

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE POLIOMAVÍRUS JC E  
BK EM URINAS DE PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS E DE  
INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS & EM ÁGUAS SUPERFICIAIS DE PORTO  
ALEGRE, BRASIL.**

JULIANA COMERLATO  
Bacharel em Biomedicina

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil  
Novembro de 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE POLIOMAVÍRUS JC E  
BK EM URINAS DE PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS E DE  
INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS & EM ÁGUAS SUPERFICIAIS DE PORTO  
ALEGRE, BRASIL.**

JULIANA COMERLATO  
Bacharel em Biomedicina

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola e do Ambiente  
como um dos requisitos para a  
obtenção do Grau de Mestre em  
Microbiologia do Ambiente.

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil  
Novembro de 2012

CIP - Catalogação na Publicação

Comerlato, Juliana  
DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE  
POLIOMAVÍRUS JC E BK EM URINAS DE PACIENTES  
TRANSPLANTADOS RENAIIS E DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS & EM  
ÁGUAS SUPERFICIAIS DE PORTO ALEGRE, BRASIL. /  
Juliana Comerlato. -- 2012.  
87 f.

Orientador: Ana Cláudia Franco.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. JC Poliomavírus. 2. BK Poliomavírus. 3.  
Pacientes transplantados renais. 4. Águas  
superficiais. 5. Nested PCR. I. Franco, Ana Cláudia,  
orient. II. Título.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço àquela que amenizou minhas inseguranças e que mesmo com a distância foi capaz de clarear minhas dificuldades me conduzindo às melhores escolhas. Obrigada mãe, por se fazer tão presente na minha vida, por me amar e me guiar a esta conquista.

Ao meu pai, que no período de realização deste mestrado dividiu comigo situações e experiências que vieram a nos fortalecer. Obrigada pai por acreditar em mim e me acompanhar sempre.

Ao Erol, que se tornou mais que um amigo, sempre preocupado com minha instalação em Porto Alegre e procurando me auxiliar. Muito obrigada pelo teu carinho, tu és um querido.

Ao Adriano, que sempre está comigo, fazendo-se presente através de suas mensagens e ligações de carinho semanais, e também por participar de mais essa etapa da minha vida profissional.

A mais amada orientadora, professora Ana Cláudia, obrigada por fazer do laboratório de virologia um lugar de tantos aprendizados. Por permitir que eu desenvolvesse habilidades acadêmicas e contribuir com elas. Por fortalecer as minhas qualidades e auxiliar na correção das minhas faltas. Obrigada também por ensinar a praticidade das situações e por me apoiar e acreditar em mim.

Ao professor Paulo Roehe, agradeço por participar e proporcionar a concretização deste mestrado. Pelo interesse na minha carreira acadêmica e o auxílio constante.

Ao professor Fernando Spilki, o responsável inicial pela escolha deste caminho, obrigada por continuar me orientando e acompanhando, e também pelas colaborações.

Ao Fabrício, obrigada por disponibilizar tanto tempo e atenção comigo, por ser paciente e chato, me orientando e me instigando a buscar tudo aquilo que eu desconhecia.

A Thalita, sempre capaz de demonstrar sua amizade por mim me auxiliando nos mais diversos momentos. Obrigada minha amiga e colega, pelo companheirismo destes anos, pelo carinho e paciência comigo, por levantar meu astral e fazer parte da minha vida.

A Marthinha que me acolheu nesta instituição ainda em 2008, me ensinando detalhe por detalhe de tudo que ela conhecia, por repetir tantas vezes as mesmas coisas e pelo espírito alegre e tranquilo que ela sempre distribuiu pelo laboratório.

A Lilian e principalmente ao Marcos, por terem contribuído tanto com o desenvolvimento prático deste trabalho. Por vestirem a camisa de IC e me surpreenderem fazendo mais do que eu esperava, empenhando-se neste trabalho.

A todos colegas de laboratório, em especial Thalita, Esmaille, Martha, Fabrício, Marcos, Fernando, Lucas, Elesbão e Gustavo, por fazerem do laboratório além de um local de trabalho e estudo, um ambiente adorável, permitindo construir um conhecimento cheio de senso de humor. Obrigada inclusive por serem capazes de me fazer rir mesmo quando eu achava ter a certeza de que o termociclador estivesse boicotando minhas PCRs.

Ao meu namorado Marcos, que participou intensamente da etapa final deste trabalho e em pouco tempo dividiu comigo muitas experiências. Obrigada amor por assumir essa bronca, por me fazer rir tão facilmente e por querer e fazer tanto por mim.

A querida Mariana, a qual sempre acreditou em mim e contribuiu para as minhas escolhas acadêmicas. Obrigada Mari por ser essa parceira maravilhosa. Me orgulho muito de termos podido trocar tantos conhecimentos.

Às colegas de estudo e diversão, Cris, Themis, Thai, Tiane, Mica, Ana, Fran, Elis e Nai, obrigada por fazerem deste período de estudo tão mais feliz.

Ao seu Reni por durante estes quase dois anos ter sido um anjo da guarda. Se preocupando comigo e me destrancando de casa sempre que necessário.

A vizinha e colega Mica por me acolher com tanto carinho e se preocupar inclusive com minha alimentação.

As amigas Roberta e Lu e também as gringas Karen, Francine, Fernanda, Casali e Paulinha por entenderem a difícil escolha entre passar os finais de semana em Caxias ou Porto Alegre. Obrigada por manterem nossa amizade mesmo com minha ausência por me apoiarem e me divertirem.

Aos meus tios, tias, primos e primas por realmente acreditarem no meu potencial, pela preocupação com meu futuro e por se esforçarem para compreender a curiosa carreira acadêmica.

Aos funcionários, professores e colegas da UFRGS, meu muitíssimo obrigada pela intervenção diária na minha rotina, por acrescentar tanto na minha profissão e vida.

A Capes e a Finep agradeço pelos recursos fomentados para a realização deste estudo.

# DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE POLIOMAVÍRUS JC E BK EM URINAS DE PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS E DE INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS & EM ÁGUAS SUPERFICIAIS DE PORTO ALEGRE, BRASIL.<sup>1</sup>

Autora: Juliana Comerlato

Orientadora: Ana Cláudia Franco

## RESUMO

Os poliomavírus humanos JC (JCV) e BK (BKV) pertencentes a família *Polyomaviridae*, são ubíquos na população humana. Seguida da infecção primária, a reativação destes vírus pode ocasionar nefropatia e rejeição do enxerto em pacientes transplantados renais. Além da importância clínica desses vírus, estudos têm sido feitos em diversas regiões do mundo no sentido de avaliar a detecção de JCV e BKV como possíveis indicadores de poluição fecal em ambientes hídricos. Este interesse surgiu após ser demonstrado que esses vírus são eliminados pela urina de seres humanos, além de ter sido observado que a ausência dos marcadores microbiológicos tradicionais na água não garante a ausência de vírus neste mesmo ambiente. Este estudo foi conduzido para acessar a distribuição e circulação do JCV e BKV em pacientes transplantados renais e indivíduos saudáveis e em águas superficiais de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Para alcançar este objetivo duas reações em cadeia da polimerase do tipo *nested* (nPCRs) foram otimizadas. Dentre as amostras clínicas 92 urinas constituíram o grupo de pacientes transplantados renais, enquanto que 88 urinas foram coletadas de indivíduos saudáveis, estabelecendo o grupo controle. As amostras ambientais foram coletadas de um grande corpo hídrico, o Arroio Dilúvio, e da maior estação de tratamento de esgoto (ETE) da região, a ETE São João – Navegantes, ambos localizados em Porto Alegre. Desta amostragem, 14 foram coletadas no arroio e 16 na ETE, totalizando 30 amostras de águas superficiais. O DNA das amostras foi extraído e submetido às nPCRs. Os produtos de amplificação foram selecionados, sequenciados e submetidos à análise filogenética. Entre as amostras de urina, o DNA de BKV foi encontrado em maior frequência nos pacientes transplantados renais (65,2 %) do que nos indivíduos saudáveis (32,9 %) ( $p < 0,001$ ). Por outro lado o JCV foi igualmente detectado em ambos os grupos de indivíduos. Considerando todas as amostras de água analisadas, 40 % foram positivas para JCV, enquanto 20 % foram positivas para BKV. Todos os genótipos de JCV e BKV encontrados nas amostras de água foram também encontrados nas amostras de urina, enquanto o contrário não foi observado. Este trabalho reforçou a importância da detecção do BKV em transplantados renais para impedir o desenvolvimento de complicações pós-transplante induzidas por este vírus. Além disso, foi demonstrada a importância dos poliomavírus, principalmente do JCV, como contaminante no ambiente hídrico, o que sugere que esse vírus poderia ser escolhido como um marcador adicional de poluição fecal de origem humana em águas superficiais.

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Microbiologia do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (106 p.) Novembro, 2012.

# MOLECULAR DETECTION AND CHARACTERIZATION OF BK AND JC POLYOMAVIRUSES IN URINE SAMPLES OF RENAL TRANSPLANT PATIENTS AND OF HEALTHY INDIVIDUALS & SUPERFICIAL WATER IN PORTO ALEGRE, BRASIL.<sup>1</sup>

Author: Juliana Comerlato

Supervisor: Ana Cláudia Franco

## ABSTRACT

The human polyomaviruses JC (JCV) and BK (BKV), members of the Polyomaviridae family, are widespread in the human population. Following the primary infection, virus reactivation may lead to nephropathy and graft rejection in renal transplant patients (RTPs). In addition, JCV and BKV have been evaluated as potential indicators of fecal pollution in environmental waters. This is particularly interesting because these viruses are excreted by human urine, and because the absence of the traditional microbial indicators of environmental does not ensure the absence of human's pathogenic viruses in water. This study was carried out to assess the distribution of BK and JC polyomaviruses in urine samples collected from RTPs and healthy individuals and in superficial waters of Porto Alegre, Rio Grande do Sul. To achieve these objectives two nested polymerase chain reactions (nPCRs) were optimized. Ninety two and 88 urine samples were collected from RTPs and healthy individuals, respectively. The environmental samples were collected from a large canalized water stream, Arroio Dilúvio, and from a large sewage treatment plant (STP), the STP São João – Navegantes, both located in Porto Alegre. Fourteen samples were collected from Arroio Dilúvio and 16 from the STP, in total 30 superficial water samples were analyzed. The viral DNA was extracted and submitted to the nPCRs. The amplicons were selected, sequenced and submitted to phylogenetic analysis. A higher frequency of BKV was found in the urine samples of RTPs (65.2 %) comparing with the control group (32.9 %) ( $p < 0.001$ ). JCV DNA was equally detected in both groups. Considering all the water samples analyzed, 40 % were JCV positive, while 20 % of the samples were BKV positive. All the JCV and BKV genotypes found in the water samples were found in the urine samples, and the opposite was not observed. This study strengthens the importance of BKV detection in RTPs to prevent the developed of pos-transplant complications. Analyzing the water samples, both polyomaviruses were found, and JCV was more frequent as a fecal contaminant, being a possible choice as an additional indicator of human fecal pollution in superficial waters.

<sup>1</sup>Master of Science dissertation in Environment Microbiology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (106 p.) November, 2012.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....</b>	<b>xi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 – Objetivo geral .....	3
1.2 – Objetivos específicos .....	3
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>4</b>
2.1 – Taxonomia .....	4
2.2 – Histórico.....	5
2.3 – Organização estrutural e genômica .....	6
2.4 – Classificação genotípica do JCV .....	8
2.5 – Classificação genotípica do BKV .....	10
2.6 – Ciclo replicativo .....	10
2.7 - Epidemiologia .....	12
2.8 – Manifestações clínicas .....	13
2.8.1 – Leucoencefalopatia multifocal progressiva.....	14
2.8.2 - Poliomavírus e oncogenicidade .....	15
2.8.3 – Estenose uretral e cistite hemorrágica.....	15
2.8.4 – Nefropatia .....	16
2.9 – Pacientes transplantados renais .....	17
2.9.1 – Poliomavírus no transplante renal .....	18
2.10 – Técnicas moleculares para detecção de JCV e BKV .....	19
2.11 – Distribuição do poliomavírus em ambientes aquáticos .....	20
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1 – Coleta das amostras .....</b>	<b>22</b>
3.1.1 – Urinas dos pacientes transplantados renais .....	22
3.1.2 – Urinas de indivíduos saudáveis .....	22
3.1.3 – Amostras de águas .....	23
<b>3.2 - Concentração e purificação das amostras.....</b>	<b>26</b>
<b>3.3 – Extração do DNA.....</b>	<b>27</b>
3.3.1 – Extração de DNA total das amostras de urina.....	27
3.3.2 – Extração das amostras de água.....	27

<b>3.4 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)</b> .....	<b>28</b>
3.4.1 – Otimização das condições de amplificação da PCR.....	28
3.4.2 – Construção do controle interno .....	29
3.4.3 – Sensibilidade da PCR .....	30
3.4.4 - Detecção de resultados falso-negativos e falso-positivos .....	30
<b>3.5 – Nested PCR para JC e BK poliomavírus</b> .....	<b>30</b>
3.5.1 – Otimização das condições de amplificação das nested PCRs.....	31
<b>3.6 – Sequenciamento dos produtos das nested PCRs</b> .....	<b>32</b>
<b>3.7 – Análise das sequências e construção das árvores filogenéticas</b> .....	<b>33</b>
<b>3.8 – Estatística</b> .....	<b>34</b>
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>35</b>
<b>4.1 – Utilização do controle interno na PCR</b> .....	<b>35</b>
<b>4.2 – Sensibilidade da PCR</b> .....	<b>35</b>
<b>4.3 – Detecção de JCV e BKV</b> .....	<b>36</b>
4.3.1 - Pacientes transplantados renais e indivíduos saudáveis .....	36
4.3.1.1 – Correlação entre presença de poliomavírus, idade e gênero dos indivíduos. ....	38
4.3.2 – Águas superficiais.....	38
<b>4.4 – Caracterização molecular do JCV e BKV nas amostras clínicas e ambientais</b> .....	<b>40</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>43</b>
<b>5.1 – Detecção do JCV e BKV em pacientes transplantados renais e indivíduos saudáveis</b> .....	<b>43</b>
<b>5.2 – Detecção do JCV e BKV em águas superficiais</b> .....	<b>45</b>
<b>5.3 – Caracterização molecular do JCV e BKV nas amostras clínicas e ambientais</b> .....	<b>50</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>54</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>55</b>
<b>APÊNDICE</b> .....	<b>72</b>
<b>VITA</b> .....	<b>74</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>75</b>

## LISTA DE TABELAS

		Página
TABELA 1	Frequência de JCV e BKV nos grupos de pacientes transplantados renais e controle.....	36
TABELA 2	Frequência de BKV e JCV nas amostras de águas coletadas no Arroio Dilúvio, Porto Alegre .....	39
TABELA 3	Deteccção de JCV e BKV nas amostras de água coletadas da ETE São João - Navegantes, Porto Alegre.....	39

## LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 Organização funcional do genoma dos poliomavírus humanos.....	7
FIGURA 2 Representação esquemática do ciclo replicativo dos poliomavírus em uma célula permissiva.....	12
FIGURA 3 Imagem de satélite de Porto Alegre demonstrando os pontos de coleta no Arroio Dilúvio.....	24
FIGURA 4 Vista aérea da estação de tratamento de esgoto ETE São João – Navegantes.....	25
FIGURA 5 Imagem do gel de agarose a 1,5 % demonstrando a amplificação de quantidades conhecidas do CI.....	36
FIGURA 6 Imagem demonstrando os produtos de amplificação das PCRs....	38
FIGURA 7 Análise filogenética da região VP1 do JC poliomavírus.....	41
FIGURA 8 Análise filogenética da região VP1 do BK poliomavírus.....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AIDS: *Acquired Immune Deficiency Syndrome* - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida  
BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*  
BKV: *BK polyomavirus*  
CI: Controle Interno  
cm: Centímetros  
DNA: *Deoxyribonucleic Acid* - Ácido Desoxirribonucleico  
EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético  
ETE: Estação de Tratamento de Esgoto  
EUA: Estados Unidos da América  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: Ácido Sulfúrico  
HPyV: *Human polyomavirus* - Poliomavírus Humanos  
ICTV: *International Committee on Taxonomy of Viruses*  
INMET: Instituto Nacional de Meteorologia  
KIV: *KI polyomavirus*  
LB: Luria Bertani  
M: Marcador  
mmHg: Milímetro de Mercúrio  
MgCl<sub>2</sub>: Cloreto de Magnésio  
min.: Minutos  
mm: milímetros  
mL: Mililitros  
mM: Milimolar  
MCV: *Merkel Cell Polyomavirus*  
MPyV: *Murine Polyomavirus*  
N: normal  
NCBI: *National Center for Biotechnology Information*  
NCCR: Região de Controle não Codificante  
ng: Nanogramas  
NaOH: Hidróxido de Sódio  
nPCR: *Nested PCR*  
°C : Graus Celsius  
p: Nível descritivo  
p.: Página  
pb: Pares de Bases  
pmol: Picomoles  
PCR: *Polimerase Chain Reaction* - Reação em Cadeia da Polimerase  
PF: *Primer Forward* – Oligonucleotídeo senso  
pH: Potencial de Hidrogênio Iônico  
PML: *Progressive Multifocal Leukoencephalopathy* - Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva  
PR: *Primer Reverse* – Oligonucleotídeo anti-senso  
PVAN: *Polyomavirus associated nephropathy* - Nefropatia Associada à Poliomavírus  
qPCR: *quantitative PCR* - PCR quantitativa  
%: Porcentagem  
rpm: Rotações por Minuto  
RS: Rio Grande do Sul  
s: Segundos  
SV40: *Simian vacuolating virus 40*

TAE: Tampão Tris-Acetato-EDTA  
tAg: Antígeno tumoral pequeno  
TAg: Antígeno tumoral grande  
truncTAg: TAg truncado  
Taq polimerase: Enzima polimerase extraída da bactéria *Thermus aquaticus*  
TE: Tampão Tris-EDTA  
UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
U: Unidade  
UV: Ultravioleta  
µg: Micrograma  
µL: Microlitro  
µm: Micrômetro  
µM: Micromolar  
VP: *Viral Protein* - Proteínas do Capsídeo Viral  
WUV: *WU Polyomavirus* - Poliomavírus WU  
X: vezes  
α: Nível de significância

## 1. INTRODUÇÃO

Os poliomavírus JC (JCV) e BK (BKV) são vírus humanos classificados no gênero *Polyomavirus*, família *Polyomaviridae* e que se encontram amplamente distribuídos em humanos. Os seus genomas são compostos de DNA de 5128 e 5153 pares de bases (pb) (JCV e BKV) e não são envelopados, apresentando baixa variabilidade genômica e alta resistência no meio ambiente. As infecções estabelecidas pelo BKV e JCV ocorrem provavelmente durante a infância e persistem indefinidamente mesmo em indivíduos saudáveis uma vez infectados. É estimado que em torno de 35 a 90 % da população mundial adulta seja soropositiva para JCV e BKV. Embora sejam encontrados em indivíduos saudáveis, esses poliomavírus têm sido comumente relacionados com infecções virais oportunistas em indivíduos imunocomprometidos. Dentre as doenças mais comumente descritas estão: a cistite hemorrágica e nefropatia, e leucoencefalopatia multifocal progressiva (PML), como consequências das infecções por BKV e JCV, respectivamente. Em pacientes transplantados renais, estes vírus, especialmente alguns genótipos de BKV, ocasionam complicações importantes, podendo levar inclusive à falência do rim enxertado. Além disso, tais poliomavírus têm demonstrado potencial oncogênico.

Dentre as diversas formas de transmissão do JCV e BKV, a via urino oral tem se destacado. Tal característica contribui na ampla distribuição destes vírus reportada por estudos sorológicos. Porém quando analisada a excreção destes vírus pela população, a frequência de positivos tende a variar, já que a imunossupressão é o gatilho para a multiplicação, e assim para a excreção, destes vírus. Determinar a viruria - excreção pela urina - do JCV e BKV em diferentes grupos de indivíduos, saudáveis ou não, pode reforçar a associação destes agentes infecciosos com a ocorrência de determinadas manifestações clínicas e a busca por ferramentas diagnósticas para detecção destes patógenos.

Considerando a principal via de excreção viral, a via urinária, e a resistência a condições ambientais adversas, esses vírus têm sido encontrados amplamente em diferentes corpos hídricos, e ambos poliomavírus têm sido investigados como possíveis marcadores de poluição cloacal e contaminação por esgoto residencial em vários países.

No Brasil, estudos sobre a distribuição dos poliomavírus vêm sendo desenvolvidos, entretanto, poucos estudos avaliaram a prevalência e caracterização do BKV e JCV em amostras de urina e de água superficiais. Estas informações geram maior preocupação quando relacionamos a variedade de doenças que estes patógenos causam com sua disseminação inapropriada em corpos hídricos de consumo humano. A detecção do JCV e BKV em amostras clínicas e ambientais é realizada basicamente por técnicas moleculares, as quais apresentam maior sensibilidade em relação às técnicas clássicas de detecção viral, e ainda eliminam o viés da dificuldade atual no

isolamento destas espécies em cultivo celular. Desta forma a detecção e caracterização do DNA do JCV e BK tanto nas amostras de urina dos pacientes transplantados e indivíduos saudáveis quanto nas amostras de águas superficiais auxiliarão no conhecimento acerca da distribuição destes vírus na população do município de Porto Alegre.

### **1.1 – Objetivo geral**

Este estudo objetivou a detecção e caracterização molecular dos poliomavírus JC e BK em amostras de urinas de pacientes transplantados renais e indivíduos saudáveis e em águas superficiais do município de Porto Alegre, iniciando um estudo da avaliação dos poliomavírus como possíveis marcadores de poluição cloacal.

### **1.2 – Objetivos específicos**

A – Padronizar reações de nested PCR para detecção e caracterização molecular dos poliomavírus JC e BK.

B – Verificar e comparar a frequência destes poliomavírus em urinas coletadas de um grupo de transplantados renais e de um grupo de indivíduos saudáveis, no município de Porto Alegre.

C – Estabelecer uma estimativa preliminar da frequência do JCV e BKV em águas superficiais, coletadas no município de Porto Alegre.

D – Caracterizar molecularmente parte das amostras de águas e urinas positivas para os vírus em estudo.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 – Taxonomia

Os poliomavírus JC (JCV) e BK (BKV) pertencem à família *Polyomaviridae* ausente de ordem e constituída de um único gênero, *Polyomavirus* (ICTV, 2011). Estes vírus foram inicialmente classificados como membros da família *Papovaviridae*, cujo nome referia-se a: papilomavírus de coelho (pa), poliomavírus murino (po) e *Simian vacuolating virus 40* (SV40) (Cole & Conzen, 2001). Atualmente, de acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), o gênero *Polyomavirus* é dividido em 13 espécies (ICTV, 2011). Até o momento cinco espécies bem descritas foram identificadas como poliomavírus humanos: poliomavírus BK (Gardner et al., 1971), poliomavírus JC (Padgett et al., 1971), poliomavírus KI (KIV) (Allander et al., 2007), poliomavírus WU (WUV) (Gaynor et al., 2007), e poliomavírus Merkel Cell (MCV) (Feng et al., 2008). Mais recentemente foram descritos outros quatro poliomavírus humanos: poliomavírus humanos 6 e 7 (HPyV6 e HPyV7) (Schowalter et al., 2010), poliomavírus associado a tricodisplasia espinosa (Van der Meijden et al., 2010) e poliomavírus humano 9 (HPyV9) (Scuda et al., 2011). Porém, as características destas espécies ainda estão sendo estudadas. Com exceção do JCV e BKV, cujos genomas apresentam muitas similaridades, os outros poliomavírus humanos parecem ser bastante distintos.

As demais espécies infectam roedores, aves, coelhos e primatas não-humanos. Esta variedade de espécies tem instigado o estudo taxonômico desta família buscando uma melhor classificação. Johne et al. (2011) sugerem a subdivisão da família *Polyomaviridae* em três gêneros: *Orthopolyomavirus* (que inclui JCV, BKV, e SV40), *Wukipolyomavirus* (contendo os novos poliomavírus humanos), e *Avipolyomavirus*, o qual infecta aves (Johne et al., 2011). Tal classificação ainda não foi assentida pelo ICTV.

## 2.2 – Histórico

O *Mouse polyomavirus*, conhecido atualmente como poliomavírus murino (MPyV), e o SV40 foram os primeiros poliomavírus descritos. O MPyV foi isolado em 1953 durante estudos em ratos que apresentavam diversos tumores (Gross, 1953; Stewart, 1955), sendo essa característica a responsável pelo uso da palavra polioma; *poly* – muitos e *oma* – tumor. Já o SV40 foi reportado pela primeira vez em 1960 como um contaminante presente nos estoques das vacinas de poliomielite viral (Sweet & Hilleman, 1960). Desde sua descoberta, ambos os vírus têm sido utilizados extensivamente como modelos de estudo da replicação viral de membros dessa família. Oncogênese e outros mecanismos celulares também foram descritos baseados em estudos realizados com estes vírus, principalmente pelo fato de apresentarem propriedades oncogênicas e seu genoma se assemelhar ao ácido desoxirribonucleico (DNA) minicromossomal (Hundesha et al., 2006).

Em 1971, foram descritos os primeiros poliomavírus que infectam somente humanos, JCV e o BKV. Eles receberam este nome em função das iniciais dos pacientes dos quais eles foram isolados pela primeira vez (Gardner

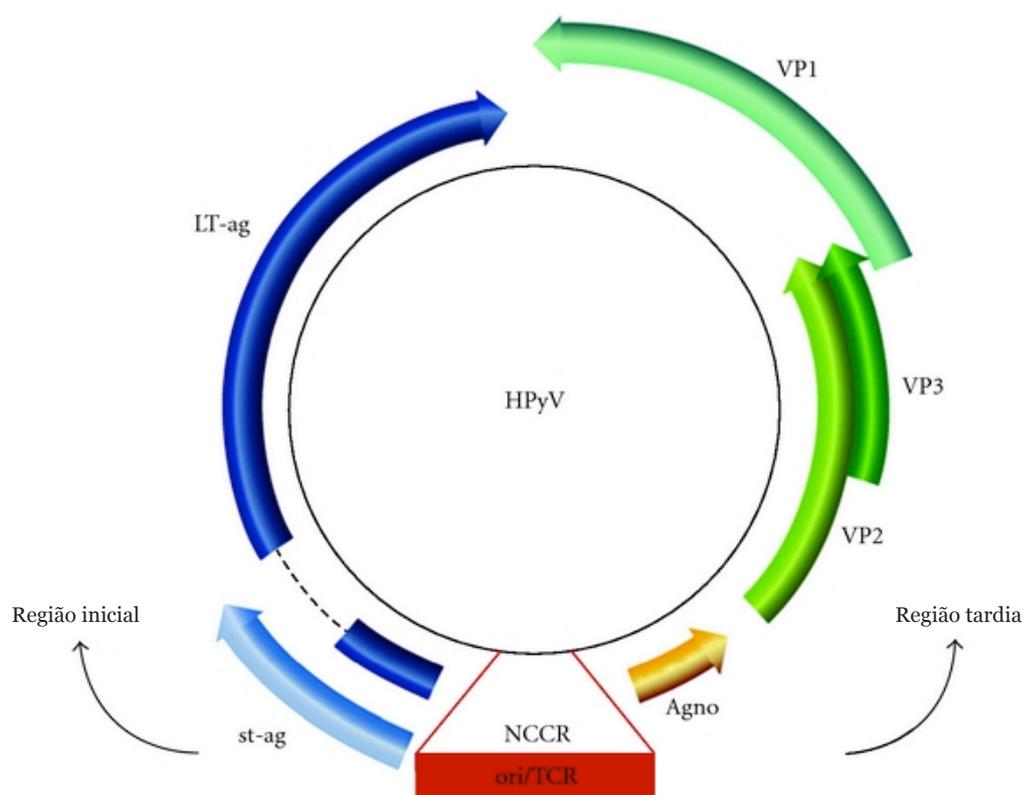
et al., 1971; Padgett et al., 1971). O JCV foi isolado a partir do tecido cerebral de um paciente com Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva (PML) e Linfoma de Hodgkin (Padgett et al., 1971). No mesmo ano, Gardner et al., (1971) isolaram o BKV da urina de um paciente submetido ao transplante renal.

Os poliomavírus humanos, KIV e WUV foram descobertos em 2007, em aspirados de nasofaringe (Allander et al., 2007; Gaynor et al., 2007), enquanto o MCV foi isolado a partir de um tipo raro e agressivo câncer de pele (Feng et al., 2008). Sobre os últimos quatro poliomavírus humanos descritos, o HPyV 6 e o HPyV7 foram detectados em 2010 como pertencentes à microbiota da pele (Schowalter et al., 2010), enquanto que o HPyV9 e o poliomavírus associado a tricodisplasia espinosa estão relacionados respectivamente com pacientes transplantados renais e com uma rara doença de pele (Scuda et al., 2011; Van der Meijden et al., 2011). Estes dois últimos poliomavírus humanos foram os mais tardiamente descobertos, reportados ambos em 2011.

### **2.3 – Organização estrutural e genômica**

O JCV e BKV, assim como todos os poliomavírus humanos, são pequenos, medindo aproximadamente 45 nm de diâmetro, não envelopados e com genoma de dupla fita de DNA circular composta de aproximadamente 5 mil pares de bases (pb) (Shah, 1996; Neu et al., 2009). Seu genoma é empacotado com histonas celulares, formando um minicromossomo viral (Meneguzzi et al., 1978) que se assemelha estruturalmente a cromatina celular do hospedeiro (Müller et al., 1978). Semelhanças genômicas entre o BKV e o JCV conferem a eles aproximadamente 72 % de similaridade (Frisque et al., 1979).

O genoma do JCV e BKV é dividido em três regiões: região codificante inicial, a qual codifica o antígeno tumoral grande (LT-ag) e o antígeno tumoral pequeno (st-ag); região codificante tardia, a qual codifica as proteínas do capsídeo viral (VP1, VP2 e VP3) e a agnoproteína não-estrutural; e a região de controle não codificante (NCCR), a qual contém os promotores virais e a origem de replicação. Estes vírus também codificam um antígeno T auxiliar que é derivado de um *splicing* alternativo do transcrito do LT-ag, também conhecido como TAg truncado (truncTag) (Bollag et al., 1989). (Figura 1).



**FIGURA 1.** Organização do genoma dos poliomavírus humanos (HPyV). As regiões inicial e tardia dos genes são transcritas em direções opostas e a partir das fitas complementares de DNA. Fonte: Moens et al., 2011.

O capsídeo destes vírus é icosaédrico contendo 5- e 6- eixos simétricos (Shah et al., 1996). Este capsídeo é formado pela maior proteína do

capsídeo, VP1, organizada em 72 pentâmeros (Stehle et al., 1996). Cada um destes pentâmeros interage com a cadeia C- terminal de uma das menores proteínas do capsídeo, VP2 ou VP3 (Chen et al., 1998). Estas duas proteínas menores, VP2 e VP3, circundam a única molécula de DNA viral do poliomavírus.

Enquanto as proteínas VP1, VP2 e VP3 compõem a estrutura do vírus, as proteínas T (LT-ag, st-ag e truncTAg) estão envolvidas com a replicação viral. O LT-ag forma um complexo que se liga à origem de replicação do DNA viral e age como uma helicase, abrindo e desenrolando o DNA para iniciar a transcrição das regiões tardias (Mastrangelo et al., 1989; Wang & Simmons, 2009). LT-ag também tem demonstrado atuar na condução da célula hospedeira para a fase S, prevenindo a repressão do seu ciclo celular (Bollag et al., 1989; Kelley & Georgopoulos, 1997; Van Aalderen et al., 2012). A função da st-ag ainda é pouco elucidada, mas em MPyV sabe-se que esta proteína complementa a ação da LT-ag no direcionamento da progressão do ciclo celular por diferentes mecanismos (Berger & Wintersberger, 1986; Van Aalderen et al., 2012). Já a função da truncTag permanece desconhecida. A agnoproteína por sua vez é uma proteína não-estrutural que medeia a montagem dos vírions. Especialmente no JCV, esta proteína é capaz de inibir reparos na dupla fita de DNA, devendo assim aumentar a taxa de produção e de mutações dos vírions (Myhre et al., 2010).

#### **2.4 – Classificação genotípica do JCV**

A caracterização molecular do JCV tem sido utilizada extensivamente para conhecimento da evolução e migração das populações já

que diferentes subtipos desta espécie raramente infectam o mesmo hospedeiro humano (Sugimoto et al., 1997; Stoner et al., 2000). No Brasil poucos estudos foram desenvolvidos utilizando o JCV como marcador da migração populacional ou sua associação com grupos étnicos (Fink et al., 2010; Fumian et al., 2010; Cayres-Vallinoto et al., 2012).

A genotipagem do JCV pode ser realizada de três formas distintas: a partir da região de 610 pb que compreende as extremidades 3' dos genes VP1 e antígeno T (Ault & Stoner, 1992); a partir de uma região de 215 pb, próxima à extremidade 5' do gene VP1 (Agostini et al., 1997a); ou a partir da toda sequência codificante do genoma do JCV, em torno de 4854 pb (Agostini et al., 1997b). A região de 610 pb, que fica em torno da posição de 1800-2400 pb no genoma viral, é a mais polimórfica, sendo considerada assim a mais importante para estudos filogenéticos (Hatwell & Sharp, 2001).

Sugimoto et al. (1997) e Jobes et al. (1998) classificaram o JCV em tipos e subtipos com base na sequência genômica do vírus. A classificação realizada por Jobes et al. (1998) divide o JCV em 8 principais tipos, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 e os subtipos 1A, 1B, 2A, 2B, 2C, 3A e 3B. Os tipos 1 e 4 são encontrados na Europa; os tipos 2 e 7 na Ásia; o tipo 8 é descrito em Papua Nova Guiné; e os tipos 3 e 6 na África. Apenas o tipo 5 não foi descrito como pertencendo a uma região em particular, pois aparece como sendo um recombinante dos outros tipos (Jobes et al., 1998; Stoner et al., 2000). Esta classificação realizada por Jobes vem sendo usada nos estudos filogenéticos de JCV atualmente (Shackelton et al., 2006; Glass & Venter, 2009; Fink et al.,

2010; Boukoum et al., 2012), enquanto a classificação proposta por Sugimoto et al. (1997) encontra-se em desuso.

### **2.5 – Classificação genotípica do BKV**

Apesar dos estudos desenvolvidos sobre a classificação genotípica do BKV, sua diversidade tem sido menos associada à migração da população humana do que o JCV (Yogo et al., 2009; Zhong et al., 2009). Entretanto, a caracterização molecular do BKV tem sido realizada para determinar a relação de diferentes genótipos com manifestações clínicas nos indivíduos (Moens & Van Ghelue, 2005; Sharma et al., 2006). Todavia, ainda não foi estabelecida uma relação definitiva entre genótipo e doença.

A avaliação filogenética do BKV é realizada principalmente através do gene VP1, já que este é responsável pela variedade antigênica entre os isolados de BKV (Jin et al., 1993). Os isolados de BKV são classificados em quatro genótipos, designados tipos I, II, III e IV (Sharma et al., 2006). O tipo I é o mais prevalente mundialmente e é dividido em quatro subtipos (Ia, Ib-1, Ib-2 e Ic) (Takasaka et al., 2004; Ikegaya et al., 2006; Zheng et al., 2007). Já o tipo IV tem sua distribuição geográfica limitada ao leste asiático, enquanto que os tipos II e III são pouco distribuídos mundialmente (Nishimoto et al., 2007; Zheng et al., 2007; Zhong et al., 2009).

### **2.6 – Ciclo replicativo**

A replicação dos poliomavírus é amplamente dependente de fatores da célula hospedeira (Hirsch & Steiger, 2003). O ciclo replicativo se inicia através da adsorção das partículas virais à superfície celular. Esta etapa ocorre pela ligação da proteína VP1 com os ácidos siálicos ligados a glicoproteínas ou

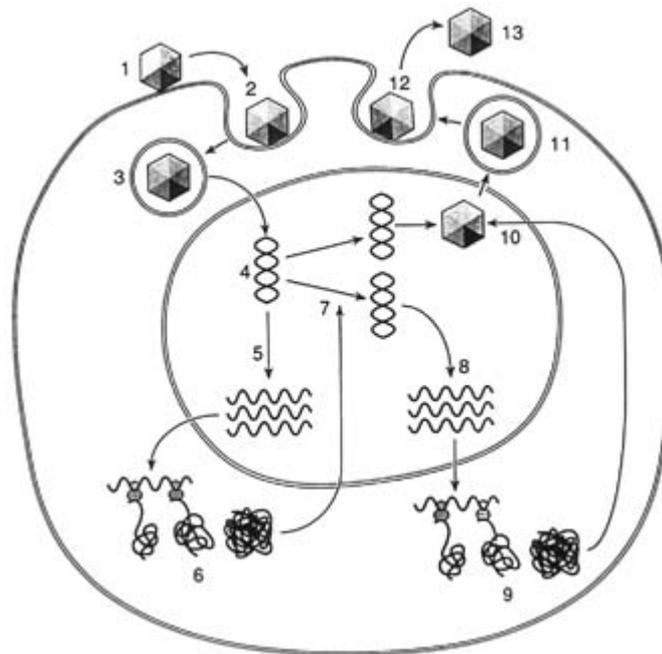
aos gangliosídeos GDrb e GTrb, presentes na membrana celular do hospedeiro (Low et al., 2006; Dugan et al., 2007). Após a ligação inicial o vírus atravessa a membrana celular por endocitose mediada por receptores. Tais receptores estão presentes em locais apropriados da membrana lipídica, enriquecidos de colesterol e, como mencionado anteriormente, gangliosídeos (Singh et al., 2010). Um processo de acidificação ocorre dentro do endossoma, causando a clivagem da VP1, expondo as proteínas VP2 e VP3 e, conseqüentemente, o ácido nucleico viral. Estas duas proteínas virais levam à entrada do genoma no núcleo celular, através da interação com importinas (Nakanishi et al., 2007).

No núcleo será iniciada a replicação do DNA viral e a transcrição dos genes precoces (funcionais e reguladores) e tardios (estruturais) do vírus (Cole & Conzen, 2001). Primeiramente, são sintetizadas as proteínas precoces e após as proteínas tardias, que irão constituir a estrutura do vírus. Na seqüência, ainda no núcleo da célula infectada, ocorre a montagem das novas partículas virais. As proteínas estruturais associam-se para formar capsômeros, os quais agregam-se em torno do ácido nucleico viral replicado, formando o nucleocapsídeo.

Após as partículas virais deixarem o núcleo, estas são envolvidas por endossomas que se fundem com a membrana plasmática do hospedeiro liberando assim os vírions para o meio extracelular (Cole & Conzen, 2001) (Figura 2).

Dependendo do tipo celular afetado, há duas formas do poliomavírus infectar as células. As células que permitem a replicação do DNA viral, conhecidas como células permissivas, irão favorecer a produção de novos

víriões, enquanto que nas células não permissivas, que por sua vez não permitem a multiplicação viral, ocorrerá transformação celular ou oncogênese (White & Khalili, 2004).



**FIGURA 2.** Representação esquemática do ciclo replicativo dos poliomavírus em uma célula permissiva. O ciclo inicia-se com a ligação do vírus ao receptor da célula (1). Após tal interação o vírus é endocitado para o interior da célula (2). O vírus é transportado para o núcleo (3) ocorre a desencapsidação e seu genoma é exposto (4) para expressão dos genes precoces (5). Apenas após a síntese das proteínas (6) precoces e duplicação do DNA viral (7) é que ocorrerá a expressão (8) e síntese das proteínas tardias (9), permitindo a formação de novos víriões (10). Os víriões são então liberados do núcleo (11) e conduzidos para o exterior da célula (12) completando a infecção (13). Fonte: Fields Virology 4 th Edition.

## 2.7 - Epidemiologia

Os poliomavírus JC e BK têm como único hospedeiro natural os humanos, e estão amplamente distribuídos entre a população mundial. Estudos sorológicos indicam que a infecção primária é adquirida durante a infância e é usualmente assintomática (Kean et al., 2009). Em torno de 35 % a 90 % dos adultos são soropositivos para JCV e BKV no mundo (Shah et al., 1973; Bodaghi et al., 2009; Egli et al., 2009a; Khanna et al., 2009). Soropositividade

para BKV ocorre em 90 % das crianças entre 5 e 9 anos enquanto para o JCV ocorre em 50 a 60 % das crianças com mais de 10 anos de idade (Knowles, 2006). Estudos sorológicos indicam ainda que deva ocorrer exposição às cinco espécies de poliomavírus (BKV, JCV, KIV, WUV, MCV) durante a infância, sendo a ocorrência de infecções por BKV a mais prevalente (Kean et al., 2009). A frequência destes vírus já foi estabelecida em diversas populações no mundo. Os estudos epidemiológicos incluem desde pacientes imunodeprimidos, em função de doenças imunológicas ou transplante de órgãos, até indivíduos saudáveis (Kean et al., 2009).

Os principais modos de transmissão destes vírus incluem a via urino-oral e a via respiratória (Goudsmit et al., 1982; Abedi Kiasari et al., 2008; Lin et al., 2008). Outros potenciais modos de transmissão para estes vírus, atualmente discutidos, incluem as rotas transplacentária (Pietropaolo et al., 1998; Bofill-Mas et al., 2000; Zheng et al., 2004), percutânea (transmissão por transfusão de sangue e órgãos), venérea (Hirsch & Steiger, 2003) e inclusive por contato pela pele (Schowalter et al., 2010). Tanto os indivíduos comprometidos imunologicamente, quanto os indivíduos saudáveis são veículos para excreção e transmissão destes vírus (Kitamura et al., 1990; Egli et al., 2009b; Boothpur & Brennan, 2010).

## **2.8 – Manifestações clínicas**

Embora o JCV e BKV estejam bastante distribuídos na população humana, seus papéis como agentes etiológicos em manifestações clínicas tem sido objeto de discussão (Weimberg & Mian, 2010). Doença clínica associada ao JCV e BKV foi demonstrada em imunossuprimidos, nos quais ocorre o

descontrole da infecção pelo JCV e BKV, resultando na manifestação evidente das doenças (Eash et al., 2006; Boothpur & Brennan, 2010).

Durante a infecção primária esses vírus podem infectar células epiteliais e endoteliais de diversos órgãos (Fishman, 2002) e, a seguir, podem desenvolver latência no trato urinário, linfócitos B, glândulas salivares e nas células epiteliais da próstata (Shinohara et al., 1993; Knowles et al., 2003; Jeffers et al., 2009; Comar et al., 2011). Na infecção pelo JCV, após um contexto de profunda imunossupressão, o vírus pode ainda se distribuir pelo sistema nervoso central infectando oligodendrócitos e astrócitos (Silverman & Rubinstein, 1965).

Os fatores que controlam o equilíbrio entre latência e reativação destes vírus ainda não estão bem elucidados (Gardner, 1977). Entretanto, é sabido que as reativações não são induzidas somente pela imunossupressão significativa, como ocorre nos pacientes transplantados (Kahan et al., 1980; Gardner et al., 1984; Arthur et al., 1988), mas também por outros fatores, como gravidez (Coleman et al., 1980), diabetes, idade avançada (Tajima et al., 1990), doenças neoplásicas (Zheng et al., 2008), e infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Berger et al., 1987).

### **2.8.1 – Leucoencefalopatia multifocal progressiva**

O JCV é o agente causador da leucoencefalopatia multifocal progressiva (PML) Esta é uma doença neurológica progressiva rara e subaguda. Sua progressão se dá pela desmielinização de células do sistema nervoso central (Kean et al., 2009).

A PML tem sido associada com o desenvolvimento da AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) há mais de 20 anos, apresentando-se como parte da ampla variedade de complicações decorrentes desta síndrome (Berger et al., 1987). Além de ocorrer em pacientes com AIDS, a PML também pode se desenvolver em outros indivíduos que apresentam outras desordens, tais como: tuberculose, sarcoidose, doenças linfoproliferativas, entre outras (Berger & Major, 1999).

Os primeiros sintomas da doença são decorrentes de lesões multifocais assimétricas que podem levar a prejuízos na fala, visão e na organização mental. À medida que a doença progride pode-se desenvolver cegueira, paralisia entre outras anormalidades, podendo levar a morte de 3 a 6 meses após o início dos sintomas (Berger & Major, 1999).

### **2.8.2 - Poliomavírus e oncogenicidade**

Os poliomavírus JC e BK e também o SV40 são associados com a ocorrência de tumores em humanos (White et al., 2005; Cheng et al., 2009). Em estudos com animais estes vírus demonstraram ação oncogênica (Shah, 1996). Em humanos o JCV também tem sido relacionado com tumores gliais (astrocitomas, ependimomas, oligodendrogliomas, glioblastomas) (Croul et al., 2003; White et al., 2005).

### **2.8.3 – Estenose uretral e cistite hemorrágica**

Estenose uretral e cistite hemorrágica são outras duas patologias renais fortemente associadas à infecção pelo BKV. A estenose uretral ocorre principalmente nos pacientes transplantados renais (Coleman et al., 1978), e seu desenvolvimento está diretamente relacionado com a viremia destes

pacientes (Geddes et al., 2011). Esta doença, assim como a nefropatia, destacada a seguir, é considerada uma das complicações pós-transplante.

A cistite hemorrágica é uma condição clínica que acomete principalmente os pacientes transplantados de medula óssea (Gaziev et al., 2010). Além do BKV outros vírus vinculados com a imunossupressão, tais como: o citomegalovírus e o adenovírus, também podem desencadear esta doença. A forma mais severa da cistite hemorrágica é a falência do rim em função do desenvolvimento secundário da nefropatia (Gaziev et al., 2010). A doença pode ter uma remissão natural, se isso não ocorrer se faz uso do tratamento de suporte, já que não há tratamento específico (Harkensee et al., 2008).

#### **2.8.4 – Nefropatia**

Na última década, o aumento da variedade e qualidade de imunossupressores utilizados nos transplantes renais tornou o BKV o maior desencadeador de rejeição do rim na população transplantada (Dall & Hariharan, 2008). A nefropatia associada à poliomavírus (PVAN) é a principal doença resultante da infecção por esse vírus em pacientes transplantados renais. Por outro lado, a associação do JCV com a PVAN não foi comprovada (Saundh et al., 2010).

Esta patologia tem demonstrado ser a maior causa de falência do enxerto em pacientes transplantados renais (Saundh et al., 2010), sendo responsável por em torno de 5 % dos casos de rejeição principalmente no primeiro ano após o transplante (Hirsch et al., 2002). Os pacientes não apresentam nenhum outro sintoma a não ser a diminuição da função renal. A

PVAN pode ainda desenvolver-se em rins não transplantados de pacientes que receberam transplante de outros órgãos, como coração e pulmão, e também de pacientes HIV positivos (Verghese et al., 2009).

O desenvolvimento da PVAN tem sido associado com uma variedade de agentes imunossupressores em combinação com diferenças quantitativas da imunossupressão (Barri et al., 2001; Hirsch et al., 2002). O desenvolvimento da doença é inicialmente observado através da virúria, precedida pela viremia e, após, pelos danos renais irreversíveis, podendo então levar à perda do rim transplantado (Babel et al., 2009). Sendo assim, detectar e acompanhar a virúria, principalmente nos pacientes transplantados renais, é a principal forma de detecção precoce do desenvolvimento da PVAN. Um estudo recente sugere ainda que a reativação precoce do BKV, até cinco dias após o transplante de rim, é um fator de risco importante para o desenvolvimento da PVAN (Saundh et al., 2012).

O monitoramento de poliomavírus no paciente transplantado permite a alteração do tratamento imunossupressor e a restauração da resposta imune antiviral do paciente (Ramos et al., 2002; Randhawa et al., 2009).

### **2.9 – Pacientes transplantados renais**

O paciente transplantado renal necessita de rigoroso acompanhamento médico e realizações de exames clínicos e laboratoriais periodicamente. Tais cuidados são tomados devido ao grande número de rejeições do enxerto e também de complicações infecciosas que podem acometer estes indivíduos (Castro, 2006).

A rejeição do rim transplantado, principal complicação pós-transplante, é manejada pelo uso de medicação imunossupressora por toda a vida do paciente. Entretanto, é a indução desta imunossupressão no paciente que o faz ficar pré-disposto a infecções por microorganismos (Castro, 2006).

Dentre as infecções que podem ser desencadeadas estão as de origem fúngica, bacteriana e viral. Enquanto que para prevenir infecções bacterianas e fúngicas utilizam-se antibióticos e antifúngicos de amplo espectro, o combate contra as infecções virais tem demonstrado ser ineficaz nos transplantados (Castro, 2006).

Os principais agentes causadores de infecções virais neste grupo de indivíduos são os poliomavírus JC e BK, adenovírus, citomegalovírus e alguns vírus da família *Herpesviridae* (Helanterä et al., 2010; Carratalà et al., 2012)

### **2.9.1 – Poliomavírus no transplante renal**

Nas últimas duas décadas, a disponibilidade de um grande número de drogas imunossupressoras auxiliou significativamente na redução dos casos de rejeição aguda do órgão transplantado. Entretanto, o mesmo fato acabou por ocasionar um aumento das complicações causadas por agentes virais nos pacientes transplantadores renais, destacando-se a PVAN (Kwak et al., 2002).

É sabido que a excreção de poliomavírus na urina está diretamente associada à PVAN nos transplantados. Diferentes frequências de detecção de DNA de BKV e JCV na urina de pacientes transplantados já foram descritas: 30,5 % (Pires et al., 2011), 61,4 % (Baldanti et al., 2007) e 33 % (Priftakis et al., 2000). A variação da frequência de excreção dos vírus nos diferentes estudos realizados dificulta a padronização de um protocolo para o tratamento e

acompanhamento destes pacientes. Em função disso, a elaboração de protocolos para a prevenção e controle da PVAN tem sido realizada, estudando a população local.

Para a determinação inicial da PVAN, é realizada a detecção do DNA dos poliomavírus em sangue e/ou urina por PCR qualitativa ou quantitativa, em combinação com a citologia urinária. No entanto, o diagnóstico definitivo somente é obtido através de biópsia do tecido renal e imunohistoquímica (Drachenberg & Papadimitriou, 2006).

### **2.10 – Técnicas moleculares para detecção de JCV e BKV**

Com base na impossibilidade de isolamento de JCV e na limitação do isolamento de BKV em cultivos celulares (Acott et al., 2006), a detecção desses vírus em amostras clínicas e ambientais tem sido realizada através da detecção de DNA viral. Para detecção de poliomavírus o método de PCR oferece vantagens, tais como rapidez, alta sensibilidade e especificidade (Fong & Lipp, 2005a). Além disso, a PCR permite a diferenciação dos vírus através do uso de oligonucleotídeos espécie específicos. Esta técnica molecular, amplamente utilizada, permite diversas variações que possibilitam aumentar a especificidade e/ou sensibilidade da reação, podendo inclusive facilitar a caracterização de diferentes espécies apenas pela avaliação do tamanho do produto amplificado pela reação. Uma variação da PCR que permite tal caracterização, e concomitante aumento da sensibilidade, é a nested-PCR (nPCR) (Kämmerer et al., 1994).

### **2.11 – Distribuição do poliomavírus em ambientes aquáticos**

Como descrito anteriormente, o JCV e BKV são ubíquos na população e, amplamente excretados pela urina. Desta forma, altas concentrações destes vírus já foram encontradas em esgotos de diferentes cidades, mesmo em localizações amplamente divergentes. (Bofill-Mas et al., 2000; Fumian et al., 2010).

O poliomavírus não apresenta envelope, característica que permite maior resistência a condições extremas do meio ambiente, tais como as enfrentadas em um corpo hídrico. Em estudo realizado por Bofill-Mas et al. (2001) foi demonstrada a estabilidade do BKV e JCV tanto em amostras de esgoto quanto nas de urina por 92 dias, mesmo após adição de DNase, o que prediz a presença de vírus infeccioso nas amostras, ou ao menos íntegro. No mesmo estudo foi avaliada a resistência do JCV ao baixo potencial de hidrogênio iônico (pH), fator que favorece a transmissão pela rota de infecção urino-oral. Neste experimento, os vírions de BKV foram lisados logo após entrarem em contato com a solução de pH 1 a 3, enquanto os JCV sofreram lise apenas após 30 minutos (min). Em pH 5, ambos pareceram manter-se intactos (Bofill-Mas et al., 2001).

A detecção e avaliação da presença de poliomavírus como um marcador de poluição cloacal em fontes de água de esgoto pode oportunizar a avaliação e monitoramento dos diferentes poliomavirus que são prevalentes em determinadas áreas geográficas (Bofill-Mas et al., 2000).

Atualmente diversos vírus têm sido estudados e avaliados em variadas fontes de água como novos indicadores de poluição fecal. Neste

grupo de vírus se destacam os vírus entéricos, conhecidos por causarem entre outras manifestações clínicas, gastroenterites, serem transmitidos principalmente pela rota fecal-oral, e apresentarem resistência ao tratamento habitual da água (Fong et al. 2005b; Kokkinos et al. 2010; La Rosa et al. 2010; Prado et al. 2011). Embora os indicadores microbianos de qualidade da água atuais, coliformes totais e fecais (WHO, 2008), provaram ser úteis no acesso da qualidade da água no passado, atualmente reconhece-se que a ausência de detecção destas bactérias não prediz ausência de vírus (Jiang & Chu, 2004; Fong et al., 2005b).

De acordo com as características descritas sobre o BKV e JCV, diversos estudos têm sido conduzidos na busca destes vírus como possíveis indicadores de poluição fecal da água assim como os vírus entéricos. Além de serem candidatos para o monitoramento da poluição fecal, o JCV e BKV, por serem estritamente infecciosos ao homem, podem também ser utilizados no rastreamento de poluição fecal humana (McQuaig et al., 2006; Gibson et al., 2011). O JCV foi primeiramente sugerido como um vantajoso indicador de poluição cloacal da água em 2000 (Bofill-Mas et al., 2000), desde então diversos grupos tem estudado o comportamento do JCV e também do BKV nos ambientes aquáticos (Bofill-Mas et al., 2006; Hundesa et al., 2006; Fumian et al., 2010; Moresco et al., 2012; Souza et al., 2012; Sidhu et al., 2012). A frequência de poliomavírus encontrada nesses trabalhos variou de 3 % a 96 %, porém as metodologias utilizadas e os tipos de amostras processadas foram distintas.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 – Coleta das amostras**

##### **3.1.1 – Urinas dos pacientes transplantados renais**

A amostragem de urinas oriundas dos pacientes transplantados renais foi constituída de amostras de urina destinadas ao descarte. Um total de 92 urinas foi coletado de forma aleatória de pacientes submetidos ao transplante renal no Complexo Hospitalar Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. A idade dos pacientes variou entre 1 e 79 anos, destes, 63 % eram homens e 37 % mulheres. O período de coleta ocorreu entre Março e Novembro de 2007. Após coletadas, as urinas foram extraídas e armazenadas sob refrigeração (-20 °C), onde permaneceram até o processamento das mesmas. A coleta destas amostras foi aprovada pelo comitê de ética local do Complexo Hospitalar Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.

##### **3.1.2 – Urinas de indivíduos saudáveis**

As amostras de urina do grupo de indivíduos saudáveis, também intitulado grupo controle, foram gentilmente cedidas por indivíduos não transplantados e sem sintomas de doença renal, residentes em Porto Alegre.

Os voluntários foram instruídos a coletar urina total em frascos estéreis próprios para coleta de urina. As coletas foram realizadas no mês de Janeiro de 2012. A faixa etária dos pacientes foi de 3 a 80 anos, sendo que 56 % eram mulheres e 44 % homens. Todos os voluntários preencheram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (ver Apêndice).

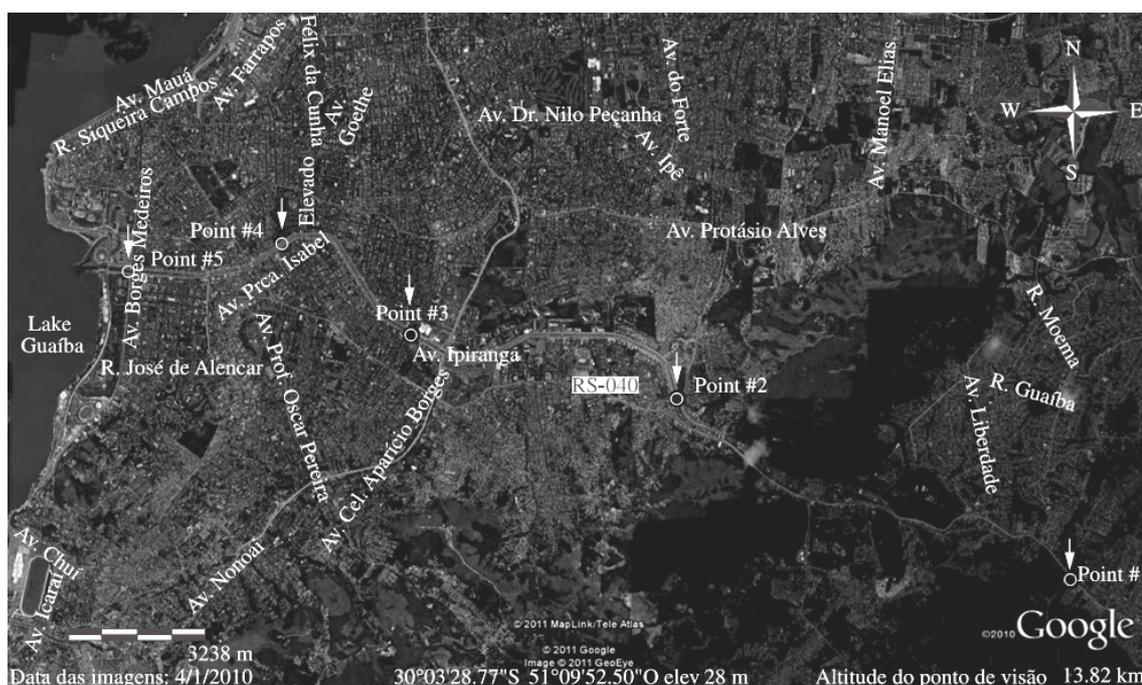
### **3.1.3 – Amostras de águas**

Um total de 30 amostras de água foi coletado da região de Porto Alegre. Essas amostras foram compostas de águas superficiais oriundas do Arroio Dilúvio, e da estação de tratamento de esgoto (ETE) São João - Navegantes.

O Arroio Dilúvio é um canal de água que atravessa a cidade de Porto Alegre, capital do Rio Grande do Sul, constituída de aproximadamente 1.500.000 habitantes. A extensão canalizada do Arroio Dilúvio percorre uma distância de 13,8 quilômetros, desaguando no lago Guaíba, que é a principal fonte de abastecimento de água de Porto Alegre (Porto Alegre, 2011). Durante seu percurso o arroio recebe águas de escoamento natural, efluentes cloacais de importante parcela da população, além de efluentes de diversos estabelecimentos de saúde incluindo hospitais de grande porte (Faria et al., 1994). Em 1998, 446 mil habitantes de Porto Alegre, o correspondente a um terço da população da cidade, contribuía para o descarte de efluentes no Arroio Dilúvio (Menegat, 2006), reforçando assim a interferência da população na constituição deste corpo hídrico.

As amostras coletadas do Arroio Dilúvio totalizaram 14, sendo estas coletadas em 5 diferentes pontos do curso do arroio. Estes pontos foram

denominados 1, 2, 3, 4 e 5; o ponto 1 corresponde à nascente e o ponto 5 ao ponto mais a jusante em direção ao Lago Guaíba (Figura 3). As coletas foram realizadas em Janeiro, Abril e Setembro de 2009.



**FIGURA 3.** Imagem de satélite de Porto Alegre demonstrando os pontos de coleta no Arroio Dilúvio. Da fonte (Ponto 1, Leste) a foz (Ponto 5, Oeste) (demonstrados com pontos por setas brancas). Figura feita com o auxílio do Google Earth Pro<sup>tm</sup>. Fonte: Vecchia et al., 2012a.

O Departamento Municipal de Água e Esgotos (DMAE) é o órgão responsável pela captação, tratamento e distribuição de água, bem como pela coleta e tratamento do esgoto sanitário em Porto Alegre. Este órgão consta com nove ETEs. A ETE São João – Navegantes realiza o tratamento de esgoto de 11 bairros da cidade, totalizando 150 mil habitantes beneficiados, da zona norte da capital (DMAE, 2012). Nesta ETE o processo de tratamento de esgoto implementado é o de Lodos Ativados. Nesse processo, o ar é injetado em um

tanque de aeração contendo esgoto, e a matéria orgânica é degradada por bactérias na presença do oxigênio dissolvido. O termo "lodo ativado" refere-se à suspensão "ativa" de microrganismos que decompõem a matéria orgânica solúvel. Os sólidos resultantes do processo são desidratados em leitos de secagem. A ETE São João é a ETE de maior porte existente em Porto Alegre atualmente.

Dezesseis amostras constituem as coletas realizadas nesta ETE Mensalmente duas amostras foram coletadas entre o período de Março a Outubro de 2009, oito referentes ao afluente, ponto de entrada do esgoto na ETE, e as outras oito amostras ao efluente, ponto de saída do esgoto da ETE (Figura 4).



**FIGURA 4.** Vista aérea da estação de tratamento de esgoto ETE São João – Navegantes. Ao fundo, à direita, tanques de aeração, local de coletas das amostras. Fonte: DMAE, 2012. <http://www2.portoalegre.rs.gov.br/dmae/default.php>.

O protocolo desenvolvido para a coleta das águas seguiu normas padrões baseadas em informações da CETESB, Guia de coleta e preservação de amostras de água, e da COGERH, Recomendações e cuidados na coleta de amostras de água.

Após a coleta, as amostras foram colocadas protegidas da luz solar e mantidas em gelo (na temperatura entre 2 e 8 °C), até a chegada ao laboratório. Em seguida, a amostra foi identificada conforme o ponto de amostragem e sua localização e data da coleta.

### **3.2 - Concentração e purificação das amostras**

Para os ensaios de concentração viral foi utilizado o método de filtração baseado na adsorção-eluição. Este método foi baseado no descrito por Katayama et al. (2002), com modificações. Para isso foram acoplados aos aparatos de filtração membranas de ésteres de celulose HA negativamente carregadas, com poros de 0,45 µm, 47 mm de diâmetro (Millipore). Brevemente, às amostras de água, no volume de 500 mL, foram adicionados 0,3 g de MgCl<sub>2</sub> (25 mM) e o pH foi ajustado em 5,0 utilizando uma solução 1N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Após, a mistura resultante teve sua passagem forçada pela membrana HA, em carcaça de acrílico esterilizada, em pressão de vácuo de 760 mmHg, em um fluxo de filtração de aproximadamente 100 mL/min. Aproveitando este mesmo sistema de vácuo, a membrana foi lavada com 87,5 mL de uma solução 0,5 mM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pH 3,0. A seguir foi realizada a eluição, durante a qual, ainda sob pressão negativa, foram adicionados na membrana 2,5 mL de uma solução de NaOH (pH 10,5). O filtrado resultante foi então neutralizado com 12,5 µL de 50 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e tampão TE (10 mM de Tris, pH

7,4 e 1 mM de EDTA, pH 8,0) 100X concentrado. Por fim esse material foi aliquotado, a partir do copo coletor e mantido a -70 °C até o processamento.

### **3.3 – Extração de DNA**

#### **3.3.1 – Extração de DNA total das amostras de urina**

O protocolo de extração do DNA viral das amostras de urina foi baseado no descrito por Sambrook & Russell (2001). Inicialmente as amostras foram transferidas para frascos tipo falcon de 50 mL e centrifugadas a 3.500 rpm por 10 min (*Centrífuga Sigma 2-16PK*). Após a centrifugação, 500 µL do sobrenadante foi adicionado a um tubo de reação. A este foi adicionado igual volume de fenol (*Invitrogen*), homogeneizado e deixado à temperatura ambiente por 5 min para então ser centrifugado a 1.300 rpm por 5 min (*Centrífuga Sigma 1-14*). Ao sobrenadante resultante desta primeira etapa foram adicionados 800 µL de etanol absoluto (*Pro-analysis*). Este foi homogeneizado, armazenado a -20 °C por 30 min e então centrifugado a 13.000 rpm por 30 min (*Centrífuga Sigma 1-14*) para precipitação e formação do sedimento de ácido nucleico. O DNA precipitado foi então ressuspendido em 50 µL de TE com 10 % de RNase (*New England Biolabs*) e armazenado a -70 °C até o processamento

#### **3.3.2 – Extração das amostras de água**

Para extração de ácidos nucleicos virais, foi utilizado o *kit* comercial *RTP DNA/RNA Virus Mini Kit* (Invitek), de acordo com as especificações do fabricante. Para isso, 400 µL de cada amostra foram utilizados. Após a finalização do processo de purificação de ácidos nucleicos, o material eluído foi armazenado em freezer – 70 °C para posterior análise.

### 3.4 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para realizar a identificação simultânea dos poliomavírus JC e BK, foram utilizados oligonucleotídeos já descritos na literatura (Bofill-Mas et al., 2000). Estes oligonucleotídeos (PF 5'- AACATTTTCYCCTCCTG -3' e PR - 5'- TATTGCMCCAGGAGGT -3') posicionados em 1352–1367pb e 2132–2148pb do genoma, se baseiam nas sequências dos genes que codificam o antígeno T e a proteína VP1 destes vírus, amplificando uma região conservada para ambos os poliomavírus. A base degenerada Y, presente no oligonucleotídeo *forward* corresponde às bases nitrogenadas T e C, enquanto que a base degenerada M presente no oligonucleotídeo *reverse* corresponde às bases nitrogenadas A e C. Tais genes estão disponíveis no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Os produtos resultantes desta reação de amplificação são de 797 e 773 pb para o genoma de BKV e JCV, respectivamente.

#### 3.4.1 – Otimização das condições de amplificação da PCR

A fim de determinar o menor número possível de genomas de poliomavírus presentes nas amostras estudadas foi necessário otimizar a PCR descrita por Bofill-Mas et al. (2000). A padronização da técnica foi realizada utilizando-se uma amostra de urina sabidamente positiva para BKV e diferentes concentrações de MgCl<sub>2</sub> (1,0 a 3,0 mM) e de oligonucleotídeos (0,2 a 0,4 µM). Paralelamente foram testadas diferentes temperaturas de anelamento dos oligonucleotídeos (42 a 46 °C).

A condição ótima de amplificação para uma reação de 25 µl foi obtida com 3 mM de MgCl<sub>2</sub> (*Invitrogen*); 0,4 µM de cada oligonucleotídeo (*IDT*); 1,5 U de Taq DNA polimerase (*Invitrogen*); 10 % de tampão de PCR (*Invitrogen*) e 0,6 mM de deoxinucleosídeos trifosfatos (*ABgene*) por reação. Foi utilizado 1 µL de DNA molde por reação.

As reações foram realizadas em termociclador *Mastercycler Eppendorf* sob as seguintes condições: 5 min de desnaturação inicial a 94 °C, seguidos de 35 ciclos de 1 min a 94 °C (desnaturação); 1 min a 42 °C (anelamento); 1 min e 15 s a 72 °C (extensão) e uma etapa final de extensão de 5 min a 72 °C. Os produtos foram analisados apenas após a realização das outras duas reações de nPCR, descritas abaixo. Tal procedimento foi seguido a fim de evitar contaminações pelo manuseio dos tubos de reação oriundos desta primeira PCR, já que os mesmos foram utilizados como DNA molde para as próximas reações. A técnica de análise destes produtos encontra-se descrita em conjunto com a das reações de nPCR.

### **3.4.2 – Construção do controle interno**

O controle interno (CI) utilizado nesta PCR é um fragmento de DNA que pode ser amplificado com os mesmos oligonucleotídeos utilizados para amplificar o fragmento alvo, diferenciando-se do mesmo pelo menor tamanho.

Para a construção do CI foi selecionado um produto de amplificação inespecífico obtido durante as etapas de otimização da PCR. Este produto, de 541 pb, foi clonado no plasmídeo pCR®2.1 (Kit TOPO TA Cloning®, *Invitrogen*). O processo de clonagem seguiu-se através das seguintes etapas: ligação do inserto com o vetor (pCR 2.1) com auxílio da enzima T4 DNA ligase;

inserção do clone por transformação em células de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  competentes; multiplicação das células transformadas em meio LB (Luria Bertani) com ampicilina (50  $\mu$ g/ml) a 37 °C; e extração do DNA plasmidial pelo método de minipreparação descrito por Sambrook & Russel (2001). Após o clone resultante foi submetido ao sequenciamento, demonstrando ter 100 % de identidade com um segmento do genoma humano que codifica parte de uma proteína presente nos cílios das células humanas.

### **3.4.3 – Sensibilidade da PCR**

A sensibilidade da PCR foi determinada utilizando diluições decimais seriadas de quantidades conhecidas de moléculas do CI. As diluições do CI foram submetidas à PCR nas condições otimizadas e o limite de detecção foi determinado considerando a maior diluição em que foi observada amplificação do CI.

### **3.4.4 - Detecção de resultados falso-negativos e falso-positivos**

Para cada reação de PCR das amostras uma quantidade fixa de controle interno (65 moléculas) foi adicionada visando detectar resultados falso-negativos. Para detectar resultados falso-positivos, devido a possíveis contaminações, a cada 10 reações de amplificação de amostras foram adicionados controles negativos, os quais continham água ao invés de DNA.

### **3.5 – Nested PCR para JC e BK poliomavírus**

A diferenciação entre os produtos de amplificação de BKV e JCV foi realizada através de duas novas reações de amplificação, uma para BKV e outra para JCV, utilizando os produtos obtidos na primeira PCR. Para isso foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos, específicos para cada vírus,

baseados nos iniciadores já reportados por Bofill-Mas et al. (2000). A detecção do DNA de BKV foi realizada utilizando os oligonucleotídeos: PF 5'-CCAGGGGCAGCTCCCAAAAAG-3' e PR 5'-AGTAGATTTCCACAGGTTAGGTCCTC3', que geram um produto de 296 pb. Os oligonucleotídeos JCV específicos foram: PF 5'-TAAAGCCTCCCCCCAACAGAAA-3' e PR 5'-ACAGTGTGGCCAGAATTCCACTACC-3', e o tamanho do produto originado foi de 215 pb. Ambos os pares de oligonucleotídeos permitem a amplificação de parte da sequência do gene da proteína VP1 das duas espécies de poliomavírus, BKV (nt 1486 ao 1782) e JCV (nt 1710 ao 1924). Tal sequência tem por característica fornecer importantes informações filogenéticas sobre estes vírus, devido à grande variabilidade antigênica desta região observada nas duas espécies de poliomavírus.

### **3.5.1 – Otimização das condições de amplificação das nested PCRs**

As reações de nPCR foram padronizadas visando principalmente altas especificidade e sensibilidade. Para isto, várias concentrações de MgCl<sub>2</sub> (1,0 a 3,0 mM) e de oligonucleotídeos (0,2 a 0,4 μM) foram testadas em diferentes temperaturas de anelamento (58, 59, e 60 °C).

A condição ótima de amplificação numa reação de 25 μl foi obtida com 1 mM de MgCl<sub>2</sub> (*Invitrogen*); 0,2 μM de oligonucleotídeo direto (*IDT*); 0,2 μM de oligonucleotídeo reverso (*IDT*); 0,6 mM de deoxinucleosídeos trifosfatos (*ABgene*); 1,5 U de Taq DNA polimerase (*Invitrogen*) e 10 % de tampão de

PCR (*Invitrogen*) por reação. Além disto, em todas as reações foi utilizado 1 µL da reação da primeira PCR como DNA molde.

A temperatura e o tempo de cada etapa da reação foram os seguintes: uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C por 5 min, seguida de 35 ciclos contendo: uma etapa de desnaturação a 94 °C por 1 min, uma de anelamento a 60 °C por 1 min e uma de extensão a 72 °C por 1 min; além disto, uma etapa final de extensão a 72 °C por 5 min foi realizada.

Os resultados de todas as reações de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5 % contendo brometo de etídeo (0,5 µg/mL), visualizados sob luz ultravioleta (UV) e comparados com marcador de peso molecular conhecido [100 bp DNA ladder (*BioLabs*)].

### **3.6 – Sequenciamento dos produtos das nested PCRs**

A fim de confirmar a especificidade da PCR e realizar a caracterização molecular dos amplificados, o sequenciamento de alguns produtos, selecionados ao acaso, foi realizado.

Os produtos que apresentaram alta concentração de amplificado, avaliada pela presença intensidade dos fragmentos de DNA no gel de agarose, foram sequenciados diretamente, já os produtos que apresentaram fragmentos de DNA menos intensos foram clonados antes de serem enviados para sequenciamento. O kit de clonagem utilizado foi o TOPO TA Cloning® contendo o vetor pCR®2.1 (*Invitrogen*). Em seguida da clonagem foi realizado o plaqueamento em agar LB com 50 µg/mL de ampicilina (*Merck*), e as colônias presentes após a incubação (24 h a 37 °C), foram multiplicadas sob agitação em meio LB contendo 50 µg/mL de ampicilina durante 12 horas a

37°C. Finalmente o DNA plasmidial foi extraído pelo método de minipreparação descrito por Sambrook & Russel (2001).

O próximo passo foi o envio do DNA plasmidial em tubos de microcentrífuga de 0,5 mL contendo 6 µL de: 30 a 45 ng (quando produto de PCR) ou 100 a 250 ng (quando plasmídeo) de DNA molde e 3,2 pmol de oligonucleotídeo ao Laboratório ACTGene Análises Moleculares LTDA (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) para sequenciamento, foram enviados, pelo menos, dois tubos de cada amostra (um com o oligonucleotídeo direto e o outro com o reverso). Os oligonucleotídeos enviados correspondem aos das reações de nPCR específicos para cada poliomavírus.

O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (*Applied Biosystems*), de acordo com as recomendações do fabricante. Os DNA-moldes foram marcados utilizando-se os oligonucleotídeos e o reagente BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 (*Applied Biosystems*). As reações de marcação foram realizadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (*Applied Biosystems*). Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa *Data Collection v 1.0.1* (*Applied Biosystems*) utilizando variados parâmetros.

### **3.7 – Análise das sequências e construção das árvores filogenéticas**

A análise das sequências foi realizada através do software *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). As sequências de JCV e BKV utilizadas como referência foram obtidas do banco

de dados do *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Foi utilizado o programa editor de alinhamento de sequências *BioEdit*. A análise filogenética foi conduzida utilizando o MEGA 5.0 (Tamura et al., 2011) pelo método de distância *neighbor-joining* para as árvores de BKV (Saitou & Nei, 1987) e o método *UPGMA* (*Unweighted Pair-Group Method*) e *maximum likelihood* para as árvore de JCV (Sneath & Sokal, 1973; Tamura et al., 2011), usando os parâmetros de distância Kimura 2 (Kimura, 1980). As significâncias estatísticas dos ramos foram mensuradas com suporte de *bootstrap* para 500 réplicas (Felsenstein, 1985).

### **3.8 – Estatística**

A análise estatística foi realizada no Departamento de Estatística do Instituto de Matemática da UFRGS. Esta análise foi conduzida para avaliar a presença ou não de JCV e/ou BKV nas amostras de urinas de ambos os grupos de indivíduos estudados, e também para avaliação das variáveis sexo e idade em relação aos grupos e vírus. As variáveis foram resumidas, por grupo de estudo, pelas estatísticas descritivas pertinentes: frequência absoluta (n) e relativa (%).

O nível de significância adotado foi de 0,05 ( $\alpha = 5\%$ ) ou menor que este, e níveis descritivos (p) inferiores a esse valor foram considerados significantes.

Para avaliação da presença de um ou ambos os vírus, ou ausência deles em cada grupo, foi utilizado o teste qui-quadrado. Já para a variável contínua, idade, utilizou-se o teste t de Student.

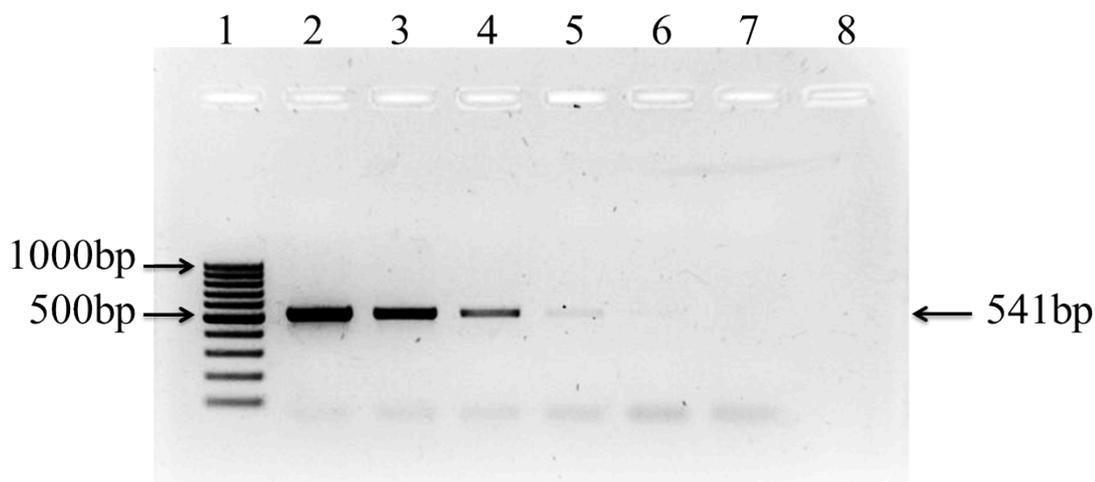
## **4. RESULTADOS**

### **4.1 – Utilização do controle interno na PCR**

O CI adicionado em todas as amostras da primeira PCR originou um fragmento de 541 pb. A presença do CI na ausência do produto viral foi interpretada como ausência de DNA viral ou, pelo menos, ausência de DNA em quantidades detectáveis por este método. Por outro lado, a ausência de ambos, o produto viral e o CI, implicaram em uma falha na amplificação, o que poderia ser considerado um resultado falso negativo, possivelmente por algum erro ou inibição da técnica.

### **4.2 – Sensibilidade da PCR**

A sensibilidade da PCR foi determinada através das amplificações de diluições seriadas na base 10 do CI. Foi possível visualizar o produto de amplificação no gel de agarose até a adição mínima de 6 moléculas do CI (Figura 5, coluna 6). Entretanto, como a banda visualizada no gel de agarose quando adicionado apenas 6 moléculas de CI foi pouca intensa, estipulou-se adição de 65 moléculas de CI para fácil observação do funcionamento da técnica. Desta forma podemos observar que o menor limite de detecção do teste de PCR utilizado neste trabalho esteve posicionado entre 65 e 6 moléculas (Figura 5).



**FIGURA 5.** Imagem do gel de agarose a 1,5 % demonstrando a amplificação de quantidades conhecidas do CI. 1: Marcador de 100 pb (*Fermentas*); 2: 65000; 3: 6500; 4: 650; 5: 65; 6: 6; 7: 0 moléculas de CI; 8: controle negativo.

### 4.3 – Detecção de JCV e BKV

#### 4.3.1 - Pacientes transplantados renais e indivíduos saudáveis

Os resultados referentes à detecção de DNA de JCV e BKV das amostras de urina dos indivíduos saudáveis (n=88) e dos pacientes transplantados renais (n=92) estão demonstrados na Tabela 1.

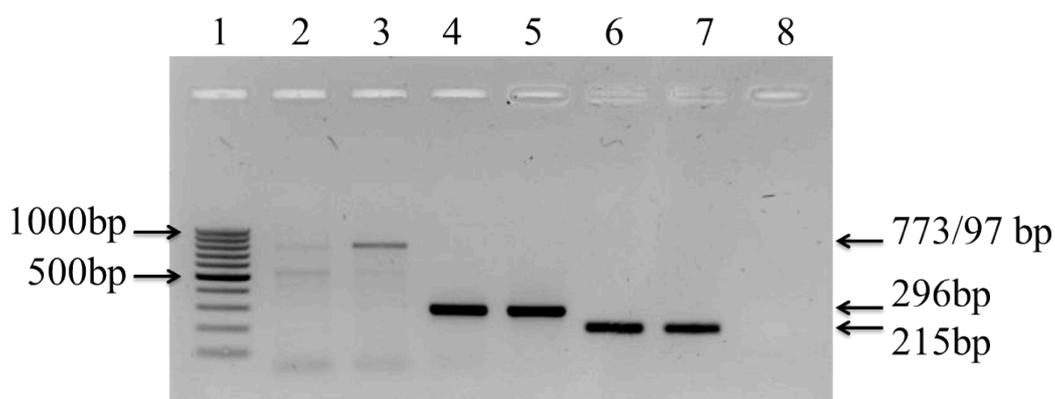
**TABELA 1.** Frequência de JCV e BKV nos grupos de pacientes transplantados renais e controle.

	Transplantados n (%)	Controle n (%)
Apenas JCV	7/92 (7,6 %)	18/88 (20,5 %) <sup>a</sup>
Apenas BKV	25/92 (27,2 %)	15/88 (17,0 %)
Co-infecção	35/92 (38,04 %) <sup>a</sup>	14/88 (15,9 %)
Ausência de vírus	25/92 (27,2 %)	41/88 (46,6 %) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Os dados foram estatisticamente significantes (p<0,05)

Das 180 urinas analisadas, 41,1 % e 49,4 % foram positivas para JCV e BKV respectivamente, incluindo todos os indivíduos envolvidos no estudo. Entretanto, enquanto que o BKV foi detectado em 32,9 % das amostras

do grupo controle, foi encontrada frequência significativamente maior desse vírus no grupo de pacientes transplantados renais (65,2 %,  $p < 0,001$ ). Diferente do encontrado com o BKV, o JCV foi detectado em 36,4 % das amostras do grupo controle, enquanto 45,6 % dos pacientes transplantados renais foram positivos. Quando avaliada apenas a presença do JCV, foi observada frequência significativamente maior no grupo controle do que no grupo de pacientes transplantados renais ( $p < 0,05$ ). A frequência da detecção de ambos os vírus na mesma amostra, sugerindo co-infecção, difere significativamente entre os grupos (15,9 % e 38 % para o grupo controle e transplantados, respectivamente;  $p < 0,05$ ). Quando a positividade de um ou ambos os vírus foram analisadas, em 53,4 % dos indivíduos saudáveis (47/88) foi possível detectar DNA de JCV e/ou BKV, enquanto que nos pacientes transplantados renais 72,8 % (67/92) foram positivos para um ou ambos os vírus. Já a ausência de DNA viral foi associada positivamente com o grupo controle ( $p < 0,05$ ). Na Figura 6 demonstração do padrão de bandas das PCRs.



**FIGURA 6.** Imagem demonstrando os produtos de amplificação das PCRs. Produtos das urinas positivas para JC e BK poliomavírus. Oito microlitros da reação de 25  $\mu$ L foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%. Coluna 1: Marcador de 100 pb (*Fermentas*); 2 e 3: produtos de amplificação da primeira PCR, 773 ou 797 pb; 4 e 5: produtos de amplificação da nPCR para BKV; 6 e 7: produtos de amplificação da nPCR para JCV; 8 controle negativo.

#### 4.3.1.1 – Correlação entre presença de poliomavírus, idade e gênero dos indivíduos.

No grupo de pacientes transplantados renais a frequência de JCV na urina foi significativamente maior nos homens (57,4%, 31/54) do que nas mulheres (31,3%, 10/32) ( $p < 0,05$ ). Entre os indivíduos positivos para JCV pertencentes ao grupo controle, a média de idade foi de 37.3 anos enquanto que a média de idade dos pacientes negativos para JCV foi de 29.3 anos ( $p < 0,05$ ).

Não foram encontradas relações entre a presença de DNA de BKV na urina de ambos os grupos estudados e a idade ou gênero dos indivíduos testados.

#### 4.3.2 – Águas superficiais

Amostras de água superficial do Arroio Dilúvio foram coletadas em cinco pontos que percorrem o canal de água. As coletas foram realizadas em três períodos diferentes do ano. Do total de 14 amostras de água avaliadas,

cinco foram positivas para BKV e oito para JCV, destas, quatro foram positivas para ambos os vírus (Tabela 2).

**TABELA 2.** Frequência de BKV e JCV nas amostras de águas coletadas no Arroio Dilúvio, Porto Alegre.

Data da coleta		Janeiro		Abril		Setembro	
Poliovírus		BK	JC	BK	JC	BK	JC
Pontos do arroio	P#1	+ <sup>a</sup>	+	-	+	+	+
	P#2	+ <sup>a</sup>	-	-	-	-	-
	P#3	-	-	-	+	-	-
	P#4	-	+ <sup>a</sup>	+	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>
	P#5	-	-	-	+	N/T	N/T

<sup>a</sup>Amostras sequenciadas. + (Detectado) - (Não detectado) N/T (Não testado).

Das 16 amostras de água coletadas na ETE São João durante oito meses, quatro foram positivas para JCV e apenas uma foi positiva para BKV. Foi demonstrado maior frequência de vírus nas amostras do efluente (Tabela 3).

**TABELA 3.** Detecção de JCV e BKV nas amostras de água coletadas da ETE São João - Navegantes, Porto Alegre.

Pontos de coleta		Afluente		Efluente	
Poliovírus		BK	JC	BK	JC
Datas da coleta	Março	-	-	-	+
	Abril	-	-	-	-
	Maio	-	-	-	-
	Junho	-	-	-	-
	Julho	-	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>	+ <sup>a</sup>
	Agosto	-	-	-	+ <sup>a</sup>
	Setembro	-	-	-	-
	Outubro	-	-	-	-

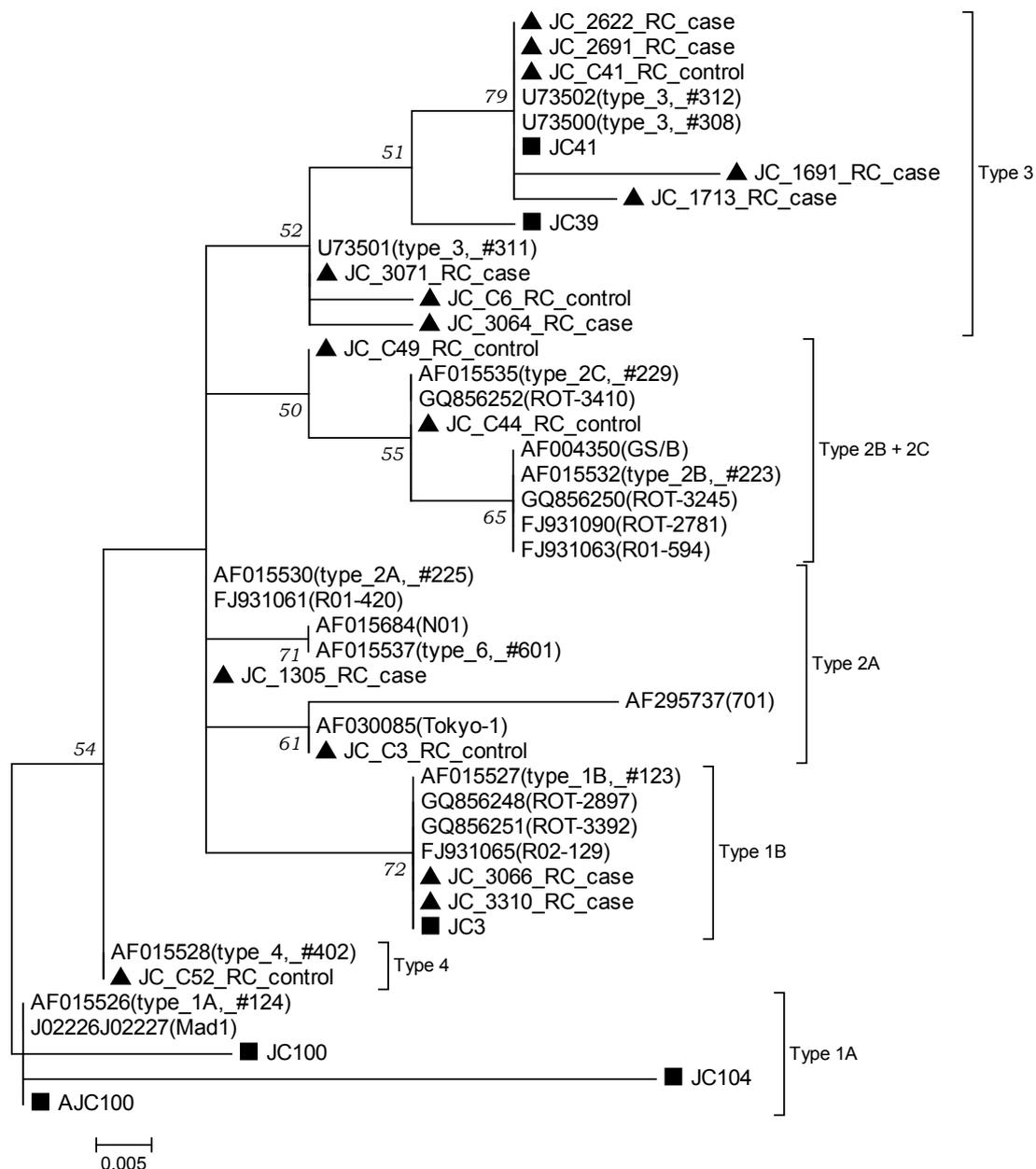
<sup>a</sup>Amostras sequenciadas. + (Detectado) - (Não detectado).

O JCV foi mais frequentemente encontrado do que o BKV em todas as amostras de água testadas (40 % de amostras positivas para JCV enquanto 20 % de amostras BKV positivas)

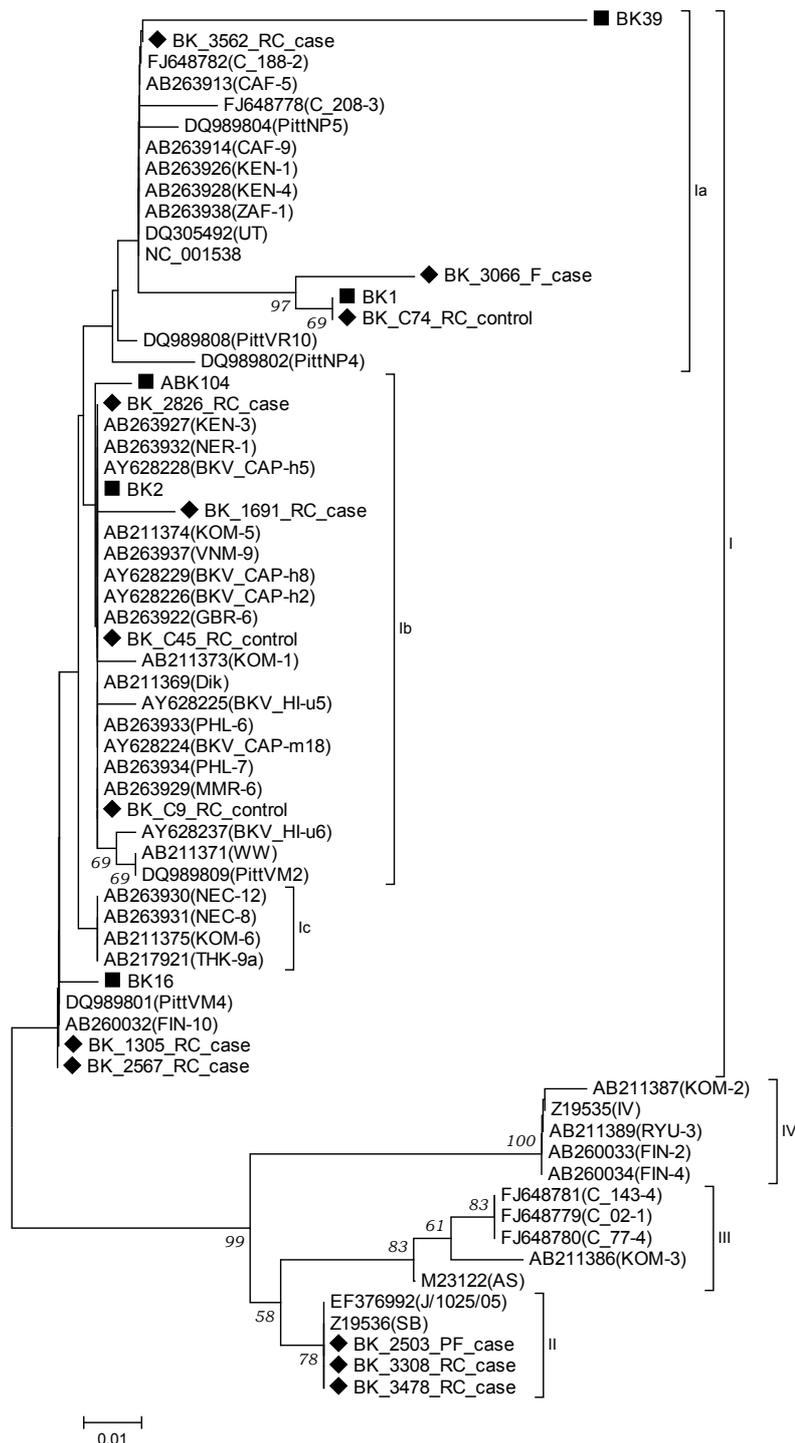
#### **4.4 – Caracterização molecular do JCV e BKV nas amostras clínicas e ambientais**

Vinte e sete produtos das amostras clínicas de 296 e 215 pb, referentes ao BKV e JCV respectivamente, foram selecionados para sequenciamento. As sequências obtidas foram confirmadas pela comparação com as outras disponíveis no *GenBank* usando o programa *BLAST*. Destas amostras de urina, 15 são sequências de JCV e 12 de BKV. Os resultados das análises filogenéticas para JCV e BKV estão demonstrados nas Figuras 7 e 8, respectivamente, em conjunto com as amostras de água, descritas a seguir e também caracterizadas. Os variantes do JCV detectados nas amostras clínicas foram agrupados em quatro diferentes tipos, 1, 2, 3 e 4. As sequências de BKV obtidas no estudo são representativas dos tipos I e II.

As amostras de água positivas para JCV e BKV foram selecionadas e conduzidas à caracterização molecular. JCV dos tipos 1 e 3 foram identificados (Figura 7), enquanto que todos os BKV identificados foram caracterizados como pertencendo ao tipo 1 (Figura 8).



**FIGURA 7.** Análise filogenética de sequências nucleotídicas de 215pb referentes à região VP1 do JC poliomavírus. Foram alinhadas 43 sequências nucleotídicas para elaboração desta árvore. Das sequências do estudo 15 pertencem às urinas e 6 às amostras de água. Os genótipos de JCV encontrados foram comparados com outros previamente reportados. Os triângulos pretos representam as amostras clínicas; seguido do número de identificação da amostra está representada a qual grupo pertence (*control* = grupo controle; *case* = grupo transplantados). Os quadrados pretos representam as amostras de água analisadas.



**FIGURA 8.** Análise filogenética de sequências nucleotídicas de 296pb referentes à região VP1 do poliomavírus BK. Foram alinhadas 62 sequências nucleotídicas para elaboração desta árvore. Das sequências do estudo, 12 pertencem às urinas e 5 às amostras de água. Os genótipos de BKV encontrados foram comparados com outros previamente reportados. Os triângulos pretos representam as amostras clínicas; seguido do número de identificação da amostra está representada a qual grupo pertence (*control* = grupo controle; *case* = grupo transplantados). Os quadrados pretos representam as amostras de água analisadas.

## **5. DISCUSSÃO**

### **5.1 – Detecção do JCV e BKV em pacientes transplantados renais e indivíduos saudáveis**

Os poliomavírus BKV e JCV são ubíquos em humanos e são excretados pela urina de indivíduos imunocompetentes e imunossuprimidos. Especialmente em pacientes submetidos a transplante renal esses vírus, especialmente o BKV, tem sido relacionado com desenvolvimento de doença renal e complicações pós - transplante. Sendo assim, um dos objetivos desse estudo foi identificar DNA de BKV e JCV na urina de pacientes submetidos a transplante renal e em indivíduos saudáveis.

No presente estudo o DNA do JCV e/ou do BKV foi encontrado com maior frequência nos pacientes transplantados renais (72,8 %) do que nos indivíduos saudáveis (53,4 %), indicando que esses indivíduos estavam excretando vírus no momento das coletas. A excreção viral em taxas mais altas nos pacientes transplantados provavelmente está relacionada com a terapia imunossupressora à qual estes pacientes são submetidos (Machado et al., 2011; Rota et al., 2011), já descrita em trabalhos prévios. Na Itália, 61,4 % dos pacientes transplantados foram positivos para poliomavírus (Baldanti et al., 2007), enquanto foram encontrados 33 % de pacientes positivos na Suécia (Priftakis et al., 2000). No Brasil, em trabalho semelhante, Pires et al. (2011)

detectaram DNA de BKV e de JCV na urina de 22,4 % (30/134) dos indivíduos saudáveis, e em 30,5 % (18/59) dos pacientes transplantados renais da região norte do Brasil. Neste estudo 38 % dos pacientes transplantados renais foram positivos para ambos os poliomavírus, indicando co-infecção com os dois vírus. A frequência de co-infecções em indivíduos saudáveis foi mais baixa (15,9 %). Altas taxas de co-infecção para estes poliomavírus foram previamente reportadas no Brasil em estudo com pacientes HIV positivos (Nali et al., 2012). Nali et al., (2012) encontraram excreção simultânea do JCV e BKV em 56 % dos pacientes investigados. Entretanto estes achados diferem de outros disponíveis na literatura, os quais tem demonstrado taxas muito menores. Priftakis et al. (2000) encontraram 3,5 % de co-infecção em transplantados renais, enquanto um estudo desenvolvido em Saint Louis, EUA, reportou a ocorrência de co-infecção em apenas 1,5 % dos pacientes (Cheng et al., 2011). Variações nos resultados de detecção viral podem ser devido a diferenças na sensibilidade das técnicas de detecção, diferenças de aspectos clínicos e estado imunológico dos indivíduos testados, ou mesmo diferenças demográficas dos pacientes.

Amostras positivas para BKV, associadas ou não à presença de JCV, foram significativamente mais frequentes no grupo de transplantados do que nos indivíduos saudáveis. Resultados similares sobre a detecção de BKV foram recentemente descritos por Montagner et al. (2010). Estes autores encontraram 61,7 % de urinas positivas para BKV coletadas de pacientes transplantados renais na região sul do Brasil. Pires et al. (2011) também encontraram significativa diferença na detecção de BKV; enquanto 27,1 % dos

transplantados foram positivos, apenas em 2,2 % do grupo controle foi detectado BKV.

Quando a presença somente de DNA do JCV nas urinas foi analisada, essa foi significativamente maior nos indivíduos saudáveis do que nos transplantados. Tal resultado está de acordo com outros obtidos em estudos com a população italiana e portuguesa (Rodrigues et al., 2007; Costa et al., 2009). Entre os pacientes submetidos ao transplante de rim, o JCV foi mais prevalente em homens do que em mulheres, enquanto que no grupo controle uma maior frequência do JCV esteve relacionada com os indivíduos mais velhos ( $p < 0.05$ ). Estas associações entre gênero, idade e virúria do JCV já foram reportadas por outros pesquisadores (Rodrigues et al., 2007).

O rastreamento e a caracterização molecular de poliomavírus em pacientes transplantados renais se torna uma eficiente maneira de reduzir o desenvolvimento da nefropatia e a consequente rejeição do enxerto, através, então, do ajuste precoce da terapia imunossupressora. Esta providência pode melhorar a qualidade de vida destes pacientes.

## **5.2 – Detecção do JCV e BKV em águas superficiais**

A Identificação de vírus patogênicos para humanos no ambiente hídrico tem sido uma das metas para a melhora do controle microbiológico da água há alguns anos (Fong & Lipp, 2005a). Os poliomavírus JC e BK são considerados possíveis candidatos a este controle, em função da resistência que apresentam no ambiente, da via de excreção e da importância clínica. Sendo assim, e considerando-se que não há dados disponíveis sobre a distribuição de poliomavírus em águas superficiais de Porto Alegre, esse

estudo foi desenhado para determinar a presença desses vírus em amostras de água do arroio Dilúvio e da ETE Navegantes, além de definir quais os genótipos de JCV e BKV que ocorrem nessas águas.

Quando analisada a presença do JCV nas amostras do Arroio Dilúvio (8/14), a frequência encontrada correspondeu a 57,14 % das amostras, enquanto que 35,7 % das amostras foram BKV positivas. Comparando este resultado com dados sobre a presença de outros vírus nestas mesmas amostras do Arroio Dilúvio (Vecchia et al., 2012a), o JCV apresentou considerado destaque. Vecchia et al. (2012a) observaram que 64,28 % das amostras de água foram positivas para enterovírus, 28,57 % foram positivas para torque teno vírus e 21,43 % para adenovírus. De acordo com estes dados a taxa de detecção do JCV só foi menor do que a encontrada para o enterovírus.

Foi possível observar uma maior frequência de poliomavírus nos pontos de coleta 1 e 4 do percurso do arroio (Figura 3). No ponto 1 estão localizadas as nascentes do arroio. Devido à baixa densidade de edificação nesta região os cursos de seus afluentes são, na maior parte dos casos, ainda naturais. Esta característica permite classificar este ponto como pertencendo a uma zona de baixo impacto ambiental (Menegat, 2006). Todavia, sabe-se que contaminações do lençol freático são possíveis. Sendo assim a constante frequência de JCV neste ponto observada nesse estudo, sugestiva de contaminação por dejetos de humanos, não condiz com a classificação inicialmente estipulada para esta zona. O ponto 4, por sua vez, é o último ponto anterior ao deságue no Lago Guaíba. Este ponto se encontra numa zona

classificada como de alto impacto ambiental, principalmente em função da intensa urbanização, incluindo edificação de vários hospitais (Menegat, 2006). Tais características justificam a alta frequência de JCV neste ponto.

Foi observada uma associação entre a presença do JCV com o segundo período de coleta, transcorrido em Abril. Neste mês, de acordo com o Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) o nível de precipitação foi reduzido quando comparado com os outros meses de coleta. Enquanto nos meses de Janeiro e Setembro o nível de precipitação foi de 169 e 293 mmHg, respectivamente, no mês de Abril foi apenas de 31 mmHg (INMET, 2009). Assim a baixa precipitação parece ter influenciado na maior detecção de JCV no arroio.

Com relação às águas coletadas da ETE, das 16 amostras avaliadas cinco foram positivas, quatro para JCV (25 %) e uma para BKV (6,25 %). Quando as mesmas amostras de água foram submetidas à detecção de ácidos nucléicos de vírus entéricos, em estudo prévio, a maior taxa de detecção observada foi de adenovírus, encontrado em 37,5 % das amostras (6/16) (Vecchia et al., 2012b). Das cinco amostras positivas, apenas uma pertence ao afluente. Este resultado pode estar relacionado com a maior carga orgânica e também com a presença das partículas sólidas no esgoto da entrada da ETE, já que os vírus podem se adsorver nestes materiais, dificultando sua detecção pela metodologia utilizada. A carga orgânica pode também inibir diretamente a detecção molecular dos vírus, todavia a adição do CI neste trabalho visou à identificação da inibição das amplificações e a reavaliação das amostras inibidas. Em concordância com este resultado, Vecchia et al. (2012b) obteve

maior frequência de adenovírus, enterovírus e torque teno vírus no esgoto pós-tratamento do que no esgoto de entrada da ETE. Esses dados sugerem que o sistema utilizado para tratamento do esgoto está sendo ineficaz no que diz respeito à eliminação de vírus presentes no afluente. Quando comparados os resultados de detecção de vírus aqui obtidos com os resultados de Vecchia et al. (2012a), em cada ponto de coleta no Arroio Dilúvio e na ETE, observou-se que o JCV e o enterovírus foram encontrados nas mesmas amostras coletadas. Por outro lado, não houve relação entre a frequência de detecção dos outros identificados.

O mês de Julho, no qual a média de temperatura é menor, foi o único mês no qual ambas as amostras de esgoto foram positivas para JCV. A correlação entre a presença do poliomavírus, e também de outros vírus entéricos, com baixas temperaturas, já foi reportada anteriormente (Fongaro et al., 2012).

A presença de vírus em amostras de água superficial no Brasil tem sido relatada em alguns trabalhos. Esses estudos focam na detecção de vírus entéricos e de poliomavirus em diversos tipos de água. Moresco et al (2012) analisaram 132 amostras de águas coletadas em 11 praias da ilha de Florianópolis, Santa Catarina, para a presença de vírus entéricos e poliomavírus. Dentre os analisados, o vírus mais prevalente foi o adenovírus humano (55 %) enquanto que o JCV foi detectado em apenas 3 % das amostras (Moresco et al., 2012). Porém, em um estudo mais recente também realizado por este grupo, foi avaliada contaminação viral em uma Lagoa do município de Florianópolis e a percentagem de amostras positivas para JCV foi

de 21 % (Fongaro et al., 2012). Já este resultado se aproxima do encontrado no presente trabalho. Em outro estudo, desenvolvido no Rio de Janeiro, foi acessada a frequência do poliomavírus JC através de uma nPCR em amostras de água coletadas em uma ETE. Noventa e seis e 43 % das amostras de água pré- e pós - tratamento de esgoto, respectivamente, foram JCV positivas (Fumian et al., 2010). Tais resultados indicam eficácia no tratamento de esgoto da ETE em questão, diferente do observado no presente estudo.

Os resultados de detecção de vírus em amostras de água podem ser influenciados por diversos fatores, incluindo, diferenças nos métodos de concentração de vírus, diferenças na sensibilidade dos métodos moleculares e inclusive diferenças na composição do ambiente aquático avaliado (Girones et al., 2010). Particularmente quando comparado o presente estudo com o reportado nas praias de Florianópolis, as diferenças dos resultados podem ser atribuída às diferenças das amostras de água. Enquanto este estudo avaliou amostras de efluentes e esgoto, Moresco et al. (2012) avaliaram águas oceânicas, sendo a salinidade um possível interferente nos resultados (Girones et al., 2010).

JCV e BKV são ubíquos nas amostras de água de esgoto não tratado e de lodo das fossas sépticas da Flórida e Califórnia; EUA. Em estudo conduzido por McQuaig et al. (2010), uma frequência similar dos dois vírus foi encontrada nestas águas. A frequência de JCV e BKV descrita aqui corrobora com estudos prévios, os quais reportam uma ampla detecção de poliomavírus humanos em amostras ambientais. A maioria destes outros estudos utilizaram principalmente qPCR ou nPCR para detecção dos poliomavírus e trabalharam

com amostras de água residuais. Entre outros locais já estudados, estão também: Cairo, Egito; Patras, Grécia; Barcelona, Espanha; Nancy, França; Pretoria, África do Sul; Umea, Suécia; Tokyo, Japão; Califórnia e Washington, EUA e Alemanha (Bofill-Mas et al. 2000; Albinana-Gimenez et al. 2006; Bofill-Mas et al. 2006; Rafique & Jiang 2008; Hamza et al., 2009; Haramoto et al. 2010).

### **5.3 – Caracterização molecular do JCV e BKV nas amostras clínicas e ambientais**

Os oligonucleotídeos utilizados na nPCR anelam-se a uma região conservada que codifica a maior proteína do capsídeo destes poliomavírus, a VP1, a qual é responsável pela variabilidade antigênica entre os isolados de JCV e BKV. A amplificação desta região genômica permitiu a detecção dos dois vírus (Jin et al., 1993; Luo et al., 2009), enquanto que a análise por sequenciamento permitiu a caracterização de cada espécie identificada em diferentes genótipos. No Brasil, o presente estudo é um dos primeiros que trabalham com determinação de genótipos de poliomavírus circulantes na população e em águas superficiais. Especificamente no caso do BKV, a sua caracterização em subtipos tem ganhado importância pelo possível envolvimento de determinados genótipos do BKV com o desenvolvimento da nefropatia (Moens & Van Ghelue, 2005). Apesar disso, poucos grupos que trabalham com identificação de BKV tem realizado sua genotipagem.

A análise filogenética das amostras BKV positivas mostrou a presença dos tipos I e II nas urinas, enquanto nas amostras de água apenas o tipo I foi encontrado. Este tipo pode ser classificado em três principais subtipos:

I/a, I/b e I/c. Um estudo que sugere a relação entre os subtipos de BKV e a migração populacional, detectou primeiramente na população europeia e americana o subtipo I/b, o qual foi encontrado no presente estudo (Zhong et al., 2009). Dentro do tipo I, o subtipo a foi também encontrado, enquanto que as outras amostras não puderam ser caracterizadas em subtipos, permanecendo apenas como pertencentes ao tipo I. O subtipo I/a pertence ao primeiro genoma de BKV caracterizado nos EUA (Howley et al., 1975; Seif et al., 1979).

Zalona et al. (2011) foram os primeiros pesquisadores a demonstrar os genótipos circulantes do BKV no Brasil. Este grupo detectou BKV em pacientes transplantados renais no Rio de Janeiro e encontrou os tipos I, II e III, fortalecendo assim os achados deste estudo.

O JCV tem sido estudado como um marcador de migração da população humana devido a seu envolvimento como agente infeccioso no homem desde o surgimento das populações modernas, 100,000–200,000 anos atrás (Stoner et al., 2000). Em consequência disto, a caracterização molecular deste vírus em determinadas áreas geográficas tem permitido conhecer a diversidade populacional do local estudado (Rafique & Jiang, 2008). Os tipos de JCV distribuídos no esgoto e em outros corpos hídricos urbanos parecem representar os vírus que estão sendo excretados pela população residente aos arredores dos corpos de água.

As sequências de JCV analisadas foram classificadas nos tipos europeus 1 e 4, no tipo africano 3, e no tipo asiático 2, os quais são característicos do Velho Mundo (Stoner et al., 2000). A análise filogenética possibilita ainda classificar os genótipos 1 em subtipos 1A e 1B, os quais são

predominantes na Hungria e Espanha respectivamente. Já o tipo 2 foi classificado nos subtipos 2A, 2B e 2C. Destes o tipo 2B leva destaque por ser frequente nos pacientes JCV positivos que desenvolvem PML. O subtipo 2A tem como origem o leste asiático, sendo diferenciado do 2C em função de um poliformismo da VP1 (Stoner et al., 2000). Quando analisada a árvore filogenética do JCV, construída com as amostras de urina e de água, pode-se observar que os tipos 2 e 4, presentes nas amostras clínicas, não foram encontrados nas amostras de água. Entretanto, os tipos 1 e 3, que são os associados com a população de origem europeia e africana, respectivamente, foram identificadas tanto nas amostras de água quanto nas urinas. Essa origem populacional está de acordo com a estrutura da população brasileira, inclusive do sul do país (Parra et al., 2003; Fumian et al., 2010). Reforçando estes achados, estudos anteriores desenvolvidos nos estados do Rio de Janeiro e São Paulo já demonstraram a presença destes tipos de JCV na população brasileira (Fink et al., 2010; Fumian et al., 2010). Além disso, diferentes genótipos de JCV foram reportados recentemente pela primeira vez na região amazônica do Brasil. Tal estudo encontrou genótipos semelhantes aos já descritos na população nativa norte americana (Zheng et al., 2003; Cayres-vallinoto et al., 2012).

A falta de concordância entre o período de coleta das águas e urinas impossibilita afirmar que os poliomavírus circulantes nas águas sejam os mesmos que circulam nos indivíduos inseridos no estudo. Porém, mesmo com este viés, todos os genótipos de JCV e BKV encontrados nas amostras de água foram também encontrados nas amostras de urina, enquanto o contrário

não foi observado. Este é o primeiro estudo que reporta a presença e diversidade genética do BKV e JCV circulando na região sul do Brasil.

## 6. CONCLUSÕES

No presente trabalho três reações de PCR foram otimizadas, uma convencional e duas nPCR, com o objetivo de detectar e diferenciar os poliomavírus humanos JC e BK detectados em amostras humanas e de águas superficiais.

BKV e JCV foram encontrados em indivíduos saudáveis e em transplantados renais, sendo que em transplantados a proporção de pacientes positivos para um ou os dois poliomavírus foi maior do que em saudáveis.

BKV foi mais frequente em transplantados do que em saudáveis, e os genótipos encontrados desse vírus foram os tipos I e II.

JCV foi sutilmente mais frequente em transplantados, porém esse resultado não foi significativo. Os genótipos encontrados nas urinas avaliadas representam os tipos 1 a 4.

Este trabalho demonstrou pela primeira vez a circulação do JCV e BKV nas águas superficiais da cidade de Porto Alegre.

Nas amostras do arroio Dilúvio o JCV foi encontrado em maior frequência do que o BKV. Já nas amostras da ETE, mesmo o JCV sendo mais frequente, ambos os vírus foram encontrados em baixa frequência. O tipo I foi o único genótipo de BKV encontrado nas águas, enquanto que os tipos 1 e 3 foram os encontrados para JCV.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEDI KIASARI, B.; VALLELY, P.J.; CORLESS, C.E.; AL-HAMMADI, M.; KLAPPER, P.E. Age-related pattern of KI and WU polyomavirus infection. **Journal of Clinical Virology**, Inglaterra, v. 43, n. 1, p. 123–125, jun. 2008.

ACOTT, P.D.; O'REGAN, P.A.; LEE, S.H.; CROCKER, J.F. Utilization of vero cells for primary and chronic BK virus infection. **Transplantation Proceedings**, Canada, v. 38, n. 10, p. 3502-3505, dez. 2006

AGOSTINI, H.T.; YANAGIHARA, R.; DAVIS, V.; RYSCHKEWITSCH, C.F.; 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 of the USA**, EUA, v. 94, p. 14542–14546, jan/dez. 1997a.

AGOSTINI, H.T.; RYSCHKEWITSCH, C.F.; BRUBAKER, G.R.; SHAO, J.; STONER, G.L. Five complete genomes of JC virus Type 3 from Africans and African Americans. **Archives of Virology**, EUA, v. 142, p. 637–655, jan/dez. 1997b.

ALBINANA-GIMENEZ, N.; CLEMENTE-CASARES, P.; BOFILL-MAS, S.; HUNDESA, A.; RIBAS, F.; GIRONES, R. Distribution of human polyomaviruses, adenoviruses, and hepatitis E virus in the environment and in a drinking-water treatment plant. **Environmental Science & Technology**, Espanha, v. 40, n. 23, p. 7416-7422, dez. 2006.

ALLANDER, T.; ANDREASSON, K.; GUPTA, S.; BJERKNER, A.; BOGDANOVIC, G.; PERSSON, M.A.; DALIANIS, T.; RAMQVIST, T.; ANDERSSON, B. Identification of a third human polyomavirus. **Journal of Virology**, Suécia, v. 81, n. 8, p. 4130–4136, jan/dez. 2007.

ARTHUR, C.K.; APPERLEY, J.F.; GUO, A.P.; RASSOOL, F.; GAO, L.M.; GOLDMAN, J.M. Cytogenetic events after bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia in chronic phase. **Blood**, Inglaterra, v. 71, p. 1179-1186, jan/dez. 1988.

AULT, G.S.; STONER, G.L. Two major types of JC virus defined in progressive multifocal leukoencephalopathy brain by early and late coding region DNA

sequences. **The Journal of General Virology**, EUA, v. 73, p. 2669–2678, out. 1992.

BABEL N, FENDT J, KARAIVANOV S, BOLD G, ARNOLD S, SEFRIN A, LIESKE E, HOFFZIMMER M, DZIUBIANAU M, BETHKE N, MEISEL C, GRÜTZ G, REINKE P. Sustained BK viruria as an early marker for the development of BKV-associated nephropathy: analysis of 4128 urine and serum samples. **Transplantation**, Alemanha, v. 88, n.1, p. 89-95, jul. 2009.

BALDANTI F, FOGAZZI GB, FURIONE M, SAGLIMBENI L, ROVIDA F, GATTI M, PAOLUCCI S, TARANTINO A, GERNA G. Quantification and identification of polyomavirus DNA in blood and urine of renal transplant recipients. **Diagnose Microbiology Infection Disease**, Itália, v. 57, n. 3, p. 301-307, mar. 2007.

BARRI, Y.M.; AHMAD, I.; KETEL, B.L.; BARONE, G.W.; WALKER, P.D.; BONSIB, S.M.; ABUL-EZZ, S.R. Polyoma viral infection in renal transplantation: the role of immunosuppressive therapy. **Clinical Transplantation**, EUA, v. 15, n. 4, p. 240-246, ago. 2001.

BERGER, J.R.; KASZOVITZ, B.; POST, M.J.; DICKINSON, G. Progressive multifocal leukoencephalopathy associated with human immunodeficiency virus infection. **Annals of Internal Medicine**, v. 107, p. 78–87, jul. 1987.

BERGER, H.; WINTERSBERGER, E. Polyomavirus small T antigen enhances replication of viral genomes in 3T6 mouse fibroblasts. **Journal of Virology**, v. 60, n. 2, p. 768-770, nov. 1986.

BERGER, J.R.; MAJOR, E.O. Progressive multifocal leukoencephalopathy. **Seminars in Neurology**, v. 19, n. 2, p. 193-200, jan/dez. 1999.

BODAGHI, S.; COMOLI, P.; BÖSCH, R.; AZZI, A.; GOSERT, R.; LEUENBERGER, D.; GINEVRI, F.; HIRSCH, H.H. Antibody responses to recombinant polyomavirus BK large T and VP1 proteins in pediatric kidney transplant patients. **Journal of Clinical Microbiology**, Itália, v. 47, p.2577–2585, ago. 2009.

BOFILL-MAS, S.; PINA, S.; GIRONES, R. Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. **Applied Environmental Microbiology**, Espanha, v. 66, n. 1, p. 238–245, jan. 2000.

BOFILL-MAS, S.; FORMIGA-CRUZ, M.; CLEMENTE-CASARES, P.; CALAFELL, F.; GIRONES, R. Potential transmission of human polyomaviruses through the gastrointestinal tract after exposure to virions or viral DNA. **Journal of virology**, Espanha, v. 75, p. 10290–10299, nov. 2001.

BOFILL-MAS, S.; ALBINANA-GIMENEZ, N.; CLEMENTE-CASARES, P.; HUNDESA, A.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; ALLARD, A.; CALVO, M.; GIRONES, R. Quantification and Stability of Human Adenoviruses and Polyomavirus JCPyV in Wastewater Matrices. **Applied and Environmental Microbiology**, Espanha, v. 72, n. 12, p. 7894–7896, dez. 2006.

BOLLAG, B.; CHUKE, W.F.; FRISQUE, R.J. Hybrid genomes of the polyomaviruses JC virus, BK virus, and simian virus 40: identification of sequences important for efficient transformation. **Journal of Virology**, v. 63, n. 2, p.863-872, fev. 1989.

BOOTHUPUR, R.; BRENNAN, D.C. Human polyoma viruses and disease with emphasis on clinical BK and JC. **Journal of Clinical Virology**, EUA, v. 47, n. 4, p. 306-312, jan. 2010.

BOUKOUM, H.; NAHDI, I.; ABID, N.; FOULONGNE, V.; SAHTOUT, W.; ZALLEMA, D.; SKIRI, H.; ALOUI, S.; ACHOUR, A.; SEGONDY, M.; AOUNI, M. Distribution of JC polyomavirus genotypes in Tunisian renal transplant recipients between January 2008 and January 2011. **Journal of Medical Virology**, Tunisia, v. 84, n. 11, p. 1818-1824 nov. 2012.

CAYRES-VALLINOTO, I.M.; VALLINOTO, A.C.; AZEVEDO, V.N.; MACHADO, L.F.; ISHAK, M.D.E.O.; ISHAK, R. Human JCV Infections as a Bio-Anthropological Marker of the Formation of Brazilian Amazonian Populations. **PLoS One**, Brasil, v. 7, n. 10, out. 2012.

CARRATALÀ, J.; MONTEJO, M.; PÉREZ-ROMERO, P. Infections caused by herpes viruses other than cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Espanha, v. 30, n. 2, p. 63-69, mar. 2012.

CASTRO, M.C.R. Manual de Transplante Renal – Período pós transplante. São Paulo: Grupo Lopso de Comunicação. Associação Brasileira de Transplante de Órgãos, 2006.

CETESB. **Guia de coleta e preservação de amostras de água**. São Paulo [s. ed], 1987.

CHEN, X.S.; STEHLE, T.; HARRISON, S.C. Interaction of polyomavirus internal protein VP2 with the major capsid protein VP1 and implications for participation of VP2 in viral entry. **The EMBO Journal**, EUA, v. 17, n. 12, p. 3233-3240, jun. 1998.

CHENG, J.; DECAPRIO, J.A.; FLUCK, M.M.; SCHAFFHAUSEN, B.S. Cellular transformation by Simian Virus 40 and Murine Polyoma Virus T antigens. **Seminars in Cancer Biology**, EUA, v. 19, n. 4, p. 218-228, ago. 2009

CHENG, X.S.; BOHL, D.L.; STORCH, G.A.; RYSCHKEWITSCH, C.; GAUDREAUULT-KEENER, M.; MAJOR, E.O.; RANDHAWA, P.; HARDINGER, K.L.; BRENNAN, D.C. Inhibitory interactions between BK and JC virus among kidney transplant recipients. **Journal of the American Society of Nephrology**, EUA, v. 22, n. 5, p 825-831, maio. 2011.

COGERH. **Recomendações e cuidados na coleta de amostras de água** – Informe técnico nº.02. Fortaleza: [s. ed.], 2001.

COLE, C.N.; CONZEN, S.D. Polyomaviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M., editors. *Fields Virology*. 4<sup>th</sup> Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkens, 2001. p. 2141–2174.

COLEMAN, D.V.; MACKENZIE, E.F.; GARDNER, S.D.; POULDING, J.M.; AMER, B.; RUSSELL, W.J. Human polyomavirus (BK) infection and ureteric stenosis in renal allograft recipients. **Journal of Clinical Pathology**, Inglaterra, v.31, n. 4, p. 338-347, abr. 1978.

COLEMAN, D. V.; WOLFENDALE, M. R.; DANIEL, R. A.; DHANJAL, N.K., GARDNER, S. D.; GIBSON, P. E.; FIELD, A. M. A prospective study of human poliomyovirus infection in pregnancy. **Journal of Infections Disease**, v. 142, p. 1-8, jan/dez. 1980.

COMAR, M.; BONIFACIO, D.; ZANCONATI, F.; DI NAPOLI, M.; ISIDORO, E.; MARTINI, F.; TORELLI, L.; TOGNON, M. High prevalence of BK polyomavirus sequences in human papillomavirus-16-positive precancerous cervical lesions. **Journal of Medical Virology**, Itália, v. 83, n. 10, p 1770-1776, out. 2011.

COSTA, C.; BERGALLO, M.; SIDOTI, F.; ASTEGIANO, S.; TERLIZZI, M.E.; MAZZUCCO, G.; SEGOLONI, G.P.; CAVALLO, R. Polyomaviruses BK- and JC-DNA quantitation in kidney allograft biopsies. **Journal of Clinical Virology**, Itália, v. 44, p. 20–23, jan/dez. 2009.

CROUL, S.; OTTE, J.; KHALILI, K. Brain tumors and polyomaviruses. **Journal of Neurovirology**, EUA, v. 9, n. 2, p. 173-182, abr. 2003.

DALL, A.; HARIHARAN, S. BK virus nephritis after renal transplantation. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, EUA, v. 3, n. 2, p. 68-75, mar. 2008.

DMAE – **Departamento Municipal de Água e Esgoto**. Disponível em: <[http://www2.portoalegre.rs.gov.br/dmae/default.php?p\\_secao=318](http://www2.portoalegre.rs.gov.br/dmae/default.php?p_secao=318)> Acesso em: 22 out. 2012.

DRACHENBERG, C.B.; PAPADIMITRIOU, J.C. Polyomavirus-associated nephropathy: update in diagnosis. **Transplant Infection Disease**, EUA, v. 8, n. 2, p. 68-75, jun. 2006.

DUGAN AS, GASPAROVIC ML, TSOMAIA N, MIERKE, D.F.; O'HARA, B.A.; MANLEY, K.; ATWOOD, W.J. Identification of amino acid residues in BK virus VP1 that are critical for viability and growth. **Journal of Virology**, EUA, v. 81, n. 21, p. 11798-11808, nov. 2007.

EASH, S.; MANLEY, K.; GASPAROVIC, M.; QUERBES, W.; ATWOOD, W.J. The human polyomaviruses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, EUA, v. 63, n. 7-8, p. 865-876, abr. 2006.

EGLI, A.; DUMOULIN, A.; KOHLI, S.; HIRSCH, H.H. Polyomavirus BK after kidney transplantation: role of molecular and immunological markers. **Trends in Transplantation**, v. 3, p. 85–102. 2009a.

EGLI, A.; INFANTI, L.; DUMOULIN, A.; BUSER, A.; SAMARIDIS, J.; STEBLER, C.; GOSERT, R.; HIRSCH, H. H. Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. **Journal of Infection Disease**, Suíça, v. 199, p. 837–846, jan-dez. 2009b.

FARIA, C. M.; NEUVALD, I. C.; ALVES, P. M. A. **Avaliação da evolução de alguns parâmetros físico - químicos e microbiológicos no Arroio Dilúvio**. Porto Alegre: DMAE, Publicações Técnicas do DMAE, n. 54, ago. 1994. CD-ROM.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, EUA, v. 39, p. 783-791, jul. 1985.

FENG, H.; SHUDA, M.; CHANG, Y.; MOORE, P.S. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. **Science**, EUA, v. 319, p. 1096–1100, fev. 2008

FINK, M.C.; DE OLIVEIRA, A.C.; ROMANO, C.M.; VIDAL, J.E.; URBANO, P.R.; TATENO, A.F.; OLIVEIRA, C.M.; DE ALBUQUERQUE LUNA, E.J.; PANNUTI, C.S. Molecular characterization of human polyomavirus JC in Brazilian AIDS patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. **Journal of Clinical Virology**, Brasil, v. 48, n. 1, p. 6-10, mar. 2010.

FISHMAN, J.A. BK virus nephropathy-polyomavirus adding insult to injury. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 7, p. 527-530, ago. 2002.

FONG, T.T.; LIPP, E. K. Enteric Viruses of Humans and Animals in Aquatic Environments: Health Risks, Detection, and Potential Water Quality Assessment Tools. **Microbiology and Molecular Review**, EUA, v. 69, p. 357-371, jun. 2005a.

FONG, T.T.; GRIFFIN, D.W.; LIPP, E.K. Molecular assays for targeting human and bovine enteric viruses in coastal waters and their application for library-independent source tracking. **Applied and Environmental Microbiology**, EUA, v. 71, n. 4, p. 2070-2078, jan/dez. 2005b.

FONGARO, G; NASCIMENTO, M.A; VIANCELLI, A; TONETTA, D; PETRUCIO, M.M; BARARDI, C.R. Surveillance of human viral contamination and physicochemical profiles in a surface water lagoon. **Water Science Technology**, Brasil, v. 66, n. 12, p. 2682-2687, out. 2012.

FRISQUE, R.J.; MARTIN, J.D.; PADGETT, B.L.; WALKER, D.L. Infectivity of DNA from four isolates of JC virus. **Journal of Virology**, v. 32, p. 476-482, 1979.

FUMIAN, T.M.; GUIMARÃES, F.R.; PEREIRA VAZ, B.J.; DA SILVA, M.T.; MUYLEAERT, F.F.; BOFILL-MAS, S.; GIRONÉS, R.; LEITE, J.P.; MIAGOSTOVICH, M.P. Molecular detection, quantification and characterization of human polyomavirus JC from waste water in Rio De Janeiro, Brazil. **Journal of Water and Health**, Brasil, v.8, n.3, p. 438-445, set. 2010

GARDNER, S.D.; FIELD, A.M.; COLEMAN, D.V.; HULME, B. New Human Papovavirus (b.k.) Isolated from urine after Renal Transplantation. **The Lancet**, Inglaterra, v. 297, n. 7712, p. 1253 - 1257, jun. 1971.

GARDNER, S.D. Implication of papovaviruses in human diseases. In: Kurstak E, editor. Comparative diagnosis of viral diseases. Vol 1. Human and related viruses (parte A). **New York: Academic Press**, 1977. p. 41-84.

GARDNER, S.D.; MACKENZIE, E.F.; SMITH, C.; PORTER, A.A. Prospective study of the human polyomaviruses BK and JC and cytomegalovirus in renal transplant recipients. **Journal of Clinical Pathology**, v. 37, n. 5, p. 578-586, maio. 1984.

GAYNOR, A.M.; Nissen, M.D.; Whiley, D.M.; Mackay, I.M.; Lambert, S.B.; Wu, G.; Brennan, D.C.; Storch, G.A.; Sloots, T.P.; Wang, D. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. **PLoS Pathogens**, EUA, v. 3, n. 5, p. 595-604, mai. 2007.

GAZIEV, J.; PABA, P.; MIANO, R.; GERMANI, S.; SODANI, P.; BOVE, P.; PERNO, C.F.; MARZIALI, M.; GALLUCCI, C.; ISGRÒ, A.; PACIARONI, K.; ROVEDA, A.; SIMONE, M.D.; DE ANGELIS, G.; ALFIERI, C.; LUCARELLI, G. Late-onset hemorrhagic cystitis in children after hematopoietic stem cell transplantation for thalassemia and sickle cell anemia: a prospective evaluation of polyoma (BK) virus infection and treatment with cidofovir. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, Itália, v. 16, n. 5, p. 662-671, maio. 2010.

GEDDES, C.C.; GUNSON, R.; MAZONAKIS, E.; WAN, R.; THOMSON, L.; CLANCY, M.; CARMAN, W.F. BK viremia surveillance after kidney transplant: single-center experience during a change from cyclosporine-to lower-dose tacrolimus-based primary immunosuppression regimen. **Transplant Infection Disease**, Inglaterra, v. 13, n. 2, p. 109-116, abr. 2011.

GIBSON, K.E.; OPRYSZKO, M.C.; SCHISLER, J.T.; GUO, Y.; SCHWAB, K.J. Evaluation of human enteric viruses in surface water and drinking water resources in southern Ghana. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, EUA, v. 84, n. 1, p. 20-29, jan. 2011.

GIRONES, R.; FERRÚS, M.A.; ALONSO, J.L.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; CALGUA, B.; CORRÊA, A.D.E.; HUNDESA, A.; CARRATALA, A.; BOFILL-MAS, S. Molecular detection of pathogens in water--the pros and cons of molecular techniques. **Water Research**, Espanha, v. 44, n. 15, p. 4325-4339, ago. 2010.

GLASS, A.J.; VENTER, M. Improved detection of JC virus in AIDS patients with progressive multifocal leukoencephalopathy by T-antigen specific fluorescence resonance energy transfer hybridization probe real-time PCR: evidence of diverse JC virus genotypes associated with progressive multifocal leukoencephalopathy in Southern Africa. **Journal of Medical Virology**, África do Sul, v. 81, n. 11, p. 1929-1937, nov. 2009.

GOUDSMIT, J.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P.; VAN STRIEN, A.; VAN DER NOORDAA, J. The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils. **Journal of Medical Virology**, v. 10, p. 91-99, jan/dez. 1982.

GROSS L. A filterable agent, recovered from Ak leukemic extracts, causing salivary gland carcinomas in C3H mice. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, EUA, v. 83, n. 2, p. 414-421, jun. 1953.

HAMZA, I.A.; JURZIK, L.; STANG, A.; SURE, K.; UBERLA, K.; WILHELM, M. Detection of human viruses in rivers of a densely-populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses. **Water Research**, Alemanha, v. 43, n. 10, p. 2657-2668, jun. 2009.

HARAMOTO, E.; KITAJIMA, M.; KATAYAMA, H.; OHGAKI, S. Real-time PCR detection of adenoviruses, polyomaviruses, and torque teno viruses in river water in Japan. **Water Research**, Japão, v. 44, n. 6, p. 1747-1752, mar. 2010.

HARKENSEE, C.; VASDEV, N.; GENNERY, A.R.; WILLETTS, I.E.; TAYLOR, C. Prevention and management of BK-virus associated haemorrhagic cystitis in children following haematopoietic stem cell transplantation - a systematic review and evidence-based guidance for clinical management. **British Journal of Haematology**, Reino Unido, v. 142, n. 5, p. 717-731, set. 2008.

HATWELL, J.N.; SHARP, P.M. Evolution of human polyomavirus JC. **The Journal of General Virology**, Reino Unido, v. 81, n. 5, p. 1191-1200, maio. 2001.

HELANTERÄ, I.; EGLI, A.; KOSKINEN, P.; LAUTENSCHLAGER, I.; HIRSCH, H.H. Viral impact on long-term kidney graft function. **Infectious Disease Clinics of North America**, Finlândia, v. 24, n. 2, p. 339-371, jun. 2010.

HIRSCH, H.H.; KNOWLES, W.; DICKENMANN, M.; PASSWEG, J.; KLIMKAIT, T.; MIHATSCH, M.J.; STEIGER, J. Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. **The New England Journal of Medicine**, Suíça, v. 347, n. 7, p. 488-496, ago. 2002.

HIRSCH, H.H.; STEIGER, J. Polyomavirus BK. **Lancet Infectious Disease**, Suíça, v. 3, p. 611–623, out. 2003.

HOWLEY, P.M.; KHOURY, G.; BYRNE, J.C.; TAKEMOTO, K.K.; MARTIN, M.A. Physical map of the BK virus genome. **Journal of Virology**, EUA, 16, 959–973, out. 1975.

HUNDESA, A.; MALUQUER DE MOTES, C.; BOFILL-MAS, S.; ALBINANA-GIMENEZ, N.; GIRONES, R. Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment. **Applied Environmental Microbiology**, Espanha, v. 72, n. 12, p. 7886-7893, dez. 2006.

ICTV - **Internacional Committee on Taxonomy of Viruses** (2011). Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2011>>. Acesso em: 22 out. 2012.

IKEGAYA, H.P.J.; SAUKKO, R.; TERTTI, K.P.; METSÄRINNE, M.J.; CARR, B.; CROWLEY, K.; SAKURADA, H.Z.; ZHENG, T.; KITAMURA YOGO, Y. Identification of a genomic subgroup of BK polyomavirus spread in European populations. **The Journal of General Virology**, Japão, v. 87, n. 11, p. 3201-3208, nov. 2006.

INMET – **Instituto Nacional de Meteorologia** (2009). Disponível em: <[http://www.inmet.gov.br/html/prev\\_climatica.php](http://www.inmet.gov.br/html/prev_climatica.php)>. Acesso em: 24 out. 2012.

JEFFERS, L.K.; MADDEN, V.; WEBSTER-CYRIAQUE, J. BK virus has tropism for human salivary gland cells in vitro: implications for transmission. **Virology**, EUA, v. 394, n. 2, p.183-193, nov. 2009.

JIANG, S.C.; CHU, W. PCR detection of pathogenic viruses in southern California urban rivers. **Journal of Applied Microbiology**, EUA, v. 97, p. 17–28, jan/dez. 2004.

JIN, L.; GIBSON, P.E.; KNOWLES, W.A.; CLEWLEY, J.P. BK virus antigenic variants: sequence analysis within the capsid VP1 epitope. **Journal of Medical Virology**, Inglaterra, v. 39, n. 1, p. 50–56, jan. 1993.

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**, EUA, n. 79, p. 2491-2498, out. 1998.

JOHNE, R.; BUCK, C.B.; ALLANDER, T.; ATWOOD, W.J.; GARCEA, R.L.; IMPERIALE, M.J.; MAJOR, E.O.; RAMQVIST, T.; NORKIN, L.C. Taxonomical developments in the family Polyomaviridae. **Archives of Virology**, Alemanha, v. 156, n. 9, p. 1627-1634, set, 2011.

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

KHANNA, N.; WOLBERS, M.; MUELLER, N.J.; GARZONI, C.; PASQUIER, R.A.; FUX, C.A.; VERNAZZA, P.; BERNASCONI, E.; VISCIDI, R.; BATTEGAY, M.; HIRSCH, H.H. JC virus-specific immune responses in human immunodeficiency Virus Type 1 Patients with Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. **Journal of Virology**, Suíça, v. 83, n. 9, p. 4404-4011, maio. 2009.

KÄMMERER, U.; KUNKEL, B.; KORN, K. Nested PCR for specific detection and rapid identification of human picornaviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, Alemanha, v. 32, n. 2, p. 285-289, fev. 1994.

KATAYAMA, H.; SHIMASAKI, A.; OHGAKI, S. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and norwalk virus from coastal seawater. **Applied Environmental Microbiology**, Japão, v. 68, p. 1033-1039, mar.2002

KEAN, J.M.; RAO, S.; WANG, M.; GARCEA, R.L. Seroepidemiology of Human Polyomaviruses. **PLoS Pathogens**, EUA, v. 5, n. 3, p.1 -10, mar. 2009.

KELLEY, W.L.; GEORGOPOULOS, C. The T/t common exon of simian virus 40, JC, and BK polyomavirus T antigens can functionally replace the J-domain of the Escherichia coli DnaJ molecular chaperone. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, EUA, v. 94, n. 8, p. 3679-3684, abr. 1997.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p.111-120, dez. 1980.

KITAMURA, T.; ASO, Y.; KUNIYOSHI, N.; HARA, K.; YOGO, Y. High Incidence of Urinary JC Virus Excretion in Nonimmunosuppressed Older Patients. **Journal of Infection Disease**, Japão, v. 161, n. 6, p. 1128-1133, jun. 1990.

KNOWLES, W.A.; PIPKIN, P.; ANDREWS, N.; VYSE, A.; MINOR, P.; BROWN, D.W.; MILLER, E. Population based study of antibody to the human

polyomaviruses BKV and JCV and the simian polyomavirus SV40. **Journal Medical Virology**, Inglaterra, v. 71, p. 115–123, set. 2003.

KNOWLES, W.A. Discovery and epidemiology of the human polyomaviruses BK virus (BKV) and JC virus (JCV). **Advances in Experimental Medicine and Biology**, Inglaterra, v. 577, p. 19–45, jan/dez. 2006.

KOKKINOS, P.; FILIPPIDOU, S.; KARLOU, K.; VANTARAKIS, A. Molecular typing of enteroviruses, adenoviruses, and hepatitis A viruses in untreated and treated sewage of a biological treatment plant in Greece. **Food and Environmental Virology**, Grécia, vol. 2, p. 89-96, jan/dez. 2010.

KWAK, E.J.; VILCHEZ, A.R.; RANDHAWA, P.; SHAPIRO, R.; BUTEL, J.S.; KUSNE, S. Pathogenesis and management of polyomavirus infection in transplant recipients. **Clinical Infectious Diseases**, EUA, v. 35, p. 1081-1087, nov. 2002.

LA ROSA, G.; POURSHABAN, M.; IACONELLI, M.; MUSCILLO, M. Quantitative real-time PCR of enteric viruses in influent and effluent samples from wastewater treatment plants in Italy. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità - Environmental Issues of Health Concern*, Itália, v. 46, p. 266-273, 2010.

LIN, F.; ZHENG, M.Y.; LI, H.; ZHENG, C.H.; RAO, G.F.; ZHENG, M.Q.; WU, F.; ZENG, A.P.; LI, X.Y.; HOU, J.Y. Discovery and identification of WU polyomavirus in children from Zhejiang region. **Bing Du Xue Bao**, China, v. 24, n. 1, p. 69–71, jan. 2008.

LOW, J.A.; MAGNUSON, B.; TSAI, B.; IMPERIALE, M.J. Identification of gangliosides GD1b and GT1b as receptors for BK virus. **Journal of Virology**, v. 80, n. 3, p. 1361-1366, fev. 2006.

LUO, C.; BUENO, M.; KANT, J.; MARTINSON, J.; RANDHAWA, P. Genotyping schemes for polyomavirus BK, using gene-specific phylogenetic trees and single nucleotide polymorphism analysis. **Journal of Virology**, EUA, v. 83, p. 2285–2297, mar. 2009.

MACHADO, D.M.; FINK, M.C.; PANNUTI, C.S.; SUCCI, R.C.M.; MACHADO, A.A.; CARMO, F.B.; GOUVÊA, A.D.E.F.; URBANO, P.R.; BELTRÃO, S.V.; DOS SANTOS, I.C.; MACHADO, C.M. Human polyomaviruses JC and BK in the urine of Brazilian children and adolescents vertically infected by HIV. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Brasil, v. 106, n. 8, p. 931-935, jan/dez. 2011.

MASTRANGELO, I.A.; HOUGH, P.V.; WALL, J.S.; DODSON, M.; DEAN, F.B.; HURWITZ, J. ATP-dependent assembly of double hexamers of SV40 T antigen at the viral origin of DNA replication. **Nature**, EUA, v. 338, n. 6217, p. 658-662, abr. 1989.

MCQUAIG, S.M.; SCOTT, T.M.; HARWOOD, V.J.; FARRAH, S.R.; LUKASIK, J.O. Detection of human-derived fecal pollution in environmental waters by use of a PCR-based human polyomavirus assay. **Applied and Environmental Microbiology**, EUA, v. 72, n. 12, p. 7567-7574, dez. 2006.

MCQUAIG, S.; SINIGALLIANO, C.; GIDLEY, M.; PLANO, L.R.; ZHU, X.; WANG, J.D.; FLEMING, L.E. Presence of pathogens and indicator microbes at a non-point source subtropical recreational marine beach. **Applied and Environmental Microbiology**, EUA, v. 76, n. 3, p. 724-732, fev. 2010.

MENEGAT, R. **Atlas Ambiental de Porto Alegre**. 3ª edição. Porto Alegre: Editora UFRGS. 2006.

MENEGUZZI, G.; PIGNATTI, P.F.; BARBANTI-BRODANO, G.; MILANESI, G. Minichromosome from BK virus as a template for transcription in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Itália, v. 75, n. 3, p. 1126-1130, mar. 1978.

MYHRE, M.R.; OLSEN, G.H.; GOSERT, R.; HIRSCH, H.H.; RINALDO, C.H. Clinical polyomavirus BK variants with agnogene deletion are non-functional but rescued by trans-complementation. **Virology**, Noruega, v. 398, n. 1, p. 12-20, mar. 2010.

MOENS, U.; VAN GHELUE, M. Polymorphism in the genome of non-passaged human polyomavirus BK: implications for cell tropism and the pathological role of the virus. **Virology**, Noruega, v. 331, n. 2, p. 209-231, jan. 2005.

MOENS, U.; LUDVIGSEN, M.; VAN GHELUE, M. Human Polyomaviruses in Skin Diseases. **Pathology Research International**, Noruega, v. 2011, p. 1- 12, jun. 2011.

MONTAGNER, J.; MICHELON, T.; FONTANELLE, B.; OLIVEIRA, A.; SILVEIRA, J.; SCHROEDER, R.; NEUMANN, J.; KEITEL, E.; ALEXANDRE, C.O. BKV-infection in kidney graft dysfunction. **Brazilian Journal of Infection Disease**, Brasil, v. 14, n. 2, p. 170-174, abr. 2010.

MORESCO, V.; VIANCELLI, A.; NASCIMENTO, M.A.; SOUZA, D.S.; RAMOS, A.P.; GARCIA, L.A.; SIMÕES, C.M.; BARARDI, C.R. Microbiological and physicochemical analysis of the coastal waters of southern. **Brazilian Marine Pollution Bulletin**, Brasil, v. 64, n. 1, p. 40-48, jan. 2012.

MÜLLER, U.; ZENTGRAF, H.; EICKEN, I.; KELLER, W. Higher order structure of simian virus 40 chromatin. **Science**, v. 201, n. 4354, p. 406-415, ago. 1978.

NAKANISHI, A.; ITOH, N.; LI, P.P.; HANDA, H.; LIDDINGTON, R.C.; KASAMATSU, H. Minor capsid proteins of simian virus 40 are dispensable for nucleocapsid assembly and cell entry but are required for nuclear

entry of the viral genome. **Journal of Virology**, EUA, v. 81, n. 8, p 3778-3785, abr. 2007.

NALI, L.H.S.; CENTRONE, C.C.; URBANO, P.R.P.; PENALVA-DE-OLIVEIRA, A.C.; VIDAL, J.E.; MIRANDA, E.P.; PANNUTTI, C.S.; FINK, M.C.D.S. - High prevalence of the simultaneous excretion of polyomaviruses JC and BK in the urine of HIV-infected patients without neurological symptoms in São Paulo. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, Brasil, v. 54, n. 4, p. 201-205, ago. 2012.

NEU, U.; STEHLE, T.; ATWOOD, W.J. The polyomaviridae: contributions of virus structure to our understanding of virus receptors and infectious entry. **Virology**, Alemanha, v. 384, p. 389–399, jan. 2009

NISHIMOTO, Y.; ZHENG, H.Y.; ZHONG, S.; IKEGAYA, H.; CHEN, Q.; SUGIMOTO, C.; KITAMURA, T.; YOGO, Y. An Asian origin for subtype IV BK virus based on phylogenetic analysis. **Journal of Molecular Evolution**, Japão, v. 65, p. 103–111, jul. 2007.

PADGETT, B.L.; WALKER, D.L.; ZURHEIN, G.M.; ECKROADE, R.J.; DESSEL, B.H. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. **The Lancet**, EUA, v. 1, p. 1257–1260, jun. 1971.

PARRA, F.C.; AMADO, R.C.; LAMBERTUCCI, J.R.; ROCHA, J.; ANTUNES, C.M.; PENA, S.D. Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Brasil, v. 100, n. 1, p. 177–182, jan. 2003.

PIETROPAOLO, V.C.; DI TARANTO, C.; DEGENER, A.M.; JIN, L.; SINIBALDI, L.; BAIOCCHINI, A.; MELIS, M.; ORSI, N. Transplacental transmission of human polyomavirus BK. **Journal of Medicine Virology**, Itália, v. 56, p. 372–376, dez. 1998.

PIRES, E.P.; BERNARDINO-VALLINOTO, C.V.; ALVES, D.M.; MIGONE, S.R.; MACHADO, L.F.; ISHAK, M.O.; ISHAK, R.; CAYRES-VALLINOTO, I.M.; VALLINOTO, A.C. Prevalence of infection by JC and BK polyomaviruses in kidney transplant recipients and patients with chronic renal disease. **Transplant Infectious Disease**, Brasil, v. 13, n. 6, p. 1-5, jan. 2011.

PORTO ALEGRE (Município). **Drenagem Urbana - DEP, 2011. O Arroio Dilúvio.** Disponível em: <[http://www2.portoalegre.rs.gov.br/dep/default.php?p\\_secao=71](http://www2.portoalegre.rs.gov.br/dep/default.php?p_secao=71)>. Acesso em: 22 out. 2012.

PRADO, T.; SILVA, D.M.; GUILAYN, W.C.; ROSE, T.L.; GASPAR, A.M.C.; MIAGOSTOVICH, M.P. Quantification and molecular characterization of enteric viruses detected in effluents from two hospital wastewater treatment plants. **Water Research**, Brasil, v. 45, p. 1287-1297, jan. 2011.

PRIFTAKIS, P.; BOGDANOVIC, G.; TYDEN, G.; DALIANIS, T. Polyomaviruria in renal transplant patients is not correlated to the cold ischemia period or to rejection episodes. **Journal of Clinical Microbiology**, Suécia, v. 38, n. 1, p. 406-407, jan. 2000.

RAFIQUE, A.; JIANG, S.C. Genetic diversity of human polyomavirus JCPyV in Southern California wastewater. **Journal of Water Health**, EUA, v. 6, n. 4, p. 533-538, dez. 2008.

RAMOS, E.; DRACHENBERG, C.B.; PAPADIMITRIOU, J.C.; HAMZE, O.; FINK, J.C.; KLASSEN, D.K.; DRACHENBERG, R.C.; WILAND, A.; WALI, R.; CANGRO, C.B.; SCHWEITZER, E.; BARTLETT, S.T.; WEIR, M.R. Clinical course of polyoma virus nephropathy in 67 renal transplant patients. **Journal of the American Society of Nephrology**, EUA, v. 13, n. 8, p. 2145-2151, ago. 2002.

RANDHAWA, P.S.; FINKELSTEIN, S.; SCANTLEBURY, V.; SHAPIRO, R.; VIVAS, C.; JORDAN, M.; PICKEN, M.M.; DEMETRIS, A.J. Human polyoma virus-associated interstitial nephritis in the allograft kidney. **Transplantation**, EUA, v. 67, n. 1, p. 103-109, jan. 2009.

RODRIGUES, C.; PINTO, D.; MEDEIROS, R. Molecular epidemiology characterization of the urinary excretion of polyomavirus in healthy individuals from Portugal a Southern European population. **Journal of Medical Virology**, Portugal, v. 79, p. 1194-1198, ago. 2007.

ROTA, S.; FIDAN, K.; BOZDAY, G.; DALGIÇ, A.; FIDAN, I.; SUCAK, G.; MÜDERRIS, T. Investigation of BK and JC virus DNA positivities by real-time polymerase chain reaction in the clinical samples of patients with high risk. **Mikrobiyol Bul**, Turquia, v. 45, n. 2, p. 280-287, abr. 2011.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, EUA, v. 4, p. 406-425, jul. 1987.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. editors. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. p. 631-632.

SAUNDH, B.K.; TIBBLE, S.; BAKER, R.; SASNAUSKAS, K.; HARRIS, M.; HALE, A. Different patterns of BK and JC polyomavirus reactivation following renal transplantation. **Journal of Clinical Pathology**, Reino Unido, v. 63, p. 714-718, ago. 2010.

SAUNDH, B.K.; BAKER, R.; HARRIS, M.; WELBERRY SMITH, M.P.; CHERUKURI, A.; HALE, A. Early BKV reactivation in donor kidney is a risk

factor for development of BK polyomavirus associated nephropathy. **Journal of Infection Disease**, Reino Unido, out. 2012.

SCHOWALTER, R.M.; PASTRANA, D.V.; PUMPHREY, K.A.; MOYER, A.L.; BUCK, C.B. Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. **Cell Host & Microbe**, EUA, v. 7, n. 6, p. 509-515, jun. 2010.

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**, Alemanha, v. 85, n. 9, p. 4586-4590, maio. 2011.

SEIF, I.; KHOURY, G.; DHAR, R. The genome of human papovavirus BKV. **Cell**, USA, v. 18, p. 963-977, dez. 1979.

SHACKELTON, L.A.; RAMBAUT, A.; PYBUS, O.G.; HOLMES, E.C. JC virus evolution and its association with human populations. **Journal of Virology**, EUA, v. 80, n. 20, p. 9928-9933, out. 2006.

SHAH, K.V.; DANIEL, R.W.; WARSZAWSKI, R.M. High prevalence of antibodies to BK virus, an SV40-related papovavirus, in residents of Maryland. **Journal of Infection Disease**, v. 128, n. 6, p. 784-787, dez. 1973.

SHAH, K.V. Polyomaviruses, In: Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M. (ed.). *Fields virology*, 3rd ed. Raven Publishers, Philadelphia, Pa. Vol. 2. 1996. p. 2027- 2043.

SHARMA, P.M.; GUPTA, G.; VATS, A.; SHAPIRO, R.; RANDHAWA, P. Phylogenetic analysis of polyomavirus BK sequences. **Journal of Virology**, v. 80, n. 18, p. 8869-8879, set. 2006.

SHINOHARA, T.; MATSUDA, M.; CHENG, S.H.; MARSHALL, J.; FUJITA, M.; NAGASHIMA, K. BK virus infection of the human urinary tract. **Journal of Medical Virology**, Japão, v. 41, p. 301-305, dez. 1993.

SIDHU, J.P.; HODGERS, L.; AHMED, W.; CHONG, M.N.; TOZE, S. Prevalence of human pathogens and indicators in stormwater runoff in Brisbane, Australia. **Water Research**, Austrália, mar. 2012

SILVERMAN, L.; RUBINSTEIN, L. Electron microscopic observations on a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. **Acta Neuropathologica**, v. 5, p. 215-224, nov. 1965.

SINGH, R.D.; MARKS, D.L.; HOLICKY, E.L.; WHEATLEY, C.L.; KAPTZAN, T.; SATO, S.B.; KOBAYASHI, T.; LING, K.; PAGANO, R.E. Gangliosides and beta1-integrin are required for caveolae and membrane domains. **Traffic**, EUA, v. 11, n. 3, p. 348-360, mar. 2010.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R.; editors. **Numerical Taxonomy**. San Francisco: W.H. Freeman. 1973

SOUZA, D.S.; RAMOS, A.P.; NUNES, F.F.; MORESCO, V.; TANIGUCHI, S.; LEAL, D.A.; SASAKI, S.T.; BÍCEGO, M.C.; MONTONE, R.C.; DURIGAN, M.; TEIXEIRA, A.L.; PILOTTO, M.R.; DELFINO, N.; FRANCO, R.M.; MELO, C.M.; BAINY, A.C.; BARARDI, C.R. Evaluation of tropical water sources and mollusks in southern Brazil using microbiological, biochemical, and chemical parameters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Brasil, v. 76, n. 2, p. 153-161, fev, 2012.

STEHLE, T.; GAMBLIN, S.J.; YAN, Y.; HARRISON, S.C. The structure of simian virus 40 refined at 3.1 Å resolution. **Structure**, USA, v. 4, n. 2, p. 165-182, fev. 1996.

STEWART, S.E. Neoplasms in mice inoculated with cell-free extracts or filtrates of leukemic mouse tissues. I. Neoplasms of the parotid and adrenal glands. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 15, n. 5, p. 1391-1415, abr. 1955.

STONER, G.L.; JOBES, D.V.; FERNANDEZ COBO, M.; AGOSTINI, H.T.; CHIMA, S.C.; RYSCHKEWITSCH, C.F. JC virus as a marker of human migration to the Americas. **Microbes and Infection**, EUA, v. 2, n. 15, p. 1905-1911, dez. 2000.

SUGIMOTO, C.T.; KITAMURA, T.; GUO, J.; AL-AHDAL, M.N.; SHCHELKUNOV, S.N.; OTOVA, B.; ONDREJKA, P.; CHOLLET, J.Y.; EL-SAFI, S.; ETTAYEBI, M.; GRÉSENGUET, G.; KOCAGÖZ, T.; CHAIYARASAMEE, S.; THANT, K.Z.; THEIN, S.; MOE, K.; KOBAYASHI, N.; TAGUCHI, F.; YOGO, Y. Typing of urinary JCV DNA offers a novel means of tracing human migrations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Japão, v. 94, p. 9191–9196, ago. 1997.

SWEET, B.H.; HILLEMANN, M.R. The vacuolating virus, SV40. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 105, p. 420–427, 1960.

TAJIMA, M.; TAKEDA, F.; MOR, I.M.; SHIMADA, H. Prevalence of the antibody against human polyomaviruses (JCV and BKV) in aged persons. **Kausenshogakn-Zasshi**, Japão, v. 64, p. 1507-1513, dez. 1990.

TAKASAKA, T. N.; GOYA, T.; TOKUMOTO, K.; TANABE, H.; TOMA, Y.; OGAWA, S.; HOKAMA, A.; MOMOSE, T.; FUNYU, T.; FUJIOKA, S.; OMORI, H.; AKIYAMA, Q.; CHEN, H.Y.; ZHENG, N.; OHTA, T.; KITAMURA, T.; YOGO, Y. Subtypes of BK virus prevalent in Japan and variation in their transcriptional control region. **The Journal of General Virology**, Japão, v. 85, p. 2821-2827, out. 2004.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, EUA, v. 28, n.10, p. 2731-2739, maio. 2011.

VAN AALDEREN, M.C.; HEUTINCK, K.M.; HUISMAN, C.; TEN BERGE, I.J. BK virus infection in transplant recipients: clinical manifestations, treatment options and the immune response. **Netherlands Journal of Medicine**, Holanda, v. 70, n. 4, p.172-183, maio. 2012.

VAN DER MEIJDEN, E.; JANSSENS, R.W.; LAUBER, C.; BOUWES BAVINCK, J.N.; GORBALENYA, A.E.; FELTKAMP, M.C. Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient. **PLoS Pathogens**, Holanda, v.6, n. 7, p. 1-10, jul. 2010.

VECCHIA, A.D.; FLECK, J.D.; COMERLATO, J.; KLUGE, M.; BERGAMASCHI, B.; DA SILVA, J.V.; DA LUZ, R.B.; TEIXEIRA, T.F.; GARBINATTO, G.N.; OLIVEIRA, D.V.; ZANIN, J.G.; VAN DER SAND, S.; FRAZZON, A.P.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M.; SPILKI, F.R. First description of Adenovirus, Enterovirus, Rotavirus and Torque teno virus in water samples collected from the Arroio Dilúvio, Porto Alegre, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, Brasil, v. 72, n. 2, p. 323-329, maio. 2012a.

VECCHIA, A.D.; FLECK, J.D.; KLUGE, M.; COMERLATO, J.; BERGAMASCHI, B.; LUZ, R.B.; ARANTES, T.S.; SILVA, J.V.S.; THEWES, M.R.; SPILKI, F.R. Assessment of enteric viruses in a sewage treatment plant located in Porto Alegre, Southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, Brasil, (Impresso), 2012b.

VERGHESE, P.S.; FIN, L.S.; ENGLUND, J.A.; SANDERS, J.E.; HINGORANI, S.R. BK nephropathy in pediatric hematopoietic stem cell transplant recipients. **Pediatric Transplantation**, EUA, v. 13, n. 7, p. 913-918, nov. 2009.

WANG, W.; SIMMONS, D.T. Simian virus 40 large T antigen can specifically unwind the central palindrome at the origin of DNA replication. **Journal of Virology**, EUA, v. 83, n. 7, p.3312-3122, abr. 2009.

WEIMBERG, G.A.; MIAN, A.N. BK virus nephropathy and other polyoma virus infections. **The Pediatric Infection Disease Journal**, EUA, v. 29, p. 257-260, mar. 2010.

WHITE, M.K.; KHALILI, K. Polyomaviruses and human cancer: molecular mechanisms underlying patterns of tumorigenesis. **Virology**, EUA, v. 324, n. 1, p. 1-16, jun. 2004.

WHITE, M.K.; GORDON, J.; REISS, K.; DEL VALLE, L.; CROUL, S.; GIORDANO, A.; DARBINYAN, A.; KHALILI, K. Human polyomaviruses and brain tumors. **Brain Research Reviews**, EUA, v. 50, n. 1, p. 69-85, dez. 2005.

WHO - World Health Organization 2008. **Guidelines for Drinking-water Quality - Recommendations**, 3th ed. Geneva: World Health Organization. vol. 1, Disponível em: <[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/gdwq3rev/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3rev/en/)>. Acesso em: 22 out. 2012.

YOGO, Y.; SUGIMOTO, C.; ZHONG, S.; HOMMA, Y. Evolution of the BK polyomavirus: Epidemiological, anthropological and clinical implications. **Reviews in Medical Virology**, Japão, v. 19, n. 4, p. 185–199, jul. 2009.

ZALONA, A.C.J.; LOPES, G.S.; SCHRAGO, C.G.; GONÇALVES, R.T.; ZALIS, M.G.; VARELLA, R.B. Molecular Characterization of BK Polyomavirus Subtypes in Renal Transplant Recipients in Brazil. **Journal of Medical Virology**, Brasil, v. 83, p. 1401–1405, abr. 2011.

ZHENG, H.Y.; SUGIMOTO, C.; HASEGAWA, M.; KOBAYASHI, N.; KANAYAMA, A.; RODAS, A.; MEJIA, M.; NAKAMICHI, J.; GUO, J.; KITAMURA, T.; YOGO, Y. Phylogenetic relationships among JC virus strains in Japanese/Koreans and Native Americans speaking Amerind or Na-Dene. *Journal of Molecular Evolution*, Japão, v. 56, n. 1, p. 18-27, jan. 2003.

ZHENG, H.Y.; ZHAO, P.; SUGANAMI, H.; OHASI, Y.; IKEGAYA, H.; KIM, J.C.; SUGIMOTO, C.; TAKASAKA, T.; KITAMURA, T.; YOGO, Y. Regional distribution of two related Northeast Asian genotypes of JC virus, CY-a and -b: implications for the dispersal of Northeast Asians. **Microbes Infection**, Japão v. 6, p. 596–603, maio. 2004.

ZHENG, H.Y.; NISHIMOTO, Y.; CHEN, Q.; HASEGAWA, M.; ZHONG, S.; IKEGAYA, H.; OHNO, N.; SUGIMOTO, C.; TAKASAKA, T.; KITAMURA, T.; YOGO, Y. Relationships between BK virus lineages and human populations. **Microbes Infection**, Japão, v. 9, p. 204–213, fev. 2007.

ZHENG, H.Y.; NISHIMOTO, Y.; CHEN, Q.; HASEGAWA, M.; ZHONG, S.; IKEGAYA, H.; OHNO, N.; SUGIMOTO, C.; TAKASAKA, T.; KITAMURA, T.; ZUR HAUSEN, H. Novel human polyomaviruses re-emergence of a well known virus family as possible human carcinogens. **International Journal of Cancer**, Alemanha, v. 123, p. 247-250, jul. 2008.

ZHONG, S.; RANDHAWA, P.S.; IKEGAYA, H.; CHEN, Q.; ZHENG, H.Y.; SUZUKI, M.; TAKEUCHI, T.; SHIBUYA, A.; KITAMURA, T.; YOGO, Y. Distribution patterns of BK polyomavirus (BKV) subtypes and subgroups in American, European and Asian populations suggest co-migration of BKV and the human race. **The Journal of General Virology**, Japão, v. 90, n. 1, p.144-152, jan. 2009.

## APÉNDICE

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Fica garantido o sigilo das informações. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma.

### INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: **DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE POLIOMAVÍRUS EM AMOSTRAS DE URINAS DE PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAI E DE ÁGUAS SUPERFICIAIS DE PORTO ALEGRE.**

Pesquisador Responsável: Juliana Comerlato

Telefone para contato: 05181447446

Orientadora do projeto: Profa. Ana Cláudia Franco

O objetivo deste projeto é verificar a presença de duas diferentes espécies de poliomavírus (JC e BK) em urinas de pacientes transplantados renais, comparando com a frequência encontrada nas urinas de indivíduos não transplantados. Além disso, avaliar também se estes vírus estão presentes em amostras de águas superficiais do município de Porto Alegre para realizar análise molecular dos padrões de poliomavírus encontrados nas amostras clínicas e ambientais. O voluntário será incluído no grupo controle do projeto, indivíduos não transplantados. A participação do voluntário se dará na doação de uma amostra de urina. A coleta deve ser realizada pelo próprio voluntário, seguindo recomendações descritas pela pesquisadora, retiradas de protocolo. Será necessário coletar informações sobre idade e sexo do voluntário. Não há nenhum risco, prejuízo, desconforto ou lesões que podem ser provocados pela pesquisa. Não há critérios de inclusão dos voluntários, a não ser a ausência de transplante renal.

◆ Nome e Assinatura do pesquisador:

◆ CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, abaixo assinado, concordo em participar do estudo \_\_\_\_\_ como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador \_\_\_\_\_ sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido o sigilo das informações e que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento.

Local e data \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ /

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura do sujeito ou responsável: \_\_\_\_\_

## VITA

### I. Identificação

Nome: Juliana Comerlato

Endereço: Rua Vinte E Quatro de Maio, 211/506 – Centro Histórico, Porto Alegre/RS CEP 90050-180

Idade: 24 anos E-mail: jucomerlato@gmail.com Tel.: 51 8144 7446

### II. Documentação

Possui carteira de habilitação - categoria: B.

### III. Formação profissional

2011 – 2012: Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela UFRGS.

2005 – 2010: Graduação em Biomedicina pela Universidade Feevale

### IV. Formação complementar

2011 – Missão Científica de curta duração no exterior, sob orientação da Professora Rosina Gironés. Universitat de Barcelona.

2011 – Curso CBAB - Estudo da desinfecção de contaminantes virais, sob orientação da Professora Célia Barardi. Universidade Federal de Santa Catarina.

2010 – Estágio no laboratório de Enterovirose. Fundação Osvaldo Cruz. Rio de Janeiro.

2008 – 2010 – Iniciação científica em Virologia Clássica e Molecular, sob orientação do Professor Fernando Rosado Spilki Universidade Feevale.

2008 – 2009 – Iniciação científica em Bioquímica, sob orientação da Professora Joíza Lins Camargo. Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

2007 – Intercâmbio voluntário pelo Projeto Rondon. Brasil/Canadá.

2006 – 2007 – Monitora de Biologia Celular. Universidade Feevale.

2006 – Estágio no laboratório de Análises Clínicas Microlab. Caxias do Sul.

### V. Outros conhecimentos

Línguas Inglesa e Francesa.

Compreensão da Língua Espanhola.

### VII. Publicações

TAVARES, R.; TREVISOL, R.; COMERLATO, J.; FEKSA, L.R.; SPILKI, F.R.; BERLESE, D.B. Enterovirus infections and type 1 diabetes mellitus: is there any relationship?. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases** (Online), v.18, p.3-15, 2012.

VECCHIA, A.D.; FLECK, J.D.; COMERLATO, J.; KLUGE, M.; BERGAMASCHI, B.; SILVA, J.V.S.; LUZ, R.B.; TEIXEIRA, T.F.; GARBINATTO, G.N.; OLIVEIRA, D.V.; ZANIN, J.G.; VAN DER SAND, S.T.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M.; SPILKI, F.R. First description of Adenovirus, Enterovirus, Rotavirus and Torque teno virus on water samples collected from the Arroio Dilúvio, Porto Alegre, Brazil. **Brazilian Journal of Biology** (Impresso), v.72, p.1-7, 2012.

OLIVEIRA, L.K.; FLECK, J.D.; BERGAMASCHI, B.; KLUGE, M.; COMERLATO, J.; LUZ, R.B.; SILVA, J.V.S.; TRESSOLDI, M.R.; GENRO, J.; STAGGEMEIER, R.; BALDASSO, N.; SPILKI, F.R. Enteric viruses in water samples from Brazilian dairy farms. **Agricultural Water Management** (Print), v. 111, p. 34-39, 2012.

COMERLATO, J.; OLIVEIRA, L.K.; SPILKI, F.R. Enterovirus como indicadores de qualidade da água. **Revista Brasileira de Biociências** (Impresso), v. 9, p. 114-125, 2011.

CAVAGNOLLI, G.; COMERLATO, J.; COMERLATO, C.B.; RENZ, P.B.; GROSS, J.L.; LINS, J.C. HbA1c measurement for the diagnosis of diabetes: is it enough?. **Diabetic Medicine**, v.28, p.31-34, 2010.

### VIII. Artigos aceitos

VECCHIA, A.D.; FLECK, J.D.; KLUGE, M.; COMERLATO, J.; BERGAMASCHI, B.; LUZ, R.B.; ARANTES, T.S.; SILVA, J.V.S.; THEWES, M.R.; SPILKI, F.R. Assessment of enteric viruses in a sewage treatment plant located in Porto Alegre, Southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology** (Impresso), 2012.

VECCHIA, A.D.; FLECK, J.D.; KLUGE, M.; COMERLATO, J.; BERGAMASCHI, B.; LUZ, R.B.; ARANTES, T.S.; SILVA, J.V.S.; THEWES, M.R.; SPILKI, F.R. Assessment of enteric viruses in a sewage treatment plant located in Porto Alegre, Southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, Brasil, (Impresso), 2012.

VECCHIA, A.D.; KLUGE, M.; SILVA, J.V.S.; COMERLATO, J.; RODRIGUES, M.T.; FLECK, J.D.; LUZ, R.B.; TEIXEIRA, T.F.; ROEHE, P.M.; CAPALONGA, R.; OLIVEIRA, A.B.; SPILKI, F.R. Presence of Torque Teno virus (TTV) in tap water in 1 public schools from southern Brazil. **Food and Environmental Virology**, 2012

## **ANEXO**

Artigo original

“Molecular detection and characterization of BK and JC polyomaviruses in urine samples of renal transplant patients in the Southern of Brazil.”

Submetido ao Journal of Medical Virology