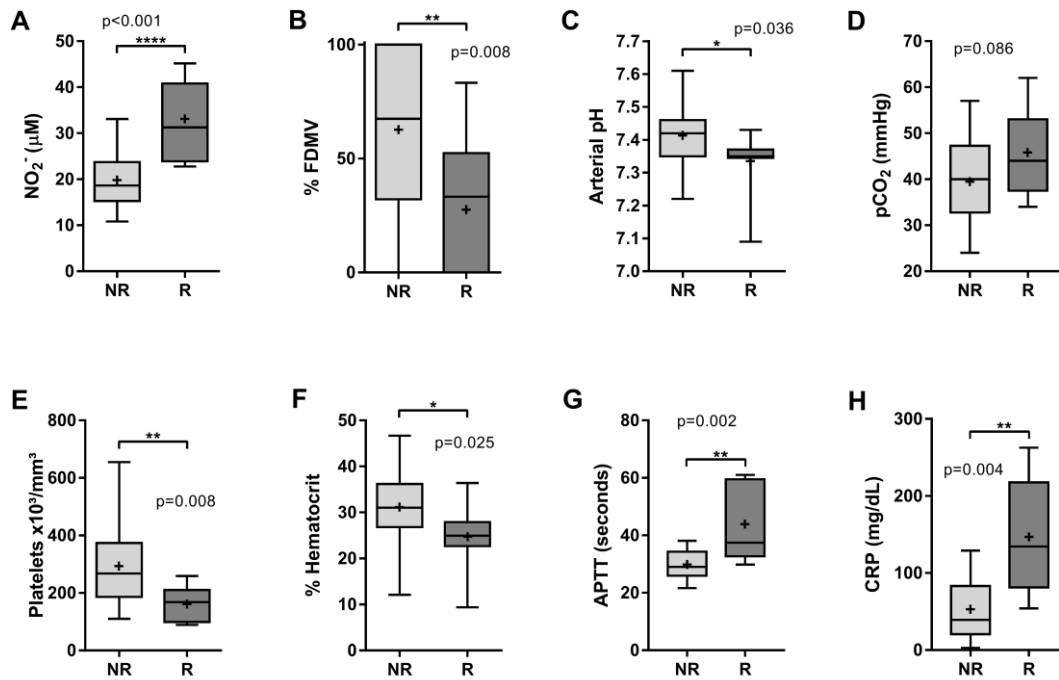


Figure 2. Analysis of clinical and laboratory changes related to CMV reactivation on the seventh day after diagnosis of sepsis. Non-reactivated group (NR). Reactivated group (R). *A*, levels of plasmatic NO. *B*, percentage of free days from mechanical ventilation (%FDMV). *C* and *D*, arterial pH and partial pressure of arterial carbon dioxide (pCO₂). *E*, counts of total platelets per cubic millimeter x10³. *F*, percentage of hematocrit in venous blood. *G*, activated partial thromboplastin time (APTT), and *H*, levels of serum C-reactive protein. All data were analyzed through Student's T test, except %FDMV and % hematocrit which were evaluated by Mann Whitney's U test. Data show as median at line and mean in +, with 25th and 75th percentile and bars represent the minimum and maximum values.

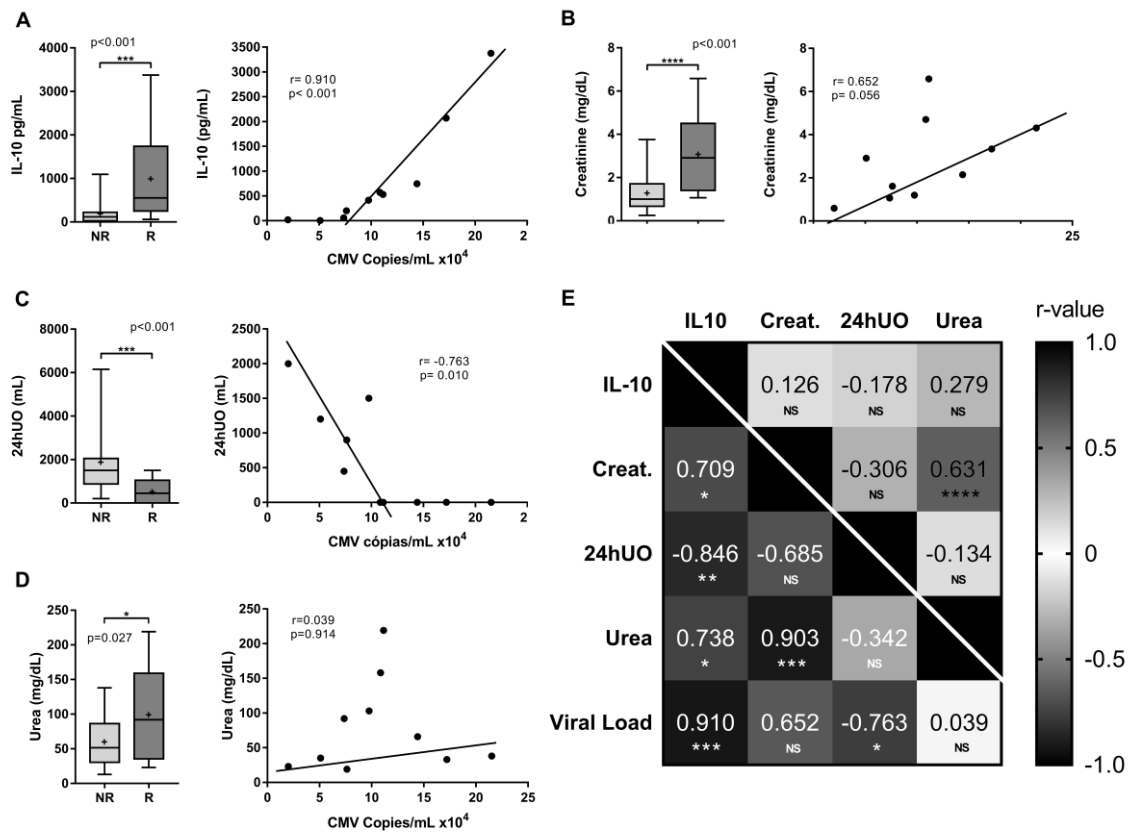


Figure 3. Effect of CMV reactivation on IL-10 levels and renal evaluation parameters. Non-reactivated (NR). Reactivated group (R). Comparison between the groups for plasma level of IL-10 (A), serum levels of creatinine (B), and urea (D), 24-hour urine output (24hUO) (C) and its correlation with viral load in the reactivated group. E, heat map of the r-value through correlation between the variables. Below the cut line are presented the values of the reactivated group and the values of the non-reactivated group, p-values were categorized through NS (p > 0.05); * (p ≤ 0.05); ** (p ≤ 0.01); *** (p ≤ 0.001); **** (p ≤ 0.0001). All data were assessed through Student's T test and Pearson's correlation. Data show as median at line and mean in +, with 25th and 75th percentile and bars represent the minimum and maximum values.

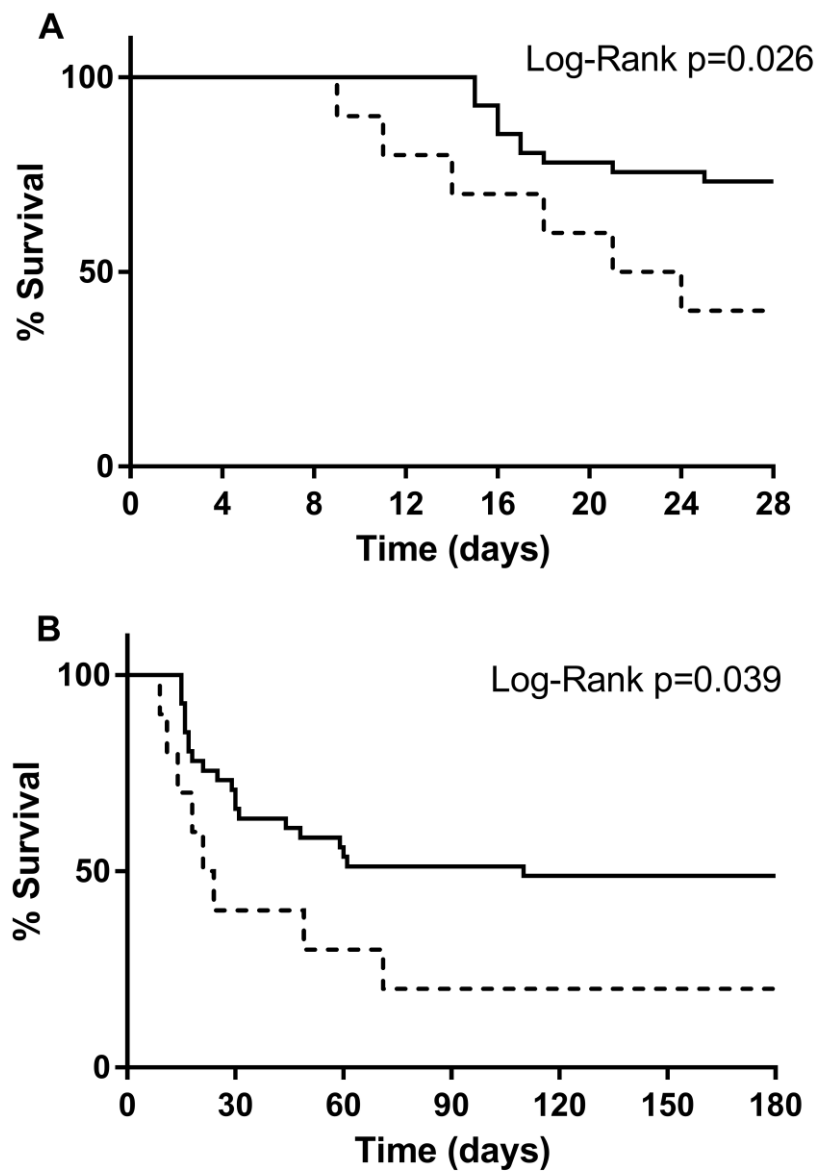


Figure 4. Survival curves among septic patients with or without CMV reactivation. *A and B*, Kaplan-Meier survival analysis (p-value through Log-Rank) comparing septic patients with (dashed line) or without (continuous line) CMV reactivation. *A*, 28-day mortality. *B*, 180-day mortality.

5. CONCLUSÃO

Em nosso estudo foi demonstrado que pacientes sépticos com reativação do citomegalovírus apresentaram um pior prognóstico clínico com redução do nível de consciência, maior gravidade de disfunção orgânica e aumento da necessidade de ventilação mecânica. O grupo reativado ainda apresentou uma maior incidência de choque séptico.

A reativação do CMV pode aumentar as taxas de mortalidade entre pacientes com sepse, especialmente nas primeiras semanas pós-reativação, e nossos dados sugerem que IL-10 e NO possam estar envolvidos neste processo. O aumento significativo de metabólitos de óxido nítrico, redução do pH arterial e dias livres de ventilação mecânica indicam que o CMV pode estar relacionado a um quadro de insuficiência respiratória na sepse. A redução da contagem total de plaquetas e porcentagem de hematócrito, bem como aumento no tempo de tromboplastina parcial ativada são indicativos de alterações do sistema de coagulação relacionados a reativação do vírus.

O aumento nos níveis plasmáticos de IL-10 durante a reativação se correlacionou com a carga viral, aumento nos níveis séricos de creatinina e ureia e redução do débito urinário de 24 horas, indicando um papel da IL-10 mediada pelo CMV na insuficiência renal presente na sepse. Deste modo, o desenvolvimento de uma melhor compreensão da reativação do CMV na sepse e possíveis novas estratégias para preveni-lo pode contribuir significativamente para o desfecho clínico destes pacientes.

6. ANEXOS

6.1. Anexo 1. Sequential organ failure assessment (SOFA)

Table 1. Sequential [Sepsis-Related] Organ Failure Assessment Score^a

System	Score				
	0	1	2	3	4
Respiration					
PaO ₂ /Fio ₂ , mm Hg (kPa)	≥400 (53.3)	<400 (53.3)	<300 (40)	<200 (26.7) with respiratory support	<100 (13.3) with respiratory support
Coagulation					
Platelets, ×10 ³ /μL	≥150	<150	<100	<50	<20
Liver					
Bilirubin, mg/dL (μmol/L)	<1.2 (20)	1.2-1.9 (20-32)	2.0-5.9 (33-101)	6.0-11.9 (102-204)	>12.0 (204)
Cardiovascular	MAP ≥70 mm Hg	MAP <70 mm Hg	Dopamine <5 or dobutamine (any dose) ^b	Dopamine 5.1-15 or epinephrine ≤0.1 or norepinephrine ≤0.1 ^b	Dopamine >15 or epinephrine >0.1 or norepinephrine >0.1 ^b
Central nervous system					
Glasgow Coma Scale score ^c	15	13-14	10-12	6-9	<6
Renal					
Creatinine, mg/dL (μmol/L)	<1.2 (110)	1.2-1.9 (110-170)	2.0-3.4 (171-299)	3.5-4.9 (300-440)	>5.0 (440)
Urine output, mL/d				<500	<200

Abbreviations: Fio₂, fraction of inspired oxygen; MAP, mean arterial pressure; PaO₂, partial pressure of oxygen.
^a Adapted from Vincent et al.²⁷
^b Catecholamine doses are given as μg/kg/min for at least 1 hour.
^c Glasgow Coma Scale scores range from 3-15; higher score indicates better neurological function.

6.2. Anexo 2. Parecer do CEP-UEL



Comitê de Ética em
Pesquisa Envolvendo
Seres Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da reativação do Citomegalovírus em pacientes com sepse internados em Unidades de Terapia Intensiva

Pesquisador: Ivete Conchon Costa

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 61406216.4.0000.5231

Instituição Proponente: CCB - Departamento de Ciências Patológicas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.816.130

Apresentação do Projeto:

A reativação do vírus tem sido amplamente associada à sepse bacteriana e provavelmente resulta do processo inflamatório e do comprometimento temporário do sistema imune, induzindo respostas exageradas a infecções graves que podem ser prejudiciais ao hospedeiro. Assim, a sepse bacteriana tem sido identificada como um fator de risco para a reativação de CMV em populações heterogêneas que se encontram em estado crítico de saúde.

É uma pesquisa a ser realizada em pacientes críticos em unidade de terapia intensiva, nos quais serão coletadas amostras de sangue para verificação de soropositividade, titulação de anticorpos IgM e IgG, presença de antígeno pp65 em leucócitos do sangue periférico, níveis de citocinas e análise de carga viral. Serão avaliadas também as características clínicas dos pacientes

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Analisar os principais aspectos fisiopatológicos associados à reativação do CMV em paciente com quadro de sepse bacteriana internados em UTI.

Objetivo Secundário:

1. Avaliar a sorologia e a reativação do CMV em paciente com sepse bacteriana em estado grave.
2. Correlacionar às taxas de expressão de algumas das principais citocinas presentes durante os

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br



Comitê de Ética em
Pesquisa Envolvendo
Serres Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 1.816.130

eventos de sepse bacteriana e reativação de CMV destes pacientes.

3. Estabelecer um perfil de morbidade e mortalidade que articule o quadro de sepse bacteriana com a reativação de CMV, considerando-se os principais agravos no âmbito das unidades de terapia intensiva.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Embora mínimos, os riscos relacionam-se à punção para coleta de sangue.

Benefícios: A análise da reativação de citomegalovírus em pacientes com sepse pode trazer uma maior compreensão sobre a cinética e a correlação entre esses dois eventos biológicos. Os dados também poderão ser usados pela equipe médica para avaliar o quadro patológico destes pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante, bem delineada e estruturada.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto: Ok, assinada por vice-chefe depto ciencias patologicas do CCB

TCLE está adequado no conteúdo e na forma de comunicação adequada à população leiga

Há autorização da direção superintendente do HU.

cronograma adequado

Orçamento está em cerca de 25 mil reais em materiais e equipamentos já disponíveis no laboratório.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_796938.pdf	26/10/2016 14:48:54		Aceito
Folha de Rosto	FolhaRosto.pdf	26/10/2016 14:47:23	TAYLON FELIPE SILVA	Aceito

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Telefone: (43)3371-5455

CEP: 86.057-970

Município: LONDRINA

E-mail: cep268@uel.br



Comitê de Ética em
Pesquisa Envolvendo
Serres Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 1.816.130

Declaração de Pesquisadores	TermoSigilo.pdf	26/10/2016 14:46:36	TAYLON FELIPE SILVA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao.pdf	26/10/2016 14:45:37	TAYLON FELIPE SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	26/10/2016 14:45:15	TAYLON FELIPE SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	26/10/2016 14:44:57	TAYLON FELIPE SILVA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Parecer.pdf	26/10/2016 14:25:58	TAYLON FELIPE SILVA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

LONDRINA, 10 de Novembro de 2016

**Assinado por:
Rosana Lopes
(Coordenador)**

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br