



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
BIOLOGIA DE AGENTES INFECCIOSOS E PARASITÁRIOS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS INFECÇÕES PELOS
POLIOMAVIRUS HUMANOS JC e BK EM PACIENTES RENAIIS CRÔNICOS
CANDIDATOS A TRANSPLANTE RENAL NO ESTADO DO ACRE**

FERNANDO DE ASSIS FERREIRA MELO

Belém-PA
2011

FERNANDO DE ASSIS FERREIRA MELO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS INFECÇÕES PELOS
POLIOMAVIRUS HUMANOS JC e BK EM PACIENTES RENAIIS CRÔNICOS
CANDIDATOS A TRANSPLANTE RENAL NO ESTADO DO ACRE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Antonio C. R. Vallinoto

Belém-PA
2011

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Melo, Fernando de Assis Ferreira

Caracterização molecular das infecções pelos poliomavírus humanos JC e BK em pacientes renais crônicos candidatos a transplante renal no estado do Acre / Fernando de Assis Ferreira Melo. – 2011.

981 f.; 23 cm

Orientador: Antonio C. R. Vallinoto.

Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Pará. Centro de Ciências Biológicas. Belém, 2011.

Inclui referências bibliográficas e anexos.

1. JCV e BKV. 2. Doença renal crônica. I. Título.

CDD 21. ed. 617.75

FERNANDO DE ASSIS FERREIRA MELO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS INFECÇÕES PELOS
POLIOMAVIRUS HUMANOS JC e BK EM PACIENTES RENAIIS CRÔNICOS
CANDIDATOS A TRANSPLANTE RENAL NO ESTADO DO ACRE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Banca Examinadora: Prof. Dr. Ricardo Ishak
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA
Profa. Dra. Izaura Maria Vieira Cayres Vallinoto
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA
Prof. Dr. Edvaldo Carlos Brito Loureiro
Instituto Evandro Chagas, IEC/SVS
Profa. Dra. Jeannie Nascimento dos Santos (Suplente)

Belém, 25 de janeiro de 2011

Diga-me e eu esquecerei, mostre-me e eu lembrarei, deixe-me fazer e

eu aprenderei

(Fernando Pessoa)

À minha querida mãe,

Maria de Lourdes Ferreira Melo

Que me ensinou a trilhar os caminhos do saber...

...que me alertou o quão seriam árduos...

...que me fez enxergar a recompensa valiosa no final.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto, inicialmente pela aceitação em ser meu orientador nessa dissertação de mestrado. Foi uma experiência gratificante ser orientado por um docente cumpridor de seus deveres acadêmicos, estando sempre à disposição e atento a responder minhas dúvidas e questionamentos. Por me passar segurança de que poderíamos terminar o trabalho em tempo hábil e que os resultados seriam úteis à ciência. Pela clareza com que colocou suas idéias e sugestões. Pela forma gentil em responder todas as minhas dúvidas, por mais simples e irrelevantes que pudessem parecer. Por me fornecer todos os elementos necessários à confecção deste trabalho, desde material científico a suporte logístico.

Ao Prof. Dr. Ricardo Ishak, pela seriedade com que coordenou esse Programa de Pós-Graduação, mostrando-nos a importância do trabalho concentrado e focado nos resultados. Pela escolha das disciplinas ofertadas e de um “time” de professores altamente competentes e envolvidos no Programa. Pelas sugestões e correções realizadas durante a fase de qualificação dessa dissertação.

Aos professores doutores Juarez Antonio S. Quaresma e Luiz Fernando Almeida Machado, membros da Banca de Qualificação, pelas correções e sugestões fundamentais à conclusão deste estudo.

A todos os professores que participaram desse Programa de Pós-Graduação pela presteza e pelo empenho durante as aulas ministradas em suas disciplinas.

À Prof. Dra. Izaura Vallinoto, por me fornecer os principais artigos científicos utilizados nesse trabalho, especialmente sua tese de doutorado que me serviu como um verdadeiro “livro-guia” em todas as etapas de confecção desta dissertação de mestrado.

Aos acadêmicos do Curso de Biomedicina da Universidade Federal do Pará (UFPA) pela ajuda e “aulas práticas” no Laboratório de Virologia, especialmente à Bárbara Santana que se dedicou, pessoalmente, à análise de grande parte das amostras estudadas.

Aos meus orientandos, ex-alunos do Curso de Medicina da Universidade Federal do Acre (UFAC), Flávio Ruzzafa e Alex Nunes Callado, pela ajuda na colheita das amostras.

A todo o corpo técnico-administrativo do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários (BAIP) da UFPA e do Hospital das Clínicas do Acre (HCAC), por fornecerem os meios para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos, meus companheiros de trabalho Mauro, Gerlane e Leandro que conviveram comigo durante o período deste mestrado, opinaram e apoiaram minhas decisões.

Aos pacientes do Serviço de Hemodiálise do Hospital das Clínicas do Acre (HCAC) que, não bastasse a dor e o sofrimento causados por sua

patologia, foram gentis em fornecer os materiais biológicos necessários a esse trabalho, entendendo que contribuiriam para o desenvolvimento científico.

Aos voluntários que, também, forneceram material biológico, com o mesmo entendimento.

Aos meus familiares, especialmente meu pai, minha mãe, minha irmã e minha avó que sempre me deram suporte e aguentaram todo meu estresse nas empreitadas dos estudos. Que respeitaram o “egoísmo necessário” que essas tarefas me exigiram e, muitas vezes, me fizeram privar de suas companhias. Obrigado pela sutileza em perceber minhas angústias e momentos difíceis, e por terem, sempre, a palavra adequada para cada situação. Sou prestigiado em ter na minha família, meus melhores amigos.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRAT	10
1INTRODUÇÃO	11
1.1 CARACTERÍSTICAS DOS POLIOMAVÍRUS	11
1.1.1 Características Gerais	11
1.1.2 Morfologia e Organização Genômica	14
1.1.3 Replicação Viral	16
1.1.4 Características Epidemiológicas	20
1.1.5 Formas de Transmissão do JCV e do BKV	22
1.1.6 Detecção do JCV e do BKV	26
1.2 OS POLIOMAVÍRUS E O MECANISMO DE TRANSFORMAÇÃO ONCOGÊNICA	29
1.3 A INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA (IRC)	34
1.3.1 A IRC e os Pacientes Candidatos ao Transplante Renal	34
1.3.2 Epidemiologia da IRC	37
1.4 OS POLIOMAVÍRUS E O TRANSPLANTE RENAL	38
1.4.1 Visão Geral	38
1.4.2 Fisiopatologia das Lesões Renais Associadas ao JCV e ao BKV no Paciente Transplantado	40
1.5 OBJETIVOS	44
1.5.1 Objetivo Geral	44
1.5.2 Objetivos Específicos	44
2. MATERIAL E MÉTODOS	45

2.1 POPULAÇÕES EXAMINADAS	45
2.1.1 Área de Estudo	45
2.1.2 Grupo de Pacientes Renais Crônicos	46
2.1.3 Grupo de Indivíduos sem Doenças Renais	46
2.1.4 Critérios de Exclusão	46
2.2 ASPECTOS ÉTICOS	47
2.3 COLETAS E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	47
2.4 ANÁLISES DAS AMOSTRAS	49
2.4.1 Extração do DNA	49
2.4.2 Reação em Cadeia mediada pela Polimerase (PCR)	49
2.4.3 Digestão Enzimática	50
2.4.4 Amplificação do Gene VP1	50
2.4.5 Seqüenciamento	51
2.4.6 Análise das Amostras de Sangue	51
2.4.7 Estatística	52
3 RESULTADOS	53
3.1 VARIÁVEIS SÓCIO-DEMOGRÁFICAS	53
3.2 VARIÁVEIS CLÍNICO-LABORATORIAIS	56
3.3 PREVALÊNCIAS DOS POLIOMAVÍRUS	58
4 DISCUSSÃO	60
5 CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
ANEXOS	

RESUMO

O presente trabalho investigou a ocorrência de infecção pelos poliomavírus JCV e BKV na população de pacientes com doença renal crônica, no Estado do Acre e em um grupo controle de indivíduos sem doença renal. Foram examinadas 100 amostras de urina do grupo de Pacientes e 99 amostras de urina do grupo Controle. Após a extração do DNA, a PCR foi usada para a amplificação de 173pb do gene que codifica o antígeno-T de ambos os vírus. A diferenciação entre as infecções por JCV e por BKV foi realizada por meio da digestão enzimática do produto amplificado, usando-se endonuclease de restrição. Esse estudo não identificou a presença do BKV nas amostras de urina do grupo de Pacientes e do grupo Controle. O JCV foi identificado em 11,1% (11/99) dos indivíduos do grupo Controle e em 4% (4/100) dos indivíduos do grupo de Pacientes. Foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos de Pacientes e Controle quanto à média de Uréia ($p < 0,001$), onde a média no grupo de Pacientes foi significativamente maior do que a média no grupo Controle. Estes resultados sugerem que os elevados níveis de uréia excretada na urina, a baixa celularidade urinária, a diminuição do “washout” (limpeza) da bexiga e o tempo para a análise das amostras, justifiquem a baixa prevalência de infecção encontrada no grupo de pacientes renais crônicos; pois esses fatores podem diminuir a quantidade de vírus na urina ou podem atuar como inibidores da PCR. Esse estudo sugere a necessidade de aumentar a sensibilidade dos testes para a identificação desses vírus.

ABSTRAT

This study aimed to investigate the occurrence of infection with polyomavirus BK and JC (JCV and BKV) in the population of patients with chronic kidney disease in the state of Acre (Brazil) and in a control group of individuals without kidney disease. We examined 100 urine samples from the group of patients and 99 urine samples from the control group. After DNA extraction, PCR was used for amplification of 173pb of the gene encoding the antigen-T of both BK and JC virus. The differentiation of JCV and BKV infections was performed by enzymatic digestion of the amplified product using a restriction endonuclease. This study did not identify the presence of BKV in urine samples from the group of patients and controls. The JCV was identified in 11.1% (11/99) of subjects in the control group and 4% (4 / 100) of individuals in the group of patients. It was found a statistically significant difference between groups of patients and controls regarding the mean of urea ($p < 0.001$), where the average in the group of patients was significantly higher than the average in the group of controls. The results suggest that high levels of urea excreted in the urine, low urinary cellularity, reduced washout of the bladder and the time until the beginning of the samples analysis, justifying the low prevalence of infection found in patients with chronic renal failure, since these factors may decrease amount of virus in urine or act as inhibitors of PCR. The results of this study indicate the need to increase the sensitivity of the methods of virus detection in chronic renal failure patients because infection by polyomavirus, especially BKV, can lead to loss of kidney function after transplantation.

1- INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERÍSTICAS DOS POLIOMAVÍRUS

1.1.1 Características Gerais

Os poliomavírus são vírus da família *Polyomaviridae*, gênero *Polyomavirus* (ICTV,2006). Esses vírus têm sido isolados em humanos, em pássaros, em ratos e macacos. Cada poliomavírus tem, praticamente, um tipo de hospedeiro e, usualmente, não produz infecções em outras espécies (Ahmed *et al.*, 1990a).

No seu hospedeiro natural, os poliomavírus infectam mais de 30 tipos celulares distintos (Gilbert & Benjamin, 2000). De acordo com esses autores, essa diversidade depende, em parte, da habilidade do vírus em ligar-se, não seletivamente, à glicoproteínas de superfícies celulares contendo ácido siálico em sua estrutura.

Os poliomavírus de ratos (Ahmed *et al.*, 1990b) e de macacos (SV40) (Anderson *et al.*, 1996) foram os primeiros poliomavírus a serem descobertos, mas no total já são conhecidos doze membros (Quadro 1). Esses dois arquétipos virais têm sido exaustivamente estudados e proveram um modelo básico de estudo para células eucarióticas. Esses estudos compreendem a duplicação e a transcrição do DNA, transformação maligna e sinais de tradução celular (Anderson *et al.*, 1996).

Em 1971, dois poliomavírus humanos foram descobertos: o vírus BK (BKV) e o vírus JC (JCV). O vírus BKV foi isolado na urina de um paciente transplantado renal com pielonefrite crônica em estágio avançado de falência renal (Gardner *et al.*, 1971). O vírus JCV foi isolado do cérebro de um paciente que sofria de leucoencefalopatia multifocal progressiva (LMP) (Padgett *et al.*, 1971). As designações JC e BK foram derivadas das iniciais dos pacientes envolvidos.

A LMP é uma doença neurodegenerativa do sistema nervoso central, caracterizada pela desmielinização de múltiplas regiões. Essa doença, anteriormente rara, voltou ao cenário médico com o advento da AIDS (Dorries *et al.*, 1994).

O JCV é o agente causal da LMP que atinge, principalmente, pacientes imunossuprimidos com AIDS, enquanto o BKV está associado a doenças como cistite hemorrágica, estenoses ureterais e outras doenças do trato urinário que são mais comumente encontradas em pacientes transplantados ou submetidos à terapia imunossupressora (David, 2001).

Quadro 1 – Vírus da família *Polyomaviridae*.

Vírus	Hospedeiro	Genoma (NT)	Proteínas Virais (Nº de Aminoácidos)						
			Ag T Longo	Ag T Médio	Ag T Pequeno	VP 1	VP 2	VP3	Agnoproteína
Vírus símio 40 (SV 40)	<i>Rhesus</i>	5243	708	NR	174	36	352	234	62
JC vírus (JCV)	Humano	5130	688	NR	172	35	344	225	71
BK vírus (BKV)	Humano	5133	695	NR	172	36	351	232	66
Papovírus linfotrópico (LPV)	Macaco verde africano	5270	679	NR	189	36	356	237	NR
Poliomavírus bovino (BPyV)	Gado	4967	586	NR	124	36	353	232	NR
Poliomavírus de hamster (HaPV)	Hamster	5366	751	401	194	37	346	221	NR
Polioma vírus (PyV)	Camundongo	5392	785	432	195	38	319	204	NR
Vírus Kirsten (KV)	Camundongo	4754	646	NR	158	37	321	222	NR
Poliomavírus de coelho (RKV)	Coelho	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Poliomavírus de rato (RPV)	Rato	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Agente símio 12 (SA 12)	Babuíno	NR	699	NR	172	NR	NR	NR	NR
Vírus de doenças de aves	Periquito	4980	554	NR	145	34	341	235	NR

Fonte: Cole (1996); NR, Não reportado; NT, nucleotídios.

1.1.2 Morfologia e Organização Genômica

Estruturalmente, os poliomavírus são vírus de DNA não envelopados, com capsídeos icosaédricos contendo 72 capsômeros pentaméricos (Figura 1) e as proteínas VP1, VP2 e VP3 que circundam uma única molécula helicoidal de DNA viral associada com quatro histonas microssomais (H2A, H2B, H3 e H4), referida como “minicromossomo” viral (Arthur, 1994).



Figura 1 - Esquema representativo dos 72 capsômeros pentaméricos do capsídeo dos poliomavírus (Fonte: Frisque *et al.*, 1999).

Os vírus da subfamília poliomavírus são pequenos, medem, aproximadamente, 45 nm e seu genoma é de, aproximadamente, 5 kilobases (Kb) (menores que o dos papilomavírus). A organização genômica dos membros dessa subfamília é muito semelhante e mantêm um padrão altamente conservado entre si (White & Fenner, 1994).

Tanto o BKV quanto o JCV são muito similares ao SV40 (o poliomavírus do macaco) quando se compara o tamanho do genoma (aproximadamente 5 kb), a organização genômica e a seqüência de DNA (Miranda *et al.*, 2003). O JCV compartilha 75% de sua seqüência nucleotídica com o BKV e 69% com o SV40 (Yang & Wu, 1979; Frisque *et al.*, 1984).

Tal semelhança facilitou o estudo desses vírus, somado a isso, a facilidade do cultivo e de sua purificação fizeram dos poliomavírus um modelo para estudos em biologia molecular, sendo que seus genomas foram completamente identificados na década de 1970, constituindo-se no primeiro genoma viral de DNA a ser completamente sequenciado (Miranda *et al.*, 2003).

O genoma dos poliomavírus divide-se em três regiões (Figura 2): uma região precoce (*early region*), uma região tardia (*late region*) e uma região controladora não codificante (Seif *et al.*, 1979; Sugimoto *et al.*, 1990).

A transcrição das duas unidades se inicia de uma região regulatória em comum (*ori*) sendo que a transcrição da região precoce se inicia em sentido horário e a transcrição da região tardia em sentido oposto (Cole, 1996; Imperiale, 2001).

A região precoce produz as seguintes proteínas: antígenos T (grandes) com 688 aminoácidos e antígenos t (pequenos) com 173 aminoácidos. Essas proteínas são responsáveis pela promoção da transformação de células em cultura e da oncogênese *in vivo* (Cole, 1996; Imperiale, 2001).

A região tardia é responsável pela codificação de: a) proteínas estruturais do capsídeo: a VP1 (354 aminoácidos), a VP2 (344 aminoácidos) e a VP3 (225 aminoácidos), que se reúnem com o DNA viral replicado para formar partículas virais (White & Khalili, 2004); e b) agnoproteína (71 aminoácidos), que difere de todas as outras proteínas codificadas pelas regiões precoces e tardias por se localizar, primariamente, no citoplasma e na região perinuclear das células infectadas. Este conceito de distribuição intracelular sugere que a agnoproteína participa da reunião do capsídeo viral, da lise celular e da liberação do vírus da célula hospedeira (Randhawa *et al.*, 2002).

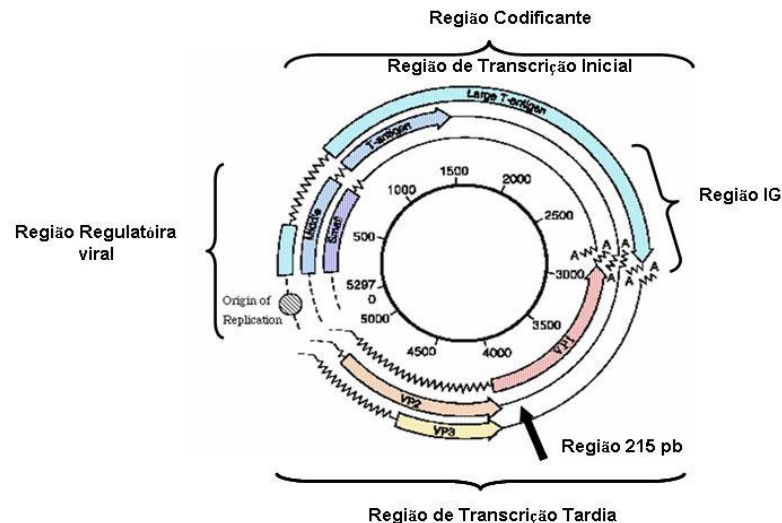


Figura 2 - Organização Genômica do JCV (Adaptado de University of Cape Town).

As proteínas VP1, VP2 e VP3 são, predominantemente, transcritas após o início da replicação genômica. A proteína VP1 é externa e, provavelmente, está envolvida na interação com a proteína receptora celular no momento da adsorção viral à célula hospedeira. Esta proteína é responsável pela capacidade hemaglutinante do vírus, *in vitro* e *in vivo*. As proteínas VP2 e VP3 são proteínas internas do capsídeo viral e, provavelmente, auxiliam na estrutura deste (Cubitt, 2006).

1.1.3 Replicação Viral

Há duas formas de infecção celular pelos poliomavírus a depender do tipo de célula infectada por esses vírus (Figura 3). Existem as células *permissivas* que permitem a replicação do DNA viral e o resultado é a infecção lítica com replicação viral e as células *não permissivas* que não permitem parte da replicação viral e o resultado de sua entrada na célula é a eliminação do vírus ou a transformação celular (oncogênese) (White & Khalili, 2004).

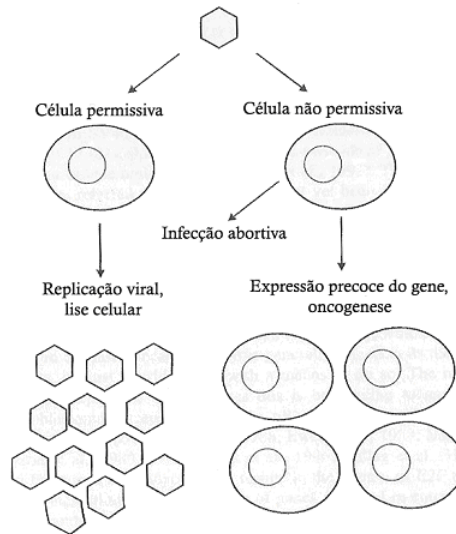


Figura 3 - Tipos de infecção celular pelos poliomavírus (Adaptado de Imperiale, 2001).

A infecção celular pelos poliomavírus se inicia com a ligação do vírus ao receptor da membrana celular por meio de glicoproteínas de superfície contendo ácido siálico na sua composição. No caso do SV40 isso se faz através do Complexo de Histocompatibilidade Principal - MHC (Norkin, 1999).

Dessa forma, sabendo-se da alta expressão das moléculas de MHC, espera-se que tal vírus infecte a maioria das células. No entanto, pouco se sabe sobre isso em relação ao JCV e ao BKV. Alguns relatos têm indicado um amplo espectro de ligação do JCV com células de mamíferos (White & Khalili, 2004).

Depois que o DNA penetra o núcleo, mecanismos intracelulares específicos suprimem a replicação do material genético do JCV, exceto em linhagens celulares neuroblásticas (Banga *et al.*, 1997). Em humanos é dito que o JCV pode infectar células das tonsilas e se espalhar através da replicação em linfócitos (Berger, 2003). Sabe-se, também, que o BKV pode se replicar em leucócitos humanos (Bergsagel *et al.*, 1992).

Tanto o JCV quanto o BKV podem infectar células renais, sendo esse o principal sítio durante a latência (Suzuki *et al.*, 2001; Komagome *et al.*, 2002).

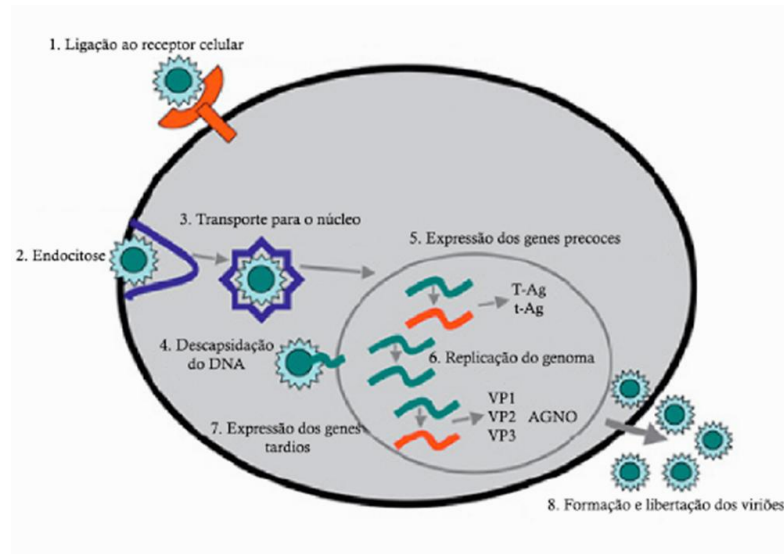


Figura 4 - Representação esquemática do ciclo de vida do poliomavírus numa célula permissiva (Adaptado de Eash *et al.*, 2006).

Após a ligação à superfície celular (Figura 4), o capsídeo do poliomavírus sofre endocitose e, então, as partículas virais penetram na célula sob a forma de vesículas. Essas vesículas se unem através da fusão de suas membranas e são chamadas de endossoma, as quais são fundidas aos lisossomas. Nesse momento, ocorre acidificação dentro daquele complexo gerando mudanças conformacionais nas proteínas do capsídeo, levando à liberação do ácido nucléico do vírus no citosol que são então, transportados para o núcleo onde se inicia a transcrição da região inicial (Anderson *et al.*, 1996).

As proteínas Ag-t e Ag-T, produzidas por essa região inicial são essenciais para a replicação do DNA; elas se ligam à região regulatória (*ori*) onde promovem a separação da dupla hélice do DNA e o recrutamento de outras

proteínas necessárias para a síntese de DNA, inclusa a DNA polimerase- α e a proteína de replicação A (Dean *et al.*, 1987).

Outra função do Ag-T é modular a indução do ciclo celular a entrar na fase S e isso caracteriza a habilidade desse antígeno na transformação celular (Dornreiter *et al.*, 1990). O papel do Ag-T, no entanto, não é muito claro. Parece estar associado à transformação celular e ao aumento da permissividade celular a esses vírus (Stahl *et al.*, 1986; Melendy & Stillman, 1993).

Com a progressão da replicação viral, os genes tardios começam a se expressar. Os produtos da transcrição desses genes, as proteínas do capsídeo VP1, VP2 e VP3 envolvem o produto da replicação do DNA viral os quais são liberados com a lise celular. Na sequência, ocorre a montagem das partículas de progênes virais no núcleo das células infectadas. Então essas partículas virais saem do núcleo por exocitose e vesículas citoplasmáticas englobam esses vírus que são liberados da célula pela fusão daquelas vesículas com a membrana citoplasmática (Cole,1996).

1.1.4 Características Epidemiológicas

O JCV foi descoberto em 1971 e é amplamente difundido na população humana. Anticorpos específicos contra esse vírus são encontrados em 80% dos adultos (Padgett *et al.*, 1971).

Através do seqüenciamento genômico do JCV, foi possível sua classificação em tipos e em subtipos. Em 1997, Sugimoto *et al.* demonstraram a associação geográfica desses tipos e subtipos virais e sua origem comum no Velho Mundo como demonstrado no Quadro 2.

A classificação genotípica do JCV pode ser feita de diferentes modos, a depender da região do gene estudada. Sua sequência genômica completa é útil para estudos filogenéticos, entretanto uma região específica que compreende um fragmento de 610pb contém muito da diversidade e é, potencialmente, a mais informativa filogeneticamente (Hatwell & Sharp, 2000).

O JCV tipo 1 predomina na Europa e nos EUA. O tipo 2, encontrado na Ásia, é dividido, principalmente, em dois: o subtipo-2a, no nordeste da Ásia, incluindo China e Japão; e o 2b, no oeste da Ásia. Os JCV tipos 3 e 6 são genótipos africanos, encontrados na Tanzânia e em Gana, respectivamente (Agostini *et al.*, 1995; Guo *et al.*, 1996). O tipo 4, encontrado apenas nos EUA, parece ser um recombinante da maior parte do genoma do genótipo 1 com um curto segmento do gene VP1 do tipo 3 (Agostini *et al.*, 1996; Agostini *et al.*, 1997). O JCV tipo 5 é um recombinante entre o subtipo 2b e o tipo 6 (Hatwell & Sharp, 2000). O tipo 7, proximamente relacionado com o tipo 2 (Jobes *et al.*, 1998), é a cepa dominante no sul da China e no sudeste da Ásia.

Quadro 2 - Classificação dos tipos e dos subtipos do JCV, baseados nas seqüências genômicas, segundo as nomenclaturas adotadas por Jobes *et al.* (1998) e Sugimoto *et al.* (1997;2002).

Domínio Geográfico	Jobes <i>et al.</i> (1998)		Sugimoto <i>et al.</i> (1997) Sugimoto <i>et al.</i> (2002)*	
	Tipos	Subtipos	Tipos	Subtipos
Europa	1 4	1A, 1B	A	EU *(EU-a, EU-b, EU-c)
Ásia	2	2A, 2B, 2C	B	B1, MY, *Af2, *B1-a, *B1-b, *B1-c, *B1-d, *B2, *MY, *CY, *SC
África	3	3A, 3B	B	Af2
	6		C	Af1
Papua	8			

Como o JCV, o BKV é amplamente encontrado na população humana, com mais de 63% de sorologia positiva em indivíduos sob estudo (White & Khalili, 2004).

Na Inglaterra, o pico de prevalência se dá no início da infância, 83% (Gardner, 1973); na Finlândia, 60% (Mantjarvi *et al.*, 1973); Alemanha, 71% (Rziha *et al.*, 1978); Itália, 83% (Portolani *et al.*, 1974); e nos Estados Unidos da América, 69%, 100% (Padgett & Walker, 1973; Shah *et al.*, 1973).

Segundo Reploeg *et al.* (2004) essas diferenças na percentagem podem ser explicadas pela idade dos indivíduos testados e pelo limite do título de anticorpos, que é considerado positivo.

Por meio de métodos de genotipagem (envolvendo a amplificação do epítipo de uma região do gene VP1) e de testes sorológicos, o BKV foi isolado e classificado em quatro subtipos - de I a IV (Jin *et al.*, 1995; Knowles, 2001).

O subtipo I é o mais prevalente e é dividido em quatro subgrupos (Ia, Ib-1, Ib-2 e Ic), com base nas sequências de variação do DNA (Takasaka *et al.*, 2004; Ikegaya *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2007).

Cada um desses subgrupos tem uma única distribuição geográfica: o Ia é prevalente na África, o Ib-1 no hemisfério sul da Ásia, o Ib-2 na Europa e o Ic no hemisfério norte da Ásia, incluindo o Japão (Takasaka *et al.*, 2004; Ikegaya *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2007).

1.1.5 Formas de Transmissão do JCV e do BKV

A infecção primária pelo JCV ocorre, geralmente, na infância e de forma assintomática (Padgett & Walker, 1973). No sítio de entrada, provavelmente o trato respiratório, esses vírus se multiplicam e seguem para o tecido renal (Heritage *et al.*, 1981; McCance, 1983) e para o sistema nervoso central (SNC), onde se multiplicam e permanecem por toda a vida (Elsner & Dorries, 1992; Quinlivan *et al.*, 1992).

Não se conhece, com exatidão, os fatores que controlam o equilíbrio entre a latência e a reativação (Gardner, 1977).

As reativações são induzidas não somente por uma imunossupressão significativa como ocorre com os transplantes renais (Hogan *et al.*, 1980; Kahan *et al.*, 1980; Gardner *et al.*, 1984) e de medula óssea (Arthur *et al.*, 1988; O'Reilly *et al.*, 1981), mas, também, por outros fatores, como enfermidades de imunodeficiência,

quimioterapia imunossupressiva (Kitamura, 1992), gravidez (Coleman *et al.*, 1980), diabetes, outras enfermidades crônicas e idade avançada (Tajima *et al.*, 1990).

Esses vírus também podem infectar células endoteliais vasculares, dos rins, do cérebro, do fígado, da retina, dos pulmões, do sangue, dos gânglios linfáticos, do coração, e do músculo (Fishman, 2002; Figura 5).

Em estudo para identificar a transmissão vertical do JCV, Daniel *et al.* (2004) não encontraram evidências que suportassem tal hipótese, embora a amostra avaliada fosse pequena e sabendo-se que a maioria das doenças de transmissão vertical apresente baixas taxas de transmissão.

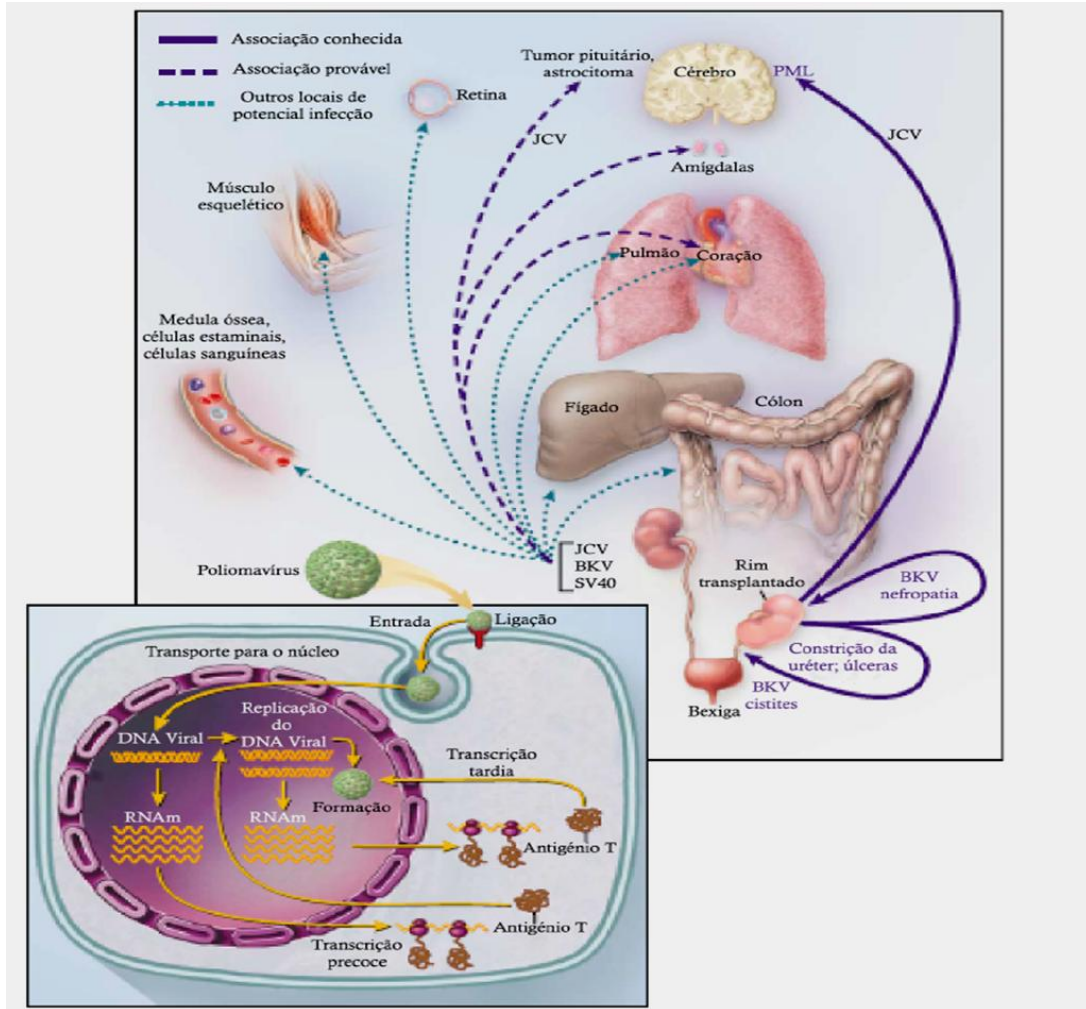


Figura 5 - Representação esquemática da infecção e da replicação do JCV, do BKV e do SV40 (Fonte: Fishman, 2002).

Muito embora a transmissão do JCV seja categorizada como horizontal (Coleman *et al.*, 1980; Daniel *et al.*, 2004), usualmente ela é feita dos pais para os filhos, durante o longo período de coabitação destes (Kunitake *et al.*, 1995), sendo rara a transmissão entre diferentes grupos populacionais humanos (Kato *et al.*, 1997).

Esse modo de transmissão do JCV permite estabelecer relações entre os subtipos desses vírus (Quadro 2) e as migrações populacionais através dos três

grandes genótipos descritos (A B e C), identificados em amostras de urina coletadas na Europa, na Ásia e na África (Yogo *et al.*, 1991; Guo *et al.*, 1996).

Sabe-se, também, que diferentes subtipos do JCV, raramente, infectam o mesmo hospedeiro humano, portanto, podemos concluir que a detecção e identificação desses vírus podem servir como marcadores de migração humana (Sugimoto *et al.*, 1997).

Em hospedeiros imunocompetentes esse vírus também pode ser encontrado em oligodendrócitos e astrócitos, via linfócitos B (Schneider & Dorries, 1993; Ferrante *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 2000),

Essa alta especificidade para alguns tecidos humanos também pôde ser observada *in vitro* onde esse vírus infectou, predominantemente, culturas de células gliais e células de linhagem dos linfócitos B (Atwood *et al.*, 1992).

Em 1975, Taguchi *et al.* descreveram que a infecção pelo BKV era frequente em mulheres grávidas e o vírus era transmitido verticalmente. A evidência da transmissão congênita desse vírus foi a presença de imunoglobulina M (IgM) no sangue do cordão umbilical. Estudos sorológicos e virológicos têm mostrado que a infecção por esse vírus, realmente, ocorre em mulheres grávidas, mas não confirmaram a transmissão vertical desse vírus (Coleman *et al.*, 1980).

A infecção primária pelo BKV é, possivelmente, contraída por via respiratória (Goudsmit *et al.*, 1982) e acontece durante os primeiros anos da infância, mantendo-se em estado latente no trato urinário e em outros órgãos (Arthur *et al.*, 1989; Elsner & Dorries, 1992; Dorries *et al.*, 1994). Essa primo-infecção é, geralmente, assintomática, mas quando os sintomas ocorrem eles são febre e sintomas respiratórios não específicos (Reploeg *et al.*, 2001). O BKV também pode ser transmitido através da doação de órgãos (Fioriti *et al.*, 2005).

A reativação do BKV pode ocorrer espontaneamente em pessoas imunocompetentes e, frequentemente, naqueles com alterações da imunidade celular como nas mulheres grávidas, pacientes com câncer recebendo quimioterápicos, pacientes com AIDS e em transplantados (Nickeleit *et al.*, 2002). Nesses pacientes, esse vírus pode causar cistite hemorrágica ou ser causa de perda da função do rim transplantado (Weiskittel, 2002).

A infecção pelo BKV manifesta-se no trato urinário como cistite hemorrágica e não hemorrágica (Chan *et al.*, 1994), como estenose ureteral (Gardner *et al.*, 1971; Coleman *et al.*, 1978; Gardner *et al.*, 1984) e como nefrite (Vallbracht *et al.*, 1993; Pappo *et al.*, 1996; Bratt *et al.*, 1999).

Doenças pulmonares que envolvem o BKV incluem pneumonia e infecção aguda do trato respiratório superior não específica (Vallbracht *et al.*, 1993; Sandler *et al.*, 1997; Cubukcu-Dimopulo *et al.*, 2000).

1.1.6 Detecção do JCV e do BKV

Os poliomavírus têm alta especificidade, tanto em relação ao hospedeiro quanto aos tipos celulares que infectam (Atwood *et al.*, 1992).

Em seres humanos, penetram pelas vias respiratórias, disseminando-se pela corrente sanguínea. Ambos os vírus são excretados na urina de pacientes infectados, o que sugere que o rim possa ser infectado em estágios precoces do contato com esses patógenos (Behbahani *et al.*, 2004).

Entre 60 e 80% dos adultos têm anticorpos contra ambos os poliomavírus (Murray *et al.*, 1999; Nickeleit *et al.*, 1999; Drews *et al.*, 2000).

Na Alemanha, em 1994, Dörries *et al.* pesquisaram o DNA dos poliomavírus em leucócitos do sangue periférico em 42 pacientes, entre eles recém-nascidos (n=10), adultos saudáveis (n=18), pacientes com LMP (n=3) e pacientes com a doença de Huntington (n=11), doença que, assim como a LMP, compromete o sistema nervoso central. Nenhum recém-nascido apresentava DNA do BKV ou do JCV, o que reforça o fato de que a primeira infecção acomete os indivíduos na infância. Entre os adultos saudáveis, a prevalência de DNA do JCV foi de 83%, e 94% apresentavam DNA do BKV. Foi identificado DNA de ambos os vírus em 50% dos pacientes com doença de Huntington e em 100% dos pacientes com LMP.

Por causa da frequência das infecções e do risco de disseminação da doença em pacientes imunocomprometidos, a detecção laboratorial rápida dos poliomavírus tem se tornado um importante ícone em detecção virológica. Além disso, a rápida detecção tem implicações importantes no tratamento do paciente (Whiley *et al.*,2001).

Métodos tradicionais para detectar e identificar os poliomavírus incluem métodos sorológicos, isolamento do vírus por cultura de células e microscopia eletrônica (Giraldo *et al.*,1982, Knowles *et al.*,1989, Nilsen *et al.*,1991). Tais métodos não são amplamente disseminados na rotina de laboratório de análises clínicas devido a suas limitações técnicas (Whiley *et al.*, 2001).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma ferramenta efetiva para detectar os poliomavírus em amostras clínicas, tornando-se, atualmente, o método padrão-ouro para a detecção desses vírus. Sabe-se que a sensibilidade do método de PCR para amostras de sangue periférico é de, aproximadamente, 70% para indivíduos portadores de HIV (vírus da imunodeficiência humana) com LMP,

contra, apenas, 30% dos pacientes portadores do HIV que não têm a doença (Giri *et al.*, 2001).

Esse baixo desempenho nas taxas de detecção pela PCR, nesse tipo de amostra, torna impraticável o método para o diagnóstico e para o prognóstico de LMP (Giri *et al.*, 2001).

O JCV pode ser detectável em tecidos cerebrais, através de biópsias, em quase 100% dos casos (Giri *et al.*, 2001).

Embora o estudo de biópsias cerebrais possa constituir um ótimo procedimento diagnóstico, biópsias são invasivas. Para tanto, as amostras para a pesquisa dos vírus podem ser obtidas através da análise do líquido cefalorraquidiano ou da urina (Tominaga *et al.*, 1992; Kitamura *et al.*, 1997).

A PCR em tempo real é o último avanço em métodos de amplificação e de detecção dos ácidos nucleicos que sobrepuja alguns dos problemas enfrentados pela técnica convencional de PCR (Whiley *et al.*, 2001).

Recentemente, Domingues *et al.* (2007) descrevem técnica de semi-nested PCR para diferenciar o BKV do JCV, funcionando, dessa forma, como ferramenta importante na diminuição do tempo necessário à identificação desses vírus.

1.2 OS POLIOMAVÍRUS E O MECANISMO DE TRANSFORMAÇÃO ONCOGÊNICA

Os tumores malignos no ser humano, geralmente, são caracterizados por aneuploidias ou rearranjos cromossomais que resultam em atividade excessiva de genes, estimulando a atividade de multiplicação celular e a deleção de genes que inibem essa multiplicação (supressores de tumor) (Lengauer *et al.*, 1998).

Em humanos, os dois vírus mais amplamente estudados como promotores da oncogênese são o JCV e o BKV. Ambos os vírus tem, aproximadamente, 70% de homologia com o DNA do SV40, que tem, sabidamente propriedades de transformação celular. Essa observação tem levado a extensiva especulação a respeito da potencialidade oncogênico desses dois vírus humanos (Laghi *et al.*, 1999).

Existem evidências do alto potencial oncogênico do JCV em animais de laboratório, por exemplo, o crescimento de vários tipos de tumores cerebrais naqueles em que foram injetadas soluções contendo o vírus. Esse vírus está relacionado ao desenvolvimento de astrocitomas, de glioblastomas, e de neuroblastomas (Lagh *et al.*, 1999).

Segundo Tavis *et al.* (1994) e O'Neill *et al.* (1995), as propriedades de transformação oncogênica dependem da instabilidade cromossômica produzida pelo antígeno T desses vírus.

Evidências de instabilidade cromossômica têm sido encontradas em estágios iniciais de neoplasias colorretais como, por exemplo, deleções cromossômicas (Laghi *et al.*, 1999).

Independente do mecanismo responsável pelo aparecimento da instabilidade genômica, ela deve ocorrer em estágios precoces e cursam com mitoses descoordenadas e com descontrole dos processos de regulação do ciclo celular. Um processo infeccioso que introduza o antígeno T poderia explicar o início abrupto da instabilidade cromossômica e, atualmente, têm-se evidências de que esse mecanismo está presente em tumores humanos dos cólons (Laghi *et al.*, 1999).

O JCV também parece estar implicado na gênese de tumores do sistema nervoso central (SNC), como tumores do plexo coróide, ependiomas,

meduloblastomas, osteosarcomas e, mais recentemente, mesoteliomas (Butel & Lednicky, 1999).

Krinska *et al.* (1999a) apresentaram resultados que evidenciam a presença do genoma do JCV em uma significativa porcentagem de pacientes com meduloblastoma. Embora o mesmo não tenha estabelecido uma relação de causa-efeito entre a presença de DNA do JCV e a presença de neoplasias do SNC esses autores chamam a atenção para importantes habilidades transformadoras que esse vírus possuem.

Lagh *et al.* (1999) observaram que a detecção do DNA viral foi substancialmente aumentada pela adição da topoisomerase I, sugerindo que os genomas desses vírus se apresentem em formas “super-espiralizadas”. A carga viral parece ser baixa em pacientes sem doenças colônicas e, pelo menos, dez vezes maior em pacientes com câncer de cólon.

Esses autores também observaram que a presença de sequências do DNA do JCV em cólons humanos, com câncer, sustenta a hipótese de que o vírus infecta o epitélio colônico e, conseqüentemente, o JCV é um forte candidato a ser causador de instabilidade gênica.

Da mesma forma que o JCV, o BKV induz a formação de alguns tumores que são tecido-específicos e estão demonstrados no Quadro 3.

Os tipos de tumores induzidos pelo BKV incluem os ependiomas, os neuroblastomas, os tumores da pineal, os tumores de ilhotas pancreáticas, os fibrossarcomas e os osteosarcomas. Isso sugere que o BKV tem um tropismo por certos tipos de células (Corallini *et al.*, 2001).

O BKV é altamente oncogênico em ratos recém-nascidos e em hamsters. A eficiência da tumorigênese por esse vírus, em hamsters, é dependente

de sua rota de infecção, sendo fracamente oncogênico quando injetado por via subcutânea, mas apresenta alta incidência na indução tumoral quando administrado por via endovenosa (White & Khalili, 2004).

O BKV foi detectado em um paciente com adenoma de ilhotas pancreáticas (insulinoma) (Caputo *et al.*, 1983). Alguns trabalhos de detecção do DNA desse vírus pela técnica de PCR também identificaram sua presença em pacientes com sarcoma de Kaposi, com tumores cerebrais e com tumores do trato urinário (Corallini *et al.*, 2001).

Quadro 3: Tumores induzidos em ratos transgênicos pela expressão dos genes dos poliomavírus (Corallini *et al.*, 2001).

Antígeno T	Local	Referência
JCV	Adrenal	Small <i>et al.</i> (1986)
	Neuroblastoma	Franks <i>et al.</i> (1996)
	Tumor neuroectodérmico	Krynska <i>et al.</i> (1999b)
	Tumores primitivos originados no cerebelo	Gordon <i>et al.</i> (2000)
	Neoplasia pituitária	Small <i>et al.</i> (1986)
BKV	Carcinoma Hepatocelular	Dalrymple & Beemon (1990)
	Carcinoma/ tumores renais, timomas e linfomas	Brinster <i>et al.</i> (1984)
SV40	Tumores do plexo coróide	Messing <i>et al.</i> (1985)

Os poliomavírus não trazem em seu código genético genes que codificam proteínas de replicação, então eles devem induzir as células do hospedeiro a entrarem na fase S do ciclo celular e essas, produzirem tais proteínas. Essa indução se faz por intermédio do Ag-T que interfere com duas proteínas supressoras da oncogênese: a p53 e a pRB. Essa estimulação aberrante é a força promotora para a transformação oncogênica produzida por esses vírus (White & Khalili, 2004).

A proteína pRB atua na regulação da entrada das células na fase S do ciclo celular, mais especificamente controla a transição G1/S através da supressão do EF2 - Fator de Promoção da Transcrição (White & Khalili, 2004).

A proteína p53 é um supressor tumoral encontrado em, aproximadamente, 55% dos tumores humanos, a qual regula a apoptose celular (White & Khalili, 2004).

O Ag-T do JCV se liga a essa proteína, inativando-a e, dessa forma, inibindo a regulação do ciclo celular e a apoptose. Isso é importante para a replicação desse vírus e, principalmente, por facilitar a transformação das células do hospedeiro em células não permissivas (White & Khalili, 2004).

Estudos recentes têm mostrado que aparentemente o Ag-T pode modular outras proteínas sinalizadoras além do pRb e o p53. Esse antígeno se liga diretamente ao substrato receptor de insulina 1 (IRS1), interferindo nas propriedades da proteína Rad51 e, conseqüentemente, nos processos de reparo do DNA (Lassak *et al.*, 2002).

Bem como a propriedade de transformação na célula que o Ag-T exerce, esse antígeno também tem propriedades indutoras de mutações como relataram Theile & Grabowski (1990).

Algumas considerações devem ser feitas quando se tenta estabelecer uma relação de causa-efeito entre a presença desse vírus e o aparecimento do câncer: (i) esse vírus é amplamente difundido na população, mas a associação com a neoplasia tem uma frequência baixa; (ii) o período entre o processo de infecção e o aparecimento da doença é muito longo; (iii) o início da infecção é subclínica, o que dificulta estabelecer a data do ocorrido; e (iv) há outros fatores contribuintes para o processo de carcinogênese como fatores ambientais e próprios do hospedeiro (White & Khalili, 2004).

White & Khalili (2004) relataram que apesar do foco do debate ser se o JCV pode ou não causar câncer, o melhor seria correlacionar essas proteínas virais como possíveis alvos para intervenções terapêuticas.

1.3. A INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA (IRC)

1.3.1 A IRC e os Pacientes Candidatos ao Transplante Renal

A insuficiência renal crônica (IRC) é uma síndrome metabólica decorrente de uma perda progressiva, geralmente lenta, da capacidade excretora renal. Dado que a função de excreção de catabólitos é resultante, principalmente, da filtração glomerular, a IRC consiste, assim, em uma perda progressiva da filtração glomerular que pode ser avaliada, clinicamente, pela medida do *clearance* (depuração) de creatinina em urina de 24 horas (Draibe, 2002).

Em indivíduos normais, a filtração glomerular é da ordem de 110 a 120 mL/min/m² de superfície corporal e corresponde à função de filtração de cerca de 2 milhões de néfrons (glomérulos e túbulos renais). Em pacientes renais crônicos a filtração se reduz podendo chegar, em casos avançados, até 10-5 mL/min/m², quando o tratamento dialítico ou a redução de função se traduz pela retenção, no

organismo, de um sem números de solutos tóxicos, geralmente, provenientes do metabolismo protéico que podem ser avaliados indiretamente através das dosagens da uréia e da creatinina plasmáticas, que se elevam progressivamente (Riella, 2003).

São várias as causas de IRC, sendo as mais comuns: a glomerulonefrite crônica, a nefropatia túbulo-intersticial crônica (pielonefrite crônica), a necrose cortical renal, a hipertensão arterial grave, os processos renais obstrutivos crônicos, a diabetes, a amiloidose, lupus eritematoso sistêmico e doenças hereditárias, tais como, rins policísticos e síndrome de Alport (Noronha, 2004).

Ao nível do parênquima renal, todas essas entidades clínicas provocam, por mecanismos iniciais diversos, proliferação celular (endotelial, mesangial, e tubular), aumento do matriz mesangial, fibrose e obliterações glomerulares, dilatações e obstruções tubulares, fibrose intersticial generalizada, além da eventual deposição renal de substâncias estranhas ao rim, como é o caso da amiloidose (Draibe, 2002).

Fato notório é o caráter progressivo da IRC que ocorre, até mesmo, na ausência da causa inicial que determinou a lesão renal. Sugere-se que com a redução inicial de certo número de néfrons, aqueles remanescentes tornam-se hiperfiltrantes, hipertrofiam-se, sofrem alterações da superfície glomerular e modificações de permeabilidade da membrana glomerular às proteínas. Essas alterações levam à produção renal de fatores de crescimento, de citocinas e de hormônios, tais como: *Insuline-like Growth Factor-I* (IGF-1), interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6), Fator Transformador do Crescimento alfa e beta (TGF- α e β), *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF), Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), Endotelina, Fator Natriurético Atrial, Angiotensina II, entre outras (Draibe, 2002).

Esses agentes seriam responsáveis pelos processos de proliferação celular renal, de coagulação intraglomerular, recrutamento e proliferação de células da resposta imune, de aumento da matriz celular, de proliferação do colágeno e de fibrose. Desse modo a continuidade da presença de lesões fibróticas glomerulares e intersticiais acabaria por determinar perda progressiva dos néfrons e da filtração glomerular (Draibe, 2002).

O tempo que um paciente portador de uma lesão renal leva para atingir fases avançadas da IRC é bastante variável, dependendo da etiologia da lesão renal, de aspectos raciais, imunitários, estado hipertensivo, sobrecargas protéicas da dieta, etc. Em fases avançadas da IRC (*clearance* de creatinina entre 15 e 5 mL/min/m²) os sintomas urêmicos se exacerbam apesar da dieta hipoprotéica, havendo necessidade de se programar tratamento dialítico e/ou transplante renal para o paciente (Draibe, 2002).

O transplante renal é uma importante opção terapêutica para o paciente com IRC, tanto do ponto de vista médico quanto do ponto de vista econômico e social. Ele está indicado quando houver insuficiência renal crônica em fase terminal, estando o paciente em diálise ou mesmo em fase pré-dialítica (pré-emptivo), considerando-se *clearance* de creatinina menor que 20/ml/min/ m² de superfície corporal. O transplante renal pré-emptivo pode ser oferecido para todos os pacientes candidatos ao transplante, particularmente, para pacientes diabéticos (a fim de reduzir as complicações vasculares, cardíacas e neurológicas próprias do diabetes) e para crianças (a fim de se evitar déficit do crescimento, osteodistrofia renal e, principalmente, pelas dificuldades dialíticas) (Noronha *et al.*, 2010).

1.3.2 Epidemiologia da IRC

A IRC é um dos maiores problemas de saúde pública no Brasil. Estima-se que para cada paciente em tratamento dialítico existam outros 25 indivíduos que apresentem algum grau de insuficiência renal (Romão Jr., 2004).

No Brasil, mais de 70.000 pacientes são dependentes de terapia renal substitutiva, seja diálise ou transplante renal, com gasto anual de cerca de 2,0 bilhões de reais. Com base no grande número de grupos de risco, a previsão é que esse número possa duplicar nos próximos cinco anos, ultrapassando os 125 mil casos em 2010 (SBN, 2007).

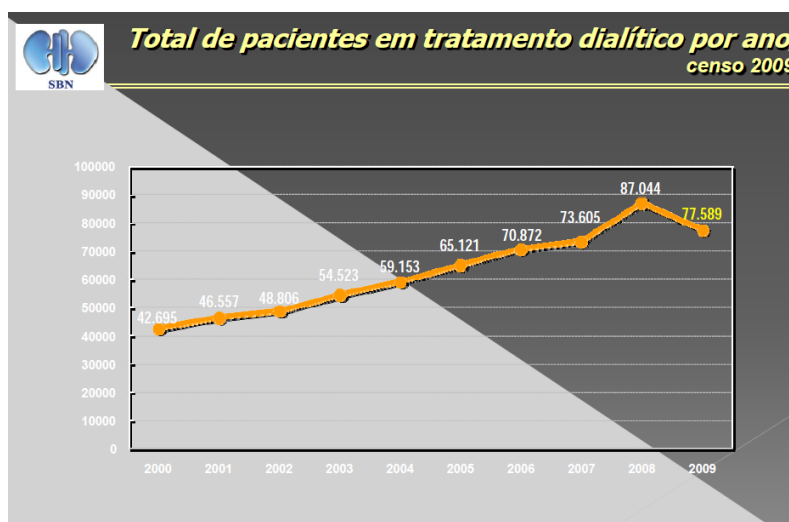


Figura 6 – Prevalência de pacientes em diálise no Brasil, 1994 a 2008 (Data SUS SBN: Censo 2009).

De acordo com dados da Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN), a prevalência de pacientes em diálise no Brasil vem aumentando de forma significativa, conforme o gráfico (Figura 6).

1.4 OS POLIOMAVÍRUS E O TRANSPLANTE RENAL

1.4.1 Visão Geral

A virúria pelo JCV é mais comum que a encontrada pelo BKV em pessoas saudáveis, mas em transplantados renais, a nefropatia dos poliomavírus é, primariamente, causada pelo BKV (Drachenberg *et al.*, 2007).

Segundo Razonable *et al.* (2005), a presença do BKV foi associada com rejeição ao rim transplantado e a presença do JCV foi acompanhada de sintomas inespecíficos em transplantados de rim, de pulmão e de pâncreas.

A reativação do JCV pode ocorrer, espontaneamente, em pessoas imunocompetentes e, frequentemente, naquelas com alterações da imunidade celular, como em mulheres grávidas, pacientes com câncer, pacientes que recebem quimioterapia, pacientes com AIDS e transplantados em uso de imunossupressores (Gardner *et al.*, 1984).

Em pacientes imunocomprometidos, o JCV pode causar LMP e o BKV pode estar envolvido no aparecimento de cistite hemorrágica em pacientes que fizeram transplante de medula óssea (Coleman *et al.*, 1978).

A reativação do BKV é, hoje, responsável por 10 a 60% das perdas de função de enxertos (órgãos transplantados) em transplantes de rim (Hurault *et al.*, 2003).

Sabe-se que os poliomavírus são associados à nefrite intersticial em receptores de rim ou de rim/pâncreas e a apresentação clínica da reativação desses vírus ocorre com aumento da uréia e da creatinina (Merlino *et al.*, 2005).

O BKV pode ser detectado na urina (Figura 6), plasma ou em biópsias, através da identificação das células conhecidas como *células decoy*. Entretanto, esse método tem capacidade limitada e técnicas como PCR tem melhor acurácia e, portanto, são aplicadas com maior frequência, apesar dos custos mais elevados (Boldorini *et al.*, 2005).

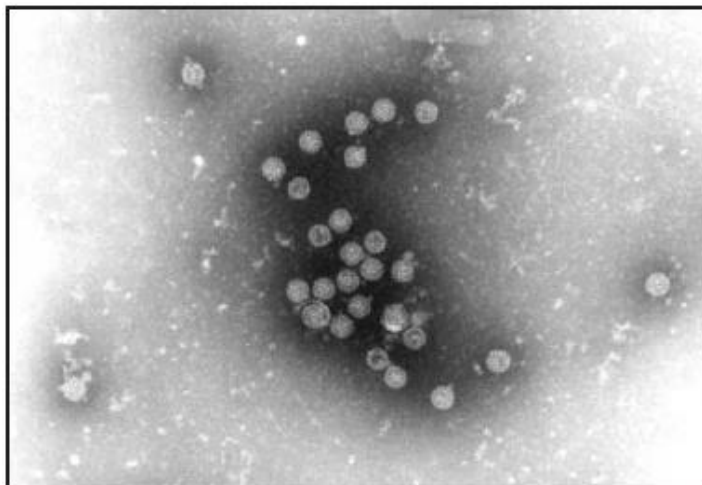


Figura 7 - Poliomavirus: BKV na urina (Fonte: Ahsan & Shah, 2006).

Os JCV e BKV são encontrados em pacientes transplantados recebendo imunossupressão, independente do esquema usado. Nenhum estudo, até o momento, aponta um imunossupressor específico como causador da reativação desses vírus, o que se sabe, com certeza, é que quanto mais potente a imunossupressão, maior é a chance de reativação viral (Hurault *et al.*, 2003).

O tratamento proposto, nos casos de diminuição da função do enxerto, tem sido a diminuição das doses dos imunossupressores. O racional para a diminuição dessas drogas é permitir ao hospedeiro, melhor eliminação desses vírus, resultando numa menor carga viral. Nenhum tratamento específico para esses vírus, como o uso de antivirais, é desenvolvido até a presente data (Noronha, 2004).

Alguns relatos da literatura têm mostrado eficácia no tratamento de pacientes com cistite hemorrágica, causada pelos poliomavírus, com drogas como o Cidofovir (Vianelli *et al.*, 2000). Segarra-Newnha & Vodolo (2001) descreveram o tratamento da LMP com a mesma droga.

1.4.2 Fisiopatologia das Lesões Renais Associadas ao JCV e ao BKV no Paciente Transplantado

A história do transplante renal modificou-se, consideravelmente, com o advento das drogas imunossupressoras como a ciclosporina, o tacrolimus, o micofenolato mofetil, a rapamicina e outras. Contudo, o aparecimento de patologias associadas a essas drogas, bem como a reativação de vírus latentes no receptor do órgão transplantado, são problemas sérios no manejo dos pacientes transplantados (Noronha *et al.*, 2004).

Notavelmente, pacientes que realizaram transplantes de rins que recebem drogas imunossupressoras em altas doses, podem desenvolver nefropatia induzida por aquele vírus, levando à perda da função do enxerto e falência do rim transplantado (Moens & Rekvig, 2001; Hirsch & Steiger, 2003).

As infecções pelo BKV e pelo JCV, há mais de 30 anos, são sabidamente conhecidas como presentes em enxertos de transplantes renais. Recentes estudos têm demonstrado uma maior responsabilidade do BKV (e menor do JCV) na ocorrência de nefrite túbulo-intersticial (aproximadamente 5%) nos pacientes transplantados renais, com piora da função renal pós-transplante e perda do enxerto em até 45% dos pacientes infectados (Lingy *et al.*, 2003).

Essa nefrite túbulo-intersticial, conhecida como nefropatia associada ao poliomavírus (NAPV) em pacientes transplantados renais, quando comparada a outras alterações histológicas, sugere que há fatores determinantes relacionados ao órgão e à resposta imune (Hirsch *et al.*, 2006). O substrato anátomo-patológico dessa nefropatia revela infiltrado inflamatório intersticial com tubulite e corpúsculos de inclusão nos núcleos das células tubulares e a presença de espessamento da cápsula de Bowman (Wen *et al.*, 2004).

Segundo Elli *et al.* (2002), o achado mais frequente em biópsias de rins transplantados é o infiltrado inflamatório intersticial intenso com tubulite focal, com necrose tubular e com fibrose intersticial médio-severa com atrofia tubular focal. As estruturas glomerulares e vasculares, geralmente, estão preservadas. Em análise mais cuidadosa observam-se, em algumas secções da lâmina, células tubulares epiteliais apresentando aumento da deformação da forma nuclear e irregularidades na cromatina.

A presença de células infectadas pelos poliomavírus (*células decoy*) na urina e a detecção do DNA do BKV e do JCV, através de PCR, no plasma e urina são marcadores da replicação viral e sugerem, fortemente, a possibilidade de NAPV (Hurault *et al.*, 2003).

No entanto, o diagnóstico da NAPV, através de biópsia renal, é desafiador devido a: (i) limitada sensibilidade devido ao frequente envolvimento focal; (ii) variação dos padrões de apresentação citopático-inflamatório e (iii) possibilidade de coexistência entre rejeição aguda o que dificulta o diagnóstico diferencial (Elli *et al.*, 2002).

A redução dos imunossupressores em pacientes com nefropatia pelo BKV tem sido a principal forma de terapia embora nem sempre se associe com a melhora da função do enxerto (Araya *et al.*, 2006). Kadambi *et al.* (2003) relataram que o antiviral Cidofovir tem demonstrado boa atividade *in vitro* contra os poliomavírus e Araya *et al.* (2006) descreveram alguns casos de sucesso no tratamento da nefropatia por BKV com uso dessa droga em baixas dosagens (0,25 - 0,42 mg/Kg/dose).

Kaneko *et al.* (2005) fizeram um estudo de prevalência dos poliomavírus em 45 pacientes renais crônicos candidatos ao transplante renal

usando a urina desses pacientes e empregando a técnica de PCR clássica para a identificação dos vírus. O grupo controle era composto por 37 indivíduos sem quaisquer patologias identificáveis. Seus resultados mostraram que 13,5% dos indivíduos normais foram positivos para o BKV e 24,3% para o JCV. Nos pacientes renais crônicos, a mesma porcentagem foi encontrada para os dois vírus (33,3%). Dado relevante foi a maior prevalência de infecção pelo BKV em pacientes que estavam em uso de algum corticoesteróide.

Nesse mesmo sentido, Kimberd (2005) publicou um trabalho de revisão de estudos sobre a detecção dos poliomavírus de 1971 a 2005 encontrando 38 publicações, a maioria com pequena amostragem e concluiu que estudos de rastreamento populacional para os poliomavírus só se justificam, economicamente, se a taxa de incidência na população for maior que 2,1%.

A detecção dos poliomavírus nos pacientes candidatos ao transplante renal (pacientes com IRC em tratamento hemodialítico) poderia fazer parte da investigação pré-transplante, pois, o conhecimento prévio dessa infecção adiantaria o diagnóstico diferencial entre a nefropatia causada por esses vírus e a rejeição crônica do enxerto; patologias essas que são, histologicamente, confundíveis, mas cujos tratamentos são muito diferentes.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo Geral

O presente trabalho visa investigar a ocorrência de infecção pelo JCV e pelo BKV na população renal crônica em tratamento dialítico, candidatos ao transplante renal, no Estado do Acre.

1.5.2 Objetivos Específicos

- Descrever a prevalência das infecções pelo JCV e pelo BKV em pacientes renais crônicos candidatos ao transplante renal e em grupo controle sem insuficiência renal crônica;
- Investigar a associação dos aspectos clínico-laboratoriais dos pacientes renais crônicos com a infecção pelos JCV e BKV;
- Investigar a associação dos aspectos sócio-demográficos dos pacientes renais crônicos com a infecção pelos JCV e BKV.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 POPULAÇÕES EXAMINADAS

2.1.1 Área de Estudo

O Estado do Acre está localizado na parte sudoeste da Amazônia. As linhas de fronteiras do Estado com as Unidades da Federação são: ao Norte com o Estado do Amazonas e a Leste com o Estado de Rondônia. O Estado tem fronteiras internacionais com a República da Bolívia, ao sul e a sudeste com a República do Peru (Acuña *et. al.*, 2009).

O Estado do Acre possui 22 sedes municipais, sendo que para nove delas, o acesso para a capital (Rio Branco) é possível somente por via fluvial ou aérea.

Conforme o Censo Demográfico (IBGE, 2010), a população residente é de 707.125 habitantes, dos quais 61,2% residem nas zonas urbanas dos 22 municípios. Na capital, Rio Branco, se concentram 45,4% do total da população do Estado (IBGE, 2010).

O local do estudo foi o Hospital das Clínicas do Acre (HCAC), inaugurado em 31/03/1998. O HCAC é uma instituição pública de nível terciário, e é sede de treinamento para os programas de residência médica em Clínica Médica, em Cirurgia-Geral, em Medicina de Família e Comunidade e em Ginecologia e Obstetrícia.

2.1.2 Grupo de Pacientes Renais Crônicos

Amostras de urina (pré-diálise) e de sangue (pré e pós-diálise) de 100 pacientes (total dos pacientes em tratamento hemodialítico no HCAC que apresentavam diurese), no período de abril a julho de 2008, com diagnóstico de

insuficiência renal crônica, atendidos no Serviço de Nefrologia e Hemodiálise do HCAC, na cidade de Rio Branco-Ac, foram avaliados para a presença da infecção pelo JCV e BKV. No presente trabalho, essa amostra será referida como Grupo de Pacientes (Anexo 1).

2.1.3 Grupo de Indivíduos sem Doenças Renais

Amostras de urina e sangue de 99 indivíduos, voluntários, residentes em Rio Branco, capital do Estado do Acre, Brasil, de ambos os gêneros, saudáveis, selecionados no próprio hospital do estudo (funcionários do hospital) com idade igual ou superior a 18 anos, coletadas no período de abril a julho de 2008 foram usadas como grupo controle. As amostras biológicas, após coletadas, foram acondicionadas a -20°C e encaminhadas para o Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará (UFPA). No presente trabalho, essa amostra será referida como Grupo Controle (Anexo 1).

2.1.4 Critérios Exclusão

Os critérios de exclusão adotados para ambos os grupos foram: a) pacientes com idade inferior a 18 anos, b) indivíduos que não concordaram em participar e em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 02).

2.2 ASPECTOS ÉTICOS

O presente projeto foi submetido e aprovado no Comitê de Ética do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, sob número de protocolo 090/06 em obediência às resoluções 196/96 e 347/05 (Anexo 3) do Conselho Nacional de Saúde, a qual trata das diretrizes e das normas

regulamentares da pesquisa envolvendo seres humanos. Todos os indivíduos envolvidos foram informados acerca do projeto e aqueles que concordaram em participar assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

2.3 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras de urina (10 a 50 mL) coletadas dos grupos de pacientes e controles, seguindo normas de antissepsia e de assepsia, foram centrifugadas e o sedimento urinário lavado três vezes com solução salina estéril (0,9%) segundo protocolo descrito abaixo.

Descongelou-se as amostras urina de um dia para o outro (obs.: as amostras de urina podem ser coletadas e estocadas à -20°C até o momento de iniciar o procedimento de lavagem). Adicionou-se 10 mL de urina no tubo de centrífuga (15mL). Centrifugou-se por 5 minutos a 4000rpm até esgotar toda a amostra do frasco (sempre desprezando o sobrenadante e acrescentando ao tubo mais urina). Após a centrifugação, desprezou-se o sobrenadante. Nos casos onde houve baixo volume de urina (menos de 10 mL), completou-se com soro fisiológico até a marca de 10 mL. Após o término das centrifugações, iniciou-se as lavagens com soro fisiológico estéril (NaCl₂ 0,9%), fazendo-se um total de três lavagens, desprezando-se, sempre, o sobrenadante. Ao final adicionou-se 10 mL de soro fisiológico no tubo contendo o *pellet* de urina. Em seguida, realizou-se nova centrifugação durante 15 minutos em 4000 rpm, desprezando-se o sobrenadante. Essa etapa foi realizada três vezes. Na 3ª lavagem, o sobrenadante foi desprezado até 3,5 cm do tubo. Este restante foi dividido em dois tubos estéreis de 2,5mL. Ao final, armazenaram-se os tubos contendo as amostras na caixa plástica à -20°C.

As amostras de sedimento foram enviadas, em recipientes apropriados para manutenção das mesmas à temperatura de -20°C , ao Laboratório de Virologia da Universidade Federal do Pará (UFPA) onde foram mantidas no freezer à -70°C , até o momento da extração de DNA, para subsequente análise molecular da presença das infecções pelos JCV e BKV, por meio de metodologia padrão, descrita a seguir.

As amostras de sangue do grupo de Pacientes foram colhidas antes e após o procedimento da hemodiálise. As amostras de sangue do grupo Controle foram colhidas no momento em que o paciente entregou a amostra de urina no laboratório, em jejum.

2.4 ANÁLISES DAS AMOSTRAS

2.4.1 Extração do DNA

O método de extração de DNA, a partir de amostras de urina, seguiu o protocolo de extração de ácido nucléico viral usando-se o Kit da *Pure Link Viral RNA/DNA* (Invitrogen, CA,USA).

2.4.2 Reação em Cadeia mediada pela Polimerase (PCR)

No presente trabalho, foi efetuada a PCR para a amplificação de 173pb do gene que codifica o antígeno-T do JCV e do BKV. Esta foi realizada no equipamento termo-ciclador da Mastercycler Personal, Eppendorf Germany.

Para a amplificação do segmento de 173pb, as reações foram executadas em um volume de $50\ \mu\text{L}$, contendo $5\ \mu\text{L}$ de DNA extraído, $200\ \mu\text{M}$ de cada dNTP, $0,5\ \mu\text{M}$ de cada iniciador, ($10\ \text{mM}$ TRIS, $50\ \text{mM}$ KCl, Ph 8,3), $1,5\ \text{mM}$ MgCl_2 , $2,4\ \text{U}$ de *Taq* DNA polimerase. O par de iniciadores envolvidos nesta reação

foi o (PEP-1)- 5'AGTCTTTAGGGTCTTCTACC-3' e (PEP-2)- 5'GGTGCCAACCTATGGAACAG-3'.

O DNA alvo foi amplificado usando-se 40 ciclos (92°C por 1,5 minutos, 55°C por 1,5 minutos, 72°C por 2 minutos seguidos por uma extensão final de 7 minutos). O produto da amplificação foi visualizado após eletroforese (100V/45 minutos) em gel de agarose a 2% em tampão TAE1 x (TAE 40x estoque- Tris Base 1,6 M, acetato de Na 0,8M e EDTA- Na₂ 40mM/1000mL água desionizada), contendo 5M de brometo de etídio (10mg/mL) e mediante a utilização de transiluminador com fonte de luz ultravioleta.

2.4.3 Digestão Enzimática

A diferenciação entre as infecções por JCV e por BKV foi realizada por meio da digestão enzimática do produto amplificado, usando-se endonuclease de restrição *BamHI* (Invitrogen, CA,USA), que cliva o DNA do JCV em um fragmento de 120pb e outro de 53pb, enquanto que o DNA do BKV não é clivado. O produto da digestão foi visualizado após eletroforese em gel de agarose a 3% em tampão TAE1 x (TAE 40x estoque- Tris Base 1,6 M, acetato de Na 0,8M e EDTA- Na₂ 40mM/1000mL água desionizada), contendo 5M de brometo de etídio (10mg/mL) e mediante a utilização de transiluminador com fonte de luz ultravioleta.

2.4.4 Amplificação do Gene VP1

Para a amplificação do segmento de 215pb, as reações foram executadas em um volume de 50 µL, contendo 400 ng de DNA extraído, 200 µM de cada dNTP, 20 pmol de cada iniciador, KCl 50 mM, MgCl₂ 2,0 mM, Tris-HCl pH 8,310 mM e 0,5 U de *Taq* DNA polimerase. O par de iniciadores envolvidos nesta

reação foi: (JLP-15) 5'-ACAGTGTGGCCAGAATTCACTACC-3', e (JLP-16)5'-TAAAGCCTCCCCCCCAACAGAAA-3', correspondendo aos nucleotídeos 1710-1734 e 1924-1902 do genoma do JCV (Arthur *et al.*, 1989). Em cada reação de amplificação, após a desnaturação inicial, à 95°C, por 5 minutos, foram efetuados 50 ciclos de um minuto à 95°C, um minuto à 63°C e um minuto à 72°C, seguidos por uma extensão final de 10 minutos à 72°C. O produto da amplificação foi visualizado após eletroforese (100 V/45 minutos) em gel de agarose à 3%, em tampão TAE 1x (TAE 40x estoque – TrisBase 1,6 M, acetato de Na 0,8 M e EDTA-Na₂ 40mM/1000 mL água desionizada), contendo 5 µL de brometo de etídio (10mg/mL) e mediante a utilização de transiluminador com fonte de luz ultra-violeta. Os produtos amplificados da região VP1 foram submetidos ao sequenciamento de nucleotídeos, para posterior identificação do tipo viral.

2.4.5 Sequenciamento

Após a purificação do produto da PCR do gene VP1, o DNA foi submetido ao sequenciamento automático, através do uso do kit da ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing (Perkin Elmer, USA). As fitas de DNA proviral foram sequenciadas em ambas as direções, utilizando-se o equipamento de sequenciamento automático ABI 310 DNA Sequencer (Perkin Elmer, USA). A análise das seqüências nucleotídicas, a edição e o alinhamento foram realizados por meio do programa BIOEDIT versão 5.0.9 (Hall, 1999), utilizando-se a plataforma Windows 98 em um computador IBM-PC. Todas as seqüências nucleotídicas obtidas no estudo foram comparadas às seqüências do banco de dados do GeneBank/NCBI, utilizando-se ferramentas para a subtipagem (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.4.6 Análise das amostras de sangue

As amostras de sangue (uréia e creatinina) foram analisadas pelo método colorimétrico cinético, com eletrodos seletivos, aparelho Konelab 60i.

2.4.7 Estatística

As variáveis foram resumidas, por grupo de estudo, pelas estatísticas descritivas pertinentes: frequência absoluta (n) e relativa (%) ou média, desvio padrão (dp), mediana, valores mínimo e máximo.

A associação entre variáveis categóricas e os grupos de estudo foi avaliada pelo Teste do Qui-quadrado de Pearson ou da Razão de Verossimilhança, quando aplicável.

Nas variáveis contínuas foi aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar o ajuste da distribuição normal dentro dos grupos de estudo.

Foi utilizado o teste t de Student na comparação entre os grupos quanto às médias das variáveis: idade, níveis de uréia e de creatinina.

Foi aplicado o teste t-pareado para comparar as medidas de uréia pré e pós-diálise no grupo de Pacientes.

A associação entre presença do JVC e variáveis de interesse foi avaliada pelo Teste do Qui-quadrado de Pearson ou da Razão de Verossimilhança, quando aplicável.

Foi adotado o nível de significância de 0,05 ($\alpha = 5\%$) e níveis descritivos (p) inferiores a esse valor foram considerados significantes e representados por *.

Todas as análises estatísticas foram executadas pelo software estatístico SPSS for Windows versão 15.0.

3 RESULTADOS

3.1 VARIÁVEIS SÓCIO-DEMOGRÁFICAS

O grupo examinado totalizou 199 indivíduos cujas amostras foram obtidas de pacientes atendidos no HCAC, divididos em dois grupos: de Pacientes (renais crônicos em hemodiálise) e indivíduos Controle, sem doença renal (Tabela 1).

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de Pacientes e Controle quanto às seguintes variáveis demográficas: distribuição por gênero ($p = 0,523$), média de idade ($p = 0,648$), distribuição por faixa etária ($p = 0,634$), distribuição por escolaridade ($p = 0,241$) e distribuição por local de nascimento ($p = 0,117$) (Tabela 1).

Foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos de Pacientes e Controle quanto à distribuição por cor ($p = 0,024$). No grupo Controle a proporção de amarelos (22,2%) foi significativamente maior do que no grupo de Pacientes (8,0%) (Tabela 1).

Tabela 1 – Características sócio-demográficas das amostras de estudo (Rio Branco,2008)

Variáveis	Grupo		Amostra total (n = 199)	p
	Pacientes (n = 100)	Controle (n = 99)		
Gênero – n (%)				
Masculino	52 (52,0)	47 (47,5)	99 (49,7)	0,523
Feminino	48 (48,0)	52 (52,5)	100 (50,3)	
Idade (anos)				
média (dp)	52,5 (13,7)	51,7 (12,9)	52,1 (13,3)	0,648
mediana	56,5	53,0	55,0	
mínimo – máximo	14 – 78	15 – 78	14 – 78	
Faixa etária – n (%)				
< 20 anos	1 (1,0)	3 (3,0)	4 (2,0)	0,634
20 a 29 anos	6 (6,0)	2 (2,0)	8 (4,0)	
30 a 39 anos	11 (11,0)	13 (13,1)	24 (12,1)	
40 a 49 anos	18 (18,0)	23 (23,2)	41 (20,6)	
50 a 59 anos	31 (31,0)	27 (27,3)	58 (29,1)	
60 a 69 anos	28 (28,0)	27 (27,3)	55 (27,6)	
70 a 79 anos	5 (5,0)	4 (4,0)	9 (4,5)	
Cor – n (%)				
Branco	27 (27,0)	33 (33,3)	60 (30,2)	0,024 *
Negro	23 (23,0)	16 (16,2)	39 (19,6)	
Amarelo	8 (8,0)	22 (22,2)	30 (15,1)	
Pardo indígena	14 (14,0)	10 (10,1)	24 (12,1)	
Pardo negróide	28 (28,0)	18 (18,2)	46 (23,1)	

Tabela 1 – Características sócio-demográficas das amostras de estudo (Rio Branco,

2008) (continuação).

Variáveis	Grupo		Amostra total (n = 199)	p
	Pacientes (n = 100)	Controle (n = 99)		
Escolaridade – n (%)				
Analfabeto	19 (19,0)	26 (26,3)	45 (22,6)	0,241
Alfabetizado	33 (33,0)	28 (28,3)	61 (30,7)	
Ensino Fundamental	34 (34,0)	23 (23,2)	57 (28,6)	
Ensino Médio	9 (9,0)	13 (13,1)	22 (11,1)	
Ensino Superior	5 (5,0)	9 (9,1)	14 (7,0)	
Local de Nascimento – n (%)				
Acre	77 (77,0)	63 (63,6)	140 (70,4)	0,117
Outros Estados	21 (21,0)	33 (33,3)	54 (27,1)	
Outros Países	2 (2,0)	3 (3,0)	5 (2,5)	

3.2 VARIÁVEIS CLÍNICO-LABORATORIAIS

As variáveis clínico-laboratoriais estudadas foram as medidas dos níveis sanguíneos de creatinina e de uréia pré- e pós-diálise, nos indivíduos do grupo de Pacientes e nos indivíduos do grupo Controle.

Foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos de Pacientes e Controle quanto à média de uréia ($p < 0,001$), onde a média no grupo de Pacientes foi significativamente maior do que a média no grupo de Controles (Tabela 2).

Foi, também, encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos de Pacientes e Controle quanto à média de creatinina ($p < 0,001$), onde a média no grupo de Pacientes foi significativamente maior do que a média no grupo

Controle (Tabela 2).

No grupo de Pacientes foi encontrada variação estatisticamente significativa entre as avaliações pré- e pós-diálise de uréia ($p < 0,001$; Tabela 3).

Todos os pacientes apresentaram redução de uréia na avaliação pós-diálise, variando entre 17 e 191 mg/dl, com média de 86,4 mg/dl (dp = 39,1 mg/dl).

Na avaliação final, 23 (23,0%) pacientes apresentavam níveis de uréia pós-diálise até 35 mg/dl (limite superior da normalidade) e 77 (77,0%), ainda, apresentavam níveis acima de 35 mg/dl.

Tabela 2 – Níveis séricos de Uréia e de Creatinina nas amostras de estudo (Rio Branco, 2008)

Variáveis	Grupos		p
	Pacientes (n = 100)	Controle (n = 99)	
Uréia (mg/dl)			
média (dp)	140,9 (45,9)	24,2 (6,4)	< 0,001 *
mediana	134,0	23,0	
mínimo – máximo	43 – 236	12 – 35	
Uréia – n (%)			
≤ 35 mg/dl	0 (0,0)	99 (100,0)	---
> 35 mg/dl	100 (100,0)	0 (0,0)	
Creatinina (mg/dl)			
média (dp)	11,04 (3,81)	0,96 (0,24)	< 0,001 *
mediana	11,35	0,90	
mínimo – máximo	2,6 – 19,0	0,4 – 1,5	
Creatinina – n (%)			
≤ 1,4 mg/dl	0 (0,0)	98 (99,0)	---
> 1,4 mg/dl	100 (100,0)	1 (1,0)	

Tabela 3 – Níveis séricos de Uréia pré- e pós-diálise no grupo de Pacientes (Rio Branco, 2008)

Uréia (mg/dl) – (n = 100)	Avaliação		Variação (Pré-Pós)	p
	Pré-Diálise	Pós-Diálise		
média (dp)	140,9 (45,9)	54,6 (22,1)	86,4 (39,1)	< 0,001 *
mediana	134,0	54,50	78,5	
mínimo – máximo	43 – 236	13 – 109	17 – 191	

3.3 PREVALÊNCIAS DOS POLIOMAVÍRUS

O JCV foi identificado em 11,1% (11/99) dos indivíduos do grupo controle e em 4% (4/100) dos indivíduos do grupo de Pacientes (Tabela 4). Entretanto, a presença do BKV não foi identificada nas amostras de urina de ambos os grupos.

Não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a prevalência de JCV e as características da amostra estudada: gênero ($p = 0,773$), faixa etária ($p = 0,567$), cor ($p = 0,078$) e local de nascimento ($p = 0,516$) (Tabela 4).

Em relação ao tipo de JCV, o vírus tipo 2 foi identificado em 9,1% (9/99) dos indivíduos do grupo Controle e em 3% (3/100) do grupo de Pacientes. O JCV tipo 3 foi encontrado em 2% dos indivíduos do grupo Controle e em 1% dos indivíduos do grupo de Pacientes (Tabela 5). Em suma, o JCV tipo 2 foi responsável por 80% (12/15) das infecções causadas pelo JCV e o tipo 3 responsável por 20% (4/15) (Tabela 5).

Tabela 4 – Prevalência do JVC segundo as características da amostra estudada.

Variáveis	Vírus JVC		p
	Negativo	Positivo	
Gênero – n (%)			
Masculino (n = 99)	91 (91,9)	8 (8,1)	0,773
Feminino (n = 100)	93 (93,0)	7 (7,0)	
Faixa etária – n (%)			
< 20 anos (n = 4)	4 (100,0)	0 (0,0)	0,567
20 a 29 anos (n = 8)	7 (87,5)	1 (12,5)	
30 a 39 anos (n = 24)	21 (87,5)	3 (12,5)	
40 a 49 anos (n = 41)	37 (90,2)	4 (9,8)	
50 a 59 anos (n = 58)	53 (91,4)	5 (8,6)	
60 a 69 anos (n = 55)	53 (96,4)	2 (3,6)	
70 a 79 anos (n = 9)	9 (100,0)	0 (0,0)	
Cor – n (%)			
Branco (n = 60)	54 (90,0)	6 (10,0)	0,078
Negro (n = 39)	35 (89,7)	4 (10,3)	
Amarelo (n = 30)	26 (86,7)	4 (13,3)	
Pardo indígena (n = 24)	24 (100,0)	0 (0,0)	
Pardo negróide (n = 46)	45 (97,8)	1 (2,2)	
Local de Nascimento – n (%)			
Acre (n = 140)	128 (91,4)	12 (8,6)	0,516
Outros Estados (n = 54)	51 (94,4)	3 (5,6)	
Outros Países (n = 5)	5 (100,0)	0 (0,0)	

Tabela 5 – Prevalência do Vírus JC (JVC) nas amostras de estudo.

Variáveis	Grupo		Amostra total (n = 199)	p
	Pacientes (n = 100)	Controle (n = 99)		
Vírus JVC – n (%)				
Negativo	96 (96,0)	88 (88,9)	184 (92,5)	0,057
Positivo	4 (4,0)	11 (11,1)	15 (7,5)	
Tipo de Vírus JVC – n (%)				
Negativo	96 (96,0)	88 (88,9)	184 (92,5)	0,148
Tipo 2	3 (3,0)	9 (9,1)	12 (6,0)	
Tipo 3	1 (1,0)	2 (2,0)	3 (1,5)	

4 DISCUSSÃO

Neste trabalho foi investigada a prevalência da infecção pelo JCV e pelo BKV na população de renais crônicos em hemodiálise, candidatos ao transplante renal, atendidos no Serviço de Hemodiálise do Hospital das Clínicas do Acre (HCAC), então denominados Grupo de Pacientes; e em indivíduos sem doença renal crônica, residentes no Estado do Acre que foram denominados Grupo Controle.

Amostras populacionais de diferentes origens étnicas desta região da Amazônia Ocidental foram investigadas. No entanto, a classificação racial adotada neste estudo difere, em parte, daquela adotada pelo IBGE. Optou-se pela subdivisão da população parda em dois grupos: a) parda com características negróides e parda com características indígenas. Justifica-se tal subdivisão pela miscigenação histórica encontrada na população Amazônica, podendo, dessa forma, reproduzir com mais fidedignidade, esse processo de mistura racial da população acriana.

Embora tenha sido encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados quanto à distribuição por cor, onde no grupo Controle, a proporção de amarelos (22,2%) foi significativamente maior do que no grupo de Pacientes (8,0%); não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre a prevalência de JVC e essa característica da amostra estudada.

Em estudo semelhante, realizado na população de Belém-PA por Cayres-Vallinoto (2008), foi reportado que a maioria da população estudada apresentou características fenotípicas de mestiços (73,7 %), o que corrobora com nossos achados, mostrando que não há predomínio étnico de prevalência do JCV e demonstram a mistura racial encontrada nas populações amazônicas.

A faixa etária dos indivíduos examinados apresentou variação de 14 a 78 anos de idade. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes

entre os grupos de Pacientes e de Controles quanto a distribuição da idade por décadas bem como a média de idade.

A distribuição do grupo populacional de acordo com o gênero mostrou equilíbrio entre os grupos estudados, não sendo encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos de Pacientes e Controle quanto à variável demográfica gênero. Semelhantes foram os resultados encontrados por Cayres-Vallinoto (2008) em estudo populacional na cidade de Belém-PA, constituída de maneira proporcional entre homens (48,5 %) e mulheres (51,5 %).

Também não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes quanto à variável demográfica local de nascimento.

Em relação aos tipos de JCV encontrados na população acriana, foi registrada a ocorrência dos tipos 2 e 3, responsáveis, respectivamente, por 80 e 20 por cento das infecções causadas por esses vírus, no presente estudo. Esses dados estão de acordo com estudos filogenéticos da distribuição mundial do JCV (Jobes *et al.*, 1998) e da composição étnica da população amazônica (Moran, 1990).

Cayres-Vallinoto (2008), também encontrou dados semelhantes na população de Belém-PA, cuja composição étnica é a mesma dos povos amazônicos. Em seu estudo foi registrada a ocorrência dos três tipos virais ancestrais, que possuem associação geográfica específica a um domínio particular do Velho Mundo, o tipo 1 (3%), encontrado na Europa; o tipo 2 (83 %), encontrado na África e na Ásia; e o tipo 3 (14%), encontrado no continente Africano.

O mesmo autor ainda destaca que a prevalência do JCV tipo 2 demonstra a importância desse vírus como marcador de migração populacional quando se observa a similaridade genética das cepas americanas, incluindo-se comunidades epidemiologicamente fechadas, como aquelas oriundas de populações asiáticas que

cruzaram o estreito de Bering e colonizaram as Américas (Agostini *et al.*, 1997; Stoner *et al.*, 2000). O JCV tipo 2 presente entre as comunidades populacionais do Brasil, acompanhou as rotas de migração colonizadora e foi disseminado, lentamente, a partir dos ameríndios para as populações tri-híbridas atuais.

Uma vez presente entre os indígenas Amazônidas, o JCV tipo 2, particularmente o subtipo MY, pode, possivelmente, por meio de contatos das populações ameríndias com grupos de escravos em processo de fuga das senzalas para regiões da floresta Amazônica de difícil acesso, ter sido introduzido, nesse momento de formação dessas comunidades (Cayres-Vallinoto, 2008).

Segundo Moran (1990), a formação da população acriana não difere da formação dos povos amazônidas. Segundo esse autor, a longa história do povoamento da Amazônia começa, praticamente, junto com a formação da floresta que conhecemos hoje. Apesar de ainda não terem sido encontrados vestígios concretos da presença humana na Amazônia durante o período compreendido entre 20.000 e 12.000 a.p (antes do presente) foi, provavelmente, neste período que os primeiros grupos humanos provenientes da Ásia chegaram de sua longa migração até a América do Sul. Eram grupos nômades de caçadores-coletores que perserguiam as grandes manadas de animais.

O papel do JCV como marcador de migrações humanas ainda pode ser evidenciada com a detecção do tipo 3 em nossa população. De acordo com Jobes *et al.* (1998), o tipo 3 representa o tipo viral ancestral de JCV, oriundo da África. A identificação desse tipo viral na amostra da população acriana confere a presença de povos africanos no processo de miscigenação mais recente, representado pelas contribuições trazidas pelos escravos africanos e pelo colonizador branco na segunda metade do século XVIII (Moran, 1990).

No entanto, sabe-se que desses escravos, poucos subiram o Amazonas, concentrando-se nos Estados do Pará e do Amapá, próximos à foz desse rio, onde se deu a colonização portuguesa (Moran, 1990). Provavelmente, esse fato explique a menor distribuição do JCV tipo 3 em relação ao tipo 2 na população do Estado do Acre.

À semelhança do Brasil, o Acre compõe-se de uma grande diversidade de povos indígenas cujas situações frente à sociedade nacional também são muito variadas. Enquanto a grande maioria dos grupos se encontrarem em contato permanente ou regular com a população regional (mestiça ou branca), alguns ainda são classificados como “isolados” pelo órgão indigenista (Ferreira, 2011).

Segundo Valle de Aquino e Iglesias, o Acre contaria com doze grupos indígenas identificados que representariam um total de cerca de 9.300 índios, ou seja, 1,4 % da população do Estado. A maior parte desse contingente é composta pelos Kaxinawá que representam cerca da metade da população indígena acreana, os outros grupos tendo geralmente uma população inferior a mil indivíduos cada um. As sociedades indígenas acreanas dividem-se de maneira desigual em duas grandes famílias lingüísticas: Pano e Arawak. Alguns desses povos encontram-se também nas regiões peruanas e bolivianas fronteiriças ao Acre. Do ponto de vista da antropologia, o conhecimento sobre as sociedades indígenas do Estado é muito desigual. Se alguns povos, como os Kaxinawá ou os Ashaninka, atraíram o interesse de vários pesquisadores, as informações etnográficas disponíveis sobre a maior parte dos povos indígenas acreanos ainda são muito incipientes (Ferreira, 2011).

A história da colonização do Acre está estreitamente ligada ao extrativismo da seringa. Até metade do século XIX, o atual Estado do Acre ainda era pouco conhecido e as populações indígenas da região viviam num relativo

isolamento do mundo moderno. Organizadas em torno da coleta de drogas do sertão (cacau, salsaparrilha, etc.), as raras e tímidas penetrações brancas na região acreana durante o século XVIII não estabeleceram nenhum núcleo de povoamento (Ferreira, 2011).

A partir da década de 1870, a situação mudou paulatinamente com a chegada maciça de seringueiros de origem nordestina, vindos principalmente do Ceará. Com uma densidade elevada de *hévea brasiliensis*, a história do Acre foi profundamente marcada pela economia extrativista da borracha. Em 1899, a região acreana produzia cerca de 60% da borracha amazonense, ou seja, mais de 12 mil toneladas. A ocupação da bacia do Purus, de acesso mais fácil a Manaus e Belém, precedeu de alguns anos à exploração de seringa no Alto Juruá. João Gabriel de Carvalho e Melo foi o primeiro colono a se estabelecer, em 1857, nas margens do Purus com 40 famílias e o fundador, em 1869, do primeiro seringal estável da região (Ferreira, 2011).

O ritmo da colonização do Acre se acelerou a partir de 1877 em consequência das grandes secas do Nordeste. A imigração de milhares de seringueiros, em busca de melhores condições de vida, organiza-se a partir das casas aviadoras de Manaus e Belém apoiadas pelo capital internacional (Ferreira, 2011).

Portanto, a distribuição dos tipos de JCV em nossa população de estudo está em correspondência com a formação etno-histórica dos povos que colonizaram a Amazônia e cujos resultados se assemelham encontrados em outros estudos como os realizados por Cayres-Vallinoto (2008) e Pires *et al.*, (2011).

Não foram identificados indivíduos portadores do BKV na população do estudo, tanto no grupo de Pacientes quanto no grupo Controle. Dados semelhantes

foram encontrados por Pires *et al.* (2011) que identificou 2,2% de prevalência desse vírus em população assintomática e não identificou a presença desses vírus na população de renais crônicos.

A excreção de JCV e de BKV na urina de pacientes receptores de transplante (renais crônicos) é bastante variável. Dados da literatura mostram valores que variam de 20% a 90% (Arthur *et al.*, 1986; Coterril *et al.*, 1992; Priftakis *et al.*, 2000). O status imune do hospedeiro tem papel fundamental na excreção dos poliomavírus, especialmente para o BKV (Sugimoto *et al.*, 1989; Chang *et al.*, 1996; Tsai *et al.*, 1997; Behbahani *et al.*, 2004).

Kaneko *et al.* (2005) descreveu bem essa diferença analisando amostras de urina de pacientes renais crônicos em uso de corticóides que apresentavam prevalência dos poliomavírus, especialmente o BKV, muito superiores ao grupo controle que não eram usuários de corticóides (55,6% versus 13,5%).

A prevalência da infecção por poliomavírus observada em nosso estudo apresentou-se de maneira diferente de outros estudos que empregaram a mesma metodologia, em populações brasileiras (Rodrigues *et al.*, 2007; Cayres-Vallinoto, 2008; Pires *et al.*, 2011).

Cayres-Vallinoto (2008) estudou a ocorrência do JCV na população de Belém (Pará) encontrando 33% de prevalência da infecção em indivíduos assintomáticos. Nesta mesma população, recentemente, Pires *et al.* (2011) reportaram uma prevalência de 22,4% de JCV em indivíduos não portadores de insuficiência renal crônica. Em Portugal, Rodrigues *et al.* (2007), ao analisarem, a excreção de poliomavírus na urina, detectaram uma prevalência de 25,7%. Esses achados são distintos dos evidenciados no presente estudo no qual os assintomáticos apresentaram 11 % de prevalência de infecção pelo JCV.

Entretanto, é comum observar-se grandes variações de prevalências em populações de um mesmo país. Suzuki *et al.*, (2002), reportou 18% de prevalência para uma população americana com ascendência européia; valor muito diferente do encontrado pelo mesmo autor, entre americanos de ascendência japonesa (53%).

Cayres-Vallinoto (2008) relatou que a prevalência do JCV entre comunidades nativas também tem mostrado uma grande variação, de acordo com a localização geográfica. Nas Américas, os Inuit do Canadá mostraram taxa de excreção de 26% (Sugimoto *et al.*, 2002). Nos Estados Unidos, os Navaho, Novo México (66%) e os Flathead, Montana (56%) mostraram índices semelhantes aos nativos da ilha do Pacífico Chamorro, Micronésia (69%) como relatou Agostini *et al.* (1997). Entre populações asiáticas, Stoner *et al.* (2000) relataram níveis elevados de 65%. Na Austrália, a prevalência foi de 33 % (Whiley *et al.*, 2001) e de 28% (Whiley *et al.*, 2004) entre os nativos. Populações nativas da Sibéria mostraram taxas de excreção viral variável como 13% (Chuckchis), 35% (Luskys e Yukaghirs), 39% (Koryaks) e 56% (Nanais), como descrito por Sugimoto *et al.* (2002).

Outros aspectos a serem considerados e que foram relatados pelo mesmo autor são: a) diferenças na idade das várias amostras populacionais (Chima *et al.*, 1998); b) a baixa prevalência pode estar associada ao número limitado de indivíduos testados, em muitos estudos (Gu *et al.*, 2003) e c) a baixa prevalência pode estar associada ao volume de urina disponibilizada para o isolamento do DNA (Jeong *et al.*, 2004).

Em nosso estudo observou-se uma baixa prevalência desses vírus na população de renais crônicos em diálise, o que foi semelhante aos resultados observados por Pires *et al.* (2011). Isso pode ser explicado pelas variáveis que

interferem na realização da PCR; desde a colheita e processamento das amostras, até os fatores inibidores dessa reação em cadeia.

Em relação à colheita das amostras, sabe-se que a urina destinada à realização da PCR não deve permanecer períodos prolongados até o início do seu processamento, pois isso acaba levando a uma alcalinização da amostra, aumentando o número de falsos negativos (Valter, 2010).

Como os pacientes em hemodiálise, habitualmente, produzem pouca ou nenhuma diurese, foram orientados a colher o máximo de urina que conseguissem durante o dia, o que frequentemente não passou de alguns poucos mililitros e, posteriormente, encaminhasssem a amostra ao nosso laboratório. Esse período entre a colheita e o processamento das amostras pode ter interferido negativamente nos resultados.

Segundo Valter (2010), para se obter um bom sedimento urinário, três condições são necessárias: a) que a urina seja recente; b) que a urina seja concentrada e c) que a urina seja ácida. Urina de baixa concentração e pH alcalino resultam em pronta dissolução dos elementos formados. Quando a urina permanece longo tempo estagnada, há possibilidade de sua alcalinização e, conseqüente, desintegração celular.

Em relação aos fatores que podem inibir a PCR, para o nosso grupo de estudo, ressaltam-se dois: a) a grande quantidade de uréia nas amostras de urina pré-diálise (objeto do estudo) e b) as secreções mucóides produzidas pelo epitélio urinário.

Segundo Al-Sould & Radstom (1998) algumas substâncias atuam como inibidores da PCR, entre eles: presença de sais biliares nas fezes, grupo heme da

hemoglobina, proteinases no leite, uréia na urina e secreções mucóides do epitélio da via urinária.

Segundo os mesmos autores, uma das maneiras de se otimizar a amplificação do DNA dessas amostras seria usar soluções com hialuronidasas, antes da realização da PCR, a fim de se remover as secreções mucóides produzidas pelo epitélio urinário.

Nossos resultados mostram que houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de Pacientes e Controle quanto à média de Uréia ($p < 0,001$), onde a média no grupo de Pacientes (149 mg/dl) foi significativamente maior do que a média no grupo Controle (24,2 mg/dl). Esse, talvez, tenha sido o mais importante fator para a baixa detecção dos poliomavírus na urina dos pacientes renais crônicos.

Em relação aos fatores mucóides produzidos pelo epitélio urinário, sabe-se que os pacientes com disfuncionalização da bexiga, como os pacientes em hemodiálise, acabam por acumular elevadas quantidades de secreções mucóides na bexiga, devido ao baixo volume urinário e à baixa frequência de micções (Han, 2002). Portanto, para nosso grupo de estudo, esse fator deve ser levado em consideração.

Outros fatores (inibidores da Taq DNA polimerase) que podem ter interferido com a positividade das amostras, especialmente a do grupo de Pacientes foram as variações de pH, a quelação de íons de magnésio, a presença de hemoglobina e glicoproteínas em quantidades anormais encontradas na urina desse grupo de renais crônicos em hemodiálise (Bej *et al.*, 1994; Greenfield & White, 1993; Mahbudani *et al.*, 1994; Panaccio *et al.*, 1994).

Os pacientes renais crônicos em hemodiálise (função renal terminal - *clearance* de creatinina < 20-15 ml/min/m²) desenvolvem importantes alterações morfológicas no parênquima renal caracterizadas, histologicamente, por: hipertrofia glomerular, formação de trombos intraglomerulares, proliferação exagerada de células glomerulares e matriz mesangial, deposição glomerular de lipídios, estiramento das células endoteliais e mesangiais, lesão dos podócitos, deposição de material protéico subendotelial. As alterações histológicas acima descritas caracterizam-se, morfolologicamente, por atrofia do parênquima renal com diminuição do volume e função do órgão (Neto, 2010).

Sabendo-se que os poliomavírus replicam-se no parênquima renal, deve-se levantar a hipótese de que, quanto menor for a quantidade de parênquima renal funcionante, menor será a eliminação desses vírus na urina. Dessa forma, tal hipótese contribuiria para o baixo índice de prevalência dos poliomavírus na população de Pacientes de nosso estudo.

5. CONCLUSÕES

- A prevalência da infecção pelo JCV observada em nosso estudo apresentou-se de maneira semelhante à encontrada em outros estudos;
- Não foi identificada a presença do BKV na população estudada;
- A distribuição dos tipos de JCV em nossa população de estudo está em correspondência com a formação etno-histórica dos povos que colonizaram a Amazônia;
- Foi observada uma baixa prevalência do JCV no grupo de Pacientes (renais crônicos em hemodiálise);
- Foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos de Pacientes e de Controles quanto à média de uréia na urina (fator inibidor da PCR), que pode ter contribuído para a baixa detecção dos poliomavírus nas amostras analisadas;
- Os resultados sugerem que fatores fisiopatológicos da insuficiência renal possam ter contribuído para a baixa detecção dos poliomavírus no grupo de pacientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACUÑA, K., COSTA, E., GROVER, A., CAMELO, A., SANTOS JUNIOR, R.
Características clínico-epidemiológicas de adultos e idosos atendidos em unidade de terapia intensiva pública da Amazônia (Rio Branco, Acre).
Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-507X2007000300006>. Acesso em 12/09/2009.
- AGOSTINI, H.T., BRUBAKER G.R., SHAO J., LEVIN, A., RYSCHKEWITSCH, C.F., BLATTNER ,W.A., STONER, G.L. BK virus and a new type of JC virus excreted by HIV-1 positive patients in rural Tanzania. **Archives of Virology**, **140**: 1919-1934, 1995.
- AGOSTINI, H.T., RYSCHKEWITSCH, C.F., STONER, G.L. Genotype profile of human polyomavirus JC excreted in urine of immunocompetent individuals. **Journal of Clinical Microbiology**, **34**:159-164, 1996.
- AGOSTINI, H.T., YANAGIHARA, R., DAVIS, V., RYSCHKEWITSCH, C.F., STONER, G.L. Asian genotypes of JC virus in Native Americans and in a Pacific Island population: Markers of viral evolution and human migration. **Evolution**, **94**: 14542-14546, 1997.
- AHMED, S., CHOWDHURY, M., KHALILI, K. Regulation of a human neurotropic virus promoter, JCV : identification of a novel activator domain located upstream from the 98 bp enhancer promoter region. **Nucleic Acids Research**, **18**: 7417-7423, 1990a.
- AHMED, S., RAPPAPORT, J., TADA, H., KERR, D., KHALILI, K. A nuclear protein derived from brain cells stimulates transcription of the human neurotropic virus promoter JCVE, in vitro. **Journal of Biological Chemistry**, **265**: 13899-13905, 1990b.
- AHSAN, N., SHAH, K.V. Polyomaviruses and human diseases. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, **577**: 1-18, 2006.

- AL-SOUD,W.A., RADSTROM, P. Capacity of urine thermostable DNA polymerases to mediate amplification in the presence of PCR-inhibiting samples. **Applied and Enviromental Microbiology**, **64**: 3748-3753, 1998.
- ANDERSON, H.A., CHEN, Y., NORKIN, L.C. Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. **Molecular Biology of Cell**, **7**: 1825-1834, 1996.
- ARAYA, C.E., LEW, J.F., FENNELL, R.S., NEIBERGER, R.E., DHARNIDHARKA, V.R. Intermediate-dose cidofovir without probenecid in the treatment of BK virus allograft nephropathy. **Pediatric Transplant**, **10**: 32-37, 2006.
- 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. **England Journal of Medicine**, **15**: 230-234, 1986.
- ARTHUR, C.K., APPERLEY, J.F., GUO, A.P., RASSOOL, F., GAO, L.M., GOLDMAN, J.M. Cytogenetic events after bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia in chronic phase. **Blood**, **71**: 1179-1186, 1988
- ARTHUR R.R., DAGOSTIN, S., SHAH, K.V. Detection of BK virus and JC virus in urine and brain tissue by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, **27**:1174, 1989.
- ARTHUR R.R., GROSSSMAN, S.A., RONNETT, B.M., BIGNER, S.H., VOGELSTEIN, B., SHAH, K.V. Lack of association of human polyomaviruses with human brain tumors. **Journal of Neuro-oncology**, **20**: 55-58, 1994.

- ATWOOD, W. J., AMEMIYA, K., TRAUB, R., HARMS, J., MAJOR, E.O. Interaction of the human polyomavirus, JCV, with human B-lymphocytes. **Virology**, **190**: 716-723, 1992.
- BANGA, S.S., KIM, S., HUBBARD, K., DASGUPTA, T., JHA, K.K., PATSALIS, P., HAUPTSCHHEIN, R., GAMBERI, B., DALLA-FAVERA, R., KRAEMER, P., OZER, H.L. SEN6, a locus for SV40-mediated immortalization of human cells, maps to 6q26-27. **Oncogene**, **14**: 313-321, 1997.
- BEHBANHANI, B.A., KLAPPER, P.E., VALLEY, P.J. Detection of BK virus and JC virus DNA in urine samples from immunocompromised (HIV-infected) and immunocompetent (HIV-non-infected) patients using polymerase chain reaction and microplate hybridization. **Journal of Clinical Virology**, **9**: 224-229, 2004.
- BERGER, J.R. Progressive multifocal leukoencephalopathy in acquired immunodeficiency syndrome: explaining the high incidence and disproportionate frequency of the illness relative to other immunosuppressive conditions. **Journal of Neurovirology**, **9**: 38-41, 2003.
- BERGSAGEL, D.J., FINEGOLD, M.J., BUTEL, J.S., KUPSKY, W.J., GARCEA, R.L. DNA sequences similar to those of simian virus 40 in ependymomas and choroid plexus tumors of childhood. **New England Journal of Medicine**, **326**: 988-993, 1992.
- BEJ, A.K., MAHBUBANI, M.H. Thermostable DNA polymerase for in vitro DNA amplification. In: **PCR technology: current innovations**, CRC Press, London, 1994. p. 219-237.
- BOLDORINI, R., BRUSTIA, M., BARCO, D., ANDORNO, S. Periodic assesment of urine and serum by cytology and molecular biology as a diagnostic tool for BK vírus nephropathy in renal transplant patients. **Acta of Cytology**, **49**: 235-243, 2005.

- BRATT, G., HAMMARIN, A.L., GRANDIEN, M. BK virus as the cause of meningoencephalitis, retinitis, and nephritis in patient with Aids. **AIDS**, **13**: 1071-1075, 1999.
- BRINSTER, R.L., CHEN, H.Y., MESSING, A., VAN DYKE, T., LEVINE, A.J., PALMITER, R.D. Transgenic mice harboring SV40 T-antigen genes develop characteristic brain tumors. **Cell**, **37**: 367-379, 1984.
- BUTEL, J. S., LEDNICKY, J. A. J. Cell and molecular biology of simian virus 40: implications for human infections and disease. **National Cancer Institute**, **91**: 119-134, 1999.
- CAPUTO, A., CORALLINI, A., GROSSI, M.P., CARRA, L., BALBONI, P.G., NEGRINI, M., MILANESI, G., FEDERSPIL, G., BARBANTI-BRODANO, G., Episomal DNA of a BK virus variant in a human insulinoma. **Journal of Medical Virology**, **12**: 37-49, 1983.
- CAYRES-VALLINOTO, I.M.V. **Epidemiologia molecular do poliomavírus humano JC em populações da Amazônia brasileira: um marcador biológico das migrações humanas**. Tese (Doutorado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) – Belém, Universidade Federal do Pará, 2008, 134p.
- CHAN, P.K.S., SHIU, S.Y.W. Association between polyomaviruria and microscopic hematuria in bone marrow transplant recipients. **Journal of Infections**, **29**: 139-146, 1994.
- 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. **Journal of Medical Virology**, **48**: 95-101, 1996.
- CHIMA, S.C., RYSCHKEWITSCH, C.F., STONER, G.L. Molecular epidemiology of human polyomavirus JC in the Biaka Pygmies and Bantu of Central America. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **93**: 615-23, 1998.

- COLE, C.N., Polyomavirinae: the viruses and their replication. In: **Fundamental Virology Fields**, B.N., KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M. (Eds.), 3rd ed. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, 1996. p. 917-946.
- COLEMAN, D., MACKENZIE, S., GARDNER, S., POULDING, J.M., AMER, B., RUSSEL, W.J.L. Human polyomavirus (BK) infection and ureteric stenosis in renal allograft recipients. **Journal of Clinical Pathology**, **31**: 338-347, 1978.
- COLEMAN, D. V., WOLFENDALE, M. R., DANIEL, R. A., DHANJAL, N.K., GARDNER, S. D., GIBSON, P. E., FIELD, A. M. A prospective study of human poliomyelitis virus infection in pregnancy. **Journal of Infectious Disease**, **142**:1-8, 1980.
- CORALLINI, A., TOGNON, M., NEGRINI, M., BARBANTI-BRODANO, G. Evidence for BK virus as a human tumor virus. In: **Human Polyomaviruses: Molecular and Clinical Perspective**. Khalili, K., Stoner, G.L. (Eds.), Wiley-Liss, New York, 2001. p. 431-460.
- COTTERILL, H.A., MACAULAY, M.E., WONG, V. Reactivation of polyomaviruses in bone marrow transplant recipients. **Journal of Clinical Pathology**, **45**: 445. 1992
- CUBITT, C.L. Molecular genetics of the BK virus. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, **577**: 85-95, 2006.
- CUBUKCU-DIMOPULO, O., GRECO, A., KUMAR, A. BK virus infection in AIDS. **American Journal of Surgery Pathology**, **24**:145-149, 2000.
- DALRYMPLE, S.A., BEEMON, K.L. BK virus T antigens induce kidney carcinomas and thymoproliferative disorders in transgenic mice. **Journal of Virology**, **64**: 1182-1191, 1990.
- DANIEL, D.C., KINOSHITA, Y., KHAN, M.A., DEL VALLE, L., KHALILI, K. RAPPAPORT, J., JOHNSON, E.M. Internalization of exogenous human immunodeficiency virus-1 protein, Tat, by KG-1 oligodendroglia cells followed by stimulation of DNA replication initiated at the JC virus origin. **DNA Cell Biology**, **23**: 858-867, 2004.

- DAVID, H. Progressive Multifocal Leukoencephalopathy (PML). In: **Control of Communicable Diseases Manual**, 18th Edition, 2001, American Public Health Association. Disponível em: <<http://webhealth.com/wiki/ProgressiveMultifocalLeukoencephalopathy> (PML). Acesso em 03/04/2009.
- DEAN, F.B., BULLOCK, P., MURAKAMI, Y., WOBBE, C.R., WEISSBACH, L., HURWITZ, J. Simian virus 40 (SV40) DNA replication: SV40 large T antigen unwinds DNA containing the SV40 origin of replication. **Proceedings of the National Academy of Science. U.S.A**, **84**: 16-20, 1987.
- DOMINGUES, J.T., DE PARIS F., SCHMITT, V.M. Proposta de reação em cadeia da polimerase (PCR) semi-nested para pesquisa e diferenciação dos vírus BK e JC Proposal of semi-nested polimerase chain reaction (PCR) for diagnosing and differentiating BK and JC vírus. **Scientia Medica**, **17**: 72-78, 2007.
- DORNREITER, I., HOSS, A., ARTHUR, A.K., FANNING, E. SV40 T antigen binds directly to the large subunit of purified DNA polymerase alpha. **EMBO Journal**, **9**: 3329–3336, 1990.
- DÖRRIES, K., VOGEL, E., GÜNTHER, S. Infection of human polyomaviruses JC and BK in peripheral blood leukocytes from immunocompetent individuals. **Virology**, **198**: 59-70, 1994.
- DRACHENBER, C.B., HIRSCH, H.H., PAPADIMITRIOU, J.C., GOSERT, R., WALI, R.K. Polyomavirus BK versus JC replication and nephropathy in renal transplant recipients: a prospective evaluation. **Transplantation**, **84**: 323-330, 2007.
- DRAIBE, S. A. Insuficiência renal crônica. In: **AJZEN, H.; SCHOR, N. Nefrologia: guia de medicina ambulatorial**. São Paulo: Manole, 2002, p.339-343.
- DREWS, K., BASHIR, T., DORRIES, K. Quantification of human polyomavirus JC in brain tissue and cerebrospinal fluid of patients with progressive multifocal

- leukoencephalopathy by competitive PCR. **Journal of Virology Methods**, **84**: 23-36. 2000.
- EASH, S., MANLEY, K., GASPAROVIC, M., QUERBES, W. AND ATWOOD, W.J. The human polyomaviruses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, **63**: 865-876, 2006.
- ELLI, A., BANFI, G., FOGAZZI, G.B., TARANTINO, A., PONTICELLI, C. BK polyomavirus interstitial nephritis in a renal transplant patient with no previous acute rejection episodes. **Journal of Nephrology**, **15**: 313-316, 2002.
- ELSNER, C., DORRIES, K. Evidence of human polyomavirus BK and JC infection in normal brain tissue. **Virology**, **191**: 72-80, 1992.
- FERRANTE, P., CALDARELLI-STEFANO, R., OMODEO-ZORINI, E., VAGO, L., BOLDORINI, R. AND COSTANZI, G. PCR detection of JC virus DNA in brain tissue from patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. **Journal of Medical Virology**, **47**: 219-225, 1995.
- FERREIRA, E. **História do Acre: Evolução da Questão indígena**. Disponível em < <http://ambienteacreano.blogspot.com/2006/05/histria-do-acre-evoluo-da-questo.html> > Acesso em 02/02/2011.
- FIORITI, D., VIDETTA, M., MISCHITELLI, M., DECENER, A.M, RUSSO, G., GIORDANO, A. Human polyomavirus BK: potential role in cancer. **Journal of Cellular Physics**, **204**: 402-406, 2005.
- FISHMAN, J.A. BK virus nephropathy-polyomavirus adding insult to injury. **New England Journal of Medicine**, **347**: 527-530, 2002.
- FRANKS, R.R., RENCIC, A., GORDON, J., ZOLTICK, P.W., CURTIS, M., KNOBLER, R.L., KHALILI, K. Formation of undifferentiated mesenteric tumors in transgenic mice expressing human neurotropic polyomavirus early protein T-antigen. **Oncogene**, **12**: 2573-2578, 1996.

- FRISQUE, R.J., BREAM, G.L., CANELLA, M.T. Human polyomavirus JC genome. **Journal of Virology**, **51**: 458-469, 1984.
- FRISQUE, R.J. "JC and BK viruses (Papovaviridae)". In: **Encyclopedia of Virology**, vol. 2. Granoff, A.G. & Webster, R.G. (ed.). Academic Press, 1999. p. 876-883.
- GARDNER, S.D., FIELD, A.M., COLEMAN, D.V., HULME, B. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. **Lancet**, **1**: 1253-1257, 1971.
- GARDNER, S.D. Prevalence in England of antibody to human polyomavirus (B.K.). **Brazilian Medical Journal**, **1**: 77-78, 1973.
- GARDNER, S.D. Implication of papovaviruses in human diseases. In: **Kurstak E, editor. Comparative diagnosis of viral diseases. Vol 1. Human and related viruses (parte A)**. Nueva York: Academic Press, 1977. p. 41-84.
- GARDNER, S.D., MACKENZIE, E.F.D., SMITH, C. A prospective study of the human polyomaviruses BK and JC and cytomegalovirus in renal transplant recipients. **Journal of Clinical Pathology**, **37**: 578-586, 1984.
- GILBERT, J.M., BENJAMIN, T.L. Early steps of Polyomavirus entry into cells. **Journal of Virology**, **74**: 8582-8588, 2000.
- GIRALDO, G., E. BETH, J. LEE, E. DE HARVEN, CHERNESKY, M. Solidphase immune electron microscopy–double-antibody technique for rapid detection of papovaviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, **15**: 517-521, 1982.
- GIRI, J.A., GREGORESKY, J., SILGUERO, P., MESSINA, O.G., PLANES, N. Polyoma virus JC DNA detection by polymerase chain reaction in CSF of HIV infected patients with suspected progressive multifocal leukoencephalopathy **American Clinical Laboratory**, **20**: 33-35, 2001.

- GORDON, J., DEL VALLE, L., OTTE, J., KHALILI, K. Pituitary neoplasia induced by expression of human neurotropic polyomavirus, JCV, early genome in transgenic mice. **Oncogene**, **19**: 4840-4846, 2000.
- GOUDSMIT, J., WERTHEIM-VAN DILLEN, P., VAN STRIEN, A., VAN DER NOORDAA, J. The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils. **Journal of Medical Virology**, **10**: 91-99, 1982.
- GREENFIELD, L., WHITE, T.J. Sample preparation methods. In: **Diagnostic molecular microbiology: principles and applications**, Persing D, Smith T, Tenover F, White TJ. ASM Press, Washington DC, 1993. p. 122-137.
- GUO, J., KITAMURA, T., EBHARA, H., SUGIMOTO, C., KUNITAKE, T., TAKEHISA, J., NA, Y. Q., AL-AHDAL, M. N., HALLIN, A., KAWABE, K., TAGUCHI, F. & YOGO, Y. **Journal of General Virology**, **77**: 919-927, 1996.
- GU, Z.Y., LI, Q., SI, Y.L., LI, X., HAO, H.J, SONG, H.J. Prevalence of BK virus and JC virus in peripheral blood leukocytes and normal arterial walls in healthy individuals in China. **Journal of Medical Virology**, **70**: 600-605, 2003.
- HALL, T.A.. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium**, **41**: 95-98, 1999.
- HAN, C., DAI, F., ZHOU, G. Urodynamics of neurogenic lower urinary tract dysfunction caused by spinal cord injury. **Zhonghua Wai Ke Za Zhi**, **40**: 441-444, 2002.
- HATWELL, J.N., SHARP, P.M. Evolution of human polyomavirus. **Journal of General Virology**, **81**: 1191-1200, 2000.
- HERITAGE, J., CHESTERS, P.M., MCCANCE, D.J. The persistence of papovavirus BK DNA sequences in normal human renal tissue. **Journal of Medical Virology**, **8**: 143-150, 1981.
- HIRSCH, H.H., STEIGER, J. Polyomavirus BK. **Infectious Diseases**, **3**: 611-623, 2003.

- HIRSCH, H.H., DRACHENBERG, C.B., STEIGER, J., RAMOS, E. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: critical issues of screening and management. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, **577**: 160-173, 2006.
- HOGAN, T.F., BORDEN, E.C., MCBAIN, J.A., PADGETT, B.L., WALKER, D.L. Human polyomavirus infections with JC virus and BK virus in renal transplant patients. **Annals of Internal Medicine**, **92**: 373-378, 1980.
- HURAUULT, L. B., FRANCOIS, A., LOBBEDEV, T., COMOZ, F., ETIENNE, I., EL HAGGAN, W., PUJO, M., GODIN, M., RYCKELYNCK, J.P. Clinical aspects of human polyomaviruses in renal transplantation. **La Presse Médicale**, **32**: 659-66, 2003.
- IKEGAYA, H., P. J. SAUKKO, R. TERTTI, K. P. METSÄRINNE, M. J. CARR, B. CROWLEY, K. SAKURADA, H.-Z. ZHENG, T. KITAMURA, AND Y. YOGO.. Identification of a genomic subgroup of BK polyomavirus spread in European populations. **Journal of General Virology**, **87**: 3201-3208, 2006.
- ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses. ICTVdB - The Universal Virus Database, 2006. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/index.htm>>. Acesso em 09/04/2008.
- IMPERIALE, M.J. The human polyoma viruses: an overview. In: **Human Polyomaviruses: Molecular and Clinical Perspective**. Khalili, K., Stoner, G.L. (Eds.). Wiley-Liss, New York, 2001. p. 53-71.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Censo 2010**. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/censo2010/dadosdivulgados/index.php?uf=12>> Acesso em 08/12/2010.
- JIN L, PIETROPAOLO V., BOOTH J.C., WARD K.H., BROWN D.W. Prevalence and distribution of BK virus subtype sin healthy people and immunocompromised patients

detected by PCR restriction enzyme. **Clinical and Diagnostic Virology**, **3**: 285-295, 1995.

JEONG, B.H., LEE, K.H., CHOI, E.K., KIM, K., KIM, Y.S. Genotyping of the JC virus in urine samples of healthy Korean individuals. **Journal of Medical Virology**, **72**: 281-289, 2004

JOBES, D.V., CHIMA, S.C., RYSCHKEWITSCH, C.F., STONER, G.L. Phylogenetic analysis of the human polyomavirus JC virus. **Journal of General Virology**, **79**: 2491-2498, 1998.

KADAMBY, P.V., JOSEPHSON, M.A., WILLIAMS, J., COREY, L., JEROME, K.R., MEEHAN, S.M., LIMAYE, A.P. Treatment of refractory BK virus-associated nephropathy with cidofovir. **American Journal of Transplant**, **3**: 186-191, 2003.

KAHAN, A., COLEMAN, D., KOSS, L. Activation of human polyomavirus infection detection by cytologic technics. **American Journal of Clinical Pathology**, **74**: 326-332, 1980.

KANEKO, T., MORIYAMA, T., TSUBAKIHARA, Y., HORIO, M., IMAI, E. Prevalence of human polyomavirus (BK and JC virus) infection in patients with chronic renal disease. **Clinical and Experimental Nephrology**, **9**: 132-137, 2005.

KATO, A., KITAMURA, T., SUGIMOTO, C., OGAWA, Y., NAKAZATO, K., NAGASHIMA, K., HALL, W. W., KAWABE, K., YOGO, Y. **Archives of Virology**, **142**: 875-882, 1997.

KIMBERD, B.A. Screening to prevent polyoma virus nephropathy: a medical decision analysis. **American Journal of Transplant**, **5**: 2014-2016, 2005.

KITAMURA, T. Detection of urinary JCV and BKV DNA during immunosuppressive therapy. **Nippon-Rinsho**, **50**: 211-215, 1992.

- KITAMURA, T., SUGIMOTO, C., KATO, A., EBIHARA, H., SUZUK, M., TAGUCHI, F., KAWABE, K., YOGO, Y. Persistent JC virus (JCV) infection is demonstrated by continuous shedding of the same JCV strains. **Journal of Clinical Microbiology**, **35**: 1255-7, 1997
- KNOWLES, W. A., M. WOODROOF, A. A., PORTER, A.N.D., GARDNER, S. D. An indirect immunofluorescence method for detection of infectious BK virus in urine. **Journal of Virological Methods**, **26**: 351-354, 1989.
- KNOWLES, W.A. Propagation and assay of BK virus. **Methods in Molecular Biology**, **165**: 19-31, 2001.
- KOMAGOME, R., SAWA, H., SUZUKI, T., SUZUKI, Y., TANAKA, S., ATWOOD, W.J., NAGASHIMA, K. Oligosaccharides as receptors for JC virus. **Journal of Virology**, **76**: 12992-13000, 2002.
- KRYNSKA, B., VALLE, L.D., CROUL, S., GORDON, J., KATSETOS, C.D., CARBONE, M., GIORDANO, A., KHALILI, K. Detection of human neurotropic JC virus DNA sequence and expression of the viral oncogenic protein in pediatric medulloblastomas. **Medical Sciences**, **96**: 11519-11524, 1999a.
- KRYNSKA, B., OTTE, J., FRANKS, R., KHALILI, K., CROUL, S. Human ubiquitous JCV(CY) T-antigen gene induces brain tumors in experimental animals. **Oncogene**, **18**: 39-46, 1999b.
- KUNITAKE, T., KITAMURA, T., GUO, J., TAGUCHI, F., KAWABE, K., YOGO, Y. **Journal of Clinical Microbiology**, **33**: 1448-1451, 1995.
- LAGHI, L., RANDOLPH, E., CHAUHAN, D.P., MARRA, G., MAJOR, E.O., NEEL, J.V., BOLAND, C.R. JC virus DNA is present in the mucosa of the human colon and in colorectal cancers. **Medical Sciences**, **96**: 7484-7489, 1999.

- LASSAK, A., DEL VALLE, L., PERUZZI, F., WANG, J.Y., ENAM, S., CROUL, S., KHALILI, K., REISS, K. Insulin receptor substrate 1 translocation to the nucleus by the human JC virus T-antigen. **Journal of Biology and Chemistry**, **277**: 17231-17238, 2002.
- LENGAUER, C., KINZLER, K. W. & VOGELSTEIN, B. Genetic instabilities in human cancers. **Nature**, **396**: 643-649, 1998.
- LINGY, H.B., FRANÇOIS, A., LOBBEDEV, T., COMOZ, F., ETIENE, I., EL HAGGAN, W., PUJO, M., GODIN, M., RYCKELYNCK, J.P. Service de nephrology-transplantation rénale. **La Presse Médicale**, **32**: 659-666, 2003.
- MAHBUDANI, M.H., BEJ, A.K. Applications of polymerase chain reaction methodology in clinical diagnostics. In: **PCR technology: current innovations**, Griffin H, Griffin A, CRC Press, London, 1994. p. 307-326.
- MANTYJARVI, R.A., MEURMAN, O.H., VIHMA, L. A human papovavirus (B.K.), biological properties and seroepidemiology. **Annals of Clinical Research**, **5**: 283-287, 1973.
- MCCANCE, D. Persistence of animal and human papovaviruses in renal nervous tissues. In: **Sever JL, Madden DL**, editores. Polyomaviruses and human neurological disease. Nueva York: Alan R. Liss, 1983. p. 343-357.
- MELENDY, T., STILLMAN, B. An interaction between replication protein A and SV40 T antigen appears essential for primosome assembly during SV40 DNA replication. **Journal of Biology and Chemistry**, **268**: 3389-3395, 1993.
- MERLINO,C., BERGALLO, M., DANIELE, R., PONZI, A.N., CAVALLO, R. BKV-DNA and JCV-DNA co-quantification assay to evaluate viral load in urine and serum. **Molecular Biotechnology**, **30**: 1-8, 2005.
- MESSING, A., CHEN, H.Y., PALMITER, R.D., BRINSTER, R.L. Peripheral neuropathies, hepatocellular carcinomas and islet cell adenomas in transgenic mice. **Nature**, **316**: 461-463, 1985.

- MIRANDA, J.J., SUGIMOTO, C., PARAGUISON, R., TAKASAKA, T., ZHENG, H., YOGO, Y. Genetic diversity of JC virus in the modern Filipino population: implications for the peopling of the Philippines. **American Journal of Physical Anthropology**, **120**: 125-132, 2003.
- MOENS, U., REKVIG, O.P. Molecular biology of BK virus and clinical and basic aspects of BK virus renal infection. In: **Human Polyomaviruses: Molecular and Clinical Perspective**. Khalili, K., Stoner, G.L. (Eds.),. Wiley-Liss, New York, 2001. p. 359-408.
- MORAN, E. F. A ecologia humana das populações da Amazônia. **Vozes** **15**: 37-45, 1990.
- MURRAY, R.P., BARON, J.E., PFALLER, M.A. **Manual of clinical microbiology**. 7th ed. Washington: ASM; 1999.
- NEWNHAM, M., VODOLO, K. Use of cidofovir in progressive multifocal leukoencephalopathy. **The Annals of Pharmacotherapy**, **35**: 741 -744, 2001.
- NETO, R.L.S. **Insuficiência Renal Crônica**. Disponível em: <[http://www.digimed.ufc.br/wiki/index.php/insufici%C3%Aancia_Renal_Cr%C3%B4nica\(IRC\)](http://www.digimed.ufc.br/wiki/index.php/insufici%C3%Aancia_Renal_Cr%C3%B4nica(IRC))>. Acesso em 08/10/2010.
- NICKELEIT, V., HIRSCHV H.H., ISABELLE, B.F. Polyomavirus infection of renal allograft recipients: from latent infection to manifest disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, **10**: 1080-1089, 1999.
- NICKELEIT, V., STEIGER, J., MIHATSCH, M.J. BK virus infection after kidney transplantation. **Graft**, **5**: S46–S57 (Suppl.), 2002.
- NILSEN, I., FLAEGSTAD, T., TRAAVIK, T. Detection of specific IgA antibodies against BK virus by ELISA. **Journal of Medical Virology**, **33**: 89–94, 1991.
- NORKIN, L.C. Simian virus 40 infection via MHC class I molecules and aveolae. **Immunology Review**, **168**: 13-22, 1999.

- NORONHA, I.L. Imunossupressão: agentes farmacológicos. In: **Manual de transplante renal**. Manole (Ed). Primeira edição brasileira, 2004. p 35-98.
- NORONHA, I.L, FERRAZ, A.S., SILVA FILHO, A.P., SAITOVICH, D., CARVALHO, D.B.M., PAULA, F.J., CAMPOS, H., IANHEZ, L.E., GARCIA, V.D. Transplante renal: Indicações e Contra-Indicações. **Projeto Diretrizes-AMB**. Disponível em:<
http://www.projetodiretrizes.org.br/4_volume/32-Transpren.pdf> Acesso em:
06/10/2010
- O'NEILL, F. J., FRISQUE, R. J., XU, X., HU, Y. X. & CARNEY, H. **Oncogene**, **10**: 1131-1139. 1995.
- O'REILLY, R.J., LEE, F.K., GROSSBARD, E., KAPOOR, N., KIRKPATRICK, D., DINSMORE R, [STUTZER C.](#), [SHAH K.V.](#), [NAHMIAS A.J.](#) Papovavirus excretion following marrow transplantation: incidence and association with hepatic dysfunction. **Transplantation Proceedings**, **13**: 262-266, 1981.
- PADGETT, B.L., WALKER, D.L., ZURHEIN, G.M., ECKROADE, R.J. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. **Lancet**, **1**: 1257-1260, 1971.
- PADGETT, B.L., WALKER, D.L. Prevalence of antibodies in human sera against JC virus, an isolate from a case of progressive multifocal leucoencephalopathy. **Journal of Infectious Diseases**, **127**: 467-470, 1973.
- PANACCIO, M., LEW, A.M. Direct PCR from whole blood using formamide and low temperatures. In: **PCR technology: current innovations**, Griffin H, Griffin A, CRC Press, London, 1994. p. 151-157.
- PAPPO, O., DEMETRIS, A.J., RAIKOW, R.B. Human polyoma virus infection of renal allografts: histopathologic diagnosis, clinical significance, and literature review. **Modern Pathology**, **9**: 105-109, 1996.

PERKIM ELMER. **Instruments, services, & reagents for the life & analytical sciences.**

Disponível em: <[http:// www.PerkinElmer.com](http://www.PerkinElmer.com). Acesso em 13/12/2010

PIRES, E.P., BERNARDINO-VALLINOTO, C.V., ALVES, D.M., MIGONE, S.R.C., MACHADO, L.F.A., ISHAK, M.O.G., ISHAK, R., CAYRES-VALLINOTO, I.M.V., VALLINOTO, A.C.R. Prevalence of infection by JC and BK Polyomaviruses in Kidney Transplant Recipients and Patients with Chronic Renal Disease. **Transplant Infectious Disease**. *In press*, 2011.

PORTOLANI, M., MARZOCCHI, A., BARBANTI-BRODANO, G., LA PLACA, M. Prevalence in Italy of antibodies to a new human papovavirus (BK Virus). **Journal of Medical Microbiology**, **7**: 543-546, 1974.

PRIFTAKIS, P., BOGDANOVIC, G., TYDEN, G., DALIANIS, T. Polyomaviruria in renal transplant patients is not correlated to the cold ischemia period or to rejection episodes. **Journal of Clinical Microbiology**, **38**: 406-407, 2000.

QUINLIVAN, E.B., NORRIS, M., BOULDIN T.W., Subclinical Central Nervous System Infection with JC Virus in Patients with AIDS. **Journal of Infectious Diseases** **166**: 80-85, 1992.

RAZONABLE, R.R., BROWN, R.A., HUMAR, A., COVINGTON, E., ALECOCK, E., PAYA, C.V. A longitudinal molecular surveillance study of human polioma vírus viremia in heart, kidney and pancreas transplant patients. **Journal of Infectious Disease**, **192**: 1349-54, 2005.

RANDHAWA, P., VATS, A., SHAPIRO, R., WECK, K., SCANTLEBURY, V. BK virus: discovery, epidemiology, and biology. **Graft**, **5**: S19-S27, 2002.

REPLOEG, M., STORCH, G., CLIFFORD, D. BK virus: A clinical review. **Clinical Infectious Diseases**, **33**: 191-202, 2001.

- REPLOEG, M.D., STORCH, G.A., CLIFFORD, D.B., Bk virus: a clinical review. **Clinical infectious diseases**, **10**: 640-644, 2004.
- RIELLA, M. C., PECOITS-FILHO, R. Insuficiência Renal Crônica: Fisiopatologia da Uremia. In: RIELLA, M. C. **Princípios da Nefrologia e Distúrbios Hidroeletrolíticos**.4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p.661-689.
- RODRIGUES, C., PINTO, D., MEDEIROS, R. Molecular epidemiology characterization of the urinary excretion of polyomavirus in healthy individuals from Portugal a Southern European population. **Journal of Medical Virology**, **79**: 1194-1198, 2007.
- ROMÃO JÚNIOR, J. E. Doença renal crônica: definição, epidemiologia e classificação. **Jornal Brasileiro de Neurologia**, **26**: 1-3, 2004.
- RZIHA, H., BORNKAMM, G.W., ZUR HAUSEN, H. BK virus: I. Seroepidemiologic studies and serologic response to viral infection. **Medical and Microbiological Immunology**, **165**: 73-81, 1978.
- SANDLER, E.S., AQUINO, V.M., GOSS-SHOHET, E., HINRICHS, S., KRISHER, K. BK papova virus pneumonia following hematopoietic stem cell transplantation. **Bone Marrow Transplant**, **20**: 163-165, 1997.
- SEGARRA-NEWNHAM, M., VODOLO, K.M. Use of cidofovir in progressive multifocal leukoencephalopathy. **Annals of Pharmacotherapy**, **35**: 741-744, 2001.
- SEIF, I., KHOURY, G. AND DHAR, R. The genome of human papovavirus BKV. **Cell**, **18**:963-977, 1979.
- SCHNEIDER, E.M., DORRIES, K. High frequency of polyomavirus infection in lymphoid cell preparations after allogeneic bone marrow transplantation. **Transplantation Proceedings**, **25**: 1271-1273, 1993.

- SHAH, K.V., DANIEL, R.W., WARSZAWSKI, R.M. High prevalence of antibodies to BK virus, and SV-40 related papovavirus, in residents in Maryland. **American Journal of Infectious Diseases**, **128**: 784-787, 1973.
- SMALL, J.A., KHOURY, G., JAY, G., HOWLEY, P.M., SCANGOS, G.A. Early regions of JC virus and BK virus induce distinct and tissue specific tumors in transgenic mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **83**: 8288-8292, 1986.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA (SBN). **Censo 2007** Disponível em <<http://www.snb.org.br>> Acesso em 10/12/2010.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA (SBN). **Censo 2009** Disponível em <<http://www.snb.org.br>> Acesso em 10/12/2010.
- STAHL, H., DROGE, P., KNIPPERS, R. DNA helicase activity of SV40 large tumor antigen. **EMBO Journal**, **5**: 1939-1944, 1986.
- STONER, G.L., JOBES, D.V., AGOSTINI, H.T., CHIMA, S.C. RYSCHKEWITSCH, C.F. JC virus as a marker of human migration to the Americas. **Microbes and Infection**, **2**: 1905-1911, 2000.
- SUGIMOTO, C., HARA, K., TAGUCHI, F., YOGO, Y. Growth efficiency of naturally occurring BK virus variants in vivo and in vitro. **Journal of Virology**, **63**: 3195-3199, 1989.
- SUGIMOTO, C., HARA, K., TAGUCHI, F. AND YOGO, Y. Regulatory DNA sequence conserved in the course of BK virus evolution. **Journal of Molecular Evolution** **31**: 485-492, 1990.
- SUGIMOTO, C., KITAMURA, T., GUO, J., AL-AHDAL, M.N., SHCHELKUNOV, S.N., OTOVA, B., ONDREJKA, P., CHOLLET, J-Y., EL-SAFI, S., ETTAYEBI, M., GRÉSENGUET, G., KOCAGÖZ, T., CHAIYARASAMEE, S., THANT, K.Z., THEIN,

- S., MOE, K., KOBAYASHI, N., TAGUCHI, F., YOGO, Y. Typing of urinary JC virus DNA offers a novel means of tracing human migrations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, **94**: 9191-9196, 1997.
- SUGIMOTO, C., HASEGAWA, M., ZHENG, H-Y., DEMENEV, V., SEKINO, Y., KOJIMA, K., HONJO, T., KIDA, H., HOVI, T., VESIKARI, T., SCHALKEN, J.A., TOMITA, K., MITSUNOBU, Y., IKEGAYA, H., KOBAYASHI, N., KITAMURA, T., YOGO, Y. JC virus strains Indigenous to Northeastern Siberians and Canadian Inuits are unique but evolutionally related to those distributed throughout Europe and Mediterranean areas. **Journal of Molecular Evolution**, **55**: 322-335, 2002.
- SUZUKI, S., SAWA, H., KOMAGOME, R., ORBA, Y., YAMADA, M., OKADA, Y., ISHIDA, Y., NISHIHARA, H., TANAKA, S., NAGASHIMA, K. Broad distribution of the JC virus receptor contrasts with a marked cellular restriction of virus replication. **Virology**, **286**: 100-112, 2001.
- SUZUKI, M., ZHENG, H., TAKASAKA, T., SUGIMOTO, C., YOGO, Y.** Asian Genotypes of JC Virus in Japanese-Americans Suggest Familial Transmission. **Journal of Virology**, **76**: 10074-10078, 2002.
- TAGUCHI, F., NAGAKI, D., SAITO, M., HARUYAMA, C., IWASAKI, K., SUZUKI, T. Transplacental transmission of BK virus in human. **Japanese Journal of Microbiology**, **19**: 395-398, 1975.
- TAJIMA, M., TAKEDA, F., MORI, M., SHIMADA, H. Prevalence of the antibody against human polyomaviruses (JCV and BKV) in aged persons. **Kansenshogakn-Zasshi**, **64**: 1507-1513, 1990.
- TAKASAKA, T., N. GOYA, T. TOKUMOTO, K. TANABE, H. TOMA, Y. OGAWA, S. HOKAMA, A. MOMOSE, T. FUNYU, T. FUJIOKA, S. OMORI, H. AKIYAMA, Q. CHEN, H.-Y. ZHENG, N. OHTA, T. KITAMURA, AND Y. YOGO. Subtypes of BK

virus prevalent in Japan and variation in their transcriptional control region. **Journal of General Virology**, **85**: 2821-2827, 2004.

TAVIS, J. E., TROWBRIDGE, P. W., FRISQUE, R. J. **Virology**, **199**: 384-392, 1994.

THEILE, M., GRABOWSKI, G. Mutagenic activity of BKV and JCV in human and other mammalian cells. **Archives of Virology**, **113**: 221-233, 1990.

TOMINAGA, T., YOGO, Y., KITAMURA, T., ASO, Y. **Virology**, **186**: 736-741, 1992.

TSAI, R.T., WANG, M., OU, W.C., LEE, Y.L., LI, S.Y., FUNG, C.Y., HUANG, Y.L., TZENG, T.Y., CHEN, Y., CHANG, D. Incidence of JC viruria is higher than that of BK viruria in Taiwan. **Journal of Medical Virology**, **52**: 253-257, 1997.

UNIVERSITY OF CAPE TOWN, Department of Molecular and Biology Cell. **Papovaviruses**. Disponível em <<http://www.mcb.uct.ac.za/cann/335/Papova1.gif>>. Acesso em 02/02/2010.

VALLBRACHT, A., LÖHLER, J., GOSSMANN, J., GLÜCK, T., PETERSEN, D., GERTH, H.J., GENCIC, M., DÖRRIES, K. Disseminated BK type polyomavirus infection in an AIDS patient associated with central nervous system disease. **American Journal of Pathology**, **143**: 29-39, 1993.

VALTER, T.M., **Bioquímica Clínica: Princípios e Interpretações**. Disponível em: <<http://www.labclinisul.com.br/artigos/Bioq.Clinica%20%20Rim%20e%20Funcao%20Renal.pdf>> Acesso em: 08/12/2010.

VIANELLI, N., RENGA, M., AZZI, A., DE SANTIS, R., BANDINI, G., TOSI, P., TURA, S. Sequential vidarabine infusion in the treatment of polyoma virus-associated acute haemorrhagic cystitis late after allogeneic bone marrow transplantation. **Bone Marrow Transplantation**, **25**: 319-320, 2000.

- WEI, G., LIU, C.K. AND ATWOOD, W.J. JC virus binds to primary human glial cells, tonsillar stromal cells, and B-lymphocytes, but not to T lymphocytes. **Journal of Neurovirology**, **6**: 127-136, 2000.
- WEISKITTEL, P.D. Polyoma Virus in Renal Transplant Recipients. **Nephrology Nursing Journal**, **29**: 247-250, 2002.
- WEN, M.C., WANG, M., CHENG, C.H., WU, M.J., CHEN, C.H., SHU, K.H., CHANG, D. Association of JC virus with tubulointerstitial nephritis in a renal allograft recipient. **Journal of Medical Virology**, **72**: 675-678, 2004.
- WHILEY, D.M., MACKAY, I., SLOOTS, T.P. Detection and Differentiation of Human Polyomaviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, **12**: 4357-4361, 2001.
- WHILEY, D.M., ARDEN, K.E., MACKAY, I.M., SYRMIS, M.W., SLOOTS, T.P. Simultaneous detection and differentiation of human polyomaviruses JC and BK by a rapid and sensitive PCR-ELISA assay and a survey of the JCV subtypes within an Australian population. **Journal of Medical Virology**, **72**: 467-472, 2004.
- WHITE, D.O., FENNER, F.J. *Papovaviridae*. In: **Medical Virology**, 4^a edição, Academic Press, 1994. p. 78-85.
- WHITE, M.K., KHALILI, K. Polyomaviruses and human cancer: molecular mechanisms underlying patterns of tumorigenesis. **Virology**, **324**: 1-16, 2004.
- YANG, R.C. & WU, R. BK virus DNA: complete nucleotide sequence of a human tumor virus. **Science**, **206**: 456-462, 1979.
- YOGO, Y., IIDA, T., TAGUCHI, F., KITAMURA, T., ASO, Y. **Journal of Clinical Microbiology**, **29**: 2130-2138, 1991.
- ZHENG, H.Y., NISHIMOTO Y., CHEN Q., HASEGAWA M., ZHONG S., IKEGAYA H., OHNO N., SUGIMOTO C., TAKASAKA T., KITAMURA, T. YOGO Y. Relationships

between BK virus lineages and human populations. **Microbes and infection**, **9**: 204-213, 2007.

Anexo 01**FICHA DE PACIENTES E CONTROLES**DATA: __/__/__
PACIENTES () CONTROLE ()

NOME: _____

GÊNERO: _____ IDADE: _____

LOCAL DE NASCIMENTO: _____

COR : () BRANCO () NEGRO () AMARELO () PARDO/INDÍGENA
() PARDO/NEGRÓIDEGRAU DE ESCOLARIDADE : () ANALFABETO () ALFABETIZADO
() ENSINO FUNDAMENTAL () ENSINO MÉDIO () ENSINO SUPERIOR

VALOR DA CREATININA PRÉ-DIÁLISE : _____

VALOR DA CREATININA PÓS-DIÁLISE: _____

VALOR DA URÉIA PRÉ-DIÁLISE: _____

VALOR DA URÉIA PÓS-DIÁLISE: _____

PRESENÇA DE BKV: () SIM () NÃO

PRESENÇA DE JCV: () SIM () NÃO

TIPO DE JCV: _____

Anexo 02



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
LABORATÓRIO DE VIROLOGIA
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Estou sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa sobre a *caracterização epidemiológica e molecular da infecção pelos Vírus JC (JCV) e Vírus BK (BKV) infectando pacientes com doença renal crônica*, que está sendo desenvolvida no Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.

Para que eu decidisse ou não em participar da pesquisa me foram prestadas as seguintes informações:

1. O título do projeto é: Epidemiologia molecular da infecção do Poliomavírus JCV em Pacientes com Insuficiência Renal Crônica.
2. O pesquisador responsável é o Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto, Biomédico, Professor Adjunto IV da Universidade Federal do Pará, com a colaboração da Dra. Denise de Melo Alves, Dra Cristina Viegas Bernardino e Dra. Silvia Regina Cruz Migone.
3. O objetivo da pesquisa é a avaliação da possível associação da infecção pelo *Vírus JC* em pacientes com insuficiência renal crônica.
4. Essa pesquisa não oferece riscos, porque as práticas são de uso rotineiro. Contudo, é possível o surgimento de uma pequena área arroxeadada e dolorosa no local da coleta de sangue.
5. Uma pequena quantidade de urina (10 a 50 mL) e de sangue (5mL) será coletada e posteriormente estocadas a -20°C no Laboratório de Virologia da UFPA para pesquisas futuras.
6. Toda nova pesquisa a ser feita com o material estocado será submetida para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição.
7. Ninguém é obrigado a participar da pesquisa, assim como qualquer pessoa poderá deixar a pesquisa no momento que quiser, pois não haverá prejuízo pessoal por esta causa.
8. Não haverá nenhum tipo de despesas para participação da pesquisa, assim como não haverá nenhuma forma de pagamento para participação.
9. O grande benefício desta pesquisa para todos os que participam, é possibilitar uma melhor fundamentação do conhecimento da prevalência e do perfil da infecção pelo JCV na região e auxiliar no estabelecimento de futuras condutas diagnósticas e de seguimento clínico-terapêutico mais adequadas.
10. A participação na pesquisa é sigilosa, isto significa que, somente os pesquisadores ficarão sabendo de sua participação. Os dados utilizados na pesquisa terão uso exclusivo neste trabalho, sem a identificação individual do participante.

Assinatura do Pesquisador Responsável

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro que li as informações acima sobre a pesquisa, que me sinto perfeitamente esclarecido(a) acerca do conteúdo da mesma, assim como seus riscos e benefícios. Declaro ainda que, por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa cooperando com a coleta de material para exame.

Belém, ____ / ____ / ____

Assinatura da participante

Prontuário: _____

Protocolo: _____

LABORATÓRIO DE VIROLOGIA

Universidade Federal do Pará, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Patologia,

Tel./fax: (91) 3201-7587, e-mails: vallinoto@ufpa.br

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA CEP-CCS/UFPA. Universidade Federal do Pará – Complexo de Aulas/CCS – Sala 14 – Campus Universitário do Guamá, 66075-110 – Belém, Pará, Tel.: (91) 3201-8028, e-mail: cepccs@ufpa.br

Anexo 3



Universidade Federal do Pará



CEP-CCS/UFPA

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ**


Ao: Prof. Dr. Antônio Carlos Rosário Vallinoto.

Carta: 078/06 CEP-CCS/UFPA.

Belém, 31 de agosto de 2006.

Senhor Pesquisador, temos a satisfação de informar que seu projeto de pesquisa intitulado "Investigação molecular da infecção pelo poliomavirus JCV em pacientes com Insuficiência Renal Crônica" sob o protocolo nº: 090/06 CEP-CCS/UFPA, foi apreciado e aprovado na reunião do dia 31 de agosto de 2006. Você tem como compromisso a entrega do relatório até o dia 30 de Dezembro de 2006 no CEP-CCS/UFPA situado no Campus universitário do Guamá no Complexo de sala de aula do CCS – sala 13 (Altos), (em frente ao estacionamento do Curso de Odontologia).

Atenciosamente,


Prof. M. Sc. Wallace Raimundo Araújo dos Santos
Coordenador do CEP-CCS/UFPA

Prof. M.Sc. Wallace Raimundo A. dos Santos
Coordenador do CEP-CCS-UFPA

Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (CEP-CCS/UFPA) - Complexo de Sala de Aula/CCS – Sala 14 - Campus Universitário, nº 01, Guamá – CEP: 66675-110 - Belém-Pará. Tel./Fax: 3201-8028 E-mail: cepccs@ufpa.br