Jussara Bianchi Castelli

**Diagnóstico de vírus por
microscopia eletrônica em urina de
pacientes com hematúria / cistite
hemorrágica após transplante de
medula óssea: associação com
aspectos clínicos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Medicina.

Área de concentração: Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes Higuchi

**São Paulo
2000**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Castelli, Jussara Bianchi

Diagnóstico de vírus por microscopia eletrônica em urina de pacientes com hematúria/cistite hemorrágica após transplante de medula óssea : associação com aspectos clínicos / Jussara Bianchi Castelli. – São Paulo, 2000.

Tese(doutorado)—Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Patologia.

Área de concentração: Patologia.

Orientadora: Maria de Lourdes Higuchi.

Descritores: 1.MICROSCOPIA ELETRÔNICA/métodos 2.CISTITE/virologia 3. HEMATÚRIA/virologia 4. TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA/efeitos adversos 5. DOENÇA ENXERTO-HOSPEDEIRO/complicações 6. INFECÇÕES POR ADENOVIRIDAE/diagnóstico 7. INFECÇÕES POR PAPOVAVIRIDAE/diagnóstico

USP/FM/SBD-220/00

DEDICATÓRIA

Ao Valter, Lunia e Gabriel.

*À minha mãe e irmãs, Wally,
Joara e Janaína.*

AGRADECIMENTOS

À **Fundação EJ Zerbini** e à **FAPESP** - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de SP(processo 98/08474-0) pelo apoio na realização deste trabalho.

À **Profa. Dra. Maria de Lourdes Higuchi**, orientadora desta tese, pela amizade e apoio no desenvolvimento do meu trabalho na equipe de Transplante de Medula Óssea e por muitos outros ensinamentos ao longo de tantos anos de convivência no Laboratório de Anatomia Patológica do InCor-HCFMUSP.

Ao **Prof. Dr. Frederico Luiz Dulley**, empreendedor incansável na luta pelo Programa de Transplante de Medula Óssea do Instituto do Coração HCFMUSP, Fundação Pró Sangue Hemocentro de São Paulo e Disciplina de Hematologia e Hemoterapia da FMUSP, que me acolheu e muito tem me incentivado na equipe de transplante de medula óssea.

Ao **Prof. Dr Adib Domingos Jatene**, que sigo como exemplo de luta e dedicação ao trabalho, pelo apoio inicial ao meu desempenho e aperfeiçoamento na equipe de Transplante de Medula Óssea, propiciando meu estágio de aprendizagem em Seattle.

Ao **Prof. Dr Antonio Sesso, Profa. Dra. Maria Irma Seixas Duarte, Profa. Dra. Carmen Lúcia Penteado Lancellotti, e Dra Yara Menezes**, pelos ensinamentos de microscopia eletrônica, sugestões e apoio no início deste trabalho.

Aos meus queridos amigos e companheiros de todos os dias no Laboratório de Anatomia Patológica do InCor-HCFMUSP, **Dr Luiz Alberto Benvenuti, Dra Glacy Sabra Vieira, Dra Léa Maria Macruz Ferreira Demarchi, Dr Mauro Canzian**, pelo seu apoio e trabalho para preencher minha ausência e, em especial à **Dra Vera Demarchi Aiello e Dr Paulo Sampaio Gutierrez**, do mesmo laboratório, bem como ao meu marido, **Dr Valter Castelli Júnior**, pela inestimável contribuição com suas experientes sugestões.

À **Dra Hatune Tanaka**, **Dra Marli Ueda** e **Dr Jonas José Kisielius**, da seção de Microscopia Eletrônica do Instituto Adolfo Lutz, pela imensa e prestimosa colaboração e ensinamentos neste trabalho.

Aos queridos amigos da equipe clínica do Transplante de Medula Óssea, **Dra Rosaura Saboya**, **Dr Roberto Luiz da Silva**, **Dr Ronald Sérgio Pallotta Filho**, em especial à **Dra Maria Cristina M. de Almeida Macedo** e principalmente ao **Dr Hélio Alvimar Lotério**, pela amizade e colaboração direta com dados clínicos e importantes sugestões.

À **Dra Clarisse Martins Machado**, infectologista da equipe do Transplante de Medula Óssea e do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, querida amiga e profissional ímpar, pela amizade, colaboração e valiosas sugestões.

Ao meu saudoso e inesquecível amigo **Dr Edmilson Zambon**.

Ao **Prof. Dr Pedro Enrique Dorlhiac-Llacer**, Diretor Técnico - Científico da Fundação Pró Sangue Hemocentro de São Paulo, pelas preciosas orientações para o aprimoramento deste trabalho.

À bióloga do Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical, **Lucy Santos Vilas Boas**, pelo carinho e imensa colaboração com os dados das culturas virais.

Aos biólogos do Setor de Microscopia Eletrônica, Histopatologia e Imunopatologia do Laboratório de Anatomia Patológica do InCor-HCFMUSP, **Nadia Vieira Sambiase**, **Márcia Martins Reis**, **Júlia Maria Lúcia La Chioma Silvestre**, **Márcio José Figueira Chaves**, **Suely Aparecida Pinheiro Palomino**, pela sua colaboração em diferentes etapas do processamento do material e imunocitoquímica, e em especial à **Shizie Fukasawa**, pela amizade, responsabilidade, dedicada competência e fundamental atuação para a realização deste trabalho.

Aos queridos amigos da enfermagem e secretaria do Transplante de Medula Óssea, **Beatriz Bahia Diomede, Meluzina Gama, Fernanda Almeida Bianchi, Nilda Rodrigues da Silva e José da Aparecida Gomes** (“Mirandinha”), e em especial à **Isamara Flores da Rocha**, pelo relacionamento carinhoso e dedicado, competência e qualidade no atendimento aos doentes e imensa colaboração neste trabalho, registrando e organizando dados e coletando material.

Aos funcionários e amigos do Laboratório de Anatomia Patológica do InCor-HCFMUSP, **Solange Aparecida Consorti, Gerson Lilá Ramos, Adriana Psota, Fátima Aparecida Batista Curto, Mary Penha Pereira, Antonio José Vicente Guedes e Joana Pereira Araújo**, que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

Ao amigo **Edson da Silva Palagi**, pela imensa colaboração e ensinamentos de computação e confecção do banco de dados.

Ao **Dr Peter Böhringer** que, sem saber, inspirou o motivo desta pesquisa.

À **Dra Maria do Rosário Dias Latorre**, epidemiologista da Faculdade de Saúde Pública da USP, pela orientação e ensinamentos na análise estatística deste trabalho.

À querida amiga **Rute Miwa Tomida**, pela disponibilidade e incansável ajuda na diagramação e confecção final deste trabalho.

À **Liduvina da Silva Neta Barros** pela precisa e prestativa orientação em todos os prazos e etapas a cumprir nesta jornada da pós-graduação.

A todos os **pacientes** do transplante de medula óssea, motivo de nosso estudo, empenho e luta, para melhoria na compreensão das doenças e no atendimento aos doentes.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas e Gráficos

Resumo

Summary

1- Introdução.....	1
1.1- Considerações gerais sobre a hematúria / cistite hemorrágica (H/CH) no pós- transplante de medula óssea.....	2
1.2- A microscopia eletrônica (ME) no diagnóstico de vírus.....	5
1.3- As drogas do regime de condicionamento e a H/CH.....	7
1.4- A doença enxerto-contra-hospedeiro (DECH) e a H/CH.....	9
1.5- Os vírus e a H/CH.....	11
2- Objetivos.....	13
3- Casuística e métodos	16
3.1- Casuística.....	17
3.1.1- Grupo de estudo (pacientes com H/CH – n=72).....	17
3.1.2- Grupo controle (pacientes sem H/CH – n=12).....	19
3.1.3- Esclarecimentos, definições e agrupamentos utilizados.....	21
3.2- Métodos.....	25
3.2.1- Análise citológica por microscopia de luz	25
3.2.2- Técnica de microscopia eletrônica de transmissão em corte ultrafino (ME).....	26
3.2.3- Técnica de imunocitoquímica (ICQ).....	27

3.2.4- Técnica de cultura viral.....	28
3.3- Estudo estatístico	29
4- Resultados.....	30
4.1- Avaliação do material pelo exame citológico.....	31
4.2- Tipo e freqüência de vírus detectados pela microscopia eletrônica	32
4.3- Fatores associados à manifestação da H/CH	48
4.4- Fatores associados a presença de vírus no grupo com H/CH.....	50
4.5- Associação da manifestação da DECH e o grau de gravidade da H/CH	55
4.6- Achados das demais técnicas de pesquisa viral — imunocito- química e cultura — junto à ME no grupo de estudo.....	57
5- Discussão.....	61
5.1- A incidência da H/CH.....	62
5.2- O condicionamento utilizado.....	62
5.3- Utilização da ME na detecção viral	64
5.4- A H/CH, os vírus e fatores associados.....	66
6- Conclusões.....	71
7- Anexos.....	74
8- Referências Bibliográficas.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS

AAG	Anemia aplástica grave
ADV	Adenovírus
BK	Poliomavírus BK
BU	Bussulfano
CIC	Ciclofosfamida
CMV	Citomegalovírus
DECH	Doença enxerto-contra-hospedeiro
H/CH	Hematúria / cistite hemorrágica
HLA	Antígenos leucocitários humanos
InCor	Instituto do Coração do HCFMUSP
JC	Poliomavírus JC
LLA	Leucemia linfóide aguda
LMA	Leucemia mielóide aguda
LMC	Leucemia mielóide crônica
LNH	Linfoma não-Hodgkin
MEL	Melfalano
nm	Nanômetro (10^{-9}m)
SMD	Síndrome mielodisplástica
TBI	Irradiação corporal total
TMO	Transplante de medula óssea
<	Menor que
>	Maior que

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 Foto da microscopia eletrônica de célula infectada por vírus da família <i>Poliomaviridae</i> (19.200X).....	34
FIGURA 2 Foto da microscopia eletrônica de célula infectada por vírus da família <i>Poliomaviridae</i> (192.400X).....	35
FIGURA 3 Foto da microscopia eletrônica de célula infectada por vírus da família <i>Poliomaviridae</i> (24.400X).....	36
FIGURA 4 Foto da microscopia eletrônica de célula infectada por vírus da família <i>Poliomaviridae</i> (148.000X).....	37
FIGURA 5 Foto da microscopia eletrônica de célula infectada por vírus da família <i>Poliomaviridae</i> (40.700X).....	38
FIGURA 6 Foto da microscopia eletrônica de célula infectada por vírus da família <i>Poliomaviridae</i> (31.000X).....	39
FIGURA 7 Foto da microscopia eletrônica de célula infectada por vírus da família <i>Poliomaviridae</i> (74.000X).....	40
FIGURA 8 Foto da microscopia eletrônica de célula infectada por vírus da família <i>Adenoviridae</i> (19.200X).....	41
FIGURA 9 Foto da microscopia eletrônica de célula infectada por vírus da família <i>Adenoviridae</i> (40.700X).....	42
FIGURA 10 Foto da microscopia eletrônica de célula infectada por vírus da família <i>Adenoviridae</i> (192.400X).....	43
FIGURA 11 Foto da microscopia eletrônica de célula infectada por vírus da família <i>Adenoviridae</i> (40.700X).....	44
FIGURA 12 Foto da microscopia eletrônica de célula infectada por vírus da família <i>Adenoviridae</i> (53.200X).....	45
FIGURA 13 Foto da microscopia eletrônica de célula infectada por vírus da família <i>Adenoviridae</i> (192.400X).....	46
FIGURA 14 Foto da microscopia eletrônica de célula infectada por vírus da família <i>Adenoviridae</i> (53.200X).....	47

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

	Página
TABELA 1 Características dos pacientes manifestando hematúria / cistite hemorrágica (H/CH) no pós-TMO em comparação com o grupo sem H/CH (controle)..	49
TABELA 2 Análise univariada dos fatores associados à presença de vírus detectado na urina pela microscopia eletrônica.....	51
TABELA 3 Análise múltipla dos fatores associados à presença de vírus detectado na urina pela microscopia eletrônica.....	54
TABELA 4 Associação entre a doença enxerto-contrahospedeiro (DECH) e o grau da hematúria / cistite hemorrágica (H/CH).....	55
TABELA 5 Resultado das três técnicas de detecção viral (microscopia eletrônica, imunocitoquímica e cultura) utilizadas nos pacientes apresentando hematúria / cistite hemorrágica.....	59
GRÁFICO 1 Distribuição dos pacientes segundo a duração da hematúria / cistite hemorrágica e a positividade viral	52
GRÁFICO 2 Distribuição dos pacientes segundo a positividade viral na microscopia eletrônica e o dia + pós-TMO..	53

RESUMO

CASTELLI, J.B. Diagnóstico de vírus por microscopia eletrônica em urina de pacientes com hematúria/cistite hemorrágica após o transplante de medula óssea: associação com aspectos clínicos.

Pacientes submetidos ao transplante de medula óssea, apresentando hematúria/cistite hemorrágica, tiveram amostras de urina analisadas pela microscopia eletrônica. Esta foi a técnica escolhida de pesquisa viral pela sua confiabilidade. Noventa em 402 pacientes submetidos ao transplante de medula óssea neste serviço apresentaram hematúria/cistite hemorrágica (incidência de 22%). O estudo por microscopia eletrônica foi realizado em 72 destes pacientes com hematúria/cistite hemorrágica (grupo de estudo), identificando 55,6% (40/72) de positividade viral. Foram também estudadas amostras de urina de 12 pacientes submetidos ao transplante de medula óssea sem hematúria/cistite hemorrágica (grupo controle); houve associação significativa entre a presença de vírus e hematúria/cistite hemorrágica ($p < 0,01$ – Teste exato de Fisher). No grupo com hematúria/cistite hemorrágica, 65% (26/40) dos vírus detectados pertenciam à família *Poliomaviridae*, 30% (12/40) à *Adenoviridae*, e 5% (2/40) foram positivos para ambas as famílias. Houve associação entre a positividade para vírus e a presença da doença enxerto-contra-hospedeiro ($p = 0,05 - \chi^2$) e o de início tardio ($> \text{dia} + 21$) da H/CH ($P = 0,04 - \chi^2$), bem como entre a doença enxerto-contra-hospedeiro e a severidade da H/CH ($p = 0,04 - \chi^2$). O presente estudo mostra que a microscopia eletrônica é uma ferramenta útil para detecção de vírus na urina de pacientes submetidos ao transplante de medula óssea apresentando hematúria/cistite hemorrágica e que o vírus provavelmente tem um papel no desenvolvimento do sangramento urinário, o qual é agravado pelo doença enxerto-contra-hospedeiro. A microscopia eletrônica deveria ser realizada rotineiramente para guiar as outras técnicas de detecção viral, como a imunocitoquímica e biologia molecular.

SUMMARY

CASTELLI, J.B. Electron microscopic viral diagnosis in urine of patients with hematuria/hemorrhagic cystitis after bone marrow transplantation: association with clinical aspects.

Patients submitted to bone marrow transplantation presenting hematuria/hemorrhagic cystitis had the urine analyzed by electron microscopy. It was the elected technique for viral search because its reliability. Ninety from 402 patients submitted to bone marrow transplantation at this service showed hematuria/hemorrhagic cystitis (incidence of 22%). Electron microscopy study was performed in 72 of these patients with hematuria/hemorrhagic cystitis (study group), identifying 55,5% (40/72) of viral positivity. It was also study the urine of 12 patients submitted to bone marrow transplantation without hematuria/hemorrhagic cystitis (control group); there was a significant association between the presence of virus and hematuria/hemorrhagic cystitis ($p < 0,01$). In the hematuria/hemorrhagic cystitis group, 65% (26/40) of the virus belonged to *Poliomaviridae* family, 30%(12/40) to *Adenoviridae*, and 5% (2/40) to both families. There was association between the status of graft-versus-host disease and positivity for virus ($p = 0,05$), as well as between graft-versus-host disease and the severity of hematuria/hemorrhagic cystitis ($p = 0,04$). The present study shows that electron microscopy is a useful tool for detection of virus in urine of patients submitted to bone marrow transplantation presenting hematuria/hemorrhagic cystitis and that the virus probably play a role in the development of the urinary bleeding, which is aggravated by graft-versus-host disease. Electron microscopy should be performed routinely to guide the other techniques for viral detection, like immunocitochemistry and molecular biology.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A HEMATÚRIA/CISTITE HEMORRÁGICA NO PÓS-TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA

Pacientes submetidos ao transplante de medula óssea (TMO), como modalidade terapêutica visando à cura de doenças neoplásicas (hematológicas ou não) e não-neoplásicas, por vezes manifestam hematúria/cistite hemorrágica (H/CH) durante a evolução hospitalar ou tardia.

A H/CH pós-TMO é caracterizada por hematúria não glomerular, com um espectro que vai desde uma apresentação microscópica (mais de 10 glóbulos vermelhos por campo de grande aumento no exame de urina), até a apresentação macroscópica, acompanhada ou não de disúria, eliminação de coágulos e desconforto e/ou dor em pelve ou baixo ventre. Certos pacientes manifestam formas graves com intenso sangramento do trato urinário e formação de coágulos em grande quantidade, levando a quadros de obstrução em qualquer ponto das vias urinárias, acompanhados de insuficiência renal aguda, instabilidade hemodinâmica, queda de hematócrito, havendo inclusive a necessidade eventual de intervenção cirúrgica para corrigir e/ou aliviar o quadro obstrutivo.

A opção pelo termo hematúria/ cistite hemorrágica neste presente trabalho, diferente da literatura que se refere a esta condição clínica apenas como cistite hemorrágica, é baseada em observações de autópsia onde constata-se que apesar de a bexiga, pela sua função de reservatório, sofrer

mais agressões e por isso ser o sítio principal de sangramento, o restante do trato urinário superior, em maior ou menor grau, também apresenta sangramento da mucosa, desde os cálices e pelve renal, fato este também observado por outros autores ⁽²⁹⁾.

A frequência da H/CH pós-TMO varia de 6,5 a 68% nos diferentes relatos na literatura ^(9,15,56,78). Esta complicação aumenta os requerimentos de derivados sangüíneos e dias de hospitalização após o transplante ^(65,66,67) e, às vezes, coloca em risco a vida de pacientes submetidos ao TMO ^(46,66,78,81).

Três fatores têm sido implicados no desenvolvimento da H/CH, sendo eles: as drogas utilizadas no regime de condicionamento preparatório para o transplante medular ^(15,67,78); a doença enxerto-contrá-hospedeiro (DECH) (nome oriundo do termo em inglês “graft-versus-host disease” ou GVHD, como é corriqueiramente mencionado) ^(58,62,65); e infecções virais do trato urinário ^(2,4,5,11,23,35,44,83).

A H/CH tem sido principalmente referida como efeito colateral da ciclofosfamida (antimitótico alquilante do grupo das mostardas nitrogenadas) e do bussulfano (antimitótico alquilante do grupo dos sulfonatos alquílicos) ^(6,10,13,15,46,65,67,78), drogas usadas no regime de condicionamento para o TMO e algumas vezes também para o tratamento prévio da doença de base ⁽⁷⁸⁾. Entretanto, a despeito dos protocolos de profilaxia, tais como a hiperhidratação, irrigação vesical contínua e administração da droga 2-mercaptoetano de sulfonato de sódio (“mesna”) (droga que se liga à acroleína, inativando-a), a H/CH não é bloqueada e permanece como um

problema sério do pós-TMO ^(7,30,31,68,81). Além disso, na H/CH de início tardio a ação das drogas do condicionamento não explica adequadamente seu aparecimento pela falta de relação temporal com o uso destas. A etiologia viral poderia ser uma possível explicação, porém esse fator não tem sido bem avaliado. A maioria dos estudos têm focado basicamente a influência das drogas, sem uma vigilância sistemática para infecção viral, ou então esta é feita geralmente apenas com cultura de vírus ^(6,10,30,46,65,66,67,78).

A DECH também tem sido apontada como possível agente causador da H/CH devido ao fato de que reconhecidamente causa dano epitelial. Foi mostrada previamente esta associação com a H/CH ^(57,58), além de ter sido também demonstrado que a H/CH é mais freqüente após o TMO alogênico do que após o transplante autoplástico ^(4,10,66,84). Todavia, alguns estudos têm encontrado resultados diferentes nessa análise, não se constatando tal associação entre DECH e H/CH ^(18,23,41,66).

Com respeito aos vírus, o adenovírus e o poliomavírus (um dos dois gêneros da família viral *Papovaviridae*, agora separado na família *Poliomaviridae*) são os que mais têm sido relatados como possivelmente relacionados à ocorrência da H/CH ^(2,3,4,5,22,23,55,69) mas não há um consenso sobre isso ^(8,11,12,20,25,62). Alguns estudos demonstram a excreção de poliomavírus (a espécie BK) em torno de 50% dos pacientes após o TMO, mas a H/CH desenvolve-se somente em 25% destes casos ^(5,8,20). A reativação do adenovírus também ocorre no pós-TMO, mas é relatado como raro patógeno na H/CH (0 a 5% dos pacientes) ⁽²³⁾. Outros investigadores não encontram resultados que suportem a etiologia viral da H/CH no pós-

TMO ⁽²⁵⁾. Parte desta discrepância pode ser explicada pelas diferentes definições de H/CH e técnicas de pesquisa viral.

Apesar do relativo alto número de trabalhos nesta matéria, o real significado da presença de vírus na urina de pacientes com a manifestação de H/CH no pós-TMO não está ainda bem definido. A principal dificuldade é determinar precisamente sua ocorrência pelos métodos convencionais de vigilância viral, tais como a cultura viral de rotina. O crescimento de vírus da família *Poliomaviridae*, um dos principais implicados no surgimento da H/CH, é extremamente difícil nas culturas de rotina ^(5,8,33,37).

1.2 - A MICROSCOPIA ELETRÔNICA NO DIAGNÓSTICO DE VÍRUS

A microscopia eletrônica (ME) é uma técnica que permite confirmar a presença de vírus, através de sua visualização direta e reconhecimento morfológico. Com esta técnica é possível uma análise inicial do material para detecção de vírus eventualmente envolvidos na ocorrência da H/CH, qualquer que seja seu tipo. Um outro aspecto positivo é que a pesquisa viral pela ME de corte ultrafino nos permite o diagnóstico de vírus presentes em escassa quantidade na amostra, sem o risco de estarmos dando diagnóstico falso positivo que técnicas indiretas de identificação viral podem dar. Além disso nos dá conhecimento de como o vírus está infectando a célula, sua

localização, sítio de montagem e como está destruindo as células do uroepitélio.

A ME tem permitido identificar vírus e colocá-los em grupos bem definidos de acordo com sua morfologia, tamanho e simetria geral ^(26,32,33,37,38,49). Técnicas indiretas como imunoperoxidase e hibridização *in situ* são sujeitas a resultados falso-negativos ou falso-positivos, dependendo de vários detalhes técnicos que alteram a sensibilidade do método ou levam à impregnação de fundo no material em análise. Um problema do uso da ME é a análise de um menor volume de células, o que pode ser otimizado em fluidos orgânicos utilizando-se centrifugados para obter material mais concentrado.

Assim, a ME está em uso corrente como uma ferramenta importante para a detecção rápida de certos grupos de vírus, podendo servir como guia que pode ser complementado com as outras técnicas de diagnóstico viral mais específico. Além disso, representa forma valiosa de detecção de vírus de difícil cultivo ou não cultiváveis, como é o caso dos vírus da família *Poliomaviridae* ⁽³³⁾.

1.3 - AS DROGAS DO REGIME DE CONDICIONAMENTO E A HEMATÚRIA/ CISTITE HEMORRÁGICA

Drogas quimioterápicas, associadas ou não à irradiação corporal total (TBI), são ministradas ao receptor de TMO nos dias prévios à infusão da medula óssea do doador, o que ocorre no dia convencionado como dia zero do transplante. O regime de condicionamento para anemia aplástica grave (AAG) é o mais brando, empregado em dosagens menores com objetivo de fazer a ablação só do sistema imune do receptor, de tal forma que a medula não possa ser rejeitada. No caso das neoplasias, atinge até mesmo níveis letais para que as células tumorais sejam eliminadas, ou melhor, para que seja erradicado o clone celular maligno.

A ciclofosfamida (CIC), com e sem a associação da TBI, compôs os primeiros regimes “padrão” de condicionamento usados no transplante medular para AAG e leucemias, respectivamente ^(75,80). Enquanto este permanece o regime de condicionamento de escolha para a maioria dos pacientes com AAG, vários outros protocolos de preparação de leucemia para o TMO foram estudados subseqüentemente, tendo sido adicionados outros agentes terapêuticos a estes dois, tais como etoposídeo, citosina arabinosídeo e bussulfano ⁽⁴²⁾.

O metabolismo hepático da CIC produz vários componentes com propriedade alquilante, incluindo mostarda fosforamida e aldofosforamida. Um outro produto metabólico, acroleína, parece ser o maior causador de

H/CH, ao qual se atribui um efeito ulcerativo sobre o urotélio ^(17,42,46). A bexiga provavelmente é a mais acometida pelo maior tempo de contato com a acroleína. Entretanto, há relatos esporádicos de sangramento oriundo também do trato urinário superior (pelve renal e ureteres), inclusive com evolução fatal ⁽²⁹⁾.

A H/CH manifesta-se com hematúria de diferentes graus, freqüentemente associada a disúria ⁽⁵⁸⁾, sendo relatada após o regime de condicionamento, mas também mais tardiamente ^(42,64). Há resultados bastante variados com o emprego dos diferentes protocolos de prevenção ^(46,58).

Bussulfano (BU), outra droga também empregada no condicionamento, e em geral em substituição à TBI para evitar a necessidade de radioterapia, fator de risco para a toxicidade pulmonar (pneumonite intersticial) ^(6,9,61,67), é também possível causadora de H/CH ⁽⁴²⁾. Uma explicação para isto é que seria excretada na urina sem ser metabolizada, causando dano direto à mucosa, ou atingiria a parede vesical através da circulação normal ⁽⁶⁾.

Na maioria dos trabalhos relacionados às drogas empregadas no regime de condicionamento, a preocupação principal refere-se à sua eficácia em obter baixas taxas de recorrência da neoplasia de base e grau tolerável de toxicidade. A H/CH é incluída como um dos critérios para a avaliação da toxicidade do condicionamento, havendo ainda referências a diferentes protocolos de profilaxia e tratamento. Nestes trabalhos, são estes os focos

principais de interesse, não havendo uma procura sistemática e adequada de agentes virais.

1.4 - A DOENÇA ENXERTO-CONTRA-HOSPEDEIRO (DECH) E A HEMATÚRIA/CISTITE HEMORRÁGICA

A DECH é uma condição característica do transplante medular alogênico. Na forma dita aguda, até o dia +100 pós-TMO, é resultado da aloreatividade das células linfóides imunocompetentes do doador, enxertadas e estimuladas pelos aloantígenos localizados em células e tecidos do receptor. Nesta, os linfócitos T imunocompetentes presentes na medula infundida e proliferante do doador (as quais o receptor, tendo seu sistema imune destruído pelo condicionamento, não consegue eliminar), parecem ter o papel central na resposta imune contra as células do receptor. A DECH é assim uma condição sistêmica que, em maior ou menor grau, dependendo das diferenças genéticas entre doador e receptor, atua em diferentes sistemas, com agressão a epitélios e tecido linfóide ⁽⁷⁶⁾. Este fenômeno é comprovado em diferentes epitélios estudados, tais como pele, mucosa digestiva e ductos biliares, entre outros locais nos quais a ação da DECH é também presumida. Os três sítios mencionados são os principais utilizados para o estadiamento clínico da DECH, graduação importante para

o manejo terapêutico da imunossupressão. De acordo com o critério utilizado em Seattle ⁽⁷⁹⁾, centro de referência de TMO no mundo, o estadiamento clínico da DECH aguda, que considera extensão do comprometimento cutâneo, grau de sintomas digestivos (como volume de diarreia e alterações da função hepática) além do comprometimento do estado geral, varia de zero (0) a quatro (IV): Grau zero – ausência de GVHD; Grau I – leve; Grau II – moderada; Grau III – grave; Grau IV – gravidade extrema. A partir do grau II é realizada a intervenção terapêutica para imunossupressão.

A forma crônica da DECH, após o dia + 100 do transplante, seria semelhante a uma doença autoimune tal como esclerodermia, líquen plano, síndrome de Sjögren, fascíte eosinofílica, artrite reumatóide, lupus eritematoso sistêmico e cirrose biliar primária ⁽⁷⁶⁾. Seu estadiamento clínico é: DECH crônica limitada, que não recebe intervenção terapêutica imunossupressiva, e DECH crônica extensa, que é tratada com imunossupressão. A DECH crônica extensa é classificada ainda como: progressiva, quando vem em continuação à aguda; crônica quiescente, quando há um período de resolução da DECH aguda, fazendo um hiato sem manifestação clínica entre a aguda e manifestação da DECH crônica, e *de novo*, quando o paciente não sofreu a DECH aguda, mas desenvolveu a doença crônica ⁽⁷²⁾.

Estudos relacionam H/CH à DECH aguda e crônica. Foi mostrado que a H/CH, exceto em um paciente, sempre apareceu junto com a DECH aguda em 21 pacientes numa série de 125 (17%) pacientes submetidos a TMO alogênico, condicionados com CIC, com e sem TBI. Sugeriu-se então que o

epitélio vesical também representa um órgão-alvo para a DECH aguda, sendo possível que agrave uma lesão prévia do regime de condicionamento ⁽⁵⁸⁾. Um outro estudo retrospectivo conduzido para determinar os fatores de risco para H/CH mostrou maior incidência em pacientes mais jovens e naqueles submetidos a TMO alogênico ⁽⁸⁴⁾.

1.5 - OS VÍRUS E A HEMATÚRIA/CISTITE HEMORRÁGICA

Poucos são os trabalhos realizados no sentido de se concluir o quanto os vírus estão participando na patogenia da H/CH pós-TMO, envolvendo grande série de pacientes na literatura.

Infecções virais, basicamente por adenovírus e poliomavírus (BK e JC), são os vírus mais implicados como envolvidos na gênese da H/CH.

O adenovírus (ADV), um patógeno comum de infecções do trato respiratório superior e gastrointestinal, é considerado causa significativa de morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos ^(19,34,54) e tem sido responsabilizado por H/CH em receptores de transplante renal ⁽¹⁶⁾, bem como também contribuidor/causador importante de H/CH no TMO ^(2,19,43,45,48,54,58). Neste, o ADV tem sido demonstrado em infecções desde assintomáticas e localizadas até disseminadas e fatais ^(19,28). Nos pacientes submetidos a TMO, a H/CH pode ser um sinal de infecção adenoviral letal ⁽²⁾,

havendo inclusive relatos de autópsia que correlacionam a presença de H/CH com infecção invasiva do trato urogenital, sugerindo que a infecção renal (nefrite túbulo-intersticial necrosante) possa ocorrer com rota ascendente a partir da bexiga ⁽³⁹⁾.

BK e JC são vírus uroteliotróficos ⁽⁷⁰⁾, pertencentes ao gênero poliomavírus, da família *Poliomaviridae*, sendo onipresentes, infectando populações do mundo todo. BK e JC são algumas vezes detectados na urina de mulheres grávidas ⁽²¹⁾ e idosos, mas freqüentemente detectados em imunossuprimidos, tais como transplantados renais e de medula óssea ^(12,14,51,59,63,77). Há raros relatos de cistite em criança causada por BK ⁽⁶³⁾. No TMO, a excreção urinária positiva para BK e JC tem ocorrido exclusivamente em pacientes soropositivos, indicando a probabilidade de reativação da infecção ⁽⁵⁾. O vírus BK tem sido relatado também como causador de H/CH em pacientes com TMO ^(3,4,5,20,58), mas tal fato é ainda motivo de debate, pois outros autores não têm encontrado essa associação ⁽²⁵⁾ entre poliomavírus e a H/CH de aparecimento tardio.

Especula-se que seja possível que a combinação deste com a DECH possa explicar a maioria dos casos com H/CH tardia no TMO ⁽⁵⁸⁾.

É reconhecida a dificuldade de cultivo dos poliomavírus ^(5,8,33), justificando a dificuldade dos estudos em definir o papel destes vírus na H/CH, impondo-se assim a necessidade de outros métodos para o seu diagnóstico, tais como a ME e técnicas de biologia molecular.

2 - OBJETIVOS

Esta pesquisa teve como objetivo principal determinar com maior fidelidade a frequência da infecção viral e o tipo de vírus presente na urina em série consecutiva de pacientes com H/CH pós-TMO, através de pesquisa sistemática de vírus pela ME de transmissão, em corte ultrafino de concentrado de células urinárias, procurando entender melhor o papel das viroses na etiopatogenia da H/CH.

Procurou avaliar ainda fatores associados à H/CH e à presença do vírus, bem como observar o desempenho das técnicas de imunocitoquímica e cultura realizadas em parte do total das amostras analisadas à ME.

Em resumo, com a finalidade de obter respostas para entender o significado da presença do vírus na urina de pacientes com H/CH, este trabalho teve os seguintes objetivos:

- I. Verificar a incidência de hematúria/ cistite hemorrágica (H/CH) nos pacientes submetidos ao transplante de medula óssea no Programa de Transplante de Medula Óssea do InCor-HCFMUSP.
 - II. Obter a frequência e o tipo de vírus presente na urina de pacientes transplantados de medula óssea apresentando hematúria/ cistite hemorrágica (H/CH) através da microscopia eletrônica (ME) de transmissão de centrifugados de urina.
-

-
- III. Avaliar os fatores associados à H/CH nestes pacientes submetidos ao transplante de medula óssea.
 - IV. Avaliar os fatores associados à presença dos vírus detectados pela microscopia eletrônica na urina de pacientes com manifestação de H/CH.
 - V. Verificar a possível associação entre a DECH e o grau de gravidade da H/CH
 - VI. Avaliar os achados das demais técnicas de pesquisa de vírus (cultura viral e imunocitoquímica), disponíveis em cada caso, em relação à ME de transmissão no diagnóstico viral em urina de pacientes com H/CH.
-

3 - CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 - CASUÍSTICA

No período de Julho de 1991 a Agosto de 1999, 402 pacientes foram tratados com o transplante de medula óssea no Programa de Transplante de Medula Óssea do Instituto do Coração, Universidade de São Paulo. Entre estes, noventa pacientes apresentaram H/CH no período pós-TMO.

3.1.1- GRUPO DE ESTUDO (PACIENTES COM H/CH – n=72)

A urina destes 90 pacientes consecutivos, manifestando H/CH, foi encaminhada pela equipe clínica do TMO ao laboratório do InCor - HC.FMUSP para pesquisa de vírus. Destes pacientes, 72 apresentaram amostra de urina em condições suficientes para exame pela ME, sendo selecionados para o presente estudo.

Quarenta e seis (64%) eram do sexo masculino e 26 (36%) do sexo feminino, com média de idade de 29,5 anos (DP 11 anos; mínimo de 9 anos e máximo de 58 anos; mediana de 30 anos).

As doenças que motivaram o TMO como tratamento (doença de base) neste grupo foram leucemia mielóide crônica (LMC) em 28 pacientes (38,9%), anemia aplástica grave (AAG) em 12 (16,7%), leucemia mielóide

aguda (LMA) em 12 (16,7%) e outras neoplasias representadas por, leucemia linfóide aguda em 7 (9,7%), linfoma não-Hodgkin em 8 (11,1%), mieloma múltiplo em 2 (2,8%), síndrome mielodisplástica (anemia refratária com excesso de blastos) em 1 (1,4%), leucemia aguda bifenotípica em 1 (1,4%) e tumor germinativo localizado no testículo em 1 (1,4%).

O tipo de transplante realizado foi alogênico em 66 pacientes (91,7%) e autoplástico em 6 (8,3%). Dois pacientes no grupo alogênico representavam transplantes “mismatch”, ou melhor, HLA parcialmente idênticos (diferença em um dos haplotipos) e o restante do grupo era HLA idênticos.

O regime de condicionamento utilizado no grupo de estudo foi:

- Protocolo BUMEL, em 40 (55,6%) pacientes, constituído pelas drogas bussulfano 4 mg/kg v.o. em doses diárias divididas em 4 por 4 dias (dose total 16mg/kg) e melfalano 140 mg/m² e.v. por 1 dia;
- Protocolo com CIC, em 28 (38,9%) pacientes, constituído por ciclofosfamida 50 mg/kg e.v. em dose única diária por 4 dias (dose total 200mg/kg), com ou sem a associação de bussulfano ou irradiação corporal total.
- Outro protocolo, em 4 (5,6%) pacientes, constituído por drogas diferentes das anteriores.

Com relação à manifestação da DECH, 86% (62/72) dos pacientes apresentavam-se no período dos primeiros 100 dias pós-TMO e 14% (10/72) deles estavam com mais de 100 dias de pós-transplante. Dos pacientes até o dia +100, 14 (19,4%) apresentavam estadiamento para DECH aguda grau

0 (zero), 5 (6,9%) grau I, 25 (34,7%) grau II, 6 (8,3%) grau III e 4 (5,6%) grau IV. Não foi possível obter dados com relação à DECH aguda de 2 pacientes que se encontravam neste período. Dos 10 pacientes que estavam no período além do dia +100, 2 (2,8%) apresentavam DECH crônica grau 0 (zero) ou limitado e 8 (11%) foram estadiados como DECH crônica extensa, progressiva em 7 pacientes e quiescente em 1 paciente.

Em 7 (9,7%) pacientes a H/CH teve início no período menor ou igual ao dia +21 pós-TMO e em 65 (90,3%) ela iniciou-se após o dia +21. A média de dias transcorridos após o TMO (dia+) foi de 70 dias (dia +70) (DP 94 dias; mínimo dia +6; máximo dia +763; mediana dia +51).

A duração da H/CH foi menor ou igual a 7 dias em 19 (29,7%) pacientes e maior do que 7 dias em 45 (70,3%) pacientes.

A apresentação da H/CH foi microscópica em 21 (29,2%) e em 51 (70,8%) pacientes foi macroscópica.

No **ANEXO A** podem ser vistos detalhes das variáveis por paciente.

3.1.2 - GRUPO CONTROLE (PACIENTES SEM H/CH – n=12)

Urina de 24 pacientes submetidos ao TMO sem a manifestação da H/CH atual e/ou pregressa (critério de seleção) foi também coletada para este estudo com o objetivo de verificar a frequência de vírus neste grupo de

pacientes. Entretanto, somente as amostras de urina de 12 pacientes apresentaram condições adequadas para processamento, inclusão em resina e análise do material pela ME, fato este ligado à baixa quantidade de elementos celulares que levou à não formação do sedimento urinário em volume suficiente, não permitindo as demais passagens do procedimento.

Nove (75%) destes pacientes eram do sexo masculino e 3 (25%) do sexo feminino, com média de idade de 29 anos (DP 14; mínimo de 9 anos e máximo de 47 anos; mediana de 28,5 anos).

As doenças de base neste grupo eram representadas por LMC em 5 (41,7%) pacientes, AAG em 4 (33,3%), LMA em 2 (16,7%) e linfoma de Hodgkin em 1 (8,3%).

O tipo de transplante realizado foi alogênico em 10 (83,3%) pacientes e autoplástico em 2 (16,7%).

O regime de condicionamento utilizado no grupo de estudo foi:

- Protocolo BUMEL, em 7 (58,3%) pacientes, constituído pelas drogas bussulfano 4 mg/kg v.o. em doses diárias divididas por 4 dias (dose total 16mg/kg) e melfalano 140 mg/m² e.v. por 1 dia;
 - Protocolo com CIC, em 4 (33,3%) pacientes, constituído por ciclofosfamida 50 mg/kg e.v. em doses diárias divididas por 4 dias (dose total 200mg/kg), com ou sem a associação de bussulfano ou irradiação corporal total.
 - Outro protocolo, em 1 (8,3%) paciente, constituído por drogas diferentes das anteriores.
-

Com relação à manifestação da DECH, 66,7% (8/12) dos pacientes apresentavam-se no período dos primeiros 100 dias pós-TMO e 4 deles estavam com mais de 100 dias de pós-transplante. Dos pacientes neste grupo controle até o dia +100, 2 (16,7%) apresentavam estadiamento para DECH aguda grau 0 (zero), 1 (8,3%) grau I, 2 (16,7%) grau II, 1 (8,3%) grau III e 0 (0%) grau IV. Dos 4 pacientes que se encontravam no período além do dia +100, 2 (16,7%) apresentavam estadiamento para DECH crônica grau 0 (zero) e 2 (16,7%) foram classificados como DECH crônica extensa.

A média de dias transcorridos após o TMO (dia+) em que a urina foi coletada para a pesquisa foi de 584 dias (dia +584) (DP 1083; mínimo dia +35; máximo dia +3.824; mediana dia +128).

3.1.3 - ESCLARECIMENTOS, DEFINIÇÕES E AGRUPAMENTOS UTILIZADOS

Os dois pacientes submetidos a TMO alogênico HLA parcialmente idênticos (“mismatch”) não apresentavam nenhuma diferença clínica particular com relação à manifestação da DECH comparados aos HLA idênticos.

Com relação ao regime de condicionamento, os casos foram agrupados em 2 grupos principais, BUMEL e “Com CIC”, para testar o impacto da quimioterapia do condicionamento na presença de H/CH e vírus;

os diferentes protocolos foram testados estatisticamente quando o tamanho da amostra assim o permitiu.

A ocorrência e gravidade da DECH aguda (até o dia +100) e crônica (além do dia +100) foi avaliada utilizando-se o estadiamento clínico já previamente mencionado. Foi considerado para a análise o estágio em que o paciente se encontrava ao tempo de início da manifestação da H/CH para o grupo de estudo e a data da coleta de urina para o grupo controle. Para propósitos estatísticos, os pacientes foram agrupados apenas em apresentando DECH (aguda estadiamento I a IV ou crônica extensa) ou não (zero ou sem DECH aguda ou crônica). Os pacientes submetidos ao TMO autoplástico foram incluídos na categoria “Sem GVHD”.

Não há na literatura um consenso com relação à data pós-transplante para considerar-se a H/CH de início tardio ou não. Neste trabalho foi considerado o dia+ 21 (3 semanas) pós-TMO como a data limite para essa categorização. Assim foi considerada H/CH de início precoce aquela iniciada até o dia +21 e, tardia, aquela iniciada após o dia +21. Isto foi baseado em dados de estudos de autópsia e biópsia que mostram o período de 3 semanas como o necessário para a recuperação dos efeitos do regime de condicionamento ^(53,71).

Quanto à gravidade da H/CH, os casos foram agrupados, segundo a apresentação da hematúria, em microscópica e macroscópica. Pacientes que apresentaram inicialmente hematúria microscópica e evoluíram rapidamente para macroscópica, foram incluídos nesta última categoria.

A hematúria de longa duração foi definida como tal quando persistiu por 7 dias ou mais ⁽⁴⁾.

Os resultados mostrados no presente estudo referem-se à análise da primeira amostra de urina de cada paciente, encaminhada ao laboratório para exame pela ME para pesquisa de vírus, após a H/CH ter sido diagnosticada pela equipe clínica do TMO. De vários destes pacientes neste estudo foram mandadas amostras subseqüentes para análise e controle da presença de vírus. Entretanto, pela necessidade de padronização dos dados, estas amostras posteriores não foram aqui consideradas.

O diagnóstico da H/CH realizado pela equipe clínica de TMO foi feito através de controle periódico de hematúria pela utilização da fita de detecção de hemoglobina na urina, aplicada à beira do leito em pacientes hospitalizados ou de análise laboratorial por exame de urina tipo I ou inspeção direta da urina a “olho nu”, em pacientes hospitalizados ou durante visita ambulatorial. Amostras de urina foram sempre encaminhadas para urocultura para bactérias e fungos. Assim, o diagnóstico de H/CH foi feito quando a hematúria ocorreu na ausência de infecções bacterianas e/ou diátese hemorrágica.

Nestes pacientes apresentando H/CH, sempre foram tomadas condutas para a manutenção do nível plaquetário acima de 50.000/mm³.

Com relação às medidas profiláticas para o aparecimento da H/CH, todos os pacientes receberam hiperhidratação com 3 litros/m² para forçar a diurese e minimizar os efeitos tóxicos das drogas sobre o trato urinário durante a administração do regime de condicionamento. A irrigação vesical

continua nos dias de administração da ciclofosfamida e mantida por mais 24h após, foi aplicada somente nos primeiros 24 pacientes da presente casuística, compreendidos entre o período de 1991 a 1993, no qual a equipe clínica utilizava também este recurso na tentativa de minimizar os efeitos das drogas. Nenhum paciente recebeu a administração da droga 2-mercaptoetano de sulfonato de sódio (“mesna”).

3.2 - MÉTODOS

Amostra de urina recém-colhida e encaminhada ao Laboratório de Anatomia-Patológica do InCor, foi fracionada para ser submetida a três diferentes técnicas para pesquisa de vírus, a saber: análise citológica por microscopia de luz, análise da estrutura fina em corte ultrafino por microscopia eletrônica de transmissão e pesquisa de antígenos virais através de reação imunocitoquímica com anticorpos específicos.

Amostra de urina foi também encaminhada pela equipe clínica para o Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical, para realizar cultura de vírus.

3.2.1 - ANÁLISE CITOLÓGICA POR MICROSCOPIA DE LUZ

Cerca de 10 ml de urina foram centrifugados em citocentrífuga da marca Shandon, corados pelos métodos de Leishmann e Papanicolaou e observados ao microscópio de luz. Foi avaliada a qualidade da amostra com relação à quantidade de células e morfologia celular, no sentido de identificar possível efeito citopático viral.

3.2.2 - TÉCNICA DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO EM CORTE ULTRAFINO (ME)

Cerca de 10 ml da amostra fresca de urina de cada paciente apresentando H/CH e cerca de 100 ml de cada paciente do grupo controle foram centrifugadas a 1.500 r.p.m. por cerca de 10 min para obtenção do sedimento celular. O sobrenadante foi desprezado. O sedimento foi fixado em glutaraldeído a 3% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,3 por 3 horas a 4° C e pós-fixado em tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,3 por 2 horas a 4° C, enxaguado em solução salina 0,9% com sacarose 1,78% por 3 a 5 min a temperatura ambiente, corado com acetato de uranila 0,5% com sacarose 13,3%, desidratado em etanol e embebido em resina (Araldite F), deixando-se por 48 h a 60° C para polimerização. Os blocos de resina eram trimados. Cortes de 0,5µm foram obtidos com faca de vidro utilizando-se o ultramicrotomo Sorvall Porter-Blumm/ MT-1 e corados com uma mistura (1:1) de azul de metileno 1% em bórax 1% e azur II 1%. Os cortes foram examinados ao microscópio de luz e os melhores, com maior número de células nucleadas, foram selecionadas para o corte ultrafino a 60 nm com uma faca de diamante utilizando-se o ultramicrotomo Sorvall Porter-Blumm/ MT-2, corados com acetato de uranila 5% e citrato de chumbo 1,4% e examinados ao microscópio eletrônico de transmissão Philips EM-301.

Todos os campos representados nas telas de microscopia eletrônica foram cuidadosamente examinados, utilizando-se o mesmo procedimento nos grupos de estudo e controle. No início da avaliação, posicionava-se a

tela numa primeira fileira e depois se percorria em zig-zag até o final, com o intuito de examinar todas as células e/ou restos celulares presentes na amostra. Essa observação era efetuada inicialmente com o aumento de 500 vezes e, em cada material celular, para verificar a presença de vírus, o aumento era elevado a 7.000 vezes, valor considerado adequado e suficiente para iniciar a visibilização de partículas virais. Se estas estavam presentes, ampla documentação fotográfica era efetuada, indo dos pequenos aumentos até 26.000 vezes, no sentido de registrar o aspecto celular geral e a localização e morfologia das partículas virais.

3.2.3 - TÉCNICA DE IMUNOCITOQUÍMICA (ICQ)

Parte dos casos foram também submetidos à pesquisa viral pela imunocitoquímica. A urina era citocentrifugada e a lâmina fixada em etanol por 1 hora a temperatura ambiente, tratada com peróxido de hidrogênio em PBS por 5 minutos para bloqueio da peroxidase endógena, e incubados com soro fetal bovino 10% em PBS por 1 hora a 37° C. As lâminas das amostras e respectivos controles eram então incubadas com o anticorpo primário específico contra citomegalovírus (CMV – AD169/ Chemicon), adenovírus (ADV – blend 20/11 e 2/6 / Chemicon), herpes simplex 1 e 2 (HSV – policlonal/ Dako) e poliomavírus (JCBK – 3.1.1/ Novocastra), e com o anticorpo secundário apropriado. A terceira etapa era realizada usando-se estreptoavidina-biotina marcada com peroxidase. Na revelação utilizava-se

diaminobenzidina a 0,04% e peróxido de hidrogênio a 0,036% em PBS por 4 min. a temperatura ambiente. As lâminas eram então contracoradas com hematoxilina de Harris.

3.2.4 - TÉCNICA DE CULTURA VIRAL

Amostras de urina de 24 pacientes foram colocadas para cultivo em três tipos de células (Vero, fibroblasto humano, obtido a partir de cultura primária de prepúcio, e Hep-2). Um tempo mínimo total de incubação de 1 mês foi atingido antes das culturas serem consideradas negativas, exceto para herpes simplex vírus em células Vero, as quais foram descartadas com duas semanas de incubação. O resultado foi complementado pela utilização de imunofluorescência com anticorpos específicos.

3.3- ESTUDO ESTATÍSTICO

Cada variável categórica ou qualitativa está descrita como o número e a porcentagem de pacientes apresentando aquela característica.

A homogeneidade das características dos pacientes nos grupos de estudo e controle e as diferenças entre as frequências de vírus foram analisadas pelo teste do Qui-quadrado, com correção de continuidade (Yates), ou pelo teste exato de Fisher (quando o valor esperado de alguma casela era menor que 5). Posteriormente, as diferenças significativas ou quase significativas na análise univariada foram testadas em análise multivariada (teste de Hosmer e Lemeshow Goodness-of-fit).

Variáveis quantitativas foram descritas como média e para comparação de médias foi utilizado o teste-t para amostras independentes ou teste de Mann-Whitney, de acordo com a distribuição dos valores das variáveis.

Para a realização destes testes foi elaborado um banco de dados e utilizado o programa estatístico SPSS para Windows, versão 6.0.

O valor de “p” foi considerado estatisticamente significativo se menor ou igual a 0,05.

4 - RESULTADOS

4.1 - AVALIAÇÃO DO MATERIAL PELO EXAME CITOLÓGICO

O exame citológico mostrou quantidade variável de células uroteliais descamativas, freqüentemente apresentando alterações degenerativas acentuadas com perda do citoplasma, usualmente em meio a material hemorrágico e variável número de células inflamatórias. Por vezes foram observadas atipias discretas e incomparáveis em células isoladas. Em certos casos evidenciou-se notável efeito citopático, o qual tem sido descrito como característico para o poliomavírus ^(1,25,40,70), a saber: células com aumento do volume nuclear, intensa basofilia/hipercromasia, podendo ser confundidas com células displásicas ou neoplásicas, e, às vezes, inclusão com halo claro, mimetizando infecção por citomegalovírus, só que maior do que a inclusão deste e com coloração basofílica. Em poucos casos foram observadas inclusões características do tipo Cowdry A, sugestivas de infecção por vírus do grupo herpes ou adenovírus.

4.2 - TIPO E FREQUÊNCIA DE VÍRUS DETECTADOS PELA MICROSCOPIA ELETRÔNICA

No grupo de estudo foram encontrados 55,6% (40/72) pacientes positivos para vírus na urina pela ME e 8,3% (1/12), no grupo controle.

O tipo mais comum foi o pertencente à família *Poliomaviridae*, detectado em 65% (26/40) dos casos positivos. Esta família foi caracterizada por partículas virais não envelopadas, com morfologia icosaédrica, de aparência arredondada, sítio de montagem nuclear, com diâmetro medindo em média 36 nm (DP=1,6) (**FIGURAS 1 a 7**).

Vírus da família *Adenoviridae* foram encontrados em 30% (12/40) dos casos positivos. Estes eram caracterizados por partículas não envelopadas, com morfologia icosaédrica, por vezes de aspecto hexagonal no corte ultrafino, sítio de montagem nuclear, com diâmetro medindo em média 64 nm (DP=2,9nm) (**FIGURAS 8 a 14**).

Em 2 pacientes (5%) ambos os tipos de vírus foram detectados na mesma amostra de urina, mas em diferentes células.

O arranjo cristalóide, usual nos vírus com morfologia icosaédrica, foi observado em ambos os tipos virais em cinco casos (**FIGURAS 6 a 10**). Em dois casos também foram observadas as formas tubulares características dos vírus pertencentes à família *Poliomaviridae*.

Usualmente os vírus estavam presentes, em grande quantidade de partículas, dentro de células com avançado estado degenerativo, com

acentuada perda de cromatina e intensa vacuolização citoplasmática. Não raras vezes as células estavam totalmente desprovidas de citoplasma; assim, às vezes a detecção foi feita em restos celulares. Em certos casos, as partículas virais foram também observadas adsorvidas na superfície celular de células nucleadas e hemácias.

No grupo controle, apenas um paciente (1/12)(8,3%) foi positivo para vírus pela ME. Neste caso, o vírus detectado era da família *Poliomaviridae*.

No **ANEXO A** podemos observar o resultado da ME por paciente, junto às demais técnicas efetuadas.

FIGURA 1: Foto da microscopia eletrônica do sedimento urinário de paciente apresentando hematúria / cistite hemorrágica (Pac. nº 68 do anexo-A). Célula descamativa infectada por vírus da família **Polioviridae**. Inúmeras partículas virais (V) ocupam o núcleo (N). Pequenos grumos remanescentes de cromatina estão rechaçados para a periferia junto à membrana nuclear (**setas retas**). Citoplasma (C) escasso e degenerado pode ser visto no canto inferior e superior direito. Barra = 1 µm.
(Acetato de uranila e citrato de chumbo; 19.200 X)

FIGURA 2: Foto da microscopia eletrônica do sedimento urinário com célula descamativa infectada por vírus da família **Polioviridae** em outro paciente apresentando hematúria / cistite hemorrágica (Pac. nº 1 do anexo-A). Grande aumento mostrando as partículas virais (V), com forma esférica / icosaédrica, medindo em torno de 36nm e ocupando o núcleo (N) em meio a grumos de heterocromatina (CR). Barra = 100 nm. (Acetato de uranila e citrato de chumbo; 192.400X)

FIGURA 3: Foto da microscopia eletrônica do sedimento urinário de outro paciente apresentando hematúria / cistite hemorrágica (Pac. nº 33 do anexo-A) com célula descamativa infectada por vírus da família **Polioviridae**. Numerosas partículas virais (V) ocupam o núcleo (N) (**seta vazada**) e adentram (**seta curva cheia**) vacúolos nucleares (☆) revestidos por membrana. Grumos remanescentes de cromatina são vistos na periferia junto à membrana nuclear (**seta reta**). Pequena porção do citoplasma (C) é vista no canto superior direito. Barra = 1 µm.
(Acetato de uranila e citrato de chumbo; 24.400X)

FIGURA 4: Foto da microscopia eletrônica de outra célula descamativa do sedimento urinário infectada por vírus da família ***Polioviridae***, em paciente apresentando hematúria / cistite hemorrágica (Pac. nº 1 do anexo-A). As partículas virais (V) justapõem-se e penetram em vacúolos nucleares (☆) embrulhadas pela membrana. Grumos remanescentes de heterocromatina (CR) são vistos no canto superior direito. Barra = 100 nm. (Acetato de uranila e citrato de chumbo; 148.000X)

FIGURA 5: Foto da microscopia eletrônica do sedimento urinário de outro caso com célula descamativa infectada por vírus da família ***Polioviridae***, em paciente apresentando hematúria / cistite hemorrágica (Pac. nº 26 do anexo-A). O detalhe da foto (**seta cheia**) demonstra como os vacúolos nucleares (☆) representam invaginações da membrana nuclear interna, a partir da qual os vírus são liberados para as cisternas perinucleares. O citoplasma (**C**) apresenta intenso aspecto vacuolizado degenerativo. Barra = 500 nm.

(Acetato de uranila e citrato de chumbo; 40.700X)

FIGURA 6: Foto da microscopia eletrônica do sedimento urinário, de paciente com hematúria / cistite hemorrágica (Pac. nº 68 do anexo-A), mostrando célula descamativa infectada por vírus da família ***Poliomaviridae***. Centenas de partículas virais (V) ocupam o núcleo (N), em arranjo bastante peculiar, cristalóide, fazendo formas geométricas e formando grande inclusão nuclear. Citoplasma (C) escasso e degenerado pode ser visto no canto inferior, direito e esquerdo, e superior direito. Barra = 1 μ m.

(Acetato de uranila e citrato de chumbo; 31.000X)

FIGURA 7: Foto da microscopia eletrônica do sedimento urinário, de paciente com hematúria / cistite hemorrágica (Pac. nº 68 do anexo-A), mostrando célula descamativa infectada por vírus da família ***Polioviridae***. Outro caso em que centenas de partículas virais (V) ocupam o núcleo (N) em arranjo cristalóide peculiar, fazendo formas geométricas. No canto superior direito está o limite entre o núcleo e o citoplasma (**seta reta**). Barra = 500 nm.
(Acetato de uranila e citrato de chumbo; 74.000X)

FIGURA 8: Foto da microscopia eletrônica do sedimento urinário, de paciente com hematúria / cistite hemorrágica (Pac. nº 13 do anexo-A), mostrando célula descamativa infectada por vírus da família **Adenoviridae**. Numerosas partículas virais (V) ocupam o núcleo (N), fazendo arranjo cristalóide (canto superior esquerdo). A célula está em desintegração e os vírus podem ser vistos também no citoplasma (C), cujo limite com o núcleo está apontado pela setas finas. Barra = 1 μ m. (Acetato de uranila e citrato de chumbo; 19.200X)

FIGURA 9: Foto da microscopia eletrônica do sedimento urinário, de paciente com hematúria / cistite hemorrágica (Pac. nº 13 do anexo-A), mostrando célula descamativa infectada por vírus da família **Adenoviridae**. Maior aumento da foto anterior, mostrando as partículas virais (V) ocupando núcleo (N), fazendo arranjo cristalóide (canto inferior esquerdo). O limite do núcleo com o citoplasma está apontado pela seta. Barra = 500 nm. (Acetato de uranila e citrato de chumbo; 40.700X)

FIGURA 10: Foto da microscopia eletrônica do sedimento urinário, de paciente com hematúria / cistite hemorrágica (Pac. nº 13 do anexo-A), mostrando célula descamativa infectada por vírus da família **Adenoviridae**. Maior aumento da foto anterior, mostrando as partículas virais (V) no arranjo cristalóide, com forma icosaédrica, medindo em torno de 64nm, muitas delas exibindo o característico aspecto hexagonal do capsídeo do adenovírus em corte ultrafino. Barra = 100 nm.
(Acetato de uranila e citrato de chumbo; 192.400X)

FIGURA 11: Foto da microscopia eletrônica do sedimento urinário com célula descamativa infectada por vírus da família **Adenoviridae**, em paciente apresentando hematúria / cistite hemorrágica (Pac. nº 13 do anexo-A). Maior aumento de um setor da figura 8, mostrando a região do limite entre o núcleo (N) e o citoplasma (C). As partículas virais (V) no lado citoplasmático (setas curtas no rodapé da figura) mostram as mesmas características presentes no interior do núcleo, ou seja, não apresentam envelope. Barra = 500 nm. (Acetato de uranila e citrato de chumbo; 40.700X)

FIGURA 12: Foto da microscopia eletrônica do sedimento urinário de outro caso com célula descamativa infectada por vírus da família **Adenoviridae**, em paciente apresentando hematúria / cistite hemorrágica (Pac. nº 7 do anexo-A). Várias partículas virais (V) misturadas com a heterocromatina (CR) no núcleo (N). Barra = 500 nm.
(Acetato de uranila e citrato de chumbo; 53.200X)

FIGURA 13: Foto da microscopia eletrônica do sedimento urinário com célula descamativa infectada por vírus da família **Adenoviridae**, em paciente apresentando hematúria / cistite hemorrágica (Pac. nº 7 do anexo-A). Maior aumento da figura anterior, mostrando as partículas virais (V) misturadas com a heterocromatina (CR) no núcleo. Note a variabilidade de maturação pela coloração no interior do capsídeo viral. Barra = 100 nm. (Acetato de uranila e citrato de chumbo; 53.200X)

FIGURA 14: Foto da microscopia eletrônica do sedimento urinário de outro caso com célula descamativa infectada por vírus da família **Adenoviridae**, em paciente apresentando hematúria / cistite hemorrágica (Pac. nº 46 do anexo-A). As partículas virais (V) estão misturadas com a heterocromatina (CR) no núcleo. Neste caso a variabilidade de coloração no interior do capsídeo viral está mais evidente. No canto inferior direito está o limite entre o núcleo e o citoplasma (**seta reta**). Barra = 500 nm. (Acetato de uranila e citrato de chumbo; 40.700X)

4.3 - FATORES ASSOCIADOS À MANIFESTAÇÃO DA HEMATÚRIA/ CISTITE HEMORRÁGICA

A comparação das características dos pacientes do grupo de estudo (n=72) e grupo controle (n=12) para verificar sua homogeneidade e comparabilidade não mostrou diferenças estatisticamente significantes com relação às seguintes características: sexo, doença de base, tipo de transplante, regime de condicionamento e a manifestação da DECH (TABELA 1).

A comparação das médias de idade entre ambos os grupos (29,5 versus 28,8 anos), também não mostrou diferença significativa ($p= 0,84$ – Teste-t).

Houve diferença estatisticamente significativa apenas com relação à frequência de positividade para vírus detectado pela técnica de ME entre os grupos de estudo (com H/CH) e controle (sem H/CH) ($p= 0,007$, ou seja, $<0,01$).

TABELA 1: Características dos pacientes manifestando hematúria/ cistite hemorrágica (H/CH) no pós-TMO em comparação com o grupo sem H/CH (controle)

Característica	Grupo c/ H/CH n (%)	Controle n (%)	p (*)
Sexo			
Masculino	46 (63,9)	9 (75,0)	0,53
Feminino	26 (36,1)	3 (25,0)	
Doença de Base			
AAG	12 (16,7)	4 (33,3)	0,22
Neoplasias	60 (83,3)	8 (66,7)	
Leucemias Agudas	21 (42,9)	2 (28,6)	0,68
LMC	28 (57,1)	5 (71,4)	
Tipo de TMO			
Alogênico	66 (91,7)	10 (83,3)	0,31
Autoplástico	6 (8,3)	2 (16,7)	
Condicionamento			
BUMEL	40 (58,8)	7 (63,6)	1,00
Com CIC	28 (41,2)	4 (36,4)	
BU1CIC	12 (70,6)	2 (100,0)	1,00
BU4CIC	5 (29,4)	—	
DECH			
Sim	48 (68,1)	6 (50,0)	0,32
Não	22 (31,9)	6 (50,0)	
Vírus pela ME			
Sim	40 (55,6%)	1 (8,3%)	<0,01
Não	32 (44,4%)	11 (91,7%)	

Abreviações: AAG – Anemia aplástica grave; **Neoplasias** – inclui as demais doença no grupo; **Leucemias agudas** – inclui os casos de leucemia mielóide e linfóide aguda, síndrome mielodisplástica e leucemia aguda bifenotípica; **LMC** – Leucemia mielóide crônica; **BUMEL** – regime de condicionamento utilizando bussulfano 4 mg/kg v.o. em doses diárias divididas em 4 por 4 dias (dose total 16mg/kg) e melfalano 140 mg/m² e.v. por 1dia; **Com CIC** – inclui os protocolos de condicionamento utilizando ciclofosfamida 50 mg/kg e.v. em dose única diária por 4 dias (dose total 200mg/kg), com ou sem a associação de bussulfano ou irradiação corporal total. **BU1CIC** – bussulfano por 1 dia com ciclofosfamida na dose acima; **BU4CIC** – bussulfano por 4 dias e ciclofosfamida na dose acima; **DECH** – doença enxerto contra hospedeiro aguda (grau I a IV) ou crônica extensa progressiva; **ME** – microscopia eletrônica. (*) Teste exato de Fisher.

4.4 - FATORES ASSOCIADOS À PRESENÇA DE VÍRUS

Os resultados referentes aos testes de associação da análise univariada entre as variáveis encontram-se representados na **TABELA 2**.

No grupo de estudo, representado pelos 72 pacientes com manifestação da H/CH, não houve diferença estatisticamente significativa com relação à positividade para vírus pela ME e o sexo ($p=0,98$), tipo de transplante realizado (alogênico ou autoplástico) ($p=0,18$), regime de condicionamento utilizado (BUMEL ou com CIC) ($p=0,71$), grau de gravidade da H/CH (micro ou macroscópica) ($p=0,25$) e o tempo de duração da H/CH (categorizado em menor ou igual e maior do que 7 dias) ($p=0,92$) (veja o **GRÁFICO 1**).

Foi testada a associação entre a positividade viral e a distribuição etária em tercis, com 24 pacientes em cada grupo, e esta ficou no limite da significância ($p=0,06$), com 70,8% dos pacientes com vírus positivo na urina na faixa acima dos 35 anos.

Com relação à doença de base não houve associação entre estas e a positividade viral ($p=0,18$). Entretanto, chama a atenção a frequência de positividade viral de 83,3% nos pacientes com diagnóstico prévio de leucemia mielóide aguda (LMA).

TABELA 2: Análise univariada dos fatores associados à presença de vírus detectado na urina pela microscopia eletrônica

Variável	Técnica de ME		Total n(%)	p (*)
	Vírus – n(%)	Vírus + n(%)		
sexo				
Masculino	21 (45,7)	25 (54,3)	46 (63,9)	0,98
feminino	11 (42,3)	15 (57,7)	26 (36,1)	
Idade (anos)				
Até 22,0	10 (41,7)	14 (58,3)	24 (33,3)	0,06
22,1 a 34,9	15 (62,5)	9 (37,5)	24 (33,3)	
35 ou mais	7 (29,2)	17 (70,8)	24 (33,3)	
Doença de Base				
LMC	15 (53,6)	13 (46,4)	28 (38,9)	0,18
AAG	6 (50,0)	6 (50,0)	12 (16,7)	
LMA	2 (16,7)	10 (83,3)	12 (16,7)	
Outras Neoplasias	9 (45,0)	11 (55,0)	20 (27,8)	
Tipo de TMO				
Alogênico	28 (38,9)	38 (52,8)	66 (91,7)	0,39
Autoplástico	4 (5,6)	2 (2,8)	6 (8,3)	
Condicionamento				
BUMEL	17 (25)	23 (33,8)	40 (58,8)	0,71
Com CIC	14 (20,6)	14 (20,6)	28 (41,2)	
DECH				
Não (grau 0 + Auto)	14 (20)	8 (11,4)	22 (31,4)	0,05
Sim (grau I-IV + CE)	17 (24,3)	31 (44,3)	48 (68,6)	
Grau de H/CH				
Macroscópica	20 (27,8)	31 (43,1)	51 (70,8)	0,25
Microscópica	12 (16,7)	9 (12,5)	21 (29,2)	
Dia + de Início da H/CH				
< ou = +21	6 (8,3)	1 (1,4)	7 (9,7)	0,04
> +21	26 (36,1)	39 (54,2)	65 (90,3)	
Duração da H/CH				
< ou = 7 dias	9 (14,1)	10 (15,6)	19 (29,7)	1,00
> 7 dias	20 (31,3)	25 (39,1)	45 (70,3)	

Abreviações: LMC – Leucemia mielóide crônica; AAG – Anemia aplástica grave; LMA – Leucemia mielóide aguda; **Outras Neoplasias** – inclui as demais doenças no grupo; BUMEL – regime de condicionamento utilizando bussulfano 4 mg/kg v.o. em doses diárias divididas em 4 por 4 dias (dose total 16mg/kg) e melfalano 140 mg/m² e.v. por 1dia; **Com CIC** – inclui os protocolos de condicionamento utilizando ciclofosfamida 50 mg/kg e.v. em dose única diária por 4 dias (dose total 200mg/kg), com ou sem a associação de bussulfano ou irradiação corporal total.; **DECH** – doença enxerto contra hospedeiro aguda (grau I a IV) ou crônica extensa progressiva; **Auto** – TMO autoplástico; **CE** – DECH crônica extensa progressiva; **ME** – microscopia eletrônica. (*)Qui-quadrado ou teste exato de Fisher.

O tempo de duração da H/CH (categorizado em menor ou igual e maior do que 7 dias) e a positividade viral não mostraram associação ($p=0,92$) (**GRÁFICO 1**).

A duração da H/CH foi maior ou igual a 7 dias e menor ou igual a 30 dias em 60% dos pacientes em ambos os grupos, positivo e negativo para vírus, com uma média de duração de 21 dias (DP de 21,4 dias; mínimo de 1 e máximo de 99 dias).

Houve associação entre a positividade viral e o fato do paciente apresentar DECH aguda, de qualquer grau, ou crônica ($p=0,05$), sendo que 55/72 dos pacientes (76%) manifestaram a H/CH no período compreendido entre o dia +22 e +100 pós-TMO (período de DECH aguda).

A distribuição dos pacientes com H/CH segundo o dia+ pós-TMO e a positividade viral na urina pela ME é exibida no **GRÁFICO 2**.

Houve também associação entre a positividade viral e início tardio da H/CH ($p=0,04$). Em 65 pacientes (90,3%) a H/CH iniciou-se após o dia +21 (início tardio), com 54,2% (39/65) dos pacientes apresentando positividade para vírus na urina; esta frequência foi significativamente maior ($p=0,04$).

Empregando-se a análise multivariada dos dados, obtivemos que: um paciente com leucemia mielóide aguda (LMA) tem 6,49 vezes a chance de ter o vírus, quando comparado com um paciente com leucemia mielóide crônica (LMC); e um paciente com qualquer grau de DECH tem 3,86 vezes a chance da presença de vírus quando comparado com um paciente sem DECH (TABELA 3).

TABELA 3: Análise múltipla dos fatores associados à presença de vírus detectado na urina pela microscopia eletrônica

Variável	Categoria	OR (ajustada)	IC 95% (OR ajust.)
<i>Doença de base</i>			
	LMC	1,00 (Referência)	
	AAG	2,00	[0,44; 9,11]
	LMA	6,49	[1,08; 38,98]
	Outras Neoplasias	1,89	[0,55; 6,52]
<i>DECH</i>			
	não	1,00 (Referência)	
	Sim	3,86	[1,23; 12,10]

Teste de Hosmer-Lemeshow goodness of fit: $p=0,95$; **OR**= "odds ratio" ou razão de chance; **IC**= intervalo de confiança

4.5 - ASSOCIAÇÃO DA MANIFESTAÇÃO DA DECH E O GRAU DE GRAVIDADE DA H/CH

A gravidade da H/CH não se associou à positividade viral, mas 39 (55,7%) pacientes com H/CH macroscópica apresentavam DECH e esta associação foi significativa ($p=0,04$) (**TABELA 4**).

TABELA 4: Associação entre a doença enxerto-contrahospedeiro (DECH) e o grau da hematúria / cistite hemorrágica (H/CH)

Variável	Grau de H/CH		Total	p (*)
	Macroscópica n (%)	Microscópica n (%)		
DECH**				
Não	12 (17,1)	10 (14,3)	22	
Sim	39 (55,7)	9 (12,9)	48	0.04
Total	51	19	70	

(*) Teste do Qui-quadrado

** 2 pacientes sem dados disponíveis.

Em nossos pacientes, para descrever melhor a dimensão desta morbidade, a apresentação da H/CH foi macroscópica, com ou sem coágulos sangüíneos e disúria, em 70,8% (51/72) dos pacientes e microscópica em 29,2% (21/72).

Nove pacientes (9/72 – 12,5%) do grupo de H/CH macroscópica apresentaram sangramento urinário grave, manifestando instabilidade

hemodinâmica, choque hipovolêmico, queda de hematócrito e considerável aumento das necessidades de transfusão de sangue total e plaquetas.

Destes pacientes com H/CH grave, 5 apresentaram obstrução em algum ponto do trato urinário e em 4 deles foi necessária a intervenção cirúrgica para solucionar a complicação (2 cistostomias e 1 nefrostomia para retirada de coágulos, 1 nefrectomia total e 1 instalação de Duplo “J”). Em 1 paciente foi realizada a instilação intravesical de formalina na tentativa de controlar o sangramento. Sete destes pacientes com forma grave de H/CH (7/9 – 78%), foram positivos para vírus (4 para *Poliomaviridae*/polioma e 3 para adenovírus).

Quatro dos pacientes com H/CH em forma grave faleceram tendo esta morbidade diretamente relacionada à causa do óbito. Duas autópsias destes casos demonstraram a presença de nefrite túbulo-intersticial necrosante causada por adenovírus.

Quatro outros pacientes foram submetidos à biópsia de bexiga urinária, nas quais o resultado foi inconclusivo para presença de vírus, em razão da total perda do epitélio transicional de revestimento, sítio de predileção viral, deixando apenas a submucosa edematosa e hemorrágica.

4.6 - ACHADOS DAS DEMAIS TÉCNICAS DE PESQUISA VIRAL — IMUNOCITOQUÍMICA E CULTURA — JUNTO À MICROSCOPIA ELETRÔNICA NO GRUPO DE ESTUDO

No subgrupo de pacientes positivos para família *Poliomaviridae* (26/40) pela ME, a pesquisa imunocitoquímica com anticorpo contra poliomavírus JCBK foi realizada em 6 pacientes. Esta reação anticorpo-específica confirmou o diagnóstico de poliomavírus em 5 dos casos. Neste mesmo subgrupo, a imunocitoquímica com anticorpo-específico contra adenovírus foi empregada em 14 pacientes, sendo positiva em 2 casos. As culturas realizadas em 8 pacientes neste subgrupo positivo para a família *Poliomaviridae* pela ME foram todas negativas para este tipo de vírus, mas houve um caso positivo para adenovírus neste grupo. Assim, a associação das técnicas diagnosticou 26 pacientes com infecção por vírus da família *Poliomaviridae* e a concomitância de infecção por ADV em 3 pacientes neste subgrupo.

No subgrupo de pacientes positivos pela ME para a família *Adenoviridae* (12/40), a pesquisa imunocitoquímica anticorpo-específica contra adenovírus foi realizada em 6 das amostras, confirmando o diagnóstico de adenovírus em 3 delas. Em apenas 1 caso neste grupo foi realizada pesquisa imunocitoquímica para poliomavírus, e esta foi negativa. As culturas virais, neste subgrupo com ME positiva para a família *Adenoviridae*, foram efetuadas em 6 pacientes, confirmando o diagnóstico

de adenovírus em 4 casos. Nas duas restantes, uma identificou citomegalovírus (CMV) e a outra foi negativa.

No subgrupo de pacientes com H/CH, cuja pesquisa viral por ME foi negativa (32 casos), a imunocitoquímica empregada em 17 casos (13 deles contra adenovírus e 3 contra poliomavírus), demonstrou adicionalmente mais quatro pacientes com urina positiva para vírus (1 para adenovírus e 3 para poliomavírus JCBK). Nestes casos o número de células positivas nas lâminas de imunocitoquímica era escasso, e além disso nestes casos a ME exibiu baixa representatividade, caracterizada por material paucicelular. Todas as culturas realizadas nos casos com ME negativa (10/32) resultaram negativas.

A associação das técnicas de detecção viral (ME, imunocitoquímica e cultura), evidenciou no total 44 pacientes com H/CH positivos para vírus, 26 deles com *Poliomaviridae*/poliomavírus, 12 com adenovírus, 5 com a associação de adenovírus e *Poliomaviridae*/poliomavírus e 1 com adenovírus e CMV na urina.

A **TABELA 5** mostra os resultados de pesquisa obtidos pelas três técnicas de detecção viral (ME, imunocitoquímica e cultura).

TABELA 5: Resultado das três técnicas de detecção viral (microscopia eletrônica, imunocitoquímica e cultura) utilizadas nos pacientes apresentando hematúria/ cistite hemorrágica

Diagnóstico	ME	Imunocitoquímica		Cultura
	n	Poliomavírus n+/total realizado	Adenovírus n+/total realizado	n+/total realizado outro resultado
Poliomaviridae	26	5/6 (83%) (20 NR)	2/14 (12 NR)	0/8 (0%) 1 ADV+ (18 NR)
Adenoviridae	12	0/1 (11 NR)	3/6 (50%) (6 NR)	4/6 (68%) 1 CMV+ (6 NR)
Ambos vírus	2	(2 NR)	0/1 (1 NR)	(2 NR)
Negativo	32	3/3 (29 NR)	1/13 (19 NR)	0/10 (22 NR)
Total realizado	72	10	34	24

Abreviações: NR - não realizado; ME - microscopia eletrônica

A associação das técnicas de diagnóstico para adenovírus empregadas nos 72 pacientes com H/CH resultou num total de 18 casos positivos para adenovírus (14 pela ME, 3 pela ICQ e 1 pela cultura) e a ME fez esse diagnóstico em 78% dos pacientes. Já para a família do poliomavírus, foi de 31 o total de casos positivos (28 pela ME, 3 pela ICQ e zero pela cultura), com a ME fazendo o diagnóstico em 90% dos casos, o que foi considerado como excelente desempenho em relação às demais técnicas utilizadas.

Em relação à ME, a sensibilidade da imunocitoquímica para o poliomavírus foi de 83%. A cultura viral, nos moldes realizados, apresentou

sensibilidade de 0% (zero) para o poliomavírus. Para o adenovírus, a sensibilidade da imunocitoquímica foi de 50% e a cultura viral apresentou sensibilidade de 68%.

Os três casos que foram positivos para poliomavírus na imunocitoquímica e negativos na ME, eram representados por escasso material na ME. O caso em que a imunocitoquímica resultou positiva para adenovírus e foi negativo no material da ME, teve a lâmina revisada e poderia ser interpretado como caso duvidoso ou inconclusivo.

5 - DISCUSSÃO

5.1- INCIDÊNCIA DA H/CH

A incidência de H/CH pós-TMO no Programa de Transplante de Medula Óssea do InCor-HCFMUSP foi de 22% (90/402 pacientes). Esta cifra é considerada alta, mas está entre as taxas verificadas na literatura que variam de 6,5 a 68% no pós-TMO ^(15,78). Esta ampla variação de frequência poderia ser explicada, ao menos em parte, pelo resultado de diferentes protocolos de regime de condicionamento pré-infusão medular e de profilaxia da agressão secundária ao trato urinário, ou diferentes populações estudadas com características particulares como idade, doença de base, tipo de transplante, entre outras.

5.2 - O CONDICIONAMENTO UTILIZADO

A ciclofosfamida tem reconhecida ação agressiva à mucosa do trato urinário devido à ação da acroleína ^(47,60), substância que resulta de sua metabolização hepática e é excretada pelas vias urinárias. O bussulfano também é responsabilizado numa menor proporção pela ocorrência da H/CH pós-TMO. Para ambas as drogas essa associação fica nítida quando há relação temporal entre sua utilização e o aparecimento da H/CH. Tal fato

torna difícil de explicar o surgimento das H/CH tardias apenas como um efeito tóxico das drogas.

Na literatura o protocolo BUMEL, que surgiu como uma alternativa aos efeitos tóxicos da utilização da ciclofosfamida, tem mostrado uma adequada atividade antitumoral e baixíssima (próximo de zero ou zero) incidência de H/CH em transplantes autoplásticos ^(50,52,74,82). Para transplantes alogênicos condicionados com BUMEL, o aparecimento da H/CH é maior, sugerindo a existência de outros fatores ligados à H/CH que não as drogas ^(50,52,74,82). Um dos fatores possivelmente ligados a isso poderia ser representado pela DECH do TMO alogênico e talvez pela infecção viral. Mas não há estudos com o protocolo BUMEL abordando especificamente a H/CH e suas características, mas apenas como um dos itens para avaliar a toxicidade.

Na presente casuística, o protocolo de condicionamento BUMEL foi utilizado na maior parte dos pacientes com e sem H/CH (55,6% e 58,3%, respectivamente) e não mostrou associação com a ocorrência da H/CH.

Considerando-se apenas o grupo de pacientes com H/CH, não houve também associação do condicionamento empregado com a manifestação precoce ou tardia (após o dia +21) da H/CH. A maior parte dos casos ocorreu tardiamente, sugerindo um fator etiológico diferente das drogas envolvido no desenvolvimento da H/CH.

5.3 - UTILIZAÇÃO DA ME NA DETECÇÃO VIRAL

A importância da utilização desta técnica de ME em corte ultrafino para detecção de vírus na urina já foi anteriormente demonstrada (3,24,32,36,37,63), mas utilizada em pequenas casuísticas de pacientes submetidos a TMO, e apenas como comprobatório quanto à presença de vírus, complementando a outras técnicas empregadas.

Neste trabalho a ME foi empregada de forma sistemática em pacientes submetidos consecutivamente a TMO que manifestaram H/CH para obter uma frequência fidedigna do envolvimento viral em tal ocorrência e efetuar o diagnóstico de H/CH associada a vírus.

No sentido de evitar resultados falso-negativos com a ME, nós usamos um concentrado celular obtido por ultracentrifugação da amostra de urina e pesquisamos todos os campos representados na tela de ME.

Esta técnica suplantou a reconhecida dificuldade de detecção dos vírus da família *Poliomaviridae* (5,8,33), que não apresentam crescimento em culturas de rotina, e as dificuldades em padronização de técnicas de detecção de antígenos e de ácidos nucléicos virais, nas quais deve-se ter em mente o agente a ser procurado.

Os vírus, como agentes que sobrevivem à morte da célula hospedeira para a partir dela atingirem novas células, apresentaram-se em razoável preservação estruturalmente, mesmo em células parasitadas com avançado estado degenerativo. Isto representou uma grande vantagem da ME sobre a

imunocitoquímica, pois os vírus foram detectados com certa facilidade e confiança, através de sua visibilização direta.

A imunocitoquímica neste tipo de material — hemorrágico e com células em avançado estado degenerativo — apresenta propensão para impregnação de fundo e ligações inespecíficas do anticorpo, favorecendo resultados falso positivos.

Com relação à cultura, houve bom desempenho para a detecção de adenovírus, mas o mesmo não sucedeu com o diagnóstico de poliomavírus, demonstrando a reconhecida dificuldade técnica no seu cultivo. Neste particular, a ME foi ímpar no diagnóstico dos vírus da família *Poliomaviridae* em nossa casuística.

A ME, pelo bom desempenho demonstrado, revelou-se um método confiável para o diagnóstico de H/CH associada a vírus no pós-TMO. Esta técnica fez 90% dos diagnósticos de vírus da família dos poliomavírus e 77% dos casos de ADV. Entretanto, a positividade dependeu da concentração de células nucleadas nas amostras, o que foi avaliado apenas de forma semiquantitativa (presença de muitas, poucas ou escassas células e restos celulares). O número de casos da ME considerados falso-negativos foi pequeno e estes devem estar ligados a uma questão intrínseca da técnica, na qual é analisada uma menor quantidade de células em comparação ao observado nas lâminas de citocentrifugado. Entretanto, muitas vezes só após analisar a amostra na ME é que houve mais segurança na interpretação da imunocitoquímica.

Não foi realizada nenhuma forma de quantificação objetiva com relação ao número de células e de partículas virais nas amostras, que talvez pudesse fornecer dados referentes ao grau de infecção e outras associações relativas à apresentação clínica da H/CH.

Assim sendo, a pesquisa viral por ME mostrou-se um recurso bastante eficiente na demonstração da positividade viral em urina de pacientes manifestando H/CH. Os dados aqui apresentados mostram sua importância e sugerem que esta técnica seja incluída na bateria de técnicas de investigação da possível etiologia viral da H/CH no pós-TMO.

Uma modificação técnica (por exemplo, a troca da resina de inclusão, técnica de processamento rápido) ⁽²⁷⁾ será futuramente testada para otimização do tempo de demora dos resultados do exame, que foi de 4 dias em média.

5.4 - A HEMATÚRIA/ CISTITE HEMORRÁGICA, OS VÍRUS E FATORES ASSOCIADOS

Nosso estudo foi realizado principalmente para avaliar a ME como um recurso técnico para abordagem da possível etiologia viral na H/CH ocorrendo em pacientes submetidos a TMO. Assim, utilizando a técnica de ME, encontramos positividade para vírus na urina 55,6% dos pacientes, com H/CH no pós-TMO. Houve apenas dois tipos de vírus: 65% da família

Poliomaviridae, à qual pertencem os poliomavírus, 30% da família *Adenoviridae* e 5% com a presença dos dois tipos.

Os vírus principais envolvidos na H/CH, segundo documentação da literatura, são adenovírus e poliomavírus, ambos uroteliotróficos e de alta prevalência na população mundial. ^(2,3,4,5,22,23,55,69).

Como um subproduto deste trabalho, verificamos uma associação da H/CH com a presença de vírus ($p<0,01$), agrupando os dois tipos detectados e utilizando um grupo comparável de pacientes sem H/CH.

Arthur e col em 1986 ⁽⁴⁾ também encontraram associação entre vírus e a H/CH, monitorando por ELISA e hibridização de DNA, prospectivamente, a excreção urinária apenas do poliomavírus (vírus BK) em 55 pacientes submetidos ao TMO, concluindo que a reativação do vírus pode explicar uma boa parte das H/CH de início tardio e longa duração no pós-TMO. A longa duração, igualmente aqui definida como maior que 7 dias, não se mostrou associada com a positividade viral no presente trabalho.

Questiona-se se os vírus representariam apenas um co-fator associado à DECH ^(8,11,20,25), uma vez que a H/CH ocorreria em maior número nos transplantes alogênicos. A reativação do poliomavírus é registrada em torno de 55% em imunocomprometidos ^(12,14,51,59,63,77), mas também ocorre em mulheres grávidas ⁽²¹⁾. No caso do adenovírus é relatado como raro patógeno na H/CH (0 a 5% dos pacientes) ⁽²³⁾, mas ele isoladamente em nossa casuística representou 30% dos casos.

O imunocomprometimento e a atuação da DECH tornam os transplantados de medula óssea susceptíveis a uma série de eventos

infecciosos, tanto por agentes do meio quanto por reativação de infecções latentes. Por tal razão, a DECH deve entrar sempre na avaliação quando se quer estudar os eventos infecciosos nessa população.

Verificamos associação entre a positividade viral com a manifestação da DECH em qualquer grau, tanto na análise univariada quanto multivariada. A presença de células infectadas por vírus, que sinalizam a infecção em sua membrana, provavelmente aumentam a exposição de aloantígenos talvez assim induzindo uma maior agressão pela DECH. Talvez por isso também a DECH tenha se associado ao grau de gravidade macroscópico da H/CH ($p=0,04$), como um mecanismo de agressão epitelial direta.

Neste trabalho foi considerado o dia+ 21 (3 semanas) pós-TMO como a data limite para a categorização em H/CH precoce e tardia. Isto foi baseado em dados de estudos de autópsia e biópsia que mostram o período de 3 semanas como o necessário para a restauração dos tecidos, trato gastrointestinal e pele, dos efeitos do regime de condicionamento^(53,71).

Em análise univariada a positividade viral associou-se com a H/CH de início tardio (após o dia + 21), mas perdeu significância em análise multivariada. Isto talvez indique uma relação com a DECH que ocorre a partir deste período, a qual através da sua atuação no sistema imune e/ou o seu tratamento deve ter importância na reativação viral, ou talvez esteja em função do número de casos estudados.

A H/CH na casuística aqui apresentada caracterizou-se como uma complicação predominantemente do período entre o dia +21 até o dia +100, com 76% dos pacientes dentro deste período. Nesta fase em princípio já

houve resolução da agressão quimioterápica e a “pega” (ou enxertia) medular já se estabeleceu, com o paciente ingressando no período de DECH aguda.

Nenhum outro tipo de vírus foi identificado juntando-se todas as técnicas realizadas nos 72 pacientes, exceto por um paciente manifestando hematúria microscópica que apresentou cultura viral positiva para citomegalovírus, cujo exame à ME detectou a presença de ADV. Citomegalovírus é raramente considerado como relacionado com H/CH ⁽⁷³⁾, apesar da virúria por CMV ser freqüentemente constatada ⁽³⁷⁾.

A alta freqüência de pacientes com LMA como doença de base e H/CH associada a vírus (83,3%), apresentou diferença significativa em relação ao observado para os pacientes com LMC. Este fato deve estar relacionado ao tratamento prévio ao TMO para estas duas doenças, uma vez que os pacientes com LMC recebem apenas hidroxiuréia e a LMA, quimioterapia mais agressiva, tendo assim maior comprometimento do sistema imune.

Não foi averiguada a sorologia prévia destes pacientes para tais vírus, mas por dados previamente relatados na literatura, estes vírus muito provavelmente representam reativação da infecção latente, uma vez que os vírus encontrados, adenovírus e poliomavírus apresentam alta prevalência na população geral.

E finalmente, com a finalidade de obter respostas para entender o significado da presença de vírus na urina de pacientes com H/CH, desenhemos este trabalho baseado na técnica de microscopia eletrônica,

método morfológico clássico de detecção viral. Vimos então que este método foi útil, detectando 55,6% dos pacientes com presença de vírus manifestando a H/CH. Nossa intenção a partir daqui é otimizar o tempo despendido pela ME para chegar ao resultado, através da utilização de técnicas de processamento rápido ⁽²⁷⁾, e que a ME represente o ponto de partida para padronização de técnicas de biologia molecular.

6 - CONCLUSÕES

-
1. A incidência de hematúria / cistite hemorrágica pós-transplante de medula óssea foi de 22% (90/402 pacientes no período de Julho de 1991 a Agosto de 1999).
 2. A manifestação da hematúria / cistite hemorrágica pós-transplante de medula óssea está associada à infecção por vírus de células do trato urinário ($p < 0,01$).
 3. A família *Poliomaviridae* e a família *Adenoviridae* são os dois tipos de vírus relacionados ao desenvolvimento da hematúria / cistite hemorrágica pós-transplante de medula óssea, com os poliomavírus sendo o principal agente.
 4. Esta infecção provavelmente representa reativação de vírus latente no trato urinário, pois ambos os tipos detectados (poliomavírus e adenovírus) são uroteliotróficos e de alta prevalência nas populações do mundo.
 5. A hematúria / cistite hemorrágica na casuística aqui apresentada caracterizou-se como uma complicação predominantemente do período entre o dia +21 até o dia +100, distante do regime de condicionamento, reforçando o potencial papel dos vírus e da doença enxerto-contrahospedeiro no seu desenvolvimento.
 6. Na análise univariada, a presença de vírus associou-se à manifestação da doença enxerto-contrahospedeiro aguda, em qualquer grau, ou crônica, e ao início tardio (dia+ >21) da hematúria / cistite hemorrágica,
-

porém o efeito desta última variável mostrou-se não independente na análise multivariada.

7. Foram fatores independentemente associados à presença de vírus:

- (a) a leucemia mielóide aguda (OR= 6,49), talvez pelo maior comprometimento do sistema imune destes pacientes que recebem tratamento mais agressivo quando comparado ao da leucemia mielóide crônica
- (b) a presença da doença enxerto-contrá-hospedeiro (OR= 3,86), que reconhecidamente predispõe a infecções e apresentaria um papel na reativação viral.

8. O grau de hematúria/cistite hemorrágica (apresentação macroscópica) está associado à manifestação da doença enxerto-contrá-hospedeiro ($p=0,04$), que por mecanismo ainda não esclarecido contribui para sua gravidade, talvez pela ação de agressão direta do urotélio.

9. A realização da microscopia eletrônica da urina foi de fundamental importância para o diagnóstico dos vírus da família *Poliomaviridae*, que apresentam reconhecida dificuldade no crescimento em cultura.

10. A microscopia eletrônica representa um método confiável e eficaz na detecção de vírus em urina de pacientes submetidos a transplante de medula óssea com manifestação de hematúria/cistite hemorrágica, devendo ser parte integrante da bateria de investigação etiológica em tal condição.

7- ANEXOS

ANEXO A: Lista geral das características dos 72 pacientes apresentando hematúria / cistite hemorrágica no pós-transplante de medula óssea, quanto a idade, sexo, doença de base, tipo de transplante, regime de condicionamento, manifestação de doença enxerto-contrá-hospedeiro, dia de início do sangramento urinário (dia+), gravidade do sangramento, duração do sangramento, resultados da microscopia eletrônica (ME), imunocitoquímica (ICQ) e cultura viral:

Nº Pac.	Idade/sexo	Tipo TX	Doença de Base	Regime de Condicionamento 1°/2°	DECH Aguda/crônica	Dia +	Grau de H/CH	Duração (Dias)	Forma viral na ME	Tamanho do vírus (nm/DP)	Localização do vírus	Resultado da ME	Resultado do ICQ	Resultado da Cultura
1. CEG	9,35/M	Alo	LLA	BUMEL	I	32	Macro	5	Icosaédrico+ "cristal"	31,83±1,1	N+C	<i>Polioviridae</i>	ADV+	NR
2. ABD	20,91/M	Alo	LMA	BUMEL	IV	61	Macro Grave / Coág./ Obstrução	81	Icosaédrico	62,23±6,7	N	<i>Adenoviridae</i>	Inc ADV	ADV
3. CAN	41,88/M	Alo	LMA	BUMEL	II	81	Macro	22	Icosaédrico	63,7±1,7/ 31,5±0,19	N+cist +C	<i>Adenoviridae</i>	NR	NR
4. GD	42,45/M	Alo	LMA	BUMEL	II/CEP	102	Macro /Coág.	6	Icosaédrico	38,17±2,3	Cist+C	<i>Polioviridae</i>	NR	Neg.
5. JBDO	38,70/M	Alo	LMA	BUMEL	II	52	Macro /Coág.	14	Icosaédrico	67,03±2,2	N	<i>Adenoviridae</i>	NR	ADV
6. LAG	34,62/F	Alo	LMA	BUMEL	II/CEP	185	Macro Grave /Coág.	75	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	JCBK+	NR
7. LNBMV	26,11/F	Alo	LMA	BUMEL	0	41	Microscópica	23	Icosaédrico	63,56±1,5	N	<i>Adenoviridae</i>	NR	NR
8. LSQ	56,97/F	Alo	LMA	BUMEL	?	71	Microscópica	?	Icosaédrico	37,07±2,5	N+Cist +C	<i>Polioviridae</i>	NR	NR
9. MGN	27,51/M	Alo	LMA	BUMEL	II	49	Microscópica	15	Icosaédrico	34,49±1,4	N+C	<i>Polioviridae</i>	ADV/ HSV	NR
10. PJM	18,91/M	Auto	LMA	BUMEL	NA	69	Microscópica	35	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	NR	NR
11. AMGV	39,93/F	Alo	LMC	BUMEL	II	57	Macro	50	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	NR	NR
12. BFD	28,53/M	Alo	LMC	BUMEL	II	77	Macro	12	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	ADV/ CMV/ HSV/ JCBK	NR

Continua

Nº Pac.	Idade/sexo	Tipo TX	Doença de Base	Regime de Condicionamento 1' / 2'	DECH Aguda/ crônica	Dia +	Grau de H/CH	Dura ção (Dias)	Forma viral na ME	Tamanho do vírus (nm/DP)	Localização do vírus	Resultado da ME	Resultado do ICQ	Resultado da Cultura
13. CFA	21,87/M	Alo	LMC	BUMEL	0	48	Macro Grave/Obstrução/Insuf Renal Aguda/Instabilidade Hemodinâmica / Colocação Duplo "J"	32	Icosaédrico	69,89±2,4	N+Cist +C	Adenoviridae	ADV+	NR
14. CKS	19,49/F	Alo	LMC	BUMEL	II	86	Macro /Coág.	7	Icosaédrico	41,79±3,5	N	Polioviridae	CMV Neg.	JCBK+ / ADV/ NR
15. DGM	38,55/M	Alo	LMC	BUMEL	II	46	Macro	11	Icosaédrico	35,11±1,8	N+C	Polioviridae	ADV Neg.	NR
16. FBS	35,38/F	Alo	LMC	BUMEL	III	54	Macro	30	Icosaédrico	68,34±2,3	N+C	Adenoviridae	CMV/ HSV Neg.	ADV CMV/ ADV/ NR
17. HCB	31,96/M	Alo	LMC	BUMEL	II	35	Microscópica	40	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	NR	Neg.
18. JB	30,12/M	Alo	LMC	BUMEL	III	65	Macro Grave/Obstrução/ Cistostomia	92	Icosaédrico	34,08±2,9	N	Polioviridae	JCBK+	NR
19. JC	40,53/M	Alo	LMC	BUMEL	II	31	Macro	24	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	NR	NR
20. JCP	36,52/M	Alo	LMC	BUMEL	IV	57	Macro	9	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	CMV/ HSV Neg.	NR
21. JMSR	33,54/F	Alo	LMC	BUMEL	0	30	Macro	8	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	NR	NR

Continua

Nº	Pac.	Idade/ sexo	Tipo TX	Doença de Base	Regime de Condicionamento 1°/2°	DECH Aguda/ crônica	Dia +	Grau de H/CH	Dura ção (Dias)	Forma viral na ME	Tamanho do vírus (nm/DP)	Locali zação do Virus	Resultado da ME	Resultado do da ICQ	Resultado do da Cultura
22.	JRFS	29,14/M	Alo	LMC	BUMEL	II/CEP	161	Macro /Coág.	7	Icosaédrico	62,7±2,0	N+C	Adenoviridae	CMV/ HSV	Neg.
23.	MLMM	22,44/F	Alo	LMC	BUMEL	II	93	Microscópica	22	Icosaédrico	40,0±0,7	N+Cist	Polioviridae	Neg./ Inc	Neg.
24.	OFC	45,10/F	Alo	LMC	BUMEL	IV	52	Microscópica	20	Icosaédrico	35,71±1,8	N+Cist	Polioviridae	NR	NR
25.	PP	57,66/M	Alo	LMC	BUMEL	II	31	Macro	2	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	NR	NR
26.	SCTM	22,71/F	Alo	LMC	BUMEL	III	42	Microscópica	11	Icosaédrico	63,03±5,5/ 35,90±1,5	N+Cist +C	Adenoviridae+ Polioviridae	ADV/ CMV/ HSV	NR
27.	SFA	42,38/M	Alo	LMC	BUMEL	II	22	Microscópica Macro/ Obstrução Ureteral / Hidronefrose leve	20	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	NR	NR
28.	VDS	9,97/F	Alo	LMC	BUMEL	I	65		14	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	ADV/ CMV/ HSV	NR
29.	VFM	17,44/F	Alo	LMC	BUMEL	II	70	Macro	5	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	JCBK+ /ADV/ CMV/ HSV	NR
30.	WPR	36,07/M	Alo	LMC	BUMEL	II	57	Macro /Coág.	30	Icosaédrico	33,97±1,2	N+Cist	Polioviridae	NR	NR

Continua

Nº	Pac.	Idade/ sexo	Tipo TX	Doença de Base	Regime de Condicionamento 1°/2°	DECH Aguda/ crônica	Dia +	Grau de H/CH	Dura ção (Dias)	Forma viral na ME	Tamanho do vírus (nm/DP)	Locali zação do Vírus	Resultado da ME	Resultado do da ICQ	Resultado da Cultura
31.	AEV	31,15/M	Alo	SMD	BUMEL	II	77	Macro	?	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Inc	NR
32.	NV	52,16/F	Auto	MM	BUMEL	NA	43	Macro /Coág.	24	Icosaédrico	60,48±1,7	C	Adenoviridae	JCBK	NR
33.	RJP	43,83/M	Alo	MM	BUMEL	II/CEP	106	Microscópica	?	Icosaédrico	34,98±2,2	N+Cist +C	Polioviridae	CMV/ HSV	Neg.
34.	JACS	29,24/M	Alo	LNH	BUMEL	II	59	Macro	11	Icosaédrico	30,46±0,7	N+Cist +C	Polioviridae	NR	NR
35.	MRCM	35,63/F	Auto	LNH	BUMEL	NA	32	Macro	2	Icosaédrico	62,51±2,5	mC	Adenoviridae	NR	ADV
36.	SAMC	36,11/M	Auto	LNH	BUMEL	NA	21	Macro	16	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	CMV/ HSV	Neg.
37.	WG	15,30/M	Alo	LNH	BUMEL	0	40	Macro Grave/ Coág./ Obstrução/ Cistostomia	45	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	NR	NR
38.	YCA	18,20/F	Alo	LNH	BUMEL	0	21	Microscópica	1	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	NR	NR
39.	GAO	13,21/M	Alo	LLA	Irradiação Test/ TBI1200CICCE	II	520/ 63	Macro /Coág./ Obstrução Uretral	36	Icosaédrico	35,79±1,7	N+C	Polioviridae	NR	Neg.

Continua

Nº Pac.	Idade/sexo	Tipo TX	Doença de Base	Regime de Condicionamento 1°/2°	DECH Aguda/crônica	Dia +	Grau de H/CH	Duração (dias)	Forma viral na ME	Tamanho do vírus (nm/DP)	Localização do vírus	Resultado da ME	Resultado do ICQ	Resultado da Cultura
40. MASA	17,54/M	Alo	LLA	BUMEL+ Irradiação Test	II	27	Macro	?	Icosaédrico+ filamentos	34,49±1,6	N+Cist +C	Polioviridae	ADV/ HSV CMV Neg.	NR
41. RLIS	16,20/M	Auto	LNH	BUMEL+ Irradiação Test	NA	6	Microscópica	1	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	JCBK+	Inc
42. AFT	18,72/M	Alo	AAS	BU1CIC	I	42	Macro /Coág.	11	Icosaédrico	36,69±1,7	C	Polioviridae	NR	Neg.
43. AVTP	12,90/F	Alo	AAS	BU1CIC	?	22	Microscópica	7	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	NR	Neg.
44. IAN	25,10/M	Alo	AAS	BU1CIC	II	49	Microscópica	20	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	NR	NR
45. IAP	43,24/F	Alo	AAS	BU1CIC	II	35	Macro	5	Icosaédrico+ "cristal"	35,54±0,4	N+C	Polioviridae	ADV/ CMV	NR
46. IB	21,91/M	Alo	AAS	BU1CIC	I	19	Macro	20	Icosaédrico	63,14±3,7	N	Adenoviridae	ADV+	NR
47. JFN	23,62/F	Alo	AAS	BU1CIC	0	28	Microscópica	3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	JCBK	Neg.
48. MATR	37,39/F	Alo	AAS	BU1CIC	III/CEP	102	Macro	?	Icosaédrico	36,64±0,6	N+Cist	Polioviridae	ADV/ CMV	NR
49. PSS	17,79/M	Alo	AAS	BU1CIC	0	20	Microscópica	?	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	ADV	NR
50. RT	21,43/M	Alo	AAS	BU1CIC	III	62	Macro /Coág. Grave/ Obstrução/ Nefrectomia	?	Icosaédrico	60,97±1,0	N+C	Adenoviridae	NR	NR
51. SAN	34,87/M	Alo	AAS	BU1CIC	0	63	Microscópica	5	Icosaédrico	65,30±5,9	N+C	Adenoviridae	NR	CMV
52. SLS	21,38/M	Alo	AAS	BU1CIC	0	22	Macro	10	Icosaédrico	Neg.	Neg.	Neg.	ADV/ JCBK	Neg.

Continua

Nº	Pac.	Idade/ sexo	Tipo TX	Doença de Base	Regime de Condicionamento 1°/2°	DECH Aguda/ crônica	Dia +	Grau de H/CH	Dura ção (Dias)	Forma viral na ME	Tamanho do vírus (nm/DP)	Locali zação do Vírus	Resultado da ME	Resultado do da ICQ	Resultado da Cultura
53.	SMG	23,47/F	Alo	AAS	BU1CIC	0/CL	167	Microscópica	8	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	NR	Neg.
54.	AMZ	40,55/F	Alo	LMC	BU4CIC	II/CEP	214	Microscópica	34	Icosaédrico	33,70±3,9	N+C	Poliomaviridae	NR	NR
55.	CVB	46,16/M	Alo	LMC	BU4CIC	0	112	Macro	22	Icosaédrico	34,64±0,9	N+Cist	Poliomaviridae	NR	NR
56.	JLPB	29,96/M	Alo	LMC	BU4CIC	II	50	Macro /Coág.	10	Icosaédrico	35,86±0,1	N+Cist	Poliomaviridae	ADV/ CMV	NR
57.	RR	33,43/M	Alo	LMC	BU4CIC	0	13	Microscópica	?	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	ADV/ CMV	NR
58.	RSS	32,57/M	Alo	LMC	BU4CIC	0	51	Macro /Coág.	56	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	NR	NR
59.	TGT	14,15/F	Auto/Alo	LNH	CVB/ BUMEL	III	82/44	Macro /Coág.	2	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Inc HSV	NR
60.	ERQ	33,96/F	Alo	LMA	CIC	II	56	Macro	14	Icosaédrico	61,56±1,7	N+C	Adenoviridae	NR	NR
61.	JBFA	26,60/M	Alo	LMC	CIC	IV	62	Macro	7	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	ADV/ CMV/ HSV	NR
62.	CFS	35,99/M	Alo	Tumor Germ. Testic.	FLUMEL	0	29	Macro	2	Icosaédrico	35,16±2,0	N+C	Poliomaviridae	ADV Neg.	NR
63.	RAS	16,58/M	Alo	LLA	TBIVP16MEL/ FLUMEL	II	134/ 22	Macro /Coág. Macro /Coág.	20	Icosaédrico	34,30±1,6	N+C	Poliomaviridae	Inc JCBK	NR
64.	VAM	13,82/F	Alo	LMA	TB11200CIC	0	28	Grave/ Choque Hipovolêmico	99	Icosaédrico	35,95±1,1	N+Cist +C	Poliomaviridae	CMV/ HSV	ADV
65.	VSS	19,34/F	Alo/MM	LMA	TB11200CIC	II	50	Macro	6	Icosaédrico	37,02±1,6	C	Poliomaviridae	JCBK+ / ADV Neg.	NR

Continua

Nº Pac.	Idade/sexo	Tipo TX	Doença de Base	Regime de Condicionamento 1°/2°	DECH Aguda/crônica	Dia +	Grau de H/CH	Duração (Dias)	Forma viral na ME	Tamanho do vírus (nm/DP)	Localização do vírus	Resultado da ME	Resultado do da ICQ	Resultado da Cultura
66. JVS	29,12/M	Alo/MM	LMC	TBI1200CIC	II/CEP	763	Macro /Coág.	6	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	CMV/HSV	Neg.
67. CRR	34,44/M	Alo	LABif	TBI1200CICMP	I	51	Macro /Coág.	8	Icosaédrico	38,22±1,2	N+C	<i>Polioviridae</i>	Neg.	NR
68. FST	19,88/M	Alo	LLA	TBI1200CICMP	II	64	Macro /Coág.	7	Icosaédrico + "cristal"	35,55±2,4	N+Cist +C	<i>Polioviridae</i>	CMV/HSV	Inc
69. MEA	34,27/M	Alo	LLA	TBI1200CICMP	III	91	Macro /Coág.	27	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	NR	NR
70. SRVF	41,88/F	Alo	LMC	TBI1200CICMP	0	43	Microscópica	8	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Inc JCBK	Neg.
71. FR	33,05/M	Auto	LLA	TBI600CIC+ IrradiaçãoTest	NA	18	Macro /Coág.	23	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	NR	NR
72. JETS	24,55/M	Alo	LNH	TBI600CIC+ IrradiaçãoTest	I/CEQ	232	Macro /Coág.	8	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	CMV/HSV	Neg.

Abreviações: Alo= Alogênico; Auto= autoplástico; MM= enxerto "mismatch"; AAS = anemia aplásica severa; LMC= leucemia mielóide crônica; LMA= leucemia mielóide aguda; LLA= leucemia linfóide aguda; LNH= linfoma Não-Hodgkin; LABif= leucemia aguda bifenotípica; MM= mieloma múltiplo; SMD= síndrome mielodisplásica; BUMEL= regime de condicionamento utilizando bussulfano 4 mg/kg v.o. em doses diárias divididas em 4 por 4 dias (dose total 16mg/kg) e melfalano 140 mg/m² e.v. por 1 dia; CIC –condicionamento utilizando ciclofosfamida 50 mg/kg e.v. em dose única diária por 4 dias (dose total 200mg/kg); BU1CIC= bussulfano por 1 dia com ciclofosfamida na dose acima; BU4CIC – bussulfano por 4 dias e ciclofosfamida na dose acima; Irradiação Test= Irradiação testicular; TBI1200CIC= irradiação corporal total com 1200 cGy por 3 dias e ciclofosfamida 50 mg/kg e.v.; MP= metiprednisona 20 mg/kg/dia; TBI600CIC= irradiação corporal total 600 cGy e ciclofosfamida 50 mg/kg e.v.; FLUMEL= outro protocolo; CVB= outro protocolo; TBNP16MEL= outro protocolo; DECH= doença enxerto contra hospedeiro aguda (grau I a IV); CEP = DECH crônica extensa progressiva; CEQ= DECH crônica extensa quiescente; CL= DECH crônica limitada; NA= Não aplicável; ICQ= reação imunocitoquímica; ADV= adenovírus; JCBK= citomegalovírus; HSV= herpes simplex; Inc= resultado inconclusivo; ? = ignorado; NR= Não realizado.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
1. AKURA, K.; HATAKENAKA, M.; KAWAI, K.; TAKENAKA, M.; KATO, K. -
Use of immunocytochemistry on urinary sediments for the rapid
identification of human polyomavirus infection. A case report. *Acta
Cytol.*, v. 32, n. 2, p. 247-51, 1988.
 2. AMBINDER, R.F.; BURNS, W.; FORMAN, M.; CHARACHE, P.;
ARTHUR, R.; BESCHORNER, W.; SANTOS, G.; SARAL, R.
Hemorrhagic cystitis associated with adenovirus infection in bone
marrow transplantation. *Arch. Intern. Med.*, v. 146, n. 7, p. 1400-1,
1986.
 3. APPERLEY, J.F.; RICE, S.J.; BISHOP, J.A.; CHIA, Y.C.; KRAUSZ, T.;
GARDNER, S.D.; GOLDMAN, J.M. - Late-onset hemorrhagic cystitis
associated with urinary excretion of polyomaviruses after bone
marrow transplantation. *Transplantation*, v. 43, n. 1, p. 108-12, 1987.
 4. ARTHUR, R.R.; SHAH, K.V.; BAUST, S.J.; SANTOS, G.W.; SARAL, R.
Association of BK viruria with hemorrhagic cystitis in recipients of
bone marrow transplants. *N. Engl. J. Med.*, v. 315, n. 4, p. 230-4,
1986.
 5. ARTHUR, R.R.; SHAH, K.V.; CHARACHE, P.; SARAL, R. - BK and JC
virus infections in recipients of bone marrow transplants. *J. Infect.
Dis.*, v. 158, n. 3, p. 563-9, 1988.
-

-
6. ATKINSON, K.; BIGGS, J.; NOBLE, G.; ASHBY, M.; CONCANNON, A.;
DODDS, A. - Preparative regimens for marrow transplantation
containing busulphan are associated with haemorrhagic cystitis and
hepatic veno-occlusive disease but a short duration of leucopenia
and little oro-pharyngeal mucositis. Bone Marrow Transplant., v. 2,
n. 4, p. 385-94, 1987.
 7. ATKINSON, K.; BIGGS, J.C.; GOLOVSKY, D.; CONCANNON, A.;
DODDS, A.; DOWNS, K.; ASHBY, M. - Bladder irrigation does not
prevent haemorrhagic cystitis in bone marrow transplant recipients.
Bone Marrow Transplant. v. 7, n. 5, p. 351-4, 1991.
 8. AZZI, A.; FANCI, R.; BOSI, A.; CIAPPI, S.; ZAKRZEWSKA, K.; DE
SANTIS, R.; LASZLO, D.; GUIDI, S.; SACCARDI, R.; VANNUCCHI,
A.M.; LONGO, G.; ROSSI-FERRINI, P. - Monitoring of polyomavirus
BK viruria in bone marrow transplantation patients by DNA
hybridization assay and by polymerase chain reaction: an approach
to assess the relationship between BK viruria and hemorrhagic
cystitis. Bone Marrow Transplant., v. 14, n. 2, p. 235-40, 1994.
 9. BANDINI, G.; BELARDINELLI, A.; ROSTI, G.; CALORI, E.; MOTTA,
M.R.; RIZZI, S.; BENINI, C.; TURA, S. - Toxicity of high-dose
busulphan and cyclophosphamide as conditioning therapy for
-

allogeneic bone marrow transplantation in adults with haematological malignancies. Bone Marrow Transplant., v. 13, n. 5, p. 577-81, 1994.

10. BEELEN, D.W.; QUABECK, K.; GRAEVEN, U.; SAYER, H.G.;
MAHMOUD, H.K.; SCHAEFER, U.W. - Acute toxicity and first clinical results of intensive postinduction therapy using a modified busulfan and cyclophosphamide regimen with autologous bone marrow rescue in first remission of acute myeloid leukemia. Blood, v. 74, n. 5, p. 1507-16, 1989.
 11. BOGDANOVIC, G.; LJUNGMAN, P.; WANG, F.; DALIANIS, T. Presence of human polyomavirus DNA in the peripheral circulation of bone marrow transplant patients with and without hemorrhagic cystitis. Bone Marrow Transplant., v. 17, n. 4, p. 573-6, 1996.
 12. BOGDANOVIC, G.; PRIFTAKIS, P.; TAEMMERAES, B.;
GUSTAFSSON, A.; FLAEGSTAD, T.; WINIARSKI, J.; DALIANIS, T. - Primary BK virus (BKV) infection due to possible BKV transmission during bone marrow transplantation is not the major cause of hemorrhagic cystitis in transplanted children. Pediatr. Transplant., v. 2, n. 4, p. 288-93, 1998.
-

-
13. BONTEMPS, I.; FRAPPAZ, D.; LEVIGNES, F.; FREYCON, F. - Cystite hématurique après allogreffe médullaire: une observation. *Pédiatrie*, v. 47, n. 7-8, p. 55-9, 1992.
 14. BOUBENIDER, S.; HIESSE, C.; MARCHAND, S.; HAFI, A.; KRIAA, F.; CHARPENTIER, B. - Post-transplantation polyomavirus infections. *J. Nephrol.*, v. 12, n. 1, p. 24-9, 1999.
 15. BRUGIERES, L.; HARTMANN, O.; TRAVAGLI, J.P.; BENHAMOU, E.; PICO, J.; VALTEAU, D.M.; KALIFA, C.; PATTE, C.; FLAMANT, F.; LEMERLE, J. - Hemorrhagic cystitis following high-dose chemotherapy and bone marrow transplantation in children with malignancies: incidence, clinical course, and outcome. *J Clin Oncol.*, v. 7, n. 2, p. 194-9, 1989.
 16. BUCHANAN, W.; BOWMAN, J.S.; JAFFERS, G. - Adenoviral acute hemorrhagic cystitis following renal transplantation. *Am. J. Nephrol.*, v. 10, n. 4, p. 350-1, 1990.
 17. CANNON, J.; LINKE, C.A.; COS, L.R. - Cyclophosphamide-associated carcinoma of urothelium: modalities for prevention. *Urology*, v. 38, n. 5, p. 413-6, 1991.
-

-
18. CARPENTER, P.A.; MARSHAL, G.M.; GIRI, N.; VOWELS, M.R.;
RUSSELL, S.J. - Allogeneic bone marrow transplantation for children
with acute lymphoblastic leukemia conditioned with busulfan,
cyclophosphamide and melphalan. *Bone Marrow Transplant.*, v.18,
n. 3, p. 489-94, 1996.
19. CASSANO, W.F. - Intravenous ribavirin therapy for adenovirus cystitis
after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone marrow
transplant.*, v. 7, n. 3, p. 247-8, 1991.
20. CHAN, P.K.; IP, K.W.; SHIU, S.Y.; CHIU, E.K.; WONG, M.P.; YUEN,
K.Y. - Association between polyomaviruria and microscopic
haematuria in bone marrow transplant recipients. *J. Infect.*, v. 29, n.
2, p. 139-46, 1994.
21. CHANG, D.; WANG, M.; OU, W.C.; LEE, M.S.; HO, H.N.; TSAI, R.T. -
Genotypes of human polyomaviruses in urine samples of pregnant
women in Taiwan. *J. Med. Virol.*, v. 48, n. 1, p. 95-101, 1996.
22. CHAPMAN, C.; FLOWER, A.J.; DURRANT, S.T. - The use of vidarabine
in the treatment of human polyomavirus associated acute
haemorrhagic cystitis. *Bone Marrow Transplant.*, v. 7, n. 6, p. 481-3,
1991.
-

-
23. CHILDS, R.; SANCHEZ, C.; ENGLER, H.; PREUSS, J.; ROSENFELD, S.; DUNBAR, C.; VAN RHEE, F.; PLANT, M.; PHANG, S.; BARRETT, A.J. - High incidence of adeno- and polyomavirus-induced hemorrhagic cystitis in bone marrow allotransplantation for hematological malignancy following T cell depletion and cyclosporine. *Bone Marrow Transplant.*, v. 22, n. 9, p. 889-93, 1998.
24. COLEMAN, D.V.; RUSSELL, W.J.; HODGSON, J.; P e T.; MOWBRAY, J.F. - Human papovavirus in Papanicolaou smears of urinary sediment detected by transmission electron microscopy. *J. Clin. Pathol.*, v. 30, n. 11, p. 1015-20, 1977.
25. COTTLER-FOX, M.; LYNCH, M.; DEEG, H.J.; KOSS, L.G. - Human polyomavirus: lack of relationship of viruria to prolonged or severe hemorrhagic cystitis after bone marrow transplant. *Bone Marrow Transplant.*, v. 4, n. 3, p. 279-82, 1989.
26. DOANE, F.W. - Virus morphology as an aid for rapid diagnosis. *Yale J Biol Med.*, v.53, n. 1, p. 19-25, 1980.
27. DUARTE, M.I.S.; MARIANO, O.N.; TAKAKURA, F.H.; UIP, D.E.; CORBETT, C.E.P. - A fast method for processing biologic material for electron microscopic diagnosis in infectious disease. *Ultrastruct. Pathol.*, v. 16, n. 4, p. 475-82, 1992.
-

-
28. ECHAVARRIA, M.S.; RAY, S.C.; AMBINDER, R.; DUMLER, J.S.;
CHARACHE, P. - PCR detection of adenovirus in a bone marrow
transplant recipient: hemorrhagic cystitis as a presenting
manifestation of disseminated disease. J. Clin. Microbiol., v. 37, n. 3,
p. 686-9, 1999.
29. EFROS, M.; AHMED, T.; CHOUDHURY, M. - Cyclophosphamide-
induced hemorrhagic pyelitis and ureteritis associated with cystitis in
marrow transplantation. J Urol., v. 144, n. 5, p. 1231-2, 1990.
30. EFROS, M.D.; AHMED, T.; COOMBE, N.; CHOUDHURY, M.S. -
Urologic complications of high-dose chemotherapy and bone marrow
transplantation. Urology, v. 43, n. 3, p. 355-360, 1994.
31. ERER, B.; ANGELUCCI, E.; BARONCIANI, D.; TOMASUCCI, M.;
GIARDINI, C.; GAZIEV, J. - Hemorrhagic cystitis after allogeneic
bone marrow transplantation for thalassemia. Bone Marrow
Transplant., v.12, Suppl. 1, p. 93-5, 1993.
32. FALERI, M.; GUFFANTI, M.C.; LAMPERTICO, P. - Infezione da
poliomavirus delle vie urinarie. Aspetti citologici ed ultrastruturali.
Pathologica, v. 86, n. 1, p. 52-7, 1994.
-

-
33. FONG, C.K. - Electron microscopy for the rapid detection and identification of viruses from clinical specimens. *Yale J Biol Med.*, v. 62, n. 2, p. 115-30, 1989.
34. GREEN, W.R.; GREAVES, W.L.; FREDERICK, W.R.; TADDESE-HEATH, L. - Renal infection due to adenovirus in a patient with human immunodeficiency virus infection. *Clin. Infect. Dis.*, v. 18, n. 6, p. 989-91, 1994.
35. HALE, G.A.; HESLOP, H.E.; KRANCE, R.A.; BRENNER, M.A.; JAYAWARDENE, D.; SRIVASTAVA, D.K.; PATRICK, C.C. - Adenovirus infection after pediatric bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, v. 23, n. 3, p. 277-82, 1999.
36. HIRAOKA, A.; TESHIMA, H.; MITSUI, H.; OHSUGA, Y.; NAKAGAWA, M.; NAKAMURA, H.; SHIBATA, H.; MASAOKA, T.; ISHIGAMI, S. - Ureteric obstruction after allogeneic bone marrow transplantation: an unusual complication. *Bone Marrow Transplant.*, v. 4, n. 4, p. 449-51, 1989.
37. HIRAOKA, A.; TESHIMA, H.; MITSUI, H.; OHSUGA, Y.; NAKAGAWA, M.; NAKAMURA, H.; SHIBATA, H.; MASAOKA, T.; ISHIGAMI, S.; TAGUCHI, F. - Hemorrhagic cystitis after bone marrow transplantation: importance of a thin sectioning technique on urinary
-

-
- sediments for diagnosis. *Bone Marrow Transplant.*, v. 7, n. 2, p. 107-11, 1991.
38. HSIUNG, G.D.; FONG, C.K.; AUGUST, M.J. - The use of electron microscopy for diagnosis of virus infections: an overview. *Prog. Med. Virol.*, v. 25, p. 133-59, 1979.
39. ITO, M.; HIRABAYASHI, N.; UNO, Y.; NAKAYAMA, A.; ASAI, J. - Necrotizing tubulointerstitial nephritis associated with adenovirus infection. *Hum. Pathol.*, v. 22, n. 12, p. 1225-31, 1991.
40. ITOH, S.; IRIE, K.; NAKAMURA, Y.; OHTA, Y.; HARATAKE, A.; MORIMATSU, M. - Cytologic and genetic study of polyomavirus-infected or polyomavirus-activated cells in human urine. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, v. 122, n. 4, 333-7, 1998.
41. JURADO, M.; NAVARRO, J.M.; HERNÁNDEZ, J.; MOLINA, M.A.; DePABLOS, J.M. - Adenovirus-associated haemorrhagic cystitis after bone marrow transplantation successfully treated with intravenous ribavirin. *Bone Marrow Transplant.*, v. 15, n. 4, p. 651-2, 1995.
42. KANFER, E. - Chemotherapy conditioning agents. In: TRELEAVEN, J. & WIERNIK, P. (eds.) - *Color atlas and text of bone marrow transplantation*. London, Mosby-Wolfe, 1995. p. 161-7.
-

-
43. KAPELUSHNIK, J.; VERSTANDIG, A.; OR, R.; MERETYK, S.;
DRAKOS, P.; NAPARSTEK, E.; NAGLER, A. - Hydronephrosis in
children after bone marrow transplantation: case reports. Bone
Marrow Transplant., v.17, p. 873-875, 1996.
44. KAWAKAMI, M.; UEDA, S.; MAEDA, T.; KARASUNO, T.; TESHIMA, H.;
HIRAOKA, A.; NAKAMURA, H.; TANAKA, K.; MASAOKA, T. -
Vidarabine therapy for virus-associated cystitis after allogeneic bone
marrow transplantation. Bone marrow transplant., v. 20, n. 6, p. 485-
90, 1997.
45. KITABAYASHI, A.; HIROKAWA, M.; KUROKI, J.; NISHINARI, T.;
NIITSU, H.; MIURA, A.B. - Successful vidarabine therapy for
adenovirus type 11-associated acute hemorrhagic cystitis after
allogeneic bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant.,
v. 14, n. 5, p. 853-4, 1994.
46. LETENDRE, L.; HOAGLAND, C.; GERTZ, M.A. - Hemorrhagic cystitis
complicating bone marrow transplantation. Mayo Clin. Proc., v. 67, n.
2, p. 128-30, 1992.
47. LEVINE, L.A.; JARRARD, D.F. - Treatment of cyclophosphamide-
induced hemorrhagic cystitis with intravesical carboprost
tromethamine. J. Urol., v. 149, n. 4, p. 719-23, 1993.
-

-
48. LONDERGAN, T.A.; WALZAK, M.P. - Hemorrhagic cystitis due to adenovirus infection following bone marrow transplantation. *J. Urol.*, v. 151, n. 4, p. 1013-4, 1994.
49. MADELEY, C.R. - Origins of electron microscopy and viral diagnosis. *J. Clin. Pathol.*, v. 50, n. 6, p. 454-6, 1997.
50. MARTINO, R.; BADELL, I.; BRUNET, S.; SUREDA, A.; TORRAS, A.; CUBBELS, J.; DOMINGO-ALBOS, A. - High-dose busulfan and melphalan before bone marrow transplantation for acute nonlymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant.*, v. 16, n. 2, p. 209-12, 1995.
51. MATHUR, V.S.; OLSON, J.L.; DARRAGH, T.M.; BENEDICT YEN, T.S. - Polyomavirus-induced interstitial nephritis in two renal transplant recipients: case reports and review of the literature. *Am. J. Kidney Dis.*, v. 29, n. 5, p. 754-8, 1997.
52. MATSUYAMA, T.; KOJIMA, S.; KATO, K. - Allogeneic bone marrow transplantation for childhood leukemia following a busulfan and melphalan preparative regimen. *Bone Marrow Transplant.*, v. 22, n. 1, p. 1-6, 1998.
-

-
53. McDONALD, G.B.; SALE, G.E. - The human gastrointestinal tract after allogeneic marrow transplantation. In: SALE, G.E. & SHULMAN, H.M. (ed.). The pathology of bone marrow transplantation. New York, Masson, 1984. p 77-103.
54. MIRZA, N.; WHIMBEY, E.; CHAMPLIN, R.; YOUSUF, H.; LEWIS, V.; PRZEPIORKA, D.; TARRAND, J.; BODEY, G. - Adenovirus infections in adult bone marrow transplant (BMT) recipients. Blood, v. 86, n. 10 (suppl. 1), p. 218a, 1995.
55. MIYAMURA, K.; MINAMI, S.; MATSUYAMA, T.; KODERA, Y.; YAMAUCHI, T.; TAHARA, T.; SAO, H.; MORISHIMA, Y.; YOKOMAKU, S. - Adenovirus-induced late onset hemorrhagic cystitis following allogeneic bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant., v. 2, n. 1, p. 109-15, 1987.
56. MORGAN, M.; DODDS, A.; ATKINSON, K.; SZER, J.; DOWNS, K.; BIGGS, J. - The toxicity of busulphan and cyclophosphamide as the preparative regimen for bone marrow transplantation. Br. J. Haematol., v. 77, n. 4, p. 529-34, 1991.
57. NEVO, S.; ENGER, C.; SWAN, V.; WOJNO, K.J.; FULLER, A.K.; ALTOMONTE, V.; BRAINE, H.G.; NOGA, S.J.; VOGELSANG, G.B. - Acute bleeding after allogeneic bone marrow transplantation:
-

association with graft versus host disease and effect on survival.

Transplantation, v. 67, n. 5, p. 681-9, 1999.

58. ÖST, L.; LÖNNQVIST, B.; ERIKSSON, L.; LJUNGMAN, P.; RINGDÉN, O. - Hemorrhagic cystitis--a manifestation of graft versus host disease? Bone Marrow Transplant., v. 2, n. 1, p. 19-25, 1987.
59. RANDHAWA, P.S.; FINKELSTEIN, S.; SCANTLEBURY, V.; SHAPIRO, R.; VIVAS, C.; JORDAN, M.; PICKEN, M.M.; DEMETRIS, A.J. - Human polyoma virus-associated interstitial nephritis in the allograft kidney. Transplantation, v. 67, n. 1, p. 103-9, 1999.
60. REDMAN, J.F.; KLETZEL, M. - Cutaneous vesicotomy with direct intravesical application of formalin: management of severe vesical hemorrhage resulting from high dose cyclophosphamide in boys. J. Urol., v. 151, n. 4, p. 1048-50, 1994.
61. RINGDÉN, O.; LABOPIN, M.; TURA, S.; ARCESE, W.; IRIONDO, A.; ZITTOUN, R.; SIERRA, J.; GORIN, N.C. - A comparison of busulphan versus total body irradiation combined with cyclophosphamide as conditioning for autograft or allograft bone marrow transplantation in patients with acute leukaemia. Br. J. Haematol., v. 93, n. 3, p. 637-45, 1996.
-

-
62. RUSSELL, S.J.; VOWELS, M.R.; VALE, T. - Haemorrhagic cystitis in paediatric bone marrow transplant patients: an association with infective agents, GVHD and prior cyclophosphamide. *Bone Marrow Transplant.*, v. 13, n. 5, p. 533-9, 1994.
63. SAITOH, K.; SUGAE, N.; KOIKE, N.; AKIYAMA, Y.; IWAMURA, Y.; KIMURA, H. - Diagnosis of childhood BK virus cystitis by electron microscopy and PCR. *J. Clin. Pathol.*, v. 46, n. 8, p. 773-5, 1993.
64. SALE, G.E. & SHULMAN, H.M. - Pathology of the other organ systems. In: SALE, G.E. & SHULMAN, H.M. (eds) - *The pathology of bone marrow transplantation*. New York, Masson, 1984. p. 194-6.
65. SEBER, A.; SHU, X.O.; DEFOR, T.; SENCER, S.; RAMSAY, N. - Risk factors for severe hemorrhagic cystitis following BMT. *Bone Marrow Transplant.*, v. 23, n. 1, p. 35-40, 1999.
66. SENCER, S.F.; HAAKE, R.J.; WEISDORF, D.J. - Hemorrhagic cystitis after bone marrow transplantation. Risk factors and complications. *Transplantation*, v. 56, n. 4, p. 875-9, 1993.
67. SHAW, P.J.; HUGH-JONES, K.; HOBBS, J.R.; DOWNIE, C.J.C.; BARNES, R. - Busulphan and cyclophosphamide cause little early
-

toxicity during displacement bone marrow transplantation in fifty children. Bone Marrow Transplant., v. 1, n. 2, p. 193-200, 1986..

68. SHEPHERD, J.D.; PRINGLE, L.E.; BARNETT, M.J.; KLINGEMANN, H-G.; REECE, D.E.; PHILLIPS, G.L. - Mesna versus hyperhydration for the prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in bone marrow transplantation. J. Clin. Oncol., v. 9, n. 11, p. 2016-20, 1991.
69. SHIELDS, A.F.; HACKMAN, R.C.; FIFE, K.H.; COREY, L., MEYERS, J.D. - Adenovirus infection in patients undergoing bone-marrow transplantation. N. Engl. J. Med., v. 312, n. 9, p. 529-33, 1985.
70. SHINOHARA, T.; MATSUDA, M.; CHENG, S.H.; MARSHALL, J. - FUJITA, M., NAGASHIMA, K. - BK virus infection of the human urinary tract. J. Med. Virol., v. 41, n. 4, p. 301-5, 1993.
71. SHULMAN, H.M.; SALE, G.E. - Pathology of acute and chronic cutaneous GVHD. In: Sale, G.E. & Shulman, H.M. (ed.). The Pathology of Bone Marrow Transplantation. New York, Masson, 1984. p. 40-76.
72. SHULMAN, H.M.; SULLIVAN, K.M.; WEIDEN, P.L.; McDONALD, G.B.; STRIKER, G.E.; SALE, G.E.; HACKMAN, R.; TSOI, M-S, STORB,
-

-
- R.; THOMAS, E.D. - Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *Am. J. Med.*, v. 69, n. 2, p. 204-17, 1980.
73. SPACH, D.H.; BAUWENS, J.E.; MYERSON, D.; MUSTAFA, M.M.; BOWDEN, R.A. Cytomegalovirus-induced hemorrhagic cystitis following bone marrow transplantation. *Clin Infect Dis.*, v. 16, n. 1, p. 142-4, 1993.
74. SRIVASTAVA, A.; BRADSTOCK, K.F.; SZER, J.; DE BORTOLI, L.; GOTTLIEB, D.J. - Busulphan and melphalan prior to autologous bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, v.12, n. 4, p.323-9, 1993.
75. STORB, R.; THOMAS, E.D.; BUCKNER, C.D.; CLIFT, R.A.; DEEG, H.J.; FEFER, A.; GOODELL, B.W.; SALE, G.E.; SANDERS, J.E.; SINGER, J.; STEWART, P.; WEIDEN, P.L. - Marrow transplantation in thirty "untransfused" patients with severe aplastic anemia. *Ann. Intern. Med.*, v. 92, n. 1, p. 30-6, 1980.
76. SULLIVAN, K.M. - Current status of bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, v. 21, n. 3 (Suppl. 1), p. 41-50, 1989.
-

-
77. SUNDSFJORD, A.; FLAEGSTAD, T.; FLO, R.; SPEIN, A.R.;
PEDERSEN, M.; PERMIN, H.; JULSRUD, J.; TRAAVIK, T. - BK and
JC viruses in human immunodeficiency virus type 1-infected persons:
prevalence, excretion, viremia, and viral regulatory regions. J. Infect.
Dis., v. 169, n. 3, p. 485-90, 1994.
78. THOMAS, A.E.; PATTERSON, J.; PRENTICE, H.G.; BRENNER, M.K.;
GANCZAKOWSKI, M.; HANCOCK, J.F.; PATTINSON, J.K.;
BLACKLOCK, H.A.; HOPERWELL, J.P. - Haemorrhagic cystitis in
bone marrow transplantation patients: possible increased risk
associated with prior busulphan therapy. Bone Marrow Transplant.,
v. 1, n. 4, p. 347-55, 1987.
79. THOMAS, E.D.; STORB, R.; CLIFT, R.A.; FEFER, A.; JOHNSON, F.L.;
NEIMAN, P.E.; LERNER, K.G.; GLUCKSBERG, H.; BUCKNER, C.D.
- Bone marrow Transplantation. N. Engl. J. Med., v. 292, n. 16, p.
832-43, 1975.
80. THOMAS, E.D.; BUCKNER, C.D.; BANAJI, M.; CLIFT, R.A.; FEFER, A.;
FLOURNOY, N.; GOODELL, B.W.; HICKMAN, R.O.; LERNER, K.G.;
NEIMAN, P.E.; SALE, G.E.; SANDERS, J.E.; SINGER, J.;
STEVENS, M.; STORB, R.; WEIDEN, P.L. - One hundred patients
with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation,
-

and allogeneic marrow transplantation. *Blood*, v. 49, n. 4, p. 511-33, 1977.

81. TURKERI, L.N.; LUM, L.G.; UBERTI, J.P.; ABELLA, E.; MOMIN, F.; KARANES, C.; SENSENBRENNER, L.L.; HAAS, G.P. - Prevention of hemorrhagic cystitis following allogeneic bone marrow transplant preparative regimens with cyclophosphamide and busulfan: role of continuous bladder irrigation. *J. Urol.*, v. 153, n. 3, p. 637-40, 1995.
82. VEY, N.; De PRJIJCK, B.; FAUCHER, C.; STOPPA, A.M.; SAINTY, D.; LAFAGE, M.; BOUABDALLAH, R.; CHABANNON, C.; CAMERLO, J.; GASTAUT, J.A.; MARANINCHI, D.; BLAISE, D. - A pilot study of busulfan and melphalan as preparatory regimen prior to allogeneic bone marrow transplantation in refractory or relapsed hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant.*, v. 18, n. 3, p. 495-9, 1996.
83. VÖGELI, T.A.; PEINEMANN, F.; BURDACH, S.; ACKERMANN, R. - Urological treatment and clinical course of BK polyomavirus-associated hemorrhagic cystitis in children after bone marrow transplantation. *Eur Urol.*, v. 36, n. 3, p. 252-7, 1999.
84. YANG, C.C.; HURD, D.D.; CASE, L.D.; ASSIMOS, D.G. - Hemorrhagic cystitis in bone marrow transplantation. *Urology*, v. 44, n. 3, p. 322-8, 1994.
-