PAULO ROBERTO PALMA URBANO

INCIDÊNCIA, CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E DETERMINAÇÃO DA DINÂMICA DE EXCREÇÃO DOS POLIOMAVÍRUS HUMANOS EM AMOSTRAS DE URINA DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS.

Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Sérgio Pannuti

São Paulo

2013

Ficha catalográfica
Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo
© Reprodução autorizada pelo autor

Urbano, Paulo Roberto Palma
Incidência, caracterização genotípica e determinação da dinâmica de excreção dos poliomavírus humanos em amostras de urina de indivíduos saudáveis / Paulo Roberto Palma Urbano. – São Paulo, 2013.
Dissertação (Mestrado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional
Orientador: Claudio Sérgio Pannuti

Descritores: 1. POLIOMAVÍRUS. 2. EXCREÇÃO (URINA). 3. VÍRUS JC. 4. VÍRUS BK. 5. GENÓTIPOS. 6. IMUNOCOMPETÊNCIA.

USP/IMTSP/BIB-06/2013.

Candidato: Paulo Roberto Palma Urbano

Titulo da Dissertação: Incidência, caracterização genotípica e determinação da dinâmica de excreção dos Poliomavírus humanos em amostras de urina de indivíduos saudáveis**.**

Orientador: Prof. Dr. Claudio Sérgio Pannuti

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 22/04/2013, considerou

( ) APROVADO(A) ( ) REPROVADO(A)

Examinador(a) Assinatura _____
Nome _____
Instituição _____

Examinador(a) Assinatura _____
Nome _____
Instituição _____

Presidente Assinatura _____
Nome _____
Instituição _____

Aos meus pais, Silvia e Flavio

Pelo constante apoio em minhas decisões, mesmo erradas. Por apostarem em mim, sempre. Pelo amor, pela ajuda, educação e por estarem ao meu lado. Obrigado

A minha vó, Lygia
(*in memoriam*)
Que sempre olhou, e olhará por mim... de onde quer que ela esteja.
Por me aguentar e cuidar de mim.
Te amo!

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Cláudio Pannuti, por me aceitar como aluno, pelos ensinamentos e paciência ao longo deste estudo;

A Dra. Cristina Fink, por toda ajuda para realização deste trabalho, desde a ideia inicial até o presente momento, pelas risadas, broncas e pela paciência;

A Dra. Camila Romano pela ajuda em toda análise filogenética;

A Prof. Dra. Ester Sabino e Prof. Dr. Expedito Luna pelas sugestões na qualificação e auxilio na parte estatística;

Aos meus irmãos e irmãs do laboratório, Luiz Nali, Felipe Skazi, Cristiane Centrone e Michele Padovan pelas risadas nos momentos difíceis e nos fáceis também;

Aos meus amigos do dia-a-dia, Célia Luiza, Clara Felix, Cristina Oliveira, Cristina Nunes, Debora Gerhardt, Giovana Caleiro, Lilia Targa, Paulo Nasser, Renato Oliveira e Tony Martins pelas ajudas, bate-papos, choros e risadas;

À Georgina, Sonia, Debora e Luciano por serem sempre solícitos nos momentos que precisei;

À todos os profissionais que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho;

À todos os indivíduos que por livre e espontânea vontade resolveram participar deste estudo doando as amostras para realização do mesmo;

Aos meus amigos pessoais e amigos do Centro;

À todos funcionários da Virologia

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."

José de Alencar

RESUMO

URBANO, P.R.P**. Incidência, caracterização genotípica e determinação da dinâmica de excreção dos poliomavírus humanos em amostras de urina de indivíduos saudáveis.** São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2013.

Os Poliomavírus JC e BK são os mais importantes integrantes da família *Polyomaviridae*, gênero *Orthopolyomavirus*, devido ao seu grau de patogenicidade no homem.

O poliomavírus humano JC (JCV) foi isolado a partir de fragmento do cérebro de um paciente com linfoma de Hodgkin e leucoencefalopatia multifocal progressiva por Padgett e colaboradores. Já o poliomavírus humano BK foi isolado em 1971 por Gardner e colaboradores a partir da semeadura da urina de um paciente, submetido a transplante renal, em cultura de células da linhagem VERO

Poucos são os dados sobre os poliomavírus humanos JC e BK em indivíduos sadios no mundo e no Brasil. Além disso, as formas de excreção e transmissão destes vírus ainda não estão completamente elucidadas.

Este estudo teve como objetivos principais determinar a incidência, a dinâmica de excreção e a caracterização genotípica dos poliomavírus JC e BK em amostras sequenciais de urina de indivíduos sadios. Como objetivo secundário, foram analisados filogeneticamente os subtipos dos vírus encontrados.

Foram incluídos 71 indivíduos de ambos os sexos, com idades variando entre 21 e 65 anos e destes foram coletadas amostras mensais de urina durante 6 meses.

Todas as amostras do estudo foram submetidas a um teste de PCR em tempo real, que amplifica um fragmento do gene que codifica o antígeno T, e a um PCR convencional que amplifica um fragmento do gene da proteína VP1 do vírus. Ao final do período de 6 meses de acompanhamento a incidência de excreção urinária dos poliomavírus JCV e BKV na população estudada foi de 53,52% e 64,79% respectivamente.

O perfil de excreção do JCV mostrou-se continuo em 42% dos casos , intermitente em 8% e esporádico em 50% dos casos. Analisando o perfil de excreção do BKV, em 80% dos casos mostrou-se esporádico, em 17% intermitente e em 3% dos casos contínuo.

Posteriormente, as amostras positivas foram sequenciadas e analisadas filogeneticamente observando-se que os genótipos mais prevalentes do JCV foram o 1, subtipo 1B e 3, seguidos dos genótipos 1, subtipo 1A e 4. Com relação ao BKV, o genótipo 1, subtipo 1A foi o mais prevalente, seguido do 4 e do 1, subtipo 1B.

Descritores: Poliomavírus. Excreção (Urina). Vírus JC. Vírus BK. Genótipos. Imunocompetência.

SUMMARY

URBANO, P.R.P. **Incidence, genotypic characterization and determination of the dynamics of excretion of human polyomavirus in urine samples of healthy individuals**. São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2013

The Polyomavirus JC and BK are the most important members of Polyomaviridae family, genus Orthopolyomavirus, due to their degree of pathogenicity in humans.

The human polyomavirus JC (JCV) was isolated from a fragment of the brain of a patient with Hodgkin's lymphoma and progressive multifocal leukoencephalopathy by Padgett et al. On the other hand the human polyomavirus BK was also isolated in 1971 by Gardner et al from the urine of a patient who underwent renal transplantation in VERO cell line.

There are few data on human polyomavirus JC and BK in healthy individuals on the world and in Brazil. Moreover the forms of excretion and transmission of these viruses are not yet fully elucidated. This study aimed to determine the incidence, the dynamics of excretion, and the molecular characterization of polyomavirus JC and BK in serial samples of urine of healthy individuals. A secondary objective was to analyze phylogenetically the subtypes of the viruses found during the study.

Were included 71 patients of both genders, aged from 21 to 65 years-old. Urine samples were collected every month for six months.

All samples in the study were screened by a real time PCR which amplifies a fragment of the T antigen gene, and to a conventional PCR that amplifies a fragment of the gene of VP1 protein of the virus. At the end of 6 months of follow-up, the incidence of urinary excretion of polyomaviruses BKV and JCV in the study population was 53.52% and 64.79% respectively

The profile of excretion of JCV was continuous in 42% of cases, intermittent in 8% and sporadic in 50% of cases. The profile of excretion of BKV was shown to be sporadic in 80% of cases, intermittent in 17% and continuous in only 3% of cases.

Subsequently, the positive samples were sequenced and analyzed phylogenetically showing that the more prevalent genotypes were JCV 1, subtype 1b and 3, followed by genotype 1, subtypes 1a and 4. Regarding the BKV genotype 1 subtype 1a was the most prevalent, followed by 4 and 1, subtype 1b.

Descriptors: Polyomavirus. Excretion (Urine). JC Virus. BK Virus. Genotipes. Imunocompetence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gel com produto amplificado da região VP1 do JCV.....47

Figura 2. Gel com produto amplificado da região VP1 do BKV.....47

Figura 3. Árvore filogenética das amostras JCV positivas.....64

Figura 4. Árvore filogenética das amostras BKV positivas.....67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Oligonucleotídeos e sonda responsáveis pela amplificação dos fragmentos no sistema de qPCR.....45

Tabela 2 – Primers utilizados para a amplificação do DNA do poliomavírus JC e BK, com respectivas sequencias e região amplificada.....48

Tabela 3 – Distribuição dos indivíduos segundo sexo e faixa-etária.....55

Tabela 4 – Distribuição de indivíduos positivos de acordo com a faixa-etária.....57

Tabela 5 – Indivíduos com amostras positivas para os vírus JC conforme etnia.....58

Tabela 6 –Distribuição de indivíduos que excretam JCV em relação às diferentes proporções de amostras positivas para o vírus JC nas seis coletas realizadas durante o estudo.....58

Tabela 7 – Numero de coletas positivas para o poliomavírus JC observadas em seis amostras de urina segundo diferentes faixas etárias.....59

Tabela 8 – Número de indivíduos com amostras positivas de acordo com a faixa-etária.....60

Tabela 9 – Proporção de indivíduos que excretam o poliomavírus BK em pelo menos uma amostra durante o estudo conforme etnia.....60

Tabela 10 – Distribuição de indivíduos que excretam BKV segundo diferentes proporções de amostras positivas para o vírus BK em relação as seis coletas realizadas.....61

Tabela 11 – Numero de coletas positivas para o poliomavírus BK observadas em seis amostras de urina segundo diferentes faixas etárias.....62

Tabela 12 – Relação dos genótipos e subtipos *versus* etnia dos indivíduos positivos para o poliomavírus JC.....65

Tabela 13 – Relação de genótipos e subtipos do poliomavírus JC conforme sexo dos indivíduos excretores.....65

Tabela 14 – Relação dos genótipos e subtipos *versus* etnia dos indivíduos positivos para o poliomavírus BK.....68

Tabela 15 – Relação dos genótipos e subtipos do poliomavírus BK conforme sexo dos indivíduos.....68

LISTA DE ABREVIATURAS

JCV – Poliomavírus Humano JC

BKV – Poliomavírus Humano BK

SV40 – Vírus Símio 40

MCV – Merkel Cell Poliomavírus

TSV – Tricodisplasia Spinulosa Poliomavírus

HPyv9 – Poliomavírus Humano 9

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

HCV – Vírus da Hepatite C

PCR – Reação de polimerase em cadeia

qPCR – PCR em tempo real / PCR quantitativo

pb – Pares de base

LEMP – Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva

AgT – Antígeno T grande

Agt – Antígeno t pequeno

Nm - Nanômetros

NCCR – Região não codificadora

DNA – Ácido desoxirribonucleico

TCR– Região de controle transcricional

RR – Região Regulatória

PP2A - Proteína Fosfatase 2A

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

USP – Universidade de São Paulo

TAE - Tampão Tris-Acetato-EDTA

MgCl2 – Cloreto de Magnésio

µM – Micromolar

µg - micrograma

mL – Mililitro

µL - Microlitro

dNTPs – Desoxirribonucleotídeo Trifosfato

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 20

1.1) HISTÓRICO 20

1.2) OS POLIOMAVÍRUS JC E BK 20

1.3) OUTROS POLIOMAVÍRUS 21

1.4) ESTRUTURA VIRAL 22

1.4.1) ANTÍGENO T GRANDE 23

1.4.2) ANTÍGENO T PEQUENO 23

1.4.3) PROTEÍNA VP1 24

1.4.4) PROTEÍNAS VP2 E VP3 24

1.4.5) REGIÃO DE CONTROLE TRANSCRICIONAL 24

1.4.6) AGNOPROTEÍNA 25

1.5) EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DOS POLIOMAVÍRUS: DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS E SUBTIPOS 26

1.6) PROPAGAÇÃO NO HOSPEDEIRO E LATÊNCIA 29

1.7) FORMAS DE TRANSMISSÃO DO VÍRUS E PROPAGAÇÃO NO HOSPEDEIRO 30

1.8) QUADROS CLÍNICOS ASSOCIADOS AOS POLIOMAVÍRUS JC E BK 31

1.9) ASSOCIAÇÃO ENTRE GENÓTIPOS E SUBTIPOS DOS POLIOMAVÍRUS E PATOGENIA 32

1.10) ESTUDOS SOROEPIDEMIOLÓGICOS E PREVALÊNCIA..... 33

1.11) EXCREÇÃO URINÁRIA DOS POLIOMAVÍRUS..... 33

1.12) PERFIL DE EXCREÇÃO 34

1.13) EXCREÇÃO DOS POLIOMAVÍRUS: IMPLICAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS 35

2) JUSTIFICATIVA:..... 37

3) OBJETIVOS: 40

3.1) OBJETIVO PRINCIPAL..... 40

3.2) OBJETIVO SECUNDÁRIO..... 40

4) CASUÍSTICA E MÉTODOS 42

4.2) CÁLCULO AMOSTRAL 42

4.3) CRITÉRIOS DE INCLUSÃO..... 42

4.4) CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO..... 43

4.5) ESTRATÉGIAS DE RECRUTAMENTO E RETENÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS 43

4.6) ASPÉCTOS ÉTICOS 44

4.7) AMOSTRAS..... 44

4.7.1) PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS 44

4.8) PCR EM TEMPO REAL..... 45

4.9) REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DE VP1 46

4.10) PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS POSITIVAS

..... 49

4.11) SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS DE PCR 49

4.12) CLASSIFICAÇÃO GENOTÍPICA E ANÁLISES FILOGENÉTICAS 50

4.13) CLASSIFICAÇÃO DO PERFIL DE EXCREÇÃO 51

5) ANÁLISE ESTATÍSTICA 53

6) RESULTADOS 55

6.1) POPULAÇÃO 55

6.2) INCIDENCIA E DINÂMICA DE EXCREÇÃO 56

6.2.1.1) INCIDÊNCIA E DINÂMICA DE EXCREÇÃO URINÁRIA DO POLIOMAVÍRUS HUMANO JC 56

6.2.1.2) INCIDÊNCIA E DINÂMICA DE EXCREÇÃO URINÁRIA DO POLIOMAVÍRUS HUMANO BK 59

6.2.1.3) INCIDÊNCIA E DINÂMICA DE EXCREÇÃO URINÁRIA EM INDIVÍDUOS CO-INFECTADOS 62

6.3) GENOTIPAGEM E ANÁLISE FILOGENÉTICA 63

7) DISCUSSÃO 71

8) CONCLUSÕES 80

9) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 82

10) ANEXOS 104

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1) HISTÓRICO

A família *Polyomaviridae* é formada por vírus que infectam diferentes espécies animais dentre elas, o homem (Arthur et al., 1989; Randhawa et al. 2002).

Com 25 membros, a família é dividida em 3 gêneros, *Wukipolyomavirus*, *Avipolyomavirus* e *Orthopolyomavirus* (Johne et al., 2011).

1.2) OS POLIOMAVÍRUS JC E BK

O poliomavírus BK (BKV) foi isolado em 1971 por Gardner e colaboradores a partir da semeadura da urina de um paciente, submetido a transplante renal, em cultura de células da linhagem VERO (Gardner et. al., 1971). Também em 1971, Padgett e colaboradores isolaram o poliomavírus humano JC (JCV) em células da glia de feto humano a partir de fragmento do cérebro de um paciente com linfoma de Hodgkin e leucoencefalopatia multifocal progressiva (LEMP) (Padgett *et al.*, 1971).

Os vírus JC e BK são os mais importantes integrantes da família *Polyomaviridae*, gênero *Orthopolyomavirus*, devido ao seu grau de patogenicidade no homem. Segundo estudos soroepidemiológicos, aproximadamente 85% da população adulta já foi infectada com os poliomavírus, mas somente nos pacientes imunocomprometidos eles se tornam patogênicos (Knowles et. al., 2001; Kean et. al., 2009).

1.3) OUTROS POLIOMAVÍRUS

O poliomavírus SV40, presente em símios, teria sido introduzido acidentalmente na população humana através de vacinas Salk, e tem sido associado ao linfoma não-Hodgkin (Stratton et al., 2003).

Os poliomavírus WU e KI foram descritos recentemente e são encontrados, geralmente, em crianças e jovens com doenças respiratórias. Contudo, não se sabe ao certo o potencial patogênico destes vírus (Allander et al., 2007)

Outro poliomavírus denominado Merkel cell polyomavirus (MCV) tem como principal característica causar um carcinoma neuroendócrino agressivo que atinge as células Merkel em indivíduos transplantados ou soropositivos para o HIV ou de idade avançada (Feng et al., 2008; Becker et al., 2009; Viscidi e Shah, 2009). Aproximadamente 80% das biópsias positivas para o carcinoma de células Merkel possui o DNA do MCV (Garneski et al., 2009; Pulitzer et al., 2009).

O poliomavírus denominado TSV (Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus) foi descoberto recentemente (van der Meijden et al., 2010). Assim como o SV40 possui uma relação estreita com primatas (orangotango de Borneu), ocasionando em indivíduos transplantados em tratamento com imunossupressores, uma condição cutânea rara, com eritema facial, e desenvolvimento de papilas foliculares e espinhas (van der Meijden et al., 2010).

Outro poliomavírus recém descrito na literatura é o poliomavírus humano tipo 9, porem pouco se sabe sobre as características do vírus e seu potencial patogênico (Moens et al., 2011).

Utilizando primers degenerados para região VP1 dos poliomavírus, o o último poliomavírus descrito, denominado HPyv9, foi encontrado em amostras de soro de um paciente de transplante renal e até a presente data, este poliomavírus foi encontrado em amostras de sangue total e urina de indivíduos imunocomprometidos (Moens et al., 2011; Scuda et al., 2011) mas até o momento não foi associado a doenças no homem.

1.4) ESTRUTURA VIRAL

Quanto à estrutura viral, podemos afirmar que os poliomavírus são pequenos vírus icosaédricos (~45nm), não envelopados, com genoma composto por dupla fita de DNA circular (~5170pb). Funcionalmente, o genoma do vírus apresenta uma região chamada de “precoce”, cujos genes codificam proteínas não-estruturais denominadas antígeno T grande ou “large tumor antigen” (Ag-T) e o antígeno T pequeno ou “small tumor antigen” (Ag-t) (Randhawa et al. 2002).

Outra região, denominada “tardia”, codifica as proteínas estruturais VP1, VP2 e VP3 e uma proteína denominada agnoproteína, cuja função ainda não está totalmente elucidada. Possuem ainda, uma região não codificadora (NCCR) que regula a replicação do DNA e a transcrição do RNA (Olsen et. al., 2006) e sua montagem é feita no núcleo celular (Chang et al., 1992).

Na cepa arquetípica, que é a circulante na população geral, essa região é altamente conservada (Moens, 1995). A região regulatória rearranjada, cuja função também está associada à transcrição viral, é encontrada em cepas patogênicas (Randhawa, 2002).

1.4.1) ANTÍGENO T GRANDE

O Ag-T é uma fosfoproteína nuclear não estrutural expressa pelo vírus de grande importância. Seu gene é codificado em uma região pouco sujeita a variação genética nos poliomavírus JC e BK (Arthur et al., 1989; Dyson et al., 1990) e por essa razão, tem sido a região amplificada para fins diagnósticos (Kalvatchev et. al. 2008; Fink et. al. 2006; Domingues et. al. 2007). É a primeira proteína a ser expressa pelo vírus após sua entrada na célula.

Dentre as diversas funções dessa proteína, está o estabelecimento e manutenção da transformação celular, levando em algumas situações à imortalização da célula (oncogênese) (Fishman JA., 2002).

1.4.2) ANTÍGENO T PEQUENO

O antígeno t-pequeno (Ag-t) ainda não tem sua função totalmente conhecida no ciclo dos poliomavírus JC e BK, porem sabe-se que ela auxilia a progressão do ciclo celular e ajuda a indução da fase S celular junto com o Ag-T (Mulane et al., 1998; Pallas et al., 1990).

Em estudos realizados com o SV40, sabe-se que o Ag-t tem a capacidade de se ligar à proteína fosfatase 2A (PP2A), inibindo a sua função. Isto resulta numa cascata de transdução do sinal que estimula o crescimento celular. O Ag-t pode ser importante na preparação do ambiente celular para uma replicação eficiente (Pallas et al., 1990). Também foi observado em estudos *in vitro* com o SV40 que o ciclo de vida do poliomavírus ocorre na ausência do Ag-t. No entanto, *in vivo*, especula-se que poderia ter alguma função lítica, sendo esta, entretanto, ainda desconhecida (Seif et al., 1979).

1.4.3) PROTEÍNA VP1

A proteína VP1 do capsídeo viral está exposta na face externa do vírus sendo codificada por um gene homônimo, que mede aproximadamente 1000 pares de base e é sintetizada na região tardia do vírus (Nishimoto et al., 2006; Luo et. al., 2008). Essa proteína contém epítopos de indução e reconhecimento de anticorpos.

Sendo a maior proteína estrutural do vírus, ela interage com os receptores celulares e permite a entrada do vírus do meio exógeno para o interior da célula (revisado por Hilton e Tong, 2008). A região codificadora da proteína de membrana VP1 possui considerável heterogeneidade genética distinguindo assim subtipos dos genótipos dos poliomavírus JC e BK.

1.4.4) PROTEÍNAS VP2 E VP3

As proteínas estruturais denominadas VP2 e VP3 fazem parte da cápside viral e formam complexos com a proteína VP1 através da região C-terminal permitido assim, após a translocação para o núcleo, a conclusão da montagem viral (Chang et al., 1992; Barouch and Harrison, 1994).

1.4.5) REGIÃO DE CONTROLE TRANSCRICIONAL

A região de controle não codificante (NCCR) também é conhecida por região de controle transcricional (TCR) ou ainda como região reguladora (RR). Esta região é altamente variável em diversos sítios, talvez devido a rearranjos genéticos como resultado da adaptação a diferentes ambientes de

replicação viral ocasionando assim aumento da replicação viral e intimamente associado com patologias (Seif et al., 1979; Gosert R. Et al., 2008).

Provavelmente essa diversidade confere uma vantagem seletiva para o vírus no hospedeiro, permitindo replicação e transcrição mais eficientes do genoma viral (Gosert et al., 2008). Em estudos realizados *in vitro* foram encontradas algumas mutações, deleções e duplicações nas regiões de ligação de fatores de transcrição. Estas variações alteram o funcionamento normal do promotor e do *enhancer*, influenciando desta forma a replicação (Johnsen et al., 1995).

Com base na estrutura da sequência regulatória, duas formas dos poliomavírus com diferentes propriedades biológicas, são conhecidas: a forma arquetípica e a forma rearranjada (Yogo et al 1990, Ciappi et al 1999). A forma arquetípica apresenta-se altamente conservada, basicamente em indivíduos sadios. Já a forma rearranjada é encontrada em indivíduos imunocomprometidos apresentando pequenas variações de nucleotídeos, consistindo em uma seqüência de 98 pares de bases, com uma inserção de 23 pares de bases ricas em GC e uma segunda inserção de 66 pares de bases (Yogo et al 1990, Major et al 1992, Agostini et al 1996)

1.4.6) AGNOPROTEÍNA

A agnoproteína (proteína tardia) desempenha funções reguladoras na transcrição viral, na tradução e na formação/maturação de novos vírus.

A sua presença resulta no aumento do crescimento celular, quando esta se liga diretamente à proteína de supressão tumoral (p53), devido à desregulação do ciclo celular (acumulo de células na fase G2/M) (Darbinyan et al., 2002).

A agnoproteína também interage com o AgT (proteína precoce),

influenciando assim a replicação e transcrição do DNA viral, e inibe a reparação do DNA celular se por ventura, sofreu algum tipo de dano (Safak et al., 2001; Darbinyan et al., 2004).

Em estudos realizados com o SV40, a região codificadora para a agnoproteína foi retirada e verificou-se que o vírus replicava o seu DNA, sugerindo assim, que esta proteína não é necessária para replicação viral (Resnick and Shenk, 1986).

1.5) EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DOS POLIOMAVÍRUS: DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS E SUBTIPOS

Com base no sequenciamento genômico da região da proteína VP1 dos poliomavírus estudados são identificados, hoje, 4 genótipos e diversos subtipos do vírus BK com distribuição geográfica característica: o genótipo 1 é o mais comumente encontrado no mundo (prevalência de aproximadamente 62%) (Zheng et. al. 2007; Luo et. al., 2008).

Os subtipos do genótipo 1 variam de acordo com a região geográfica, sendo o subtipo 1A o mais comumente encontrado no continente Africano, o subtipo 1-B1 no sudeste asiático, o subtipo 1-B2 na Europa e Oeste da Ásia e o subtipo 1C no Japão (Krumbholz et. al., 2008; Luo et. al. 2008; Takasaka et. al. 2004; Zheng et. al. 2007; Zhong et. al. 2009).

Três outros genótipos do poliomavírus BK foram caracterizados. O genótipo 4, apresenta prevalências que variam de 12 a 54% (Luo et. al., 2008). É dividido em 6 subtipos (a1, a2, b1, b2 c1 e c2), todos com prevalência maior na Ásia e Europa (Nishimoto et. al., 2007; Zhong et. al., 2009). Porem, ainda há controvérsias sobre essa divisão.

No Japão, segundo estudos realizados em receptores de transplante renal e medula óssea, o genótipo mais comumente encontrados foi o 1

(subtipo 1C), seguido dos genótipos 4 e 3 respectivamente (Takasaka et. al 2004; Yogo et. al. 2007)

Outro estudo, realizado em hospitais de Londres por Jin e colaboradores em 40 gestantes, onde 19 (47%) apresentaram positividade para o BKV, o genótipo 1 foi o mais prevalente (15 amostras), seguido pela co-infecção pelos genótipos 1 e 3 (4 amostras) (Jin et. al., 1995).

Os genótipos 2 e 3 são os mais raramente encontrados, e, até a presente data, nenhum relato indica a origem desses genótipos (Nishimoto et al., 2006; Ikegaya et al., 2007; Yogo et al. 2007). Após análise filogenética de amostras publicadas no GenBank, Luo e colaboradores concluíram que a freqüência desses genótipos varia de 0-9% nos continentes onde esse tipo de estudo foi realizado (África, Ásia e Europa) (Luo et. al. 2008).

O genótipo 4 é o mais prevalente na China e na Mongólia segundo Zheng e colaboradores em estudos com indivíduos normais e Luo e colaboradores em estudos de análises filogenéticas com amostras publicadas no GenBank por outros pesquisadores (Zheng et. al. 2007; Luo et. al., 2008)

Através de análises filogenéticas de 53 amostras de BKV, Nishimoto e colaboradores sugerem que o genótipo 4 é originário do leste asiático (Mongólia, noroeste, sudoeste e sudeste da China e Vietnam; excluindo o Japão) (Nishimoto Y, et. al., 2007). Porem nesta região outros estudos demonstraram que o genótipo 1, subtipo 1B-1, é o mais prevalente em imunocompetentes, seguido do genótipo 4 (Chen et. al., 2006; Krumbholz et. al. 2008).

Apenas um estudo investigou a distribuição dos diferentes genótipos do poliomavírus humano BK na população brasileira. Zalona e colaboradores sequenciaram a região da VP1 do BKV em amostras de urina de 51 indivíduos submetidos a transplante renal, no Rio de Janeiro. O genótipo 1 representou 96% dos vírus excretados nesta população. Apenas 4% das amostras apresentavam vírus do genótipo 2. Não foram identificados os genótipos 3 e 4 (Zalona et al., 2011).

O genótipo 4 é o segundo genótipo mais prevalente na Europa e Estado Unidos (Luo et. al., 2008) e o mais comumente encontrado em pacientes receptores de células tronco-hematopoiéticas (Jin et. al., 1995).

Jin e colaboradores avaliaram a ocorrência de co-infecção entre genótipos do BKV em indivíduos saudáveis (gestantes e crianças) e imunocomprometidos (pacientes HIV positivos e pacientes submetidos a transplante de medula óssea) e observaram que a presença da co-infecção ocorre sempre envolvendo o genótipo 1, em diferentes combinações com os outros genótipos. A co-infecção não foi encontrada em receptores de transplante de medula óssea (Jin et. al., 1995).

O vírus JC, possui 8 genótipos e diversos subtipos distribuídos conforme a região geográfica. O genótipo 1, com três subtipos, é encontrado principalmente em indivíduos europeus, além de ampla distribuição nos Estados Unidos (Frisque et al., 1983; Agostini et al., 1998; Agostini et al., 2001). Os principais genótipos encontrados na Ásia são os genótipos 2 e 7. O genótipo 2 é predominante na região nordeste da Ásia, enquanto que o 7 é o genótipo mais frequente na região ao sul da China e sudeste asiático (Jobes et al., 1998; Guo et al., 1998).

O genótipo 3 é característico da África oriental (Agostini et al., 1997) e o genótipo 4 é encontrado na região do Mediterrâneo (Agostini et al., 2001).

O genótipo 5 é formado a partir de um mosaico entre outros dois genótipos e foi encontrado apenas uma vez (Agostini et al., 1996; Jobes et al., 1998; Hatwell & Sharp, 2000).

O genótipo 6 é representativo das populações da região oeste e central da África (Guo et al., 1996). Finalmente, o genótipo 8 do vírus JC, é identificado em populações da Papua Nova Guiné e Micronésia (Jobes et al., 2001).

Os habitantes do “Novo Mundo” albergam genótipos característicos de sua origem em outros continentes. Os afro-americanos, por exemplo,

excretam o genótipo 3 e, menos comumente o genótipo 6, em adição a genótipos provavelmente introduzidos através do matrimônio com indivíduos europeus (Chima et al., 2000).

Não existem, até o momento, estudos demonstrando os subtipos dos poliomavírus circulantes nas populações de indivíduos sadios da América do Sul, Oceania e extremo norte do continente Americano.

1.6) PROPAGAÇÃO NO HOSPEDEIRO E LATÊNCIA

Quanto a infecção das células pelos poliomavírus sabe-se que a proteína VP1 e os receptores com resíduos de ácido siálico parecem desempenhar um papel de suma importância. O receptor do poliomavírus JC é uma glicoproteína resistente à tripsina que contém ligações α-2,6 nos resíduos do ácido siálico no seu terminal infectando assim células humanas da glia; recentemente demonstraram que a serotonina 5HT2A também pode ser um receptor para o JCV (Seganti et al., 1981; Elphick et al., 2004).

Para o BKV, pensa-se que os receptores são gangliosídeos e foram isolados de eritrócitos humanos do tipo O e de células Vero. Sabe-se que o processo de aglutinação do BKV nos eritrócitos humanos é sensível à digestão por neuraminidase (cliva resíduos de ácido siálico). A remoção enzimática do ácido siálico dos receptores é o suficiente para inibir a infecção in vitro das células Vero por BKV. (Sinibaldi et al., 1990).

Após à infecção primária, os poliomavírus disseminam-se pelo corpo através da corrente sanguínea (Dorries et al., 1994) e provavelmente persiste no trato geniturinário, córtex e medula renais, células uroteliais e próstata, entre outros potenciais sítios de replicação (Hirsch et al., 2003) pois pode ser detectado na urina de indivíduos saudáveis (Polo et al., 2004; Rodriguez et al., 2007; Bialasiewicz et al., 2009) bem como em pacientes com leucoencefalopatia multifocal progressiva, indivíduos submetidos a

transplante de órgãos (Daniel et al., 1996) e ainda alguns autores detectaram a presença dos vírus em plasma de pacientes submetidos a transplante renal, em que a biópsia era negativa para BKV (Randhawa et al., 2004).

1.7) FORMAS DE TRANSMISSÃO DO VÍRUS E PROPAGAÇÃO NO HOSPEDEIRO

Os mecanismos de transmissão e propagação dos poliomavírus e a sua interação com as células hospedeiras são pouco conhecidas. A transmissão tanto do BKV quanto do JCV ocorre apenas entre os humanos e não existe nenhuma evidência da existência de um reservatório animal (Padgett and Walker, 1973).

O JCV, infecta cerca de 70% da população humana, podendo o vírus ser encontrado principalmente na urina e no sangue, conforme estudos de Bialasiewicz e colaboradores, que detectaram mais poliomavírus em urina e sangue do que aspirado nasofaríngeo, lavado bronco alveolar, liquor ou fezes (Bialasiewicz et al., 2009) e Gallia e colaboradores detectando poliomavírus em diversos tipos de células no sangue, inclusive em células do sistema imune, demonstrando os linfócitos como alvo do vírus JC (Gallia et al., 1997) e em glândulas salivares (Jeffers et al, 2009), Outros estudos já detectaram os poliomavírus presentes em fezes (Vanchiere et al., 2005; Vanchiere et al., 2009), e lavado nasofaríngeo (Sundsfjord et al., 1994) entre outros fluidos.

Poucos são os estudos sobre transmissão vertical e seus efeitos, portanto ainda não há ainda um consenso sobre esse assunto.

Pietropaulo e colaboradores realizaram um estudo com placentas e fetos que haviam sofrido algum tipo de aborto e detectaram o BKV em algumas amostras (Pietropaolo et al., 1998). Muitos estudos demonstraram presença de anticorpos anti-poliomavírus em gestantes, mas não existem estudos pesquisando o poliomavírus em secreções genitais das gestantes ou

em leite materno. (Knowles A. 2001).

1.8) QUADROS CLÍNICOS ASSOCIADOS AOS POLIOMAVÍRUS JC E BK

A maioria das infecções primárias pelo poliomavírus é assintomática e ocorre na infância (Krumbholz et al., 2008). Contudo, em crianças imunocomprometidas, a infecção primária pelo BKV pode desencadear cistite ou nefrite (Milokanis et al., 2001).

Em indivíduos imunocomprometidos a reativação do vírus é frequente e tem sido documentada pela excreção assintomática na urina. Alguns estudos demonstram que a prevalência de excreção urinária dos poliomavÍrus variou entre 20–90% em pacientes receptores de transplantes (renal e medula óssea) e entre 16–67% em indivíduos com HIV (Arthur RR., 1988; Arthur et al., 1989).

Em condições de imunidade reduzida, como a gravidez (Kalvatchev et al., 2008), infecção por HIV (vírus da imunodeficiência humana) (Cinque et al., 2009; Kinnaird et al., 2010), diabetes (Dorries K., 1996) e em alguns casos de transplante de órgãos, (Kusne et al., 2012; Liaw et al., 2012) pode ocorrer a reativação dos poliomavírus JC e BK, causando doença.

As doenças mais comumente causadas pelo poliomavírus BK em pacientes imunocomprometidos são cistite hemorrágica e hematúria em receptores de células tronco-hematopoiéticas e estenose uretral e nefrite intersticial nos transplantados renais, estas ultimas associadas à perda precoce do enxerto renal (14% a >80%) (Rajpoot et al., 2007; Cabello et al., 2008; Hilton et al., 2008).

O poliomavírus humano JC é o agente etiológico da LEMP, doença caracterizada por doença desmielinizante adquirida do sistema nervoso central, resultante da infecção lítica e destruição dos oligodendrócitos, e

perda dos detalhes nucleares e hiperplasia dos astrócitos que se apresentam como células gigantes de aspecto atípico, semelhantes a células neoplásicas (Padgett et al., 1971; Major et al., 1992).

1.9) ASSOCIAÇÃO ENTRE GENÓTIPOS E SUBTIPOS DOS POLIOMAVÍRUS E PATOGENIA

Atualmente, não existe qualquer informação sobre eventuais diferenças patogenéticas dos genótipos do vírus BK. Entretanto, a associação entre diferentes genótipos, doença e resposta à terapêutica foi demonstrada em outros vírus. Diversos genótipos do poliomavírus humano JC, por exemplo, foram associados à patogênese da leucoencefalopatia multifocal progressiva. Estudos realizados na Europa e Estados Unidos encontraram associação entre os genótipos 1 e 2 com LEMP (Agostini et al. 1998; Dubois et al. 1997, 2001; Ferrante et al. 2003 ; Delbue et al. 2009).

Uma pesquisa realizada em uma população com aids e LEMP em São Paulo demonstrou forte associação entre os genótipos 1 e 2 com a doença. Por outro lado, o genótipo 3 foi inversamente associado à LEMP (Fink et al, 2010).

Outro vírus cujos genótipos apresentam grande relevância clínica é o vírus da hepatite C (HCV). Diversos estudos correlacionaram o genótipo do vírus da hepatite C à gravidade do quadro clínico (López-Labrador et al. 1997, Benvegnu et al. 2003 Pang et al. 2009, Chakravarti et al. 2011). A resposta à terapêutica também pode ser influenciada por diferentes genótipos. De acordo com Hino et al, o genótipo II apresentou melhor resposta ao tratamento com interferon (85%), enquanto que nos outros genótipos a resposta variou entre 40 e 70% (Hino et al, 1994).

1.10) ESTUDOS SOROEPIDEMIOLÓGICOS E PREVALÊNCIA

Estudos soroepidemiológicos indicam que aproximadamente 70% da população humana é infectada com o poliomavírus humano JC, sem associação com qualquer quadro clínico. (Gardner et al 1973, Brown et al 1975, Flaegstad et al 1991).

Diversos estudos demonstraram que grande parcela da população humana foi exposta ao BKV na infância, sendo encontrados anticorpos anti-BKV com taxas que podem chegar a 50% nas crianças inumocompetentes de até 4 anos e até 82% na idade adulta, (Jin et. al., 1995; Milokanis et al., 2001; Kean et. al., 2009; Egli et. al., 2009; Kean et. al., 2009).

1.11) EXCREÇÃO URINÁRIA DOS POLIOMAVÍRUS

A investigação de excreção dos poliomavírus pode ser realizada através de técnicas moleculares. A técnica mais utilizada é a reação em cadeia por polimerase , através da amplificação de diferentes regiões dos vírus. (Zhong et. al., 2009; Tanaka et. al., 2009; Kalvatchev et. al., 2008; Yogo et. al., 2007; Jin et. al., 1995).

Poucos são os estudos que investigam a excreção urinária dos poliomavírus na população imunocompetente, e informações sobre a prevalência e padrões de excreção na população imunocompetente ao longo do tempo são escassas.

Um estudo realizado em Portugal por Rodrigues e colaboradores em 498 amostras de urina de indivíduos saudáveis, detectou através de PCR seguida de clivagem enzimática 9 (1,8%) amostras positivas para o BKV.

Dentre as positivas, 7 eram provenientes de indivíduos do sexo masculino (Rodrigues et. al., 2007).

Em estudo prospectivo realizado por Polo e colaboradores foram coletadas 280 amostras de urina de 66 indivíduos saudáveis (51 adultos e 15 crianças. A PCR realizada para os 3 poliomavírus estudados (JCV, BKV e SV40) demonstrou a prevalência em adultos, para qualquer poliomavírus, de 62,7%, sendo 41,2% das amostras positivas para JCV, 15,7% para BKV e 5,9% para ambos. Já nas amostras de crianças, 13,2% foram positivas para poliomavírus (6,6% positivos para JCV e 6,6% positivos para BKV). Nenhuma amostra, nos dois grupos estudados, foi positiva para SV40.

Bialasiewicz e colaboradores investigaram a ocorrência dos poliomavírus JC, BK, WU e KI em amostras de indivíduos adultos imunocompetentes de diferentes idades (sangue, urina, fezes e aspirado nasofaringeo). As amostras foram submetidas a uma duplex PCR em tempo real. O BKV foi encontrado em 3% das amostras de sangue, 1% de amostras de urina mas não foi encontrado em aspirado de nasofaringe e fezes. Já o vírus JC foi encontrado em , 14% das amostras de urina e em 1,8% de amostras de fezes, enquanto que as amostras de sangue foram negativas. Esses resultados demonstram que os poliomavírus JC e BK podem ser achados em diversos fluidos corpóreos. (Bialasiewicz et. al. 2009).

1.12) PERFIL DE EXCREÇÃO

Somente dois estudos contem informações sobre a excreção dos poliomavírus JC e BK. Polo e colaboradores com uma casuística de 51 indivíduos adultos, apresentando aproximadamente 41% de positividade para o JCV e 16% para o BKV e 6% de co-infecção, concluiu que, em geral, o JCV possui excreção continua e o BKV excreção esporádica (Polo et al., 2004). Estudo mais recente, buscando amostras positivas para poliomavírus

humanos JC, foi realizado por Rossi e colaboradores com uma casuística de 17 indivíduos de origem italiana, totalizando 333 amostras coletadas durante o período de 3 meses, (Rossi et al., 2007). Esses achados sugerem, assim como no estudo de Polo, que os indivíduos positivos excretores do vírus JC o fazem de forma contínua.

1.13) EXCREÇÃO DOS POLIOMAVÍRUS: IMPLICAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS

Os indivíduos saudáveis, que reativam a infecção latente e passam a excretar o vírus, podem disseminar o vírus não apenas pela urina, mas também através do sêmen, transfusão de componentes sanguíneos e transplante de órgãos, especialmente renal. Embora se saiba que é através da urina que ocorre mais frequentemente a excreção dos poliomavírus, ainda não se sabe se os indivíduos excretores o fazem de forma contínua ou intermitente. Além disso, devido ao possível papel patogênico dos poliomavírus no homem e da eventual associação de determinados genótipos com maior virulência, há interesse em saber se os genótipos que circulam em indivíduos saudáveis, assintomáticos, são os mesmos que causam doença em pacientes imunocomprometidos.

JUSTIFICATIVA

2) JUSTIFICATIVA:

Os poliomavírus estão presentes não só em pacientes infectados pelo HIV ou em receptores de transplantes de órgãos, mas também em indivíduos saudáveis.

Sua forma de transmissão, bem como os genótipos que circulam no Brasil. ainda não são bem conhecidosa

Os indivíduos saudáveis, que reativam infecção latente e passam a excretar o vírus, podem constituir uma fonte de disseminação viral, principalmente através da urina. Entretanto, ainda não se tem conhecimento sobre o perfil de excreção dos poliomavírus nessa população. Desta forma, seria importante avaliar a prevalência e a dinâmica da excreção do vírus coletando várias amostras, em diferentes períodos.

Esta informação pode ser relevante em algumas circunstancias em que seria recomendado controlar a transmissão do vírus como, por exemplo, em unidades de transplante renal.

Além disso, ainda não se sabe se existe alguma associação entre determinado genótipo dos poliomavírus e a patogênese de doenças em pacientes imunocomprometidos. Contudo, como os genótipos que ocorrem em receptores de transplantes e em outros pacientes imunodeprimidos podem refletir os genótipos que ocorrem na comunidade, existe interesse em conhecer o perfil genotípico dos poliomavírus encontrados na população imunocompetente.Esta informação é muito importante para estudos comparativos com receptores de transplante e outros pacientes imunocomprometidos.

Como a distribuição dos genótipos dos poliomavírus varia nos diferentes continentes, o conhecimento do perfil genotípico dos poliomavírus encontrados na população imunocompetente em nosso meio serviria como

base para comparações futuras com a distribuição dos genótipos encontrada nos diferentes grupos de pacientes imunodeprimidos. Esta comparação poderia contribuir para esclarecer a existência de rotas de aquisição preferenciais para certos genótipos em determinados grupos de pacientes, bem como sugerir eventuais associações entre genótipos e adoecimento.

Tendo em vista que ainda não existem dados nacionais sobre a frequência de reativação e dinâmica de excreção urinária dos poliomavírus bem como sua caracterização genotípica na população imunocompetente, o presente estudo terá como desafio científico obter esses dados. Tais informações serão determinantes para melhor conhecimento dos vírus circulante na população.

OBJETIVOS

3) OBJETIVOS:

3.1) OBJETIVO PRINCIPAL

Determinar a incidência, a dinâmica de excreção e os genótipos dos poliomavírus JC e BK excretados através da urina, em indivíduos assintomáticos

3.2) OBJETIVO SECUNDÁRIO

Analisar filogeneticamente os genótipos e subtipos dos poliomavírus JC e BK presentes nos indivíduos estudados.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

4) CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1) DESENHO DO ESTUDO:

Estudo de coorte, prospectivo, para determinar a incidência da excreção urinária dos poliomavírus humanos JC e BK num período de 6 meses em indivíduos imunocompetentes trabalhadores do quadrilátero da saúde / USP de ambos os sexos com idade entre 18 e 65 anos.

4.2) CÁLCULO AMOSTRAL

O número de amostras foi calculado com base em outros artigos publicados sobre o tema, onde a prevalência média de excreção urinária do BK vírus em imunocompetentes é de 15%, sendo de 7% o pior resultado aceitável com intervalo de confiança de 95%.

Estimando-se uma perda de 10-20% dos indivíduos até o final do estudo, o N determinado foi de 71 indivíduos.

Essa base de calculo estatístico foi feita sobre os dados do BKV, pois a incidência do JCV é muito superior, o que levaria um numero amostral mais baixo.

Todos os indivíduos foram incluídos no estudo por conveniência.

4.3) CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos indivíduos com idade entre 18 e 65 anos, de ambos os sexos que não apresentem no momento da coleta histórico de doença crônica ou imunodepressora e não estejam fazendo uso de nenhum tipo de medicamento de uso continuo.

4.4) CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos do estudo indivíduos que relatem febre ou sintomas de doença aguda no momento da coleta, indivíduos com doenças crônicas, imunocomprometidos, menores de 18 anos e maiores de 65 anos ou que estejam fazendo uso continuo de medicamentos.

4.5) ESTRATÉGIAS DE RECRUTAMENTO E RETENÇÃO DOS VOLUNTÁRIOS

Todos os voluntários recrutados foram selecionados dentre os docentes, funcionários, alunos e estagiários do quadrilátero da saúde da USP, que tenham um vinculo permanente ou, no caso de alunos e estagiários, vínculos com tempo igual ou superior a 6 meses no momento da inclusão no estudo. O vinculo permanente garante a retenção dos voluntários durante o tempo da pesquisa.

Nenhum dos indivíduos do estudo obteve vantagem sobre qualquer serviço relacionado ao laboratório de virologia, resultados de exames ou qualquer tipo de vantagem na instituição durante o estudo.

4.6) ASPÉCTOS ÉTICOS

O projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética das instituições envolvidas (anexos 1 e 2). Foi mantido o sigilo em relação à identidade dos pacientes e resultados dos testes. Todos os indivíduos participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (T.C.L.E.) (anexo 3) na entrada do estudo.

4.7) AMOSTRAS

Dos indivíduos incluídos, foram coletadas 6 amostras de urina, sendo a primeira na entrada do estudo e as demais amostras com intervalos mensais (2, 3, 4, 5 e 6 meses após a entrada). As amostras foram coletadas entre Julho 2010 e Novembro de 2011.

4.7.1) PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Aproximadamente 10mL de urina dos indivíduos selecionados foram aliquotadas em microtubos *eppendorf* com volume de 200 µL e armazenadas em freezer -20ºC.

Depois de realizadas as alíquotas, as amostras foram submetidas a extração de DNA utilizando o kit Qiamp DNA Mini Kit (QIAGEN®), conforme instruções do fabricante.

4.8) PCR EM TEMPO REAL

A tecnologia de PCR em Tempo Real (qPCR) possibilita a detecção do produto de amplificação à medida que vai sendo formado, ao contrário do método original.

Este sistema informa se está ocorrendo amplificação da molécula alvo (separação de fluoróforo-*quencher*) e quantifica esta amplificação baseando-se em uma curva pré-estabelecida, uma vez que o software do sistema correlaciona a intensidade do sinal com a quantidade de amplificado formado.

O protocolo escolhido para a reação de PCR em tempo real foi descrito por Pal e colaboradores que utilizou *primers* e sondas específicas para o gene que codifica o Ag-T dos poliomavírus JC e BK originando um fragmento de 80pb (tabela 1) (Pal et al., 2006).

A sonda de ambas as reações foi marcada com FAM (6-carboxyfluorescein) como *reporter* na porção terminal 5´ e com TAMRA (6-carboxy-tetramethylrhodamine) como *quencher* na porção 3´.

Tabela 1: Oligonucleotídeos e sonda responsáveis pela amplificação dos fragmentos no sistema de qPCR.

	Sequencia
Forward	5’ GAAACTGAAGACTCTGGACATGGA 3’
Reverse	5’GGCTGAAGTATCTGAGACT TGGG 3
Sonda JCV	AGGATCCCAACACTCTACCCCACCTAAAAAGA
Sonda BKV	CAAGCACTGAATCCCAATCACAATGCTC

A reação final foi preparada com 12,5 µl de “TaqMan Universal PCR Master Mix (2X)” (*Applied Biosystems®*), 0,5 µl de cada *primer* (10µM), 0,5µl da sonda (5µM) e 6µl de água DEPC. Os parâmetros da reação foram de 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguidos de 45 ciclos (15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C), submetidos em equipamento ABI 7300 (*Applied Systems®*).

A sensibilidade desse teste é de aproximadamente 6.000 cópias/mL de detecção para o JCV e de aproximadamente 1.000 cópias/mL para o BKV.

4.9) REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DE VP1

Todas as amostras de DNA dos indivíduos imunocompetentes foram submetidas à PCR para genotipagem utilizando oligonucleotídeos específicos da região VP1 dos poliomavírus JC e BK onde ocorre a amplificação de um fragmento de 215 pb para amostras positivas para JC (figura 1) e 353 pb para amostras positivas para o BK (figura 2). (Agostini et al., 1997; Krumbholz el al., 2006). Esse fragmento de DNA fornece mais de 15 sítios de tipagem para diferenciação dos oito genótipos do JCV e quatro genótipos do BKV e seus diferentes subtipos.

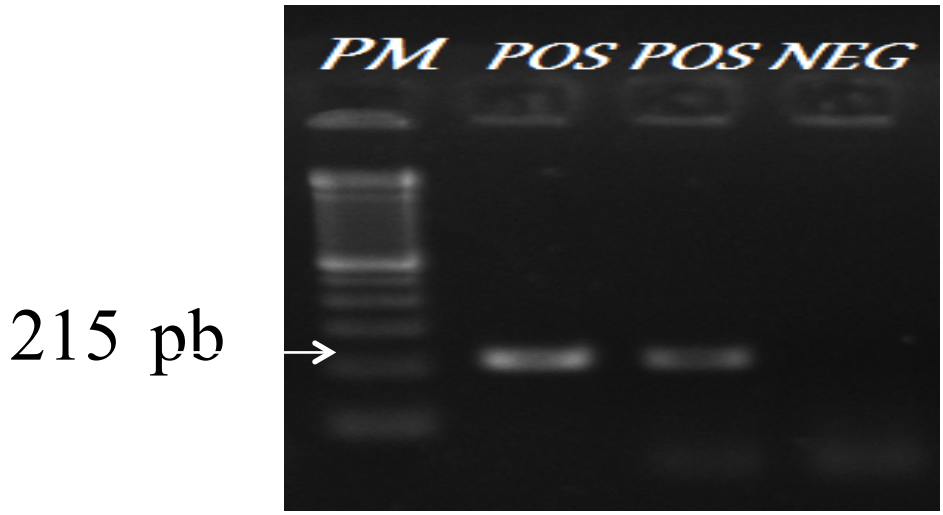

Figura 1: Gel com produto amplificado da região VP1 do JCV

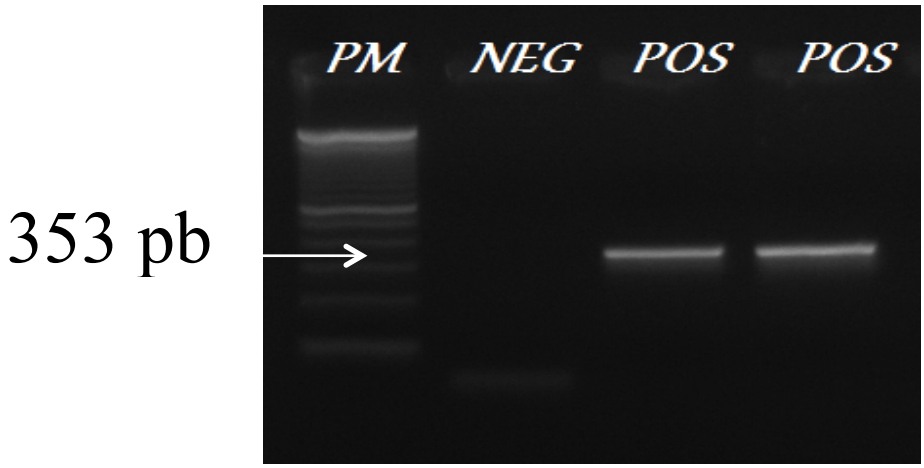

Figura 2: Gel com produto amplificado da região VP1 do BKV

A amplificação foi realizada em termociclador *Eppendorf*®, com os parâmetros de amplificação descritos por Schaffer et al. para o vírus JC e por Krumbholz et al. para o vírus BK. Os parâmetros utilizados para as reações foram: 95ºC por um minuto, 57ºC por um minuto e 72ºC por um minuto, repetidos por 35 ciclos para o vírus JC (Schaffer et al., 2006). Para o vírus BK, 94ºC por trinta segundos, 55ºC por cinquenta segundos e 72ºC por um minuto, repetidos por 35 ciclos (Krumbholz et al., 2006), ambos com

temperatura de 72ºC para extensão final durante sete minutos.

Para melhor desenvolvimento do teste, em ambos ensaios de PCR as ciclagens foram modificadas para 45 ciclos de amplificação.

As concentrações dos reagentes utilizados para ambas as PCRs foram: tampão 10X (50 mM de KCl, 10 mM de tris), desoxirribonucleotídeo Trifosfato (dNTPs) 200 µM, primer 0,5 µM cada, Cloreto de Magnésio (MgCl2) 1,5 mM, Taq polimerase 2,5 U/ reação (FINK et al., 2006) com as seguintes modificações: adição de 2,5µg/mL de CresolRed e glicerol a 57%.

O glicerol foi empregado como adjuvante para aumentar a amplificação de regiões ricas em Guanina-Citosina (Chou et al., 1992).

O CresolRed foi empregado como corante adicionado à mistura de PCR, para facilitar a aplicação em gel de agarose (Hoppe et al., 1992).

Alíquotas dos produtos de PCR foram submetidas à reação de eletroforese em gel de agarose 2% + 0,1µL/mL de SYBR Safe® (Invitrogen) para corar os amplicons resultantes da reação de PCR e posterior foto-documentação através do transiluminador de luz ultra violeta com comprimento de onda de 312nm para revelação.

Tabela 2. Primers utilizados para a amplificação do DNA dos poliomavírus JC e BK, com respectivas sequências e região amplificada.

PRIMERS	RREGIÃO	SEQÜÊNCIA	REFERÊNCIA
BKV-1	VP1 – BKV	GAAGTTCTAGAAGTTAAAACTGGG	Krumbholz et al., 2006
BKV-2	VP1 – BKV	GTGGAAATTACTGCCTTGAATAGG	Krumbholz et al., 2006
JLP-15	VP1 – JCV	ACAGTGTGGCCAGAATTCCACTACC	Agostini et at., 1997
JLP-16	VP1 – JCV	TAAAGCCTCCCCCCCAACAGAAA	Agostini et at., 1997

4.10) PURIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS POSITIVAS

A purificação dos produtos amplificados foi feita com a utilização de colunas do kit QIAQuick PCR Amplification Kit (Qiagen®) conforme instruções do fabricante.

Após o termino da purificação das amostras positivas, uma eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo 0,5 µL /mL de brometo de etídeo em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) (1X), foi realizada para uma semi quantificação do produto amplificado utilizando como marcador o *Low DNA Mass Ladder* (Gibco®).

Aproximadamente 30ng de produto amplificado foram adicionados a um microtubo *eppendorf* contendo o mix para sequenciamento com os seguintes reagentes e suas quantidades: 1 µM de *primer*, 4.4µL de *Mix Save Money* (Applied Biosystems Incorporation), e 2 µL de *Mix Big Dye Terminator 5x sequencing buffer* (Applied Biosystems Incorporation®).

A extensão enzimática foi realizada em termociclador *Eppendorf* com a seguinte ciclagem: 25 ciclos de 96°C por 10 seg. para denaturação do DNA molde, 50°C por 5 seg., para anelamento doa oligonucleotídeos e 60°C por 4 min. para a extensão.

O produto obtido foi novamente purificado visando à remoção de excesso de dideoxinucleotídeos “terminadores” presentes na reação, através do método de precipitação com isopropanol a 75%, seguido de lavagem com etanol a 80%. As amostras foram, então, ressupensas em *loading buffer* já em placas de sequenciamento.

4.11) SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS DE PCR

Os produtos de PCR, purificados, foram diretamente sequenciados, utilizando o mesmo par de *primers* empregado na reação de amplificação (JLP15/16 para o JCV e BKV1/2 para o BKV).

Para reação, os produtos da purificação foram adicionados a um mistura contendo 4ul de Ready Reaction Premix 2.5X, 2 µl de BigDye Sequencing (Applied Biosystems®), 3,2 pmol de cada oligonucleotídeo e água para completar o volume final de 20µl por amostra. Após a reação de sequenciamento, ocorre a remoção dos terminadores, que consistiu em uma lavagem com isopropanol 75% seguida por outra lavagem com Etanol 75%. Os produtos purificados foram ressuspensos em formamida 10% e submetidos ao aparelho de sequenciamento.

Esse método de sequenciamento utiliza dideoxinucleotídeos marcados com substâncias fluorescentes diferentes para cada um deles (ddA, ddC, ddT, ddG), permitindo a leitura concomitante em um mesmo sensor do aparelho de sequenciamento automatizado ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®).

4.12) CLASSIFICAÇÃO GENOTÍPICA E ANÁLISES FILOGENÉTICAS

As sequências do JCV e BKV amplificadas neste trabalho foram alinhadas com sequencias obtidas no banco de dados público GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Para isso, foi utilizado o programa de alinhamento múltiplo ClustalX (Thompson et al., 1994). O arquivo alinhado foi editado manualmente e analisado em relação à fase de leitura com o auxílio do programa CodonCode Aligner 4.0.

Os genótipos dos vírus foram determinados através de análises filogenéticas das sequências da região VP1. Utilizando o programa de

alinhamento ClustalX (Thompson et al., 1997).

O alinhamento, salvo no formato *nexus*, serviu como entrada para o programa de reconstruções filogenéticas GARLI (Genetic Algorithm for Rapid Likelihood Inference) (Zwickl D., 2006). Este programa reconstrói árvores filogenéticas através do método de máxima verossimilhança, e usa um algoritmo que otimiza os parâmetros iniciais do modelo de substituição a cada geração, permitindo que as topologias a serem geradas sejam otimizadas a cada geração. As arvores foram visualizadas no programa FigTree v1.3.1.

4.13) CLASSIFICAÇÃO DO PERFIL DE EXCREÇÃO

Foram classificados arbitrariamente como sendo de ”excreção contínua”, os indivíduos que apresentaram amostras positivas em 5 ou 6 coletas durante o estudo.

Já os indivíduos que apresentaram positividade em 3 ou 4 amostras, foram classificados como “indivíduos de excreção intermitente”.

E os indivíduos que apresentaram positividade em 1 ou 2 amostras, foram classificados como “indivíduos de excreção esporádica”.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

5) ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste T foi realizado para verificar a média, mediana e moda da idade dos indivíduos.

A distribuição genotípica em amostras de urina e a possível associação entre os indivíduos positivos e as variáveis sexo, etnia e idade foram analisada pelo método X2 (qui-quadrado) de Pearson, seguido do teste de Fisher.

Valores de $p<0,05$ foram considerados significantes. Todas as variáveis foram avaliadas através do *IBM SPSS® Statistics Base 19.*

RESULTADOS

6) RESULTADOS

6.1) POPULAÇÃO

No período de Julho de 2010 até Novembro de 2011 foram coletadas 426 amostras de urina provenientes de 71 indivíduos imunocompetentes, trabalhadores do quadrilátero da saúde (Hospital das Clinicas, Instituto do Coração, Instituto de Medicina Tropical – USP e Faculdade de Medicina da USP) escolhidos por conveniência.

Destes 71 indivíduos, 17 (24%) são do sexo masculino e 54 (76%) do sexo feminino. A idade média desses foi de 32 anos entre os indivíduos do sexo masculino (mediana de 26 anos) e 34 anos entre os indivíduos do sexo feminino (mediana de 29,5 anos).

Tabela 3: Distribuição dos indivíduos segundo sexo e faixa-etária

Faixa-etária	Número de indivíduos	Homens	Mulheres
21-30	39	10	29
31-40	10	3	7
41-50	12	3	9
51-60	9	0	9
61-65	1	1	0
Média		32	34,3
Mediana de idade		26 (21-65)	29,5 (21-60)

Quanto a etnia, 54/71 (76%) indivíduos são brancos, 9/71 (13%) são

amarelos e 8/71 (11%) são negros/pardos.

Todos os indivíduos do estudo realizaram 6 coletas de urina com intervalo mensal.

Não ocorreram desistências no decorrer do estudo.

6.2) INCIDENCIA E DINÂMICA DE EXCREÇÃO

6.2.1) PREVALÊNCIA GLOBAL DE POLIOMAVÍRUS JC E/OU BK NAS AMOSTRAS DO ESTUDO.

A prevalência global dos poliomavírus no total de amostras colhidas durante o estudo foi avaliada usando o teste de PCR em tempo real que amplifica a região genômica precoce (AgT) de ambos os poliomavírus. Dentre as 426 amostras testadas, 170 (40%) foram positivas para JCV e/ou BKV..

6.2.1.1) INCIDÊNCIA E DINÂMICA DE EXCREÇÃO URINÁRIA DO POLIOMAVÍRUS HUMANO JC

Dentre os 71 participantes do estudo, 38 (53,52%) excretaram o vírus JC em pelo menos uma das amostras coletadas.

Dentre os 17 indivíduos masculinos do estudo, 10 (58,8%) excretaram o JCV em alguma das amostras, e dois indivíduos (11,75%) foram persistentemente negativos. Dentre os 10 excretores, 5 (29.4%) excretaram o vírus JC e o vírus BK durante o acompanhamento e 5 (29.4%) excretaram exclusivamente o vírus JC.

Dentre os 54 indivíduos do sexo feminino, 28 (51,8%) excretaram o vírus JC em pelo menos uma das amostras, e 13 (24%) foram persistentemente negativas. Dos 54 indivíduos de sexo feminino 9 (16,6%) excretaram somente o vírus JC durante o acompanhamento.

Investigando a proporção de indivíduos excretores em relação à faixa etária, observamos que a maior parte dos excretores do poliomavírus humano JC, encontra-se na faixa-etária acima de 50 anos (Tabela 4). Contudo, não houve diferença estatística na proporção de excretores nas diferentes faixas etárias (P<0.395). A média de idade entre os indivíduos positivos para o poliomavírus JC foi de 31,9 anos.

Tabela 4: Distribuição de indivíduos positivos de acordo com a faixa etária.

Faixa-etária (anos)	JCV
21 – 30	21/39 (53,8%)
31 – 40	4/10 (40%)
41 – 50	6/12 (50%)
51 – 60	6/9 (67%)
61 – 70	1/1 (100%)

Investigando a etnia dos indivíduos positivos para o poliomavírus JC ,encontramos 53% indivíduos brancos, 62% dos indivíduos negros/pardos e 45% dos amarelos (Tabela 5).

Tabela 5: Indivíduos com amostras positivas para o poliomavírus JC

conforme etnia.

JCV TOTAL			
	Brancos	Amarelos	Negros e Pardo
Total	29/54 (53%)	4/9 (45%)	5/8 (62%)

Não houve diferença estatística entre as etnias avaliadas individualmente (P<0.527), ou quando divididas em brancos e não brancos (p<0,368), amarelos e não amarelos (p<0,265) e negros e não negros (p<0,996)

O perfil de excreção dos 38 indivíduos que excretaram o poliomavírus durante o estudo foi analisado com base no número de amostras positivas em relação às 6 amostras coletadas por cada indivíduo (Tabela 6).

Tabela 6 – Distribuição de indivíduos que excretaram JCV em relação às diferentes proporções de amostras positivas para o vírus JC nas seis coletas realizadas durante o estudo.

Amostras positivas / amostras coletadas	JCV+ (n=38)
6/6	11/38 (29%)
5/6	5/38 (13%)
4/6	2/38 (5%)
3/6	1/38 (3%)
2/6	0/38 (0%)
1/6	19/38 (50%)

Nas faixas etárias de 21 a 50 anos a maioria dos indivíduos apresentou excreção do vírus em uma ou duas amostras, enquanto que a maioria dos indivíduos com mais de 50 anos excretou o vírus em cinco ou seis amostras (Tabela 7).

Tabela 7: Número de coletas positivas para poliomavírus JC observadas em 6 amostras de urina segundo diferentes faixas etárias

Faixa-etária	Numero de coletas positivas			
	1-2	3-4	5-6	NEGATIVOS
21-30	11/39 (28,2%)	2/39 (5,1%)	7/39 (17,9%)	19/39 (48,7%)
31-40	4/10 (40%)	-	1/10 (10%)	5/10 (50%)
41-50	4/12 (33,3%)	-	2/12 (16,7%)	6/12 (50%)
51-60	-	1/9 (11,1%)	5/9 (55,5%)	3/9 (33,3%)
60-	-	-	1/1 (100%)	-
TOTAL	19/38 (47,4%)	3/38 (7,9%)	16/38 (42,1%)	33/71 (46,5%)

6.2.1.2) INCIDÊNCIA E DINÂMICA DE EXCREÇÃO URINÁRIA DO POLIOMAVÍRUS HUMANO BK

Dos 71 indivíduos incluídos no estudo, 46 (64,8%) excretaram o BKV em pelo menos uma das amostras, durante o acompanhamento de 6 meses.

Dos 17 indivíduos masculinos do estudo, 10 (58,8%) excretaram o vírus BK, sendo que 5(29,4%) excretaram exclusivamente, enquanto que dentre os 54 indivíduos do sexo feminino, 36 (66,6%) excretaram o vírus BK em pelo menos uma amostra.

A proporção de indivíduos que excretaram o BKV em diferentes faixas etárias pode ser vista na Tabela 8. Não se observou diferença estatística na

proporção de indivíduos que excretaram o BKV nas diferentes faixas etárias (P<0.719). A média de idade entre os indivíduos positivos para o poliomavírus BK foi de 33,1 anos.

Tabela 8: Número de indivíduos com amostras positivas de acordo com a faixa etária.

Faixa-etária	BKV
21 – 30	25/39 (64,1%)
31 – 40	8/10 (80%)
41 – 50	7/12 (58,3%)
51 – 60	5/9 (55,55%)
61 – 70	1/1 (100%)

Com relação a etnia, 68,3% indivíduos brancos, 17% negros/pardos e 14,6% amarelos excretaram poliomavírus humano BK (Tabela 9).

Tabela 9: Proporção de indivíduos que excretaram o poliomavírus BK em pelo menos uma amostra durante o estudo, conforme etnia.

BKV	Etnia		
	Brancos	Amarelos	Negros e Pardo
Total	32/54 (59,26%)	7/9 (77,7%)	7/8 (87,5%)

Não houve diferença estatística entre as etnias avaliadas

individualmente ou quando analisadas individualmente pelo método de Fisher (P<0.202), ou quando foram divididos em indivíduos brancos e não brancos (p<0,820), amarelos e não amarelos (p<0,383) e negros e não negros (p<0,153).

O perfil de excreção do poliomavírus BK dentre os 46 indivíduos que excretaram o BKV durante o estudo foi analisado com base na distribuição das proporções de amostras positivas nas seis coletas (Tabela 10)

Tabela 10 – Distribuição de indivíduos que excretaram BKV segundo diferentes proporções de amostras positivas para o vírus BK em relação às seis coletas realizadas

Amostras positivas / amostras coletadas	BKV (n=46)
6/6	0
5/6	1/46 (2,17%)
4/6	3/46 (6,53%)
3/6	5/46 (10,87%)
2/6	14/46 (30,43%)
1/6	23/46 (50%)

Comparando o perfil de excreção com a idade dos indivíduos positivos, podemos observar que a quantidade de amostras positivas durante o estudo não varia conforme a idade (Tabela 11). Não houve diferença estatística entre as faixas etárias (P<0.719). A média de idade entre os indivíduos positivos para o poliomavírus BK foi de 33,1 anos.

Tabela 11: Número de coletas positivas para poliomavírus BK

observadas em 6 amostras de urina segundo diferentes faixas etárias

Faixa-etária	Numero de coletas positivas			
	1-2	3-4	5-6	NEGATIVOS
21-30	21/39 (53,8%)	3/39 (7,7%)	1/39 (2,5%)	14/39 (35,9%)
31-40	7/10(70%)	1/10 (10%)	-	2/10(20%)
41-50	5/12 (41,6%)	2/12 (16,6%)	-	5/12 (41,7%)
51-60	4/9 (44,4%)	1/9 (11,1%)	-	4/9(44,4%)
60-	-	1/1 (100%)	-	-
TOTAL	37/46 (80,4%)	8/46 (17,4%)	1/46 (2,2%)	25/71 (35,2%)

6.2.1.3) INCIDÊNCIA E DINÂMICA DE EXCREÇÃO URINÁRIA EM INDIVÍDUOS CO-INFECTADOS

Dentre os 71 indivíduos do estudo, 26 (36,62%) apresentaram positividade para os 2 poliomavírus humanos.

Entre os indivíduos do sexo masculino, 5 (29,41%) apresentaram co-infecção, sendo 1 (20%) em algum momento do estudo enquanto que 4 (80%) excretaram ambos os vírus concomitantemente.

Já entre os indivíduos do sexo feminino, 21 dentre as 54 (38,88%) apresentaram co-infecção em algum momento do estudo, sendo que 7 (33,33%) excretaram ambos os vírus em coletas diferentes obtidas durante o estudo e 14 (66,66%) apresentaram excreção dos dois poliomavírus concomitantemente em todas as coletas positivas

Com relação a etnia dos indivíduos co-infectados, entre as mulheres, 16/21 (76,19%) são brancas, 4/21 (19,05%) são negras e 1/21 (4,76%) é

amarela. Já entre os homens, 3/5 (60%) são brancos e 2/5 (40%) são amarelos.

6.3) GENOTIPAGEM E ANÁLISE FILOGENÉTICA

Todas as amostras do estudo (426) foram submetidas a duas diferentes reações de PCR para amplificação da sequencia alvo do Ag-T do JCV e do BKV e do gene da proteína VP1 do BKV e do JCV.

O gene VP1 do vírus JC foi amplificado em 83,6% (102/122) das amostras positivas para o gene T do vírus JC. No caso do vírus BK, apenas 25,4% (31/122) das amostras anteriormente positivas para o gene T do foram positivas para o gene VP1.

A escolha das amostras a serem sequenciadas foi feita de forma arbitrária, tendo sido escolhida a primeira amostra positiva para VP1 de cada indivíduo. A amostra escolhida foi purificada e submetida a reação de sequenciamento para diferenciar os genótipos dos poliomavírus JC e BK através de analises filogenéticas

Foram sequenciadas amostras de 19 indivíduos positivos para o poliomavírus BK e 26 indivíduos positivos para o poliomavírus JC.

Nas amostras positivas para o poliomavírus JC, o genótipo 1 foi encontrado em 12/26 (46%) dos casos, sendo o subtipo 1A encontrado em 15,38% (4/26), o subtipo 1B em 30,77% (8/26). O genótipo 2 foi encontrado em 3,85% (1/26), o genótipo 3 em 30,77% (8/26), o 4 em 15,38% (4/26) e o 6 em 3,85% (1/26). Não foi encontrada nenhuma amostra que apresentasse o genótipo 5, genótipo 7 ou genótipo 8 (Figura 4).

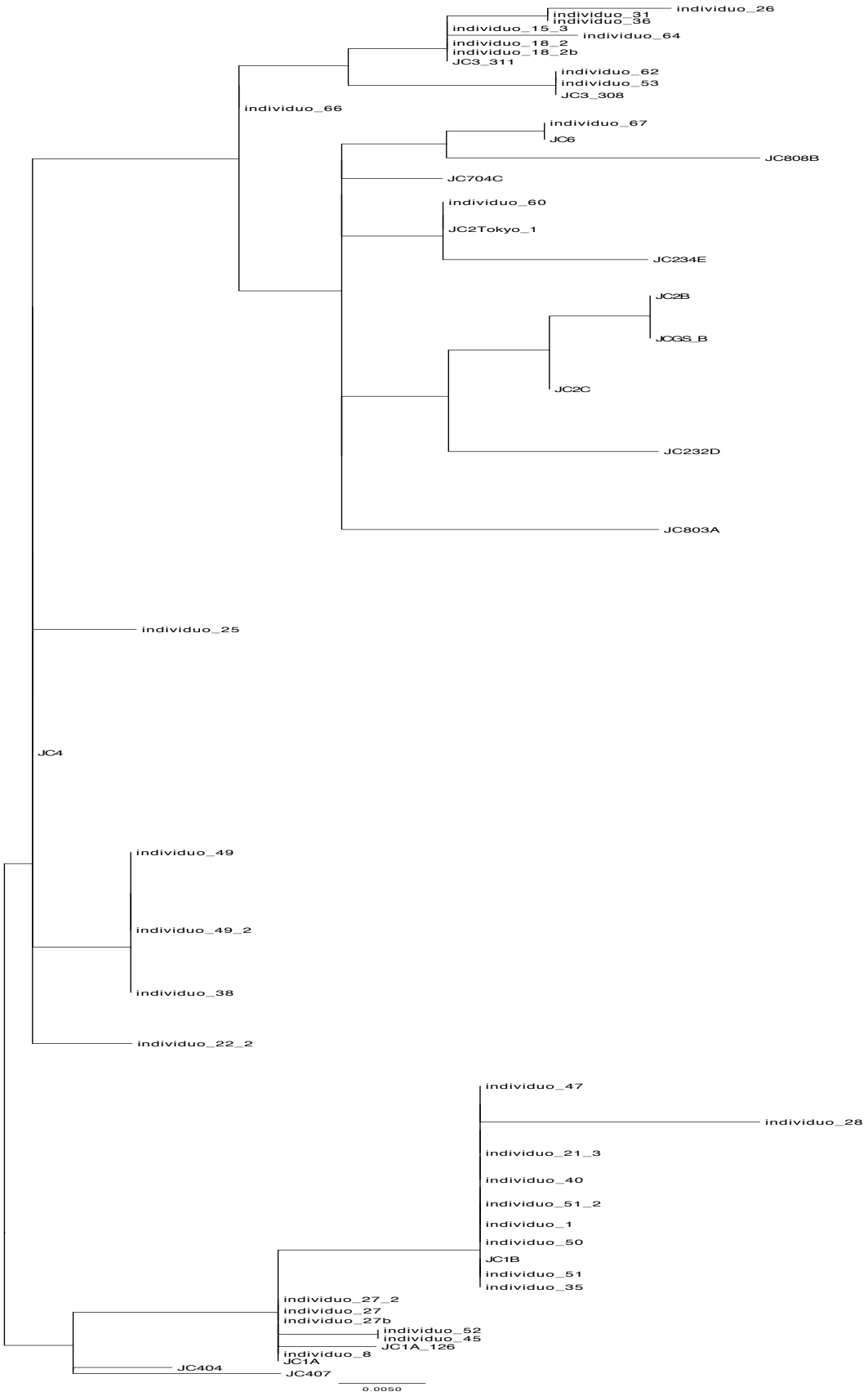

Figura 3. Árvore filogenética das amostras JCV positivas

Em relação à etnia, observamos que entre os indivíduos brancos, o genótipo 1, subtipo 1B foi o mais prevalente, seguido pelo subtipo 1A e pelo genótipo 3. Entre os indivíduos amarelos, foi observado somente o genótipo 3. Entre os indivíduos negros, o genótipo 3 foi o mais encontrado, seguido pelo genótipo 4 (tabela 12).

Tabela 12 – Relação de genótipos e subtipos *versus* etnia dos indivíduos positivos para o poliomavírus JC

Etnia / Genótipos	1a	1b	2	3	4	6
Brancos	4/21 (19,1%)	8/21 (38,1%)	1/21 (4,8%)	4/21 (19,1%)	3/21 (14,3%)	1/21 (4,8%)
Negros e Pardos	-	-	-	2/3(66,6%)	1/3 (33,3%)	-
Amarelos	-	-	-	2/2 (100%)	-	-

A distribuição dos genótipos e subtipos do VJC conforme o sexo dos indivíduos excretores pode ser vista na Tabela 13.

Tabela 13 – Relação dos genótipos e subtipos do poliomavírus JC conforme sexo dos indivíduos excretores.

Genótipo	1ª	1b	2	3	4	6	total
Homens	-	2/9 (22,22%)	-	4/9 (44,45%)	2/9 (22,22%)	1/9 (11,11%)	9
Mulheres	4/17 (23,53%)	6/17 (35,30%)	1/17 (5,88%)	4/17 (23,53%)	2/17 (11,76%)	-	17
Total	4	8	1	8	4	1	26

Dentre as amostras positivas para a PCR da VP1 do poliomavírus BK,

78,96% (15/19) foram caracterizadas como genótipo 1, 10,52% (2/19) como genótipo 4 e 5,26% (1/19) como genótipo 2. Uma amostra 5,26% (1/19) apresentou os genótipos 1 e 4 na mesma amostra e nenhuma amostra foi caracterizada como genótipo 3, conforme figura 5.

As amostras classificadas como genótipo 1, foram divididas em subtipos dos quais 80% (12/15) foram subtipo 1A e 20% (3/15) como 1-B1. Nenhuma amostra foi caracterizada como 1B-2 e 1C.

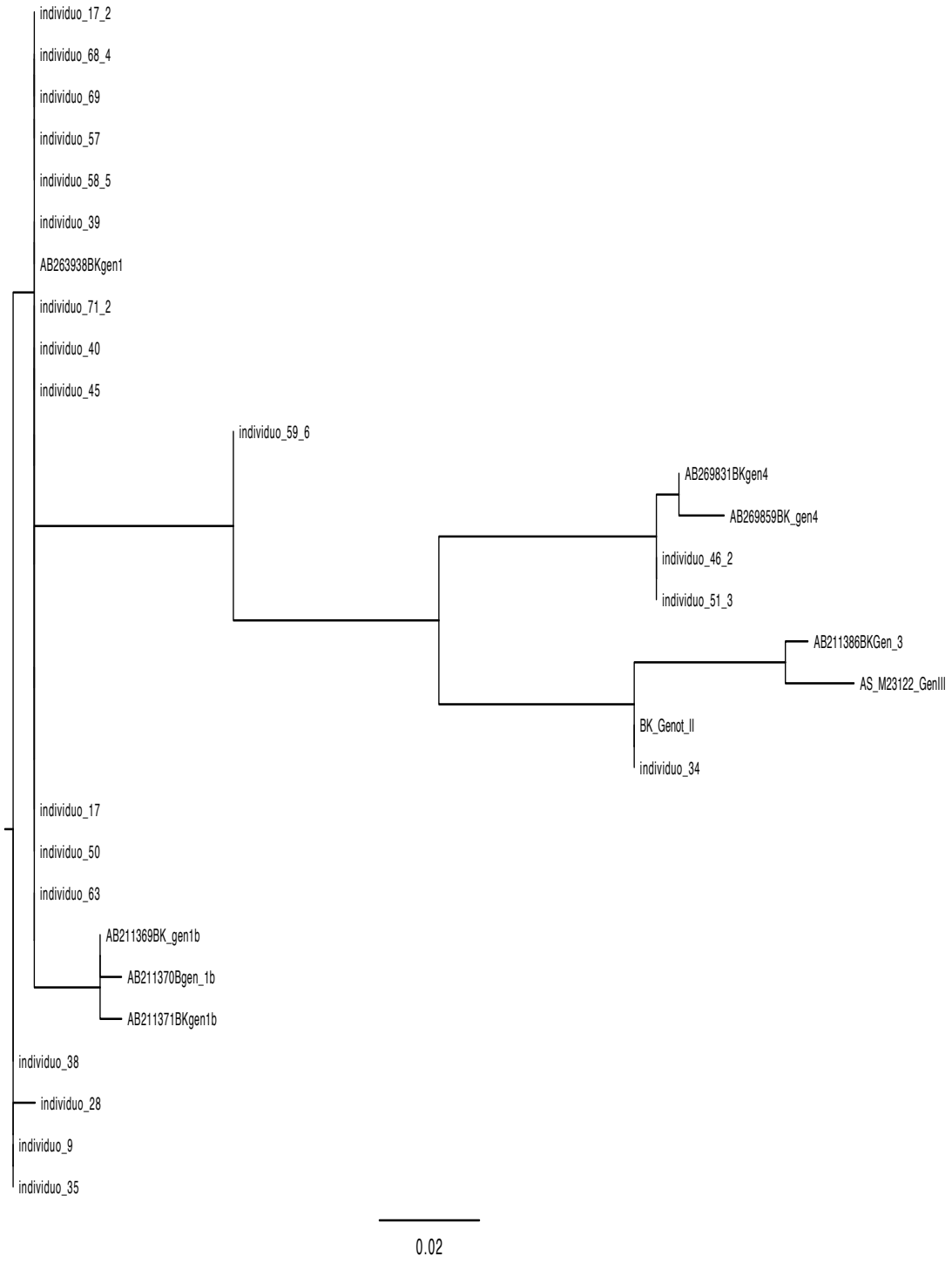

Figura 4. Árvore filogenética das amostras BKV positivas

Correlacionando os resultados obtidos com a etnia dos indivíduos positivos para BKV, identificamos como o mais prevalente em todas as etnias o genótipo 1, subtipo 1A, seguido pelos subtipo 1B e genótipo 4 entre os

indivíduos brancos, o genótipo 1, subtipo 1A entre os amarelos, e o genótipo 2 entre os indivíduos negros (Tabela 14).

A co-infecção com 2 genótipos foi observada no indivíduo branco.

Tabela 14 – Relação de genótipos e subtipos *versus* etnia dos indivíduos positivos para o poliomavírus BK

Etnia / Genótipos	1a	1b	2	4	1 e 4
Brancos	11/19 (57,91%)	3/19 (15,79%)	-	2/19 (10,52%)	1/19 (5,26%)
Negros e Pardos	-	-	1/19 (5,26%)	-	-
Amarelos	1/19 (5,26%)	-	-	-	-

A distribuição dos genótipos e subtipos do BKV segundo o sexo dos indivíduos excretores pode ser vista na Tabela 15.

Tabela 15 – Relação dos genótipos e subtipos do poliomavírus BK conforme sexo dos indivíduos.

	1a	1b	2	4	1-4	total
Homens	1/4 (25%)	2/4 (50%)	-	1/4 (25%)	-	4
Mulheres	11/15 (73,32%)	1/15 (6,67%)	1/15 (6,67%)	1/15 6,67%)	1/15 (6,67%)	15
total	12	3	1	2	1	19

Foram realizados cálculos estatísticos para verificar se havia

correlação entre o genótipos e subtipos encontrado e as variáveis sexo e etnia, porem em nenhum caso houve diferença estatística significante, nem para o BKV nem para o JCV.

Correlacionando o sexo do indivíduo com o genótipo do BKV, encontramos $p<0,304$. Quanto a etnia, utilizando o teste qui-quadrado de Pearson, encontramos $p< 0,261$ e, utilizando o teste de Fisher, ao dividir a etnia em brancos e não brancos encontramos $p< 0,195$, amarelos e não amarelos $p< 0,905$ e negros e não negros $p< 0,064$.

Já para o vírus JC, correlacionando o sexo com os genótipos e subtipos encontrados, observamos $p< 0,334$. Quanto a etnia, utilizando o teste qui-quadrado de Pearson, encontramos $p< 0,261$ e, utilizando o teste de Fisher, ao dividir a etnia em brancos e não brancos encontramos $p< 0,271$, amarelos e não amarelos $p< 0,717$ e negros e não negros $p< 0,999$.

DISCUSSÃO

7) DISCUSSÃO

O presente estudo teve por objetivo caracterizar a infecção pelos poliomavírus humanos JC e BK em uma população imunocompetente de São Paulo. Poucos ainda são os estudos que demonstram a prevalência e os genótipos circulantes dos poliomavírus nos indivíduos imunocompetentes no mundo e tais dados ainda são inéditos no Brasil.

Neste estudo foram avaliados 71 indivíduos imunocompetentes, nos quais encontramos taxas de excreção de 53,52% (38/71) para o vírus JC e 64,79% (46/71) para o vírus BK.

A excreção urinária dos poliomavírus JC foi avaliada por alguns outros estudos realizados em países da Europa.

Estudo realizado por Pagani e colaboradores revelou a excreção urinária do vírus JC em 46% da população italiana, taxa semelhante às observadas por Agostini e colaboradores que encontraram taxas de excreção de 48% na Espanha, 31% na Alemanha, 42% na Hungria e 39% na Polônia. No entanto, a maioria das amostras obtidas foi oriunda de pacientes hospitalizados ou portadores de doenças crônicas como diabetes, por exemplo.

Por outro lado, estudando populações imunocompetentes em Portugal, Matos e colaboradores encontraram o vírus em 38% da população (Matos et al., 2010) enquanto Rodrigues e colaboradores demonstraram a prevalência de 24% dos indivíduos estudados (Rodrigues et al., 2007).

Embora trabalhando com indivíduos hígidos, a taxa de excreção urinária do vírus JC por nós encontrada (53,5%) foi superior às observadas nestes estudos.

Esta alta taxa de excretores em nosso estudo está provavelmente associada a obtenção de várias amostras de cada indivíduo, diferentemente

dos outros estudos nos quais apenas uma amostra foi obtida de cada paciente. Esta hipótese é corroborada pelo fato de que em aproximadamente 50% de nossa casuística encontramos excreção intermitente do vírus, o que significa que a coleta da amostra única pode eventualmente ocorrer num período sem excreção viral.

Polo e colaboradores realizaram um estudo com metodologia semelhante ao nosso, já que analisaram indivíduos imunocompetentes de 25 a 57 anos, com coleta de várias amostras de cada indivíduo (Polo et al., 2004). Contudo, a proporção de indivíduos excretores encontrada (41%) foi semelhante aos estudos europeus, sugerindo que além do número de amostras outros fatores tais como tamanho da casuística, a localização geográfica da população estudada, seu *background* genético, ou ainda os métodos laboratoriais empregados podem influenciar nas taxas de excreção obtidas nos diferentes estudos.

Na casuística estudada encontramos excreção do vírus JC ligeiramente maior em indivíduos do sexo masculino (59%) do que do sexo feminino (50%). Esse achado também foi descrito em estudos anteriores de Rossi e colaboradores na Itália, que obtiveram 53% de positividade em indivíduos do sexo masculino e 28% do sexo feminino (Rossi et al., 2007). Resultados semelhantes foram obtidos por Rodrigues e colaboradores em Portugal, com excreção do vírus JC em 27% dos indivíduos do sexo masculino e 19% dos indivíduos do sexo feminino (Rodrigues et al., 2007).

Uma possível hipótese para explicar a maior prevalência de excreção no sexo masculino seria o maior número de linfócitos Treg (FOX P3 positivos) observado nos homens quando comparado com as mulheres, o que levaria a um controle imune menor da replicação viral (Yamakawa et al., 1996; Chiaramonte et al., 1996; Chen et al., 1997; Green et al., 1994).

Nas mulheres, a resposta imune parece ser mais acentuada, explicando assim o fato de serem mais resistentes a infecções, por um lado, mas terem por outro lado maior risco de desenvolver doenças autoimunes (Shames et al., 2002).

Resultados discrepantes foram descritos por Matos e colaboradores que não observaram diferença na excreção entre os sexos dos indivíduos (Matos et al., 2010).

Os resultados obtidos em nosso estudo demonstram altas taxas de excreção do poliomavírus JC em todas as faixas etárias

Kmieciak e colaboradores identificaram taxas de excreção mais elevadas em indivíduos sadios com idades acima de 60 anos (63,6%), sugerindo um aumento de excreção conforme a idade dos indivíduos estudados. (Kmieciak, et al., 2008).

O estudo de Rodrigues e colaboradores com a população portuguesa em 2007 também concluiu que houve um aumento da prevalência da excreção urinária do poliomavírus JC conforme o aumento da idade do grupo estudado, passando de 15% nos indivíduos com idade inferior a 25 anos para 37% dos indivíduos com idade igual ou superior a 56 anos (Rodrigues et al., 2007).

Outros grupos (Schaffer et al., 2006; Zhong et al., 2007; Egli et al., 2009) também demonstraram aumento progressivo nas taxas de excreção do vírus com aumento da faixa etária.

Apesar de também termos observado no nosso estudo aumento na proporção de excretores do JCV nas faixas etárias mais elevadas, passando de 51% na faixa etária de 21 a 30 anos para 67% a partir de 50 anos, esta diferença não foi estatisticamente significante ($P<0.395$).

Quanto aos achados relacionados a análise filogenética das amostras positivas para o vírus JC nosso estudo identificou uma prevalência maior do genótipo 1, subtipo 1B e do genótipo 3 (30,77% cada). Esses resultados eram até certo ponto esperados, já que nossa população é composta, em grande parte, por descendentes de povos do sudeste da Europa (portugueses, espanhóis e italianos) onde predomina o genótipo 1, subtipo 1B e de descendentes de povos originários da África, onde circula o genótipo

3. Esse genótipo é encontrado em populações do oeste da África. Uma hipótese para a introdução desse genótipo em nosso meio é que tenha ocorrido através do tráfico de escravos provenientes em sua maioria de Angola para o Brasil, principalmente no final do século XVI durante a colonização e no século XVIII com a descoberta do ouro. O genótipo 1, subtipo 1A, originário do norte da Europa (Alemanha, Hungria) também foi encontrado, mas em menor numero.

No estudo de Kmieciak e colaboradores, realizado na Polônia, o genótipo 1, subtipo 1A foi o mais encontrado, seguido dos subtipos 1B e genótipo 2. Nesse estudo o genótipo 1, subtipo 1A e o genótipo 2 foram os mais prevalentes em mulheres e o genótipo 2 o mais prevalente em homens (Kmieciak et al., 2008).

Comparando com os dados obtidos na nossa casuística, conseguimos demonstrar que diferenciando quanto ao sexo, o genótipo mais prevalente entre os indivíduos masculinos é o genótipo 3 e entre os indivíduos do sexo feminino é o genótipo 1, subtipo 1B. Contudo, esta diferença não foi estatisticamente significante.

Os dois indivíduos de origem asiática de nosso estudo excretaram o genótipo 3. Esse achado foi inesperado já que, diversos estudos descrevem a presença dos genótipos 2 e 7 em populações da Ásia. Tendo em vista que a transmissão do vírus JC ocorre horizontalmente, dentro e fora do ambiente familiar (Kitamura et al., 1994), a infecção pelo genótipo 3 pode ter ocorrido através de fontes externas. Uma possível fonte de infecção é a água. Fumian e colaboradores encontraram o vírus JC em 43% das amostras de esgoto tratado na cidade do Rio de Janeiro e o genótipo mais frequentemente encontrado foi o 3, africano. (Fumian et al., 2010).

O poliomavírus humano BK foi encontrado em pelo menos uma das amostras de urina de 64,78% dos voluntários deste estudo. Esta taxa de excreção é muito maior que a observada em outros estudos: 1% dos homens e 2,5% das mulheres (Rodrigues et al., 2007), enquanto Polo e colaboradores (2004) encontraram 8/51 (16%) de indivíduos positivos para o poliomavírus

BK na Espanha (Polo et al., 2004).

Mais uma vez, a coleta de múltiplas amostras de cada indivíduo pode explicar esta discrepância, já que a excreção do BKV foi na quase totalidade dos indivíduos estudados, esporádica. Dos 46 indivíduos excretores, 37 (80%) foram positivos em apenas 1 ou 2 coletas, 17% (8/46) foram positivos em 2 ou mais coletas e apenas um individuo (3%) apresentou positividade em 5 coletas. Nestas condições o número de coletas torna-se crucial para a avaliação da taxa de excretores do BKV em um determinado grupo populacional. Contudo, não se pode excluir a interferência de outros fatores para explicar esta discrepância, como por exemplo a constituição genética da população estudada, a metodologia empregada, e o tamanho de amostra analisado.

Alguns estudos apresentam resultados discrepantes em relação às taxas de excreção em diferentes faixas etárias. Um estudo realizado por Zhong e colaboradores, em 50 indivíduos divididos por faixa-etária, demonstraram que os indivíduos com idade mais avançada, em linhas gerais acima dos 30 anos, excretam mais o poliomavírus BK do que os indivíduos mais jovens. (Zhong et al., 2007).

Não encontramos aumento nas taxas de excreção associadas ao aumento da faixa etária. Nossos achados são corroborados por Rodrigues e colaboradores que também não observaram diferença estatisticamente significante entre a prevalência de excreção nas diferentes faixas etárias (Rodrigues et al., 2007).

Quanto aos genótipos e subtipos do poliomavírus BK encontrados em nosso estudo, observamos predomínio absoluto do genótipo 1, subtipo 1A (63%), seguido pelo subtipo 1B e genótipo 4 (16% e 10%, respectivamente). Este resultado era o esperado, já que o subtipo 1A é o de maior prevalência no mundo. Além disso, este subtipo tem origem africana (Zheng 2007, Krumbholz 2008, Luo 2008), e devido à alta miscigenação da população brasileira era de se esperar uma alta circulação deste subtipo entre nós pelo mesmo motivo que levou o genótipo 3 do poliomavírus JC ser o mais

prevalente, ou seja, o trafico negreiro nos séculos XVI e XVIII proveniente da África.

Outros estudos realizados em diferentes continentes também demonstram a maior prevalência do genótipo 1 seguido do genótipo 4. (Zheng et al., 2007; Krumbholz et al., 2008). Contudo, cada subtipo, em geral, mostra uma afinidade com uma população humana: 1A para os africanos, 1B-1 nas populações do sudeste asiático, 1B-2 para os europeus, e 1C no Nordeste asiático.

Comparando os resultados obtidos nesses dois estudos com os nossos achados, podemos observar que os genótipos se mantem no Brasil, mesmo em indivíduos imunocompetentes, visto que o genótipo 1, foi o mais prevalente, seguido do genótipo 4.

O genótipo 1, subtipo 1C do poliomavírus BK, não foi observado em nenhuma amostra neste estudo.

Zalona e colaboradores em 2011 realizaram o único estudo publicado sobre genótipos do poliomavírus humano BK no Brasil (Zalona et al., 2011). Estudando indivíduos submetidos a transplante renal no Rio de Janeiro, também encontrou-se predomínio absoluto do genótipo 1 (96% de amostras genotipadas) , sendo as 4% restantes classificadas como genótipo 2.

Entretanto, observou-se importante discordância de nosso estudo com o de Zalona e colaboradores em relação aos subtipos do genótipo 1, pois enquanto no nosso estudo a prevalência do subtipo 1A foi de 63%, no estudo de Zalona e colaboradores foi de 29%. Naquele estudo, houve predomínio absoluto do subtipo 1B, encontrado em 67% das amostras.

O significado desta discrepância merece investigações futuras, que tanto poderia ser devido a uma variação meramente geográfica entre populações de São Paulo e Rio de Janeiro, como poderia estar eventualmente relacionada a uma maior capacidade de reativação deste subtipo em condições de imunodepressão, como é o caso dos receptores de

transplante renal.

Poucos são os estudos que contemplam informações sobre co-infecção dos poliomavírus JC e BK. Machado e colaboradores demonstraram uma taxa de aproximadamente 10% de co-infectados em um grupo de 116 crianças e adolescentes soropositivos para o HIV (Machado et al., 2011).

Baksh e colaboradores, em um estudo com amostras de 19 indivíduos submetidos a transplante renal, encontraram 7 (37%) indivíduos co-infectados. Em nosso estudo pudemos observar uma alta taxa de co-infecção dos vírus JC e BK (36,62%).

Esse alto numero de co-infectados pode ser associado a uma alta exposição aos poliomavírus circulantes no meio ambiente como descrito por Fumian e colaboradores (Fumian et al., 2010).

Quanto a avaliação do perfil de excreção dos poliomavírus estudados, existem pouquíssimos trabalhos que fizeram esse tipo de estudo prospectivo, coletando amostras sequenciais dos indivíduos estudados durante um longo período.

Polo e colaboradores na Espanha coletaram amostras de 51 indivíduos adultos durante o estudo, porem o acompanhamento para verificar o perfil de excreção foi feito em somente 28 indivíduos (Polo et al., 2004). As amostras foram obtidas no dia zero, 7, 14 e 30 dias a partir da entrada do estudo, e depois no terceiro e quinto mês, diferente do nosso que contemplou uma amostra a cada 30 dias após a entrada do indivíduo no estudo até completar 6 coletas.

Uma vantagem do estudo comparado com o acima citado é o tamanho da casuística, que foi de 71 indivíduos contra 28 do estudo de Polo e colaboradores.

Apesar dessas pequenas diferenças, ambos chegaram a mesma conclusão quanto ao perfil de excreção do poliomavírus BK, havendo porem pequena divergência quanto aos resultados obtidos para o poliomavírus JC.

O vírus JC, segundo Polo e colaboradores teria como característica excreção continua em 50% da população estudada. No o presente estudo, embora a excreção contínua tenha sido frequentemente observada (42% dos indivíduos), a maioria dos indivíduos do estudo apresentou excreção esporádica (50%) ou intermitente (8%).

Estudo mais recente, realizado em 17 indivíduos de origem italiana, com 333 amostras coletadas durante um período de 3 meses, obtendo-se aproximadamente 20 amostras por indivíduo (Rossi et al., 2007) também encontrou que 50% dos indivíduos excretores do vírus JC o fazem de forma contínua, apresentando positividade em várias coletas consecutivas, divergindo, mais uma vez, dos nossos resultados.

Não pudemos encontrar uma explicação para esta diferença no perfil de excreção de nossa população quanto comparada às populações da Europa. Eventuais diferença entre os genótipos e subtipos nas diferentes regiões poderia interferir na dinâmica de excreção, mas naqueles estudos este aspecto não foi contemplado.

CONCLUSÃO

8) CONCLUSÕES

Com os achados deste estudo, podemos concluir que:

1. A incidência dos poliomavírus JCV e BKV na população estudada foi de 53,52% e 64,79% respectivamente, durante os seis meses de acompanhamento.

2. Após a análise filogenética, concluímos que os genótipos mais prevalentes do poliomavírus JC foram o genótipo 1, subtipo 1B e 3, seguidos dos subtipo 1A e genótipo 4, à semelhança do que se encontrou na Europa, em outros estudos.

3. Com relação ao poliomavírus BK, o genótipo 1, subtipo 1A foi o mais prevalente, seguido do genótipo 4 e subtipo 1B, também seguindo os padrões europeus. Contudo, foi observada importante discrepância quanto aos subtipos do genótipo 1 em comparação a um estudo brasileiro realizado no Rio de Janeiro, em receptores de transplante renal.

4. O perfil de excreção do JCV mostrou-se contínuo em 42% dos casos. Contudo, a maioria dos indivíduos apresentou excreção esporádica ou intermitente.

5. O perfil de excreção do BKV foi contínua em somente 3% dos indivíduos estudados, sendo esporádica em 80% dos casos e intermitente em 17%.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bibliografia utilizada para desenvolver o projeto de pesquisa:

Agostini HT, Ryschkewitsch CF, Stoner GL. JC virus type 1 has multiple subtypes: three new complete genomes. Journal of General Virology. 1998;79:801-805.

Agostini HT, Shishido-Hara Y, Baumhefner RW, Singer EJ, Ryschkewitsch CF, Stoner GL. JC virus type 2: definition of subtypes based on DNA sequence analysis of ten complete genomes. Journal of General Virology. 1998;79:1143-1151

Agostini HT, Ryschkewitsch CF, Stoner GL. Genotype Profile of Human Polyomavirus JC Excreted in Urine of Immunocompetent Individuals. Journal of Clinical Microbiology. 1996;34:1:159-164.

Agostini HT, Yanagihara R, Davis V, Ryschkewitsch CF, Stoner GL. Asian genotypes of JC virus in Native Americans and in a Pacific Island population: Markers of viral evolution and human migration. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1997;94:14542-14546

Agostini HT, Duckhut A, Jobes DV, Girones R, Schlunck G, et al.. Genotypes of JC virus in East, Central and Southwest Europe. Journal of General Virology. 2001;82:1221- 1331.

Allander T, Andreasson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, Persson MA, et al. Identification of a third human polyomavirus. Journal of Virology 2007;81:4130–4136.

Arthur RR. BK and JC virus infection in recipients of bone marrow transplants. Journal of Infection Diseases. 1988;158:563-569.

Arthur RR, Dagostin S and Shah KV. Detection of BK virus and JC virus in urine and brain tissue by the polymerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiology 1989;27:6:1174-1179

Barouch, D.H. and Harrison, S.C. Interactions among the major and minor coat proteins of polyomavirus. Journal of Virology 1994;68:6:3982-3989.

Becker JC, Houben R, Ugurel S, Trefzer U, Pföhler C, Schrama D. MC Polyomavirus is frequently present in Merkel Cell Carcinoma of European patients. Journal of investigative Dermatology. 2009;129:248-250

Benvegnu L, Pontisso P, Cavalletto D, Noventa F, Chemello L, Alberti A. Lack of Correlation Between Hepatitis C Virus Genotypes and Clinical Course of Hepatitis C Virus–Related Cirrhosis. Hepatology. 2003;25:1:211-215

Bialasiewicz S, Whiley DM, Lambert SB; Nissen MD, Sloots TP. Detection of BK, JC, WU, or KI polyomaviruses in faecal, urine, blood,

cerebrospinal fluid and respiratory samples. Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology. 2009;45:3:249-254

Brinkman JA, Rahmani MZ, Jones WE, Chaturvedi AK, Hagensee ME. Optimization of PCR based detection of human papillomavirus DNA from urine specimens. Journal of Clinical Virology. 2004;29:4:230–240

Brown P, Tsai T, Gajdusek GD. Seroepidemiology of human papovaviruses: discovery of virgin populations and some unusual patterns of antibody prevalence among remote people of the world. American Journal of Epidemiology. 1975;102:331- 340.

Cabello V, Margarit N, Díaz Pedrero M, Bernal G, Pereira P, Gentil MA., Treatment of BK virus-associated nephropathy with Cidofovir in renal transplantation. Transplantation Proceedings. 2008;40:9:2930-2.

Chakravarti A, Dogra G, Verma V, Srivastava AP. Distribution pattern of HCV genotypes & its association with viral load. Indian Journal of Medical Research. 2011;133:3:326:331

Chang, D., Haynes, J.I., 2nd, Brady, J.N. and Consigli, R.A. Identification of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP2. Virology 1992;191:978-983

Chen XQ, Bulbul M, de Grast GC, et al., Immunogenicity os two versus three injections of inactivated hepatitis A vaccine in adults. Journal of Hepatology. 1997;26:2:260-264.

Chen Q, Zheng HY, Zhong S, et al.. Subtype IV of the BK polyomavirus is prevalent in East Asia. Archives of Virology. 2006;151:2419-2429

Chiaramonte M, Majori S, Ngatchu T et al., Two differences dosages of yeast deriver recombinant hepatitis B vaccines: a comparison of immunogenicity. Vaccine. 1996;14:2:135-137.

Chima SC, Ryschkewitsch CF, Fan KJ, Stoner GL. Polyomavirus JC genotypes in an urban United States population reflect the history of African origin and genetic admixture in modern African Americans. Human Biology. 2000;72:5:837-50.

Chou Q, Russell M, Birch DE, Raymond J, Bloch W. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. Nucleic Acids Research. 1992;20:1717-1723.

Ciappi S, Azzi A, DE Santis R, Leoncini F, Sterrantino G, Mazzota F, Mecocci L. Archetypal and rearranged sequences of human polyomavirus JC transcription control region in peripheral blood leukocytes and in cerebrospinal fluid. Journal of General Virology. 1999;80:1017-1023.

Cinque P, Koralnik IJ, Gerevini S, Miro JM, Price RW. Progressive multifocal leukoencephalopathy in HIV-1 infection. Lancet Infection Diseases. 2009;9:10:625-36

Daniel AM, Swenson J, Mayreddy RP, Khalili K, Frisque RJ. Sequences within the early and late promoters of archetype JC virus restrict viral DNA replication and infectivity. Virology. 1996;216:90-101.

Darbinyan A, Darbinian N, Safak M, Radhakrishnan S, Giordano A, Khalili K. Evidence for dysregulation of cell cycle by human polyomavirus, JCV, late auxiliary protein. Oncogene. 2002;21:5574-5581.

Darbinyan A, Siddiqui KM, Slonina D, Darbinian N, Amini S, White MK, Khalili K. Role of JC virus agnoprotein in DNA repair. Journal of Virology 2004;78:8593- 8600.

D'Hauwers K, Depuydt C, Bogers JP, et al., Urine versus brushed samples in human papillomavirus screening: study in both genders. Asian Journal of Andrology. 2007;9:705–710

Delbue S., Branchetti E., Bertolacci S., et al.. JC virus VP1 loop-specific polymorphisms are associated with favorable prognosis for progressive multifocal leukoencephalopathy. Journal of Neurovirology. 2009;15:1:51.

Domingues JT, De Paris F, Schmitt VM. Proposta da reação em cadeia da

polimerase (PCR) semi-nested para pesquisa e diferenciação dos vírus BK e JC. Scientia Medica. 2007;17:2:72-78

Dorries K, Vogel E, Gunther S, Czub S. Infection of human polyomaviruses JC and BK in peripheral blood leukocytes from immunocompetent individuals. Virology. 1994;198:59-70.

Dorries K. Virus-host interactions and diagnosis of human polyomavirus-associated disease. Intervirology. 1996;39:165-175

Dubois V., Dutronc H., Lafon M.E., et al.. Latency and reactivation of JC virus in peripheral blood of human immunodeficiency virus type 1- infected patients. Journal of Clinical Microbiology, 1997;35:2288-2292.

Dyson N, Bernards R, Friend SH, et al. Large T antigens of many polyomaviruses are able to form complexes with the retinoblastoma protein. Journal of Virology 1990;64:3:1353-1356

Egli A, Infanti L, Dumoulin A, Buser A, et al.. Prevalence of Polyomavirus BK and JC Infection and Replications in 400 Healthy Blood Donors.The Journal of Infectious Diseases. 2009;199:6:837-846

Elphick F, Querbes W, Jordan JA, Gee V, Eash S, Manley K, et al., The human polyomavirus, JCV, uses serotonin receptors to infect cells. Science. 2004;306:1380-1383.

Feng H, Shuda M, Chang Y and Moore PS. Clonal Integration of a Polyomavirus in Human Merkel Cell Carcinoma. Science. 2008;319:5866:1096-1100

Ferrante P, Delbue S, Pagani E, Mancuso R, Marzocchetti A, Borghi E. et al. Analysis of JC virus genotype distribution and transcriptional control region rearrangements in human immunodeficiency virus-positive progressive multifocal leukoencephalopathy patients with and without highly active antiretroviral treatment. Journal of Neurovirology. 2003;9:1:42-46.

Fink MCDS, Penalva de Oliveira AC, Milagres FAP et al. JC vírus DNA in cerebrospinal fluid samples from Brazilian aids patients with focal brain lesions without mass effect. Journal of Infection. 2006;52:1:30-36.

Fink MC, de Oliveira AC, Romano CM, et al., Molecular characterization of human polyomavirus JC in Brazilian AIDS patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. Journal Clinical Virology. 2010;48:1:6-10

Fishman JA. BK virus nephropathy-polyomavirus adding insult to injury. New England Journal of Medicine 2002;347:527-530.

Flaegstad T, Sundsfjord A, Arthur RR, Pedersen M, Traavik T, Subramani S. Amplification and sequencing of the control regions of BK and JC virus from human urine by polymerase chain reaction. Virology. 1991;180:2:553-60.

Frisque RJ. Nucleotide sequence of the region encompassing the JC virus origin of DNA replication. Journal of Virology. 1983;46:1:170-176.

Fumian TM, Guimarães FR, Pereira Vaz BJ et al., Molecular detection, quantification and characterization of human polyomavirus JC from waste water in Rio De Janeiro, Brazil. Journal of Water Health. 2010;8:3:438-445

Gallia L, Houff A, Major O, Khalili K. Review: JC virus infection of lymphocytes-revisited. Journal of Infection Diseases. 1997;176:1603-1609.

Gardner SD, Field AM, Coleman DV, et al. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. Lancet. 1971;297:7712:1253-1257.

Gardner S. D. Prevalence in England of antibody to human polyomavirus (BK). British Medical Journal. 1973;1:77-78.

Garneski KM, Warcola AH, Feng Q, et al. Merkel cell polyomavirus is more frequently present in North American than Australian Merkel cell carcinoma tumors. Journal of Investigative Dermatology. 2009;129:1:246-248.

Gopalkrishna V, Aggarwal N, Malhotra VL et al., Chlamydia trachomatis and human papillomavirus infection in Indian women with sexually transmitted diseases and cervical precancerous and cancerous lesions. C linical

Microbiology and Infection, 2000;6:2:88-93

Gosert R, Rinaldo C.H., Fubk G.A., Egli A., et al., Polyomavirus BK with rearranged noncoding control region emerge in vivo in renal transplant patients and increase viral replication and cytopathology. The Journal of Experimental Medicine. 2008;205:4:841-852

Green MS, Shohat T, Lerman Y et al., Sex differences in the humoral antibody response to live measles vaccine in young adults. International Journal of Epidemiology. 1994;23:5:1078-81

Grinnell B.W., Padgett B.L., Walker D.L. Comparision of infectious JC virus DNAs cloned from human brain. Journal of Virology. 1983;45:299- 308.

Guo J., Kitamura T., Ebihara H., Sugimoto C.,et al., Geographical distribution of the human polyomavirus JC types A and B and isolation of a new type of Ghana. Journal of General Virology. 1996;77:919- 927

Guo J., Sugimoto C., Kitamura T., Ebihara H. et al., Four geographically distinct genotypes of JC virus are prevalente in China and Mongolia: implications for the racial composition of modern China. Journal of General Virology. 1998;79:2499-2505.

Hatwell J.N. & Sharp P.M. Evolution of human polyomavirus JC. Journal of general Virology 2000;81:1191-1200.

Hilton R & Tong CY. Antiviral therapy for polyomavirus-associated nephropathy after renal transplantation. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2008;62:5:855-9.

Hino K, Sainokami S, Shimoda K, Iino S, et al.. Genotypes and titers of hepatitis C virus for predicting response to interferon in patients with chronic hepatitis C. Journal of Medical Virology 1994;42:3:299-305.

Hirsch HH, Steiger J. Polyomavirus BK. Lancet Infection Diseases. 2003;3:10:611-623.

Hoppe BL, Conti-Tronconi BM, Horton RM. Gel-loading dyes compatible with PCR. Biotechniques. 1992;12:5:679-80

Ikegaya H, Motani H, Saukko P, Sato K, Akutsu T, Sakurada K. Bk virus genotype distribuition offers information of tracing the geographical origins of unidentified cadaver. Forensic Science International 2007;173:1:41-46

Jeffers LK, Madden V, Webster-Cyriaque J. BK virus has tropism for human salivary gland cells in vitro: Implications for transmission. Virology. 2009 doi:10.1016/j.virol.2009.07.022

Jin L, Pietropaolo V, Booth JC, Wark KH, Brown DW. Prevalence and distribuition of BK virus subtype in healthy people and immunocompromised

patients detected by PCR-restriction enzymes analysis.Clinical and Diagnostic Virology. 1995;3:3:285-295

Jobes, D. V., Chima, S. C., Ryschkewitsch, C. F. & Stoner, G. L.. Phylogenetic analysis of 22 complete genomes of the human polyomavirus JC virus. Journal of General Virology 1998;79:2491-2498.

Jobes D.V., Friedaender J.S., Mgone C.S., Agostini H.T., Koki G., Yanagihara R. New JC virus (JCV) genotypes from Papua New Guinea and Micronesia (Type 8 and Type 2E) and evolutionary analysis of 32 complete JCV genomes. Archives of Virology. 2001;146:2097- 2113.

Johne R., Buck C.B., Allander T., Atwood W.J., Garcea R.L., et al., Taxonomical developments in the Family Polyomaviridae. Archives of Virology 2011;156:1627-1634.

Kalvatchev Z, Slavov S, Shtereva M, Savova S. Reactivation of Polyomavirus hominis 1 (BKV) during pregnancy and the risk of mother-to-child transmission. Journal of Clinical Virology 2008;43:3:328–329.

Kmieciak D, De ̨bicki S, and Trzeciak WH. Occurrence Rate and Genotype Distribution of the JC Virus (JCV) in a Sample From the Polish Population. Journal of Medical Virology 2008;80:1079–1083

Kean JM, Rao S, Wang M, Garcea RL. Soroepidemiology of Human Polyomavirus.PLoS Pathogens. 2009;5:3:e1000363:1-10

Kinnaird AN, Anstead GM. Hemorrhagic cystitis and possible neurologic disease from BK virus infection in a patient with AIDS. Infection. 2010;38:2:124-7.

Kitamura T, Kinutake T, Guo J, Tominaga T, Kawabe K, Yogo Y. Transmission of the Human Polyomavirus JC Virus Occurs both within the Family and Outside the Family. Journal of Clinical Microbiology. 1994;32:10:2359-2363

Knowles WA. The epidemiology of BK Virus and the occurrence of antigenic and genomic subtypes. In: Khalili K, Stoner GL, eds. Human polyomaviruses: molecular and clinical perspectives. New York: Wiley-Liss. 2001;527–559.

Krumbholz A, Zell R, Egerer R, et al.. Prevalence of BK Virus Subtype I in Germany. Journal of medical virology. 2006;78:12:1588–1598.

Krumbholz A, Bininda-Emonds ORP, Wutzler P, Zell R.Evolution of four BK virus subtypes. Infection, Genetics and Evolution. 2008;8:632–643

Kusne S, Vilchez R, Zanwar P, Quiroz J, et al., Polyomavirus JC Urinary Shedding in Kidney and Liver Transplant Recipients Associated With Reduced Creatinine Clearance. Journal of Infectious Diseases. 2012;206:875–880

Lazcano-Ponce E, Herrero R, Muñoz N, Hernandez-Avila M, Salmerón J, Leyva A, Meijer CJ, Walboomers JM. High prevalence of human papillomavirus infection in Mexican males: comparative study of penile-urethral swabs and urine samples. Sexually Transmitted Diseases. 2001;2:85:277-280

Liaw YG, Chen CH, Shu KH, Fang CY, Ou WC, et al., Recombined sequences between the non-coding control regions of JC and BK viruses found in the urine of a renal transplantation patient. Virus Genes. 2012. DOI 10.1007/s11262-012-0815-9

López-Labrador FX, Ampurdanés S, Forns X, et al.. Hepatitis C virus (HCV) genotypes in Spanish patients with HCV infection: relationship between HCV genotype 1b, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Journal of Hepatology. 1997;27:6:959-965

Luo C, Bueno M, Kant J, Randhawa P. Biologic Diversity of Polyomavirus BK Genomic Sequences: Implications for Molecular Diagnostic Laboratories. Journal of Medical Virology. 2008;80:10:1850-1857

Machado DM, Fink MC, Pannuti CS, Succi RCM, Machado AA, Carmo FB, Gouvêa AFB, Urbano PR, et al.. Human polyomaviruses JC and BK in the urine of Brazilian children and adolescents vertically infected by HIV. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2011;106:8:931-935

Major EO., Amemiya K., Tornatore CS., Houff SA., Berger JR. Pathogenesis and molecular biology of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC

virus-induced demyelinating disease of the human brain. Clinical Microbiology Reviews. 1992;5:49-73.

Matos A, Duque V, Beato S, da Silva JP, Major E, Melico-Silvestre A. Characterization of JC human polyomavirus infection in a Portuguese population. Journal of Mededical Virology. 2010;82:3:494-504.

Milokanis E, Goes N, Rubin RH, et al. BK virus in solid organ transplant recipients: an emerging syndrome. Transplantation. 2001;72:10:1587-1592.

Moens U, Ludvigsen M, and Van Ghelue M. Human Polyomaviruses in Skin Diseases. Pathology Research International. 2011;123491. doi:10.4061/2011/123491

Moens U, Johansen T, Johnsen JI, Seternes OM, Traavik T. Noncoding control region of naturally occurring BK virus variants: sequence comparison and functional analysis. Virus Genes 1995;10:261–275.

Mullane KP, Ratnofsky M, Cullere X and Schaffhusen B. Signaling from Polyomavirus Middle T and Small T Defines Different Roles for Protein Phosphatase 2A. Molecular and Cellular Biology. 1998;18:12:7556-7564

Nishimoto T, Takasaka T, Hasengawa M, et al.. Evolution of BK Virus Based on Complete Genome Data. Journal of Molecular Evolution. 2006;63:3:341-352

Nishimoto T, Zheng HY, Zhong S, Ikegaya H, et al.. An Asian Origin for Subtype IV BK Virus Based on Phylogenetic Analysis .Journal of Molecular Evolution. 2007;65:1:103-111

Olsen GH, Andresen PA, Hilmarsen HT, et al.. Genetic variability in BK Virus regulatory regions in urine and kidney biopsies from renal-transplant patients. Journal of Medical Virology. 2006;78:3:384-393.

Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. Lancet. 1971;1:7712:1257-60.

Padgett BL and Walker DJ. Prevalence of antibodies in human sera against JC virus, an 123aulo123e from a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. Journal of Infection Diseases. 1973;127:467-470.

Pagani E, Delbue S, Mancuso R, Borghi E, Tarantini L, Ferrante P. Molecular analysis of JC virus genotypes circulating among the Italian healthy population. Journal of Neurovirology. 2003;9:5:559-566.

Pal A, Sirota L, Maudru T, Peden K, Lewis Jr A. Real-time, quantitative PCR assays for the detection of virus-specific DNA in samples with mixed populations of polyomaviruses. Journal of Virology Methods. 2006;135:32-42

Pallas DC, Shahik LK, Martin BL, Jaspers S et al., Polyoma small and middle T antigens and SV40 small t antigen form stable complexes with protein phosphatase 2A. Cell. 1990;60:1:167-176

Pang PS, Planet PJ, Glenn JS. The Evolution of the Major Hepatitis C Genotypes Correlates with Clinical Response to Interferon Therapy. PLoS ONE. 2009;4:8:e6579. doi:10.1371/journal.pone.0006579

Pietropaolo V, Di Taranto C, Degener AM, Jin L, Sinibaldi L, Baiocchini A, et al. Transplacental transmission of human polyomavirus BK. Journal of Medical Virology. 1998;56:4:372-376.

Polo C, Pérez JL, Mielnichuck A, Fedele CG, Niubò J, Tenorio A. Prevalence and patterns of polyomavirus urinary excretion in immunocompetent adults and children. Clinical Microbiology and Infection. 2004;10:7:640-644

Pulitzer MP, Amin BD, Busam KJ. Merkel Cell Carcinoma Review. Advances in Anatomic Pathology 2009;16:3:135-144.

Rajpoot DK, Gomez A, Tsang W, Shanberg A. Ureteric and urethral stenosis: A complication of BK virus infection in a pediatric renal transplant patient. Pediatric Transplantation 2007;11:4:433–435

Randhawa PS, Rehman KK, Swalsky PA, Vats A, Scantlebury V, Shapiro R, et al. DNA sequencing of viral capsid protein VP-1 region in patients with BK

virus interstitial nephritis. Transplantation. 2002;73:7:1090-4.

Randhawa P, Ho A, Shapiro R et al. Correlates of quantitative measurement of BK polyomavirus (BKV) DNA with clinical course of BKV infection in renal transplant patients. Journal of Clinical Microbiology. 2004;42:1176–1180.

Resnick J. and Shenk T. Simian virus 40 agnoprotein facilitates normal nuclear location of the major capsid polypeptide and cell-to-cell spread of virus. Journal of Virology 1986;60:1098-1106

Rodrigues C, Pinto D, Medeiros R. Molecular Epidemiology Characterization of the Urinary Shedding of polyomavirus in Healthy Individuals from Portugal – A Southern European Population. Journal of medical virology. 2007;78:8:1194-1198

Rossi A,. Delbue S., Mazziotti R., Valli M., Borghi E., Mancuso R., Calvo M. G., Ferrante P. Journal of Medical Virology vol. 2007;79:4:408 - 412

Safak M, Barruco R, Darbinyan A, Okada Y, Nagashima K, Khalili K. Interaction of JC agnoprotein with T antigen modulates transcription and replication of the viral genome in glial cels. Journal of Virology. 2001;75:1476-1486.

Schaffer K, Sheehy N, Coughlan S, Bergin C, Hall WW. JC virus in the Irish population: Significant increase of genotype 2 in immunocomromised individuals. Journal of Neurovirology. 2006;12:39–46.

Scuda N, Hofmann J, Calvignac-Spencer S, Ruprecht K, Liman P, Kühn J, Hengel H, Ehlers B. A novel human polyomavirus closely related to the african green monkey-derived lymphotropic polyomavirus. Journal of Virology. 2011;85:9:4586-4590.

Seganti L, Mastromarino P, Superti F, Sinibaldi L, Orsi N. Receptors for BK virus on human erythrocytes. Acta Virologica 1981;25:177-181

Seif, I., Khoury, G. and Dhar, R. The genome of human papovavirus BKV. Cell 1979;18:963-977.

Sinibaldi L, Goldoni P, Pietropaolo V, Longhi C, Orsi N. Involvement of gangliosides in the interaction between BK virus and Vero cells. Archives of Virology. 1990;113:291-296.

Shames RS. Gender diferences in the development and function of the imune system. Journal of Adolescent Health. 2002;30:4:59-70.

Stratton K, Almario DA, McCormick MC: Immunization Safety Review: SV40 Contamination of Polio Vaccine and Cancer. Washington, DC: The National Academies Press; 2003.

Sundsfjord A, Spein A, Lucht E, Et Al., Detection of BK Virus dna In nasopharyngeal aspirates from Children With Respiratory Infections But Not

In Saliva From Immunodeficient And Immunocompetent Adult Patients. Journal Of Clinical Microbiology. 1994;32:5:1390-1394

Takasaka T, Goya N, Tokumoto T, Tanabe K, et al., Subtypes of BK virus prevalent in Japan and variation in their transcriptional control region. Journal of General Virology. 2004;85:2821–2827

Tanaka K, Hori T, Hatakeyama N, et al.. Occurrence of the African subgroup (Ia) of BK polyomavirus in younger Japanese children. Microbiology and Immunology. 2009;53:319-322

Thompson JD, et al., CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research. 1997;25:24:4876-4882.

Vanchiere JA, Nicome RK, Greer JM, Demmler GJ, Butel JS. Frequent detection of polyomaviruses in stool samples from hospitalized children. Journal of Infectious Diseases. 2005;192:658-664.

Vanchiere JA, Abudayyeh S, Copeland CM, Lu LB, Graham DY, Butel JS. Polyomavirus shedding in the stool of healthy adults. Journal of Clinical Microbiology. 2009;47:2388-2391

van der Meijden E, Janssens RWA, Lauber C, Bouwes Bavinck JN, Gorbalenya AE, et al. Discovery of a New Human Polyomavirus Associated with Trichodysplasia Spinulosa in an Immunocompromized Patient. PLoS

Pathogens 2010;6:7:e1001024. doi:10.1371/journal.ppat.1001024

Viscidi RP e Shah KV. A skin cancer virus?. Science. 2009;319:5866:1049-1050.

Yamakawa Y, Sata M, Suzuki H, et al., Higher elimination rate of hepatites C virus among women. Journal of Viral Hepatitis. 1996;3:6:317-321.

Yogo Y, Zhong S, Suzuki M, Shibuya A, Kitamura T. Occurrence of the European Subgroup of Subtype I BK Polyomavirus in Japanese-Americans Suggests Transmission outside the Family. Journal of Virology. 2007;81:23:13254-13258

Yogo Y, Kitamura C, Sugimoto T, Ueki Y, Aso K, Taguchi F. Isolation of a possible archetypal JC virus DNA sequence from nonimmunocompromised individuals. Journal of Virology. 1990;29:2130-2138.

Zalona AC, Lopes GS, Schrago CG, Gonçalves RT, Zalis MG, Varella RB. Molecular characterization of BK polyomavirus subtypes in renal transplant recipients in Brazil. Journal of Medical Virology. 2011;83:8:1401-1405

Zheng H-Y, Nishimoto Y, Chen Q, Hasegawa M, Zhong S, et al.. Relationships between BK vírus lineages and human populations. Microbes and Infection. 2007;9:2:204-213

Zhong S, Randhawa PS, Ikegaya H, Chen Q, Zheng H-Y, et al.. Distribution patterns of BK polyomavirus (BKV) subtypes and subgroups in American, European and Asian populations suggest co-migration of BKV and the human race. Journal of General Virology. 2009;90:144-152.

Zhong S, Jeong BH, Ikegaya H, Kim YS, Xu Y,et al.. Comparison of the distribution patterns of BK poliomavírus lineages among China, Korea and Japan: Implications forhuman migrations in northeast Asia. Microbiology and Immunology. 2009;53:266-276

Zhong S, Zheng H, Suzuki M, et al.. Age-related urinary excretion of BK polyomavirus by nonimmunocompromised individuals. Journal of Clinical Microbiology. 2007;45:1:193-198

Zwickl, DJ. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Ph.D. dissertation, 2006 The University of Texas at Austin.

ANEXOS

10) ANEXOS

Anexo 1 – Aprovação do comitê de ética do Instituto de Medicina Tropical

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil
Telefone:(55-11)3061-7066/8650 e 3064-5132 FAX: (55-11) 3064-5132 e 3062-2174
e-mail: cpq-imt@usp.br

São Paulo, 31 de março de 2010.

Ilmo. Sr.
Dr. Claudio Sergio Pannuti
Orientador
(aos cuidados de Paulo Roberto Palma Urbano)

A Comissão de Pesquisa e Comissão de Ética no Uso de Animais, do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, em reunião efetuada na presente data, analisou e **aprovou** o projeto de pesquisa **CEUA-IMT 063/2010** "Prevalência, caracterização genotípica e determinação da dinâmica de excreção do poliomavírus humano BK em amostras de urina de indivíduos saudáveis", sob a sua responsabilidade.
O presente projeto utiliza material humano (soro) e deverá ser encaminhado para a Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da FMUSP.

Atenciosamente,

Dr. Jorge Casseb
Coordenador da Comissão de Pesquisa do IMTSP

Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais do IMTSP

6/4/10

Anexo 2 – Aprovação do comitê de ética do Hospital das Clinicas – CAPPesq

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

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 11/05/2011, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0032/11**, intitulado: "**PREVALÊNCIA, CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA E DETERMINAÇÃO DA DINÂMICA DE EXCREÇÃO DO POLIOMAVÍRUS HUMANO BK EM AMOSTRAS DE URINA DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS**", apresentado pelo Departamento de **MEDICINA TROPICAL**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Claudio Sérgio Pannuti**
Pesquisador (a) Executante: **Paulo Roberto Palma Urbano**

CAPPesq, 12 de Maio de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492
e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

Anexo 3 – TCLE

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

MODELO DE TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : .M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE .....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....
ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE: .....
CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. **TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA**

Prevalência, caracterização genotípica e determinação da dinâmica de excreção do poliomavírus humano BK em amostras de urina de indivíduos saudáveis

2. **PESQUISADOR** : Prof. Dr. Claudio Sergio Pannuti.

CARGO/FUNÇÃO: Pesquisador **INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL** Nº 15115 (CRM)

UNIDADE DO HCFMUSP: LIM 52 – Laboratório de Virologia IMT-USP

3. **AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA**:

RISCO MÍNIMO ☐ RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4. **DURAÇÃO DA PESQUISA** : 2 anos

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

1 – Desenho do estudo e objetivo(s)

Você está sendo convidado (a) para participar de um estudo que tem como objetivo avaliar a presença do vírus BK no sangue e na urina de indivíduos saudáveis da população geral de São Paulo. Caso você aceite participar, serão colhidas uma amostra de sangue e seis amostras de sua urina (1 coleta mensal) para verificar se você tem este vírus no seu organismo. Este vírus não causa doenças em pessoas saudáveis, mas pode provocar doença renal em pacientes submetidos a transplante de rim. O objetivo do estudo é conhecer melhor como este vírus se espalha na população de pessoas saudáveis, e deste modo, tentar encontrar formas de controlar melhor a disseminação do vírus.

2 – Descrição dos procedimentos que serão realizados, com seus propósitos e identificação dos que forem experimentais e não rotineiros;

Na entrada do estudo, será colhida uma única amostra de sangue (um tubo de 5 mL, equivalente a duas colheres de sopa) e uma amostra de urina (um frasco tipo xarope) que serão enviadas para o Laboratório de Virologia IMT/LIM52 – USP para a pesquisa do vírus BK. Em seguida, a cada mês, durante seis meses, será coletada uma amostra de urina. Estes exames são destinados exclusivamente para pesquisa, e não vão implicar em nenhum tipo de tratamento ou outra intervenção.

3 – Relação dos procedimentos rotineiros e como são realizados

Será feita a coleta de sangue da veia do braço, ou seja, após a limpeza, a pele é furada com a agulha até atingir a veia, empregando tubo de coleta a vácuo. Neste sistema o sangue flui naturalmente para o tubo. Serão coletados apenas 5 mL para o propósito desta pesquisa.

Em relação às amostras de urina, o próprio participante da pesquisa irá coletar 5mL em um frasco estéril fornecido pelo pesquisador nos dias das coletas .

4 - Autorização para armazenamento e utilização futura das suas amostras de urina e sangue para novas pesquisas.

4.1 - Quais são as razões para guardar suas amostras obtidas durante esta pesquisa?

Toda pesquisa tem como objetivo buscar resposta para algum aspecto ainda não bem conhecido de determinadas doenças. Contudo, com a rápida evolução da medicina, novos fatos e novas dúvidas estão sempre surgindo. As amostras clínicas obtidas durante uma determinada pesquisa, se guardadas de forma segura e adequada, podem ser usadas pelos investigadores para investigar estas novas questões de forma rápida e eficiente, dispensando novas coletas. Por exemplo, se esta pesquisa tem como finalidade descobrir se

um grupo de indivíduos está excretando o vírus BK na urina ou sangue e, de repente é descoberto um novo vírus que pode também ser excretado na urina, os investigadores podem, utilizando as amostras guardadas daqueles indivíduos, pesquisar este novo vírus sem necessidade de convocar novamente voluntários para a nova pesquisa

4.2 - O que envolve autorizar o armazenamento de amostras clínicas para uso futuro?

Como parte deste projeto de pesquisa você deverá colher amostras de sangue e urina para saber se vai ter ou não infecção pelo poliomavírus BK. Estas amostras, depois de colhidas e examinadas no laboratório, serão armazenadas em vez de serem desprezadas.

4.3 - O que acontecerá com as suas amostras?

Suas amostras irão para o Repositório de Amostras do Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo (LIM HC-FMUSP) e serão armazenadas de forma segura e adequada, sob responsabilidade do Prof. Dr. Claudio Sérgio Pannuti, responsável pelo Laboratório de Virologia. Estas amostras ficarão disponíveis para pesquisas futuras que poderão incluir avaliações laboratoriais extras na sua amostra, juntamente com informações clínicas obtidas durante a pesquisa original durante a qual foram coletadas estas amostras. Pode ser que estas amostras sejam utilizadas somente daqui a muitos anos, mas elas podem ajudar muitos pacientes no futuro. Qualquer projeto de pesquisa a ser realizada no futuro utilizando suas amostras deverá ser submetido à Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que irá avaliar se o estudo proposto justifica esta utilização. Antes de utilizar estas amostras, você será contatado para dar uma autorização específica para a nova pesquisa que está sendo proposta.

A autorização para guardar suas amostras no Repositório de Amostras Clínicas do Laboratório de Virologia do HC-FMUSP é inteiramente de sua escolha. Você pode decidir não autorizar o armazenamento de suas amostras. Mesmo que você decida fornecer as amostras, você pode retirar sua permissão a qualquer momento, por qualquer razão. Se você decidir retirar sua permissão suas amostras serão destruídas. No entanto, a informação já obtida de suas amostras até a sua retirada será utilizada.

Se você não der permissão para a utilização futura de suas amostras, isto não afetará de nenhuma forma sua participação no presente estudo ou seu cuidado médico atual.

Seu médico pode retirar sua autorização para o Projeto de Repositório de Amostras Clínicas por qualquer razão, como por exemplo, se for difícil coletar seu sangue.

5 – Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos dos itens 2 e 3;

Não se espera risco em relação aos procedimentos desta pesquisa, mas pode haver algum pequeno desconforto causado pela picada da agulha no antebraço na coleta de sangue, podendo aparecer uma pequena mancha roxa no local da picada, que irá

desaparecer sozinha.

6 – Benefícios para o participante

Não há benefício direto para o participante. Contudo, este estudo pode ajudar os médicos a compreender melhor a circulação do vírus BK na população saudável, o que pode ajudar a controlar sua disseminação em centros de transplante de rim.

7 – Relação de procedimentos alternativos que possam ser vantajosos, pelos quais o paciente pode optar;

Não se aplica.

8 – Garantia de acesso

Em qualquer etapa do estudo, o Sr. (a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de suas dúvidas. O investigador principal é o Prof. Dr. Claudio Sérgio Pannuti que pode ser encontrado no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo na Rua Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 470, 2º andar, CEP 05403-000 Telefone(s) 11 3061 7012 ou 3061 7020, ramal 104 e-mail cpannuti@usp.br, ou ainda com o aluno Paulo Roberto Palma Urbano, no mesmo endereço e telefone, e-mail purbano@usp.br. Se o sr. (a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

9 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;

Você pode, a qualquer momento, retirar-se da pesquisa, sem que haja qualquer prejuízo para seu acesso e atendimento na Instituição.

10 – Direito de confidencialidade

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;

11 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

Embora o resultado da pesquisa do vírus BK em suas amostras não tenham valor clínico, você pode, caso queira, saber o resultado dos exames através dos pesquisadores responsáveis.

12 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo.

Não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

13 - Os pesquisadores se comprometem a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

14 – "Acredito ter sido suficientemente esclarecido a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo". Prevalência, caracterização genotípica e determinação da dinâmica de excreção do poliomavírus humano BK em amostras de urina de indivíduos saudáveis.

Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes.

Assinatura do paciente/representante legal	Data ___/___/

Ficou claro também que minha participação é isenta de remuneração. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo.

Assinatura da testemunha	Data ___/___/___

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

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

Assinatura do responsável pelo estudo Data ___/___/___