

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

PREVALÊNCIA DA EXCREÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO
POLIOMAVÍRUS HUMANO JC EM AMOSTRAS DE
URINA DE PACIENTES COM AIDS SEM
LEUCOENCEFALOPATIA MULTIFOCAL
PROGRESSIVA

Aluna: Cristiane de Campos Centrone

Botucatu
2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

PREVALÊNCIA DA EXCREÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO
POLIOMAVÍRUS HUMANO JC EM AMOSTRAS DE
URINA DE PACIENTES COM AIDS SEM
LEUCOENCEFALOPATIA MULTIFOCAL
PROGRESSIVA

Aluno: Cristiane de Campos Centrone
Orientador: Prof. Dr. Claudio Sergio Pannuti
Co-orientadora: Prof. Dr^a. Maria Cristina Domingues da
Silva Fink

Trabalho de Iniciação Científica,
Realizado no Laboratório de Virologia
Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo,
IMT-USP, São Paulo, como exigência parcial
para obtenção do Título de Bacharel em
Ciências Biológicas – Modalidade Médica

Botucatu
2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Centrone, Cristiane de Campos.

Prevalência da excreção e caracterização molecular do poliomavírus humano JC em amostras de urina de pacientes com aids sem leucoencefalopatia multifocal progressiva / Cristiane de Campos Centrone. - Botucatu [s.n], 2009.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Ciências Biológicas – Modalidade Médica)
– Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2009

Orientador: Claudio Sergio Pannuti

Co-orientadora: Maria Cristina Domingues da Silva Fink

1. Biologia Molecular 2. Aids 3. Virologia

Palavras-chave: Aids; Excreção urinária; Leucoencefalopatia multifocal progressiva; PCR; Vírus JC

PREVALÊNCIA DA EXCREÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO POLIOMAVÍRUS HUMANO JC EM AMOSTRAS DE URINA DE PACIENTES COM AIDS SEM LEUCOENCEFALOPATIA MULTIFOCAL PROGRESSIVA.

CENTRONE, C.C.¹, URBANO, P.R.P.¹, NALI, L. S.¹, SOUZA A.C.M.F.¹, ROMAO, R.M.¹, OLIVEIRA C.M.¹, ROMANO C.¹, BORGES J.¹, PENALVA de OLIVEIRA A.C.², VIDAL, J.E.², FINK, M. C. S.¹, PANNUTI, C. S.¹

1-LABORATÓRIO DE VIROLOGIA (LIM H-FMUSP), INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, SÃO PAULO, BRASIL.

2-INSTITUTO DE INFECTOLOGIA EMÍLIO RIBAS, SÃO PAULO, BRASIL.

RESUMO

O poliomavírus humano JC (VJC) é o agente etiológico da leucoencefalopatia multifocal progressiva (LEMP), uma doença caracterizada por lesões focais não expansivas do sistema nervoso central que atinge pacientes imunocomprometidos, especialmente pessoas com aids. O objetivo principal do estudo foi determinar a prevalência da excreção do VJC em amostras de urina de pacientes com aids, sem LEMP, comparar duas técnicas de detecção do DNA do vírus JC através de duas diferentes regiões genômicas e determinar a caracterização genotípica das amostras positivas. Um total de 75 amostras foram colhidas no Instituto de Infectologia Emílio Ribas, em São Paulo, Brasil, entre maio e novembro de 2009. Para a detecção do vírus JC foi realizada a extração do DNA das amostras e posterior reação em cadeia por polimerase (PCR). Inicialmente amplificou-se um fragmento de 215pb, o qual corresponde ao gene codificador da proteína estrutural VP1 do capsídeo do vírus JC. Todas as amostras foram posteriormente submetidas à outra PCR que utiliza um par de *primers* complementar à região precoce do VJC (antígeno T) amplificando um fragmento de 173pb. Seguiu-se a digestão do produto amplificado com enzima de restrição *Bam* H1, resultando em dois fragmentos menores (120pb e 53pb). O vírus JC foi detectado em 53 amostras, igualmente para ambas as técnicas (70,7% para PCR da VP1 e enzima *Bam* H1), sendo 34/46 homens (73,9%) e 19/29 mulheres (65,5%). A excreção do VJC foi maior nos indivíduos acima de 46 anos. Dos 7 genótipos descritos na literatura, os que mais prevaleceram entre os pacientes JC positivos foram o 3B e o 3A em 10 amostras ambos (21,0%), o 2B em 9 amostras (19,0%) e o tipo 6 em 6 amostras (13,0%). Tanto nos pacientes pardos como nos pacientes brancos, o genótipo que prevaleceu foi o 3B. No presente estudo verificou-se uma alta prevalência do DNA do VJC (70,7%) e do genótipo 3 (43,0%). Dentre os métodos de detecção, foi observado que a PCR específica para o gene VP1 foi o método mais rápido e mais simples em comparação à metodologia composta por PCR e posterior digestão com enzima de restrição, embora a sensibilidade das duas técnicas tenha sido igual.

PALAVRAS-CHAVE: vírus JC; leucoencefalopatia multifocal progressiva; aids; HIV; excreção urinária; PCR.

ABSTRACT

The human poliovirus is the etiologic agent of Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML), a disease characterized by focal lesions not expansives of

the central nervous system that develops in immunocompromised patients, specially people with aids. The main aim of the study was to evaluate the prevalence of the JCV excretion in urine samples of patients with aids, without PML, to compare two JCV DNA detection techniques through of two different genomic regions and to evaluate the genotypic characterization of the positive samples. A total of 75 samples were collected in the Instituto de Infectologia Emílio Ribas, in Sao Paulo, Brazil, between may and november, 2009. To detect the JC virus it was made the DNA extraction and then the polymerase chain reaction (PCR). Firstly a fragment of 215 bp was amplified, which corresponds to the coding gene of the structural protein of the JC virus capsid VP1. All the samples were later submitted to another PCR that uses a pair of primers complementary to the early region of the JCV (T antigen) amplifying a fragment of 173 bp. Followed by the digestion of the amplified product with the restriction enzyme *Bam*H1, resulting in two smaller fragments (120 bp and 53 bp). The JC virus was detected in 53 samples, for both techniques (70,7% for VP1 PCR, and the restriction enzyme *Bam*H1), 34/46 were men (73,9%) and 19/29 were women (65,5%). The JCV excretion was higher in individuals that were over 46 years old. Regarding the seven genotypes described in the literature, the ones that were more prevalent among the JC positive patients were 3B and 3A with 10 samples each (21,0%), the 2B with 9 samples (19,0%) and genotype 6, with six samples (13,0%). As in the brown patients as the white ones, the most prevalent genotype was 3B. In the present study it was observed a high prevalence of JCV DNA (70,7%) and the genotype 3 (43,0%). Among the detection methods, it was observed that the specific PCR for the VP1 gene, was the faster and easier method compared to the methodology composed by a PCR and later restriction enzyme digestion, although the sensibility of both techniques were the same.

KEY WORDS: JC virus, Progressive Multifocal Encephalopathy, aids, HIV, urinary excretion, PCR.

INTRODUÇÃO

O vírus JC (VJC), um poliomavírus humano, é o agente etiológico da Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva (LEMP), uma doença desmielinizante da substância branca cerebral que se caracteriza por lesões focais não expansivas do sistema nervoso central (SNC), descrita inicialmente por Astrom, em 1958 [revisado por 18,13]. Geralmente o encéfalo é a região mais afetada podendo ocorrer também no cerebelo e tronco encefálico [14].

Padgett et. al. (1971) foram os primeiros a conseguir isolar o vírus JC através da inoculação, em culturas primárias de células da glia fetal humana, com tecido cerebral de um paciente de 38 anos que apresentava sinais de LEMP como uma complicação da doença de Hodgkin. O novo vírus encontrado recebeu então, as iniciais deste paciente. Padgett sugeriu ser um novo tipo de papovavírus [32].

Atualmente é classificado como pertencente à família Poliomaviridae, à qual também se incluem os vírus BK e vírus símio vasculante (SV40) [28,35]. O vírus JC pode causar infecções subclínicas e persistentes em indivíduos saudáveis, mas em condições de imunossupressão como ocorre em pacientes infectados pelo vírus HIV e transplantados, a reativação dos poliomavírus latentes no trato urinário pode ter uma maior incidência [26,9]. O surgimento da epidemia do vírus da imunodeficiência humana (HIV), contudo, levou a um aumento drástico na incidência de LEMP no mundo [26], afetando de 3 a 7% dos pacientes infectados com o HIV. O genoma do VJC consiste em um DNA fita dupla circular super-helicoidal, dividido em três regiões

principais: região precoce, a qual codifica o antígeno T (Ag T) e antígeno t (Ag t); região tardia, a qual codifica as proteínas do capsídeo viral (ou antígenos V): VP1, VP2, VP3, a proteína não-estrutural do vírus chamada de agnoproteína (participa da liberação celular do vírus replicado); e a região regulatória não-codificante (RR), a qual separa as regiões codificantes precoce e tardia do vírus e contém os *tandem-repeats*, promotores, e a origem de replicação do DNA [revisado por 28,22,24,30]. A região regulatória que recebe o nome de *arquetípica* é observada nos vírus presentes na urina da população não-LEMP [19] e que não sofreram mutação. Já a região regulatória com rearranjos e mutações (deleções e duplicações) está relacionada à replicação viral que ocorre durante a doença, encontrada nos vírus presentes no líquido e em biópsias de tecido cerebral [26,27,15,38,29], independente do tipo de imunossupressão.

O ciclo de vida do vírus JC inicia-se com o reconhecimento e ligação da proteína do capsídeo viral (VP1) à receptores da superfície das células-hospedeiras. Em seguida, o vírus atravessa os compartimentos celulares até atingir o núcleo onde ocorre a transcrição e replicação do genoma viral, seguida por viremia até os órgãos-alvos e multiplicação nestes sítios específicos [28,26, revisado por 30,34].

Geralmente a primoinfecção ocorre na infância sendo assintomática e persiste latente nos rins, linfócitos e medula óssea [26,33,35,41]. A excreção pode ser do tipo esporádica ou contínua, sendo que esta última foi a mais encontrada em estudos realizados por Pólo et al. (2003), Grabowski et al. (2009) e Rossi et al. (2007), sugerindo que a replicação viral não ocorre esporadicamente e que essa excreção pode variar [19,35,37,3]. De acordo com Rossi et al. (2007) a reativação e excreção contínuas pode aumentar a possibilidade de transmissão dentro da população [37].

Pouco se sabe a respeito de como o vírus JC é transmitido, mas um estudo feito no Japão analisou 8 famílias para tentar elucidar esta questão e verificou que o vírus é adquirido horizontalmente, tanto dentro da família como fora, e que a transmissão vertical não é um dos meios de transmissão. A fonte mais provável, segundo Kitamura et al. (1994), é pela excreção urinária do vírus JC pois as crianças estão predispostas à essa exposição pelo contato com os pais, avós, vizinhos e babás e que se confirma neste estudo pela presença de diferentes subtipos de VJC dentro das famílias analisadas, onde as crianças excretavam um subtipo de VJC diferente do excretado pelos pais [25].

A prevalência do vírus JC varia no mundo, afetando cerca de 80 % da população mundial [23]. Estudos mostraram que a prevalência da excreção do JC é de 40% nos Estados Unidos e 75% no Japão [26]. Os pacientes infectados pelo HIV correspondem à quase 80% dos casos de LEMP, sendo que apenas 1% a 3% desses pacientes desenvolvem a LEMP [26]. Contudo, pouco se sabe a respeito da prevalência da excreção urinária do poliomavírus em indivíduos com aids, sem LEMP, no Brasil.

O sequenciamento do genoma do vírus JC permitiu detectar pelo menos oito genótipos e alguns subtipos ao longo dos continentes. O tipo 1 é o mais comum na Europa e nos euro-americanos, os tipos 2 e 7 são encontrados na Ásia, os tipos 3 e 6 na África, e o tipo 4 (resultante de uma substituição na sequência de uma região do genótipo 1 por um fragmento do genótipo 3 africano) é encontrado na América (EUA) e Europa [1,2,40]. Estes genótipos diferem em sequência por cerca de 1-3%. Cada genótipo pode ter vários subtipos, os quais diferem entre si em cerca de 0.5-1% [1]. Agostini et al. (1997a) acreditam que o estudo dos genótipos e subtipos do VJC nos humanos pode nos fornecer informações importantes sobre a evolução do vírus e as migrações humanas pelo mundo pois ambos parecem ter co-evoluído juntos [6,2]. Além disso, a pesquisa por diferenças genotípicas específicas no VJC que possam ser correlacionadas com o desenvolvimento ou não de LEMP é a questão mais intrigante e

que pode nos elucidar o porquê de apenas 4-5% dos pacientes que já estão infectados com o VJC desenvolvam a LEMP [8].

Muitos trabalhos procuram relacionar a excreção urinária dos poliomavírus em indivíduos saudáveis ou naqueles com aids e LEMP, entretanto, pouco se sabe a respeito da excreção urinária em indivíduos com aids sem LEMP. Estudos comparativos entre pacientes com/sem LEMP podem ajudar na compreensão entre excreção assintomática e o desenvolvimento da doença. Além disso, a genotipagem de amostras clínicas pode ajudar na identificação de possíveis diferenças patogênicas entre os tipos de VJC [4]. O nosso objetivo neste artigo foi verificar a prevalência da excreção urinária do VJC utilizando-se para isso, duas técnicas: a PCR para a VP1 e digestão por enzima de restrição do fragmento do antígeno T, pós-PCR. O objetivo secundário foi determinar a incidência dos genótipos e subtipos do VJC na urina de indivíduos com aids, sem LEMP, em São Paulo, Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras coletadas e extração do DNA.

Setenta e cinco amostras de urina de pacientes com aids, sem LEMP, foram coletadas no Hospital Emílio Ribas de maio a novembro de 2009. Quarenta e seis indivíduos eram homens e 29 eram mulheres. O DNA viral foi extraído de 200µL das amostras usando o kit Qiagen QIAamp DNA blood Mini kit conforme instruções do fabricante.

Deteção do DNA do VJC para VP1

Fizemos a PCR para detectar a presença do vírus JC na urina destes pacientes amplificando um fragmento de 215pb correspondente ao gene VP1 do VJC. Os primers utilizados foram JLP15 (ACA GTG TGG CCA GAA TTC ACT ACC) e JLP16 (TAA AGC CTC CCC CCC AAC AGA AA), conforme protocolo descrito por AGOSTINI et al., (1997a) [6] (nucleotídeos 1710-1734 e 1924-1902) e com algumas modificações. (Quadro1). A amplificação foi realizada em termociclador Eppendorf, com os parâmetros de amplificação descritos por SCHAFFER et al., (2006): denaturação a 95°C por um minuto, anelamento a 57°C por um minuto e extensão a 72°C por um minuto, repetidos por 35 ciclos [38].

Utilizamos, inicialmente, as concentrações dos reagentes previamente descritas para a PCR padronizada para identificação do Ag T, a saber: tampão 10X (50 mM de KCl, 10 mM de tris), dNTPs 200 µM, primer 0,5 µM cada, MgCl₂ 1,5 mM, *Taq* polimerase 2,5 U/ reação, padronizadas por FINK et al., 2006 [17].

Algumas das amostras testadas, positivas anteriormente para o Ag T demonstraram, ao protocolo de genotipagem, bandas de tamanho adequado, porém, de fraca intensidade; outras apresentaram múltiplas bandas, além do fragmento de tamanho esperado. Por essa razão, algumas modificações foram inseridas ao protocolo original, como se segue: aos reagentes utilizados foram adicionados glicerol (57%) e cresol red 2,5 µg/µl. O glicerol foi empregado como adjuvante para aumentar a amplificação de regiões ricas em G-C (CHOU et al, 1992) [10]. O cresol *red* foi empregado como corante adicionado à mistura de PCR, para aplicação em gel de agarose (HOPPE et al, 1992) [20].

Alíquotas dos produtos de PCR foram submetidas à reação de eletroforese em gel de agarose 2%.

Detecção do DNA do VJC para antígeno T.

Realizamos uma PCR usando oligonucleotídeos PEP-1 (AGT CTT TAG GGT CTT CTA CC) e PEP-2 (GGT GCC AAC CTA TGG AAC AG) conforme protocolo descrito por ARTHUR et. al. (1989) [7], padronizado por FINK e col. (2006) [17] para amplificar uma região que codifica o antígeno T grande (Ag T), comum aos dois poliovírus JC e BK. (Quadro 1). O fragmento amplificado tem 173 pb de acordo com o protocolo descrito por Arthur et. al. (1989) [7], com algumas modificações. O mix da PCR foi feito em um volume total de 50µL (40µL de mix + 10 µL da amostra), contendo tampão 10X (50 mM de KCl, 10 mM de tris), dNTPs 200µM, MgCl₂ 2 mM, 0,6 µM de cada primer, *Taq Polymerase* 1,3 U/reacção e 10 µL da amostra de urina. Condições de ciclagem foram: denaturação inicial: 94°C/10 min, seguido por 40 ciclos, denaturação: 94°C/90 seg, anelamento: 55°C/90 seg e alongamento: 72°C/120 seg. A corrida foi completada com uma extensão final de 7 min 72°C e resfriamento a 4°C. Os produtos da PCR foram separados em gel de agarose a 2% e corados com brometo de etídeo. Cada reacção foi feita usando-se um controle positivo e dois negativos.

Algumas amostras em que as bandas ficaram muitas fracas não ocorreu a digestão, portanto aumentamos o número de ciclos de 40 para 50 ciclos, 10 µL de amostra para 15 µL e aumentamos a quantidade de *Taq Poyimerase* de 0,3 µL para 0,4 µL.

Enzima de restrição

Após a PCR para AgT, o DNA-alvo amplificado foi submetido ao teste de enzima de digestão para diferenciação entre os poliovírus humanos JC e BK, utilizando-se FastDigest®BamHI (Fermentas, Ontário, Canadá) segundo instruções do fabricante. A enzima de restrição reconhece um sequência específica (GGA) no fragmento amplificado do DNA do VJC e cliva este em dois fragmentos de 120 e 53pb, respectivamente (ARTHUR R., 1989) [7], permitindo diferenciá-lo do BKV, já que este não possui sítio de clivagem para esta enzima. Estes fragmentos são subsequentemente visualizados por eletroforese em gel de agarose a 2% com brometo de etídeo e visualizados sob luz UV. (Figura 1).

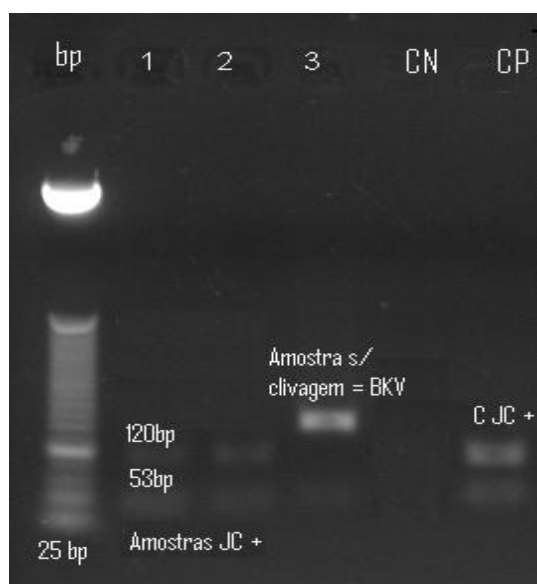


Figura 1. Diferenciação do DNA do VJC pela enzima de restrição *Bam* H1, a qual cliva o amplificado em dois fragmentos de 120 e 53pb.

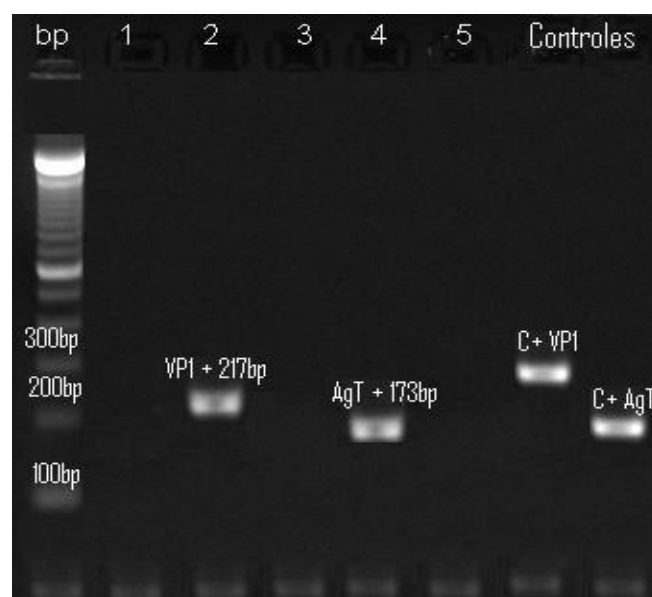


Figura 2. Detecção do DNA do VJC por PCR para a VP1 e antígeno T. Lane 1 negativo para VP1, Lane 2 positivo para VP1, Lane 3 negativo para AgT, Lane 4 positivo para AgT, Lane 5 controle negativo. C+ VP1 e C+ AgT, controles positivos para VP1 e AgT, respectivamente.

REAÇÃO DE GENOTIPAGEM

Seqüenciamento das amostras positivas

Todas as amostras que se mostraram positivas para a VP1 foram submetidas à genotipagem dos VJC detectados, através dos produtos amplificados nessa última reação.

Os produtos de PCR, purificados, foram diretamente seqüenciados, utilizando o mesmo par de *primers* empregado na reação de amplificação (JLP15/16). A purificação dos produtos amplificados foi feita com a utilização de colunas do kit Microcon® 100 (Milipore).

Após purificação, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo 0,5 µl /ml de brometo de etídeo em tampão TAE (1X), para uma semi-quantificação do produto amplificado para posterior seqüenciamento, utilizando como marcador o Low DNA Mass Ladder (Gibco).

Cerca de 100ng de produto amplificado foram adicionados a um microtubo com 3,2 pmol de *primer*, 2ul de Mix Big Dye Terminator ready reaction (Applied Biosystems Incorporation, Foster City, Califórnia, EUA), 4,4ul de *save money* (Tris-HCL 200mM (pH 9,0) e 5mM de MgCl₂). A extensão enzimática foi realizada em termociclador Eppendorf durante 25 ciclos de 96°C por 30 seg para denaturação do DNA molde, 50°C por 45 seg, para anelamento do *primer* e 60°C por 2 min para a extensão.

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

Esse método de seqüenciamento utiliza dideoxinucleotídeos marcados com substâncias fluorescentes diferentes para cada um deles (ddA, ddC, ddT, ddG), permitindo a leitura concomitante em um mesmo sensor do aparelho de sequenciamento automatizado (ABI PRISM 377 – Applied Biosystems Incorporation, Foster City, Califórnia, EUA). As amostras positivas foram submetidas a seqüenciamento genômico.

Classificação genotípica e análises filogenéticas

As seqüências do VJC amplificadas neste trabalho (*Genbank* FJ931054 a FJ931098, GQ856246 a GQ856252) foram alinhadas com seqüências obtidas no banco de dados público *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov), totalizando 135. Para isso, foi utilizado o programa de alinhamento múltiplo ClustalX (Thompson et al., 1997) [42]. O arquivo alinhado foi manualmente editado e verificado em relação à fase de leitura com o auxílio do programa SeAl (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/seal>).

Para as análises filogenéticas, o alinhamento foi exportado em formato *nexus* e utilizado como entrada para o programa de reconstrução filogenética. As inferências filogenéticas neste trabalho foram realizadas utilizando o método de análise bayesiano. O método não procura a árvore ótima, mas sim, um conjunto de árvores que possuem probabilidade de representar os dados, dado um modelo de evolução e premissas admitidas *a priori*. Em outras palavras, conhecimentos *a priori* são utilizados para prever hipóteses *a posteriori* [11].

Quadro 1 – Primers utilizados para a amplificação do DNA do VJC, com respectivas seqüências, região amplificada e tamanho do fragmento.

Identificação dos primers	Sequência	Região Amplificada
PEP1 (Arthur et al, 1989)	AGTCTTTAGGGTCTTCTACC	Ag T – 173bp
PEP2 (Arthur et al, 1989)	GGTGCCAACCTATGGAAC	Ag T
JLP15(Agostini et al,1998)	ACAGTGTGGCCAGAATTCCTACC	VP1 – 215bp
JLP16(Agostini et al,1998)	TAAAGCCTCCCCCCCCAACAGAAA	VP1

Análise estatística

Para a análise dos dados, utilizou-se o teste do χ^2 de tendência. O aplicativo utilizado para a análise dos dados foi o Epi-Info (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, versão 6) e o nível de significância alfa estabelecido foi de 5 %.

RESULTADOS

No período de maio a novembro de 2009, setenta e cinco amostras de urina de pacientes com aids, sem LEMP foram avaliadas. A idade destes pacientes variou entre 24 e 69 anos, com média de 43,6 anos e mediana de 43. Em relação à raça, 26 (49%) eram brancos, 25 (47%) pardos e 2 (4%) negros.

A PCR para pesquisa do DNA do poliomavírus JC, utilizando o par de *primers* complementares à região que codifica a proteína do capsídeo (VP1) foi realizada em todos os pacientes, mostrando-se positiva em cinquenta e três destes (70,7%) e negativa em vinte e dois (29,3%). Destes 75 pacientes, 46 eram do sexo masculino e 29 eram do sexo feminino. A positividade para os sexos foi de 73,9% (34 em 46) nos homens e 65,5% (19 em 29) nas mulheres ($p_{\text{trend}} = 0.43$), sem diferenças estatísticas. A técnica composta por PCR para amplificação do fragmento de 173pb correspondente ao antígeno T (AgT) e posterior digestão com a enzima de restrição Bam H1 foi 100% concordante com a PCR para a VP1, obtendo-se 53 amostras positivas para VJC. Contudo, foi preciso fazer algumas alterações no protocolo inicial da PCR do AgT (citadas anteriormente) pois cerca de 10 amostras não amplificavam. A idade dos pacientes positivos para o vírus JC foi de 44, 9 anos e a mediana foi de 44.

Para diferenciar a prevalência por faixa etária estratificamos os indivíduos da população estudada em três grupos de acordo com a idade, sendo a idade mínima de 24 anos e máxima de 69. O primeiro grupo consistiu de indivíduos entre 24 a 34 anos (7 positivos em 13), o segundo grupo incluiu indivíduos entre 35 e 45 anos (23 em 32), o terceiro grupo com indivíduos acima de 46 (23 em 30). A maior prevalência da excreção urinária ocorreu entre a faixa de idade acima dos 46 anos (76,7%), com $p_{\text{trend}} = 0.16$, embora essa diferença não seja estatisticamente significativa (Tabela 1).

Das 53 amostras, o sequenciamento só se mostrou adequado em 47 amostras. Destas, trinta e cinco pacientes (65,0%) eram do sexo masculino. Em relação aos genótipos verificamos que dentre os genótipos encontrados (1,2,3,4,6), os que mais prevaleceram foram o tipo 3 (20/47; 43,0%), o tipo 2 (12/47; 26,0%) e o tipo 6 (6/47;

13,0%). (Tabela 2). Já em relação aos subtipos os mais encontrados foram o 3B (10/47; 21,0%) e 3A (10/47; 21,0%) e o 2B (9/47; 19,0%). Tanto nos pacientes pardos como nos pacientes brancos, o genótipo que prevaleceu foi o 3B. (Tabela 3).

Tabela 1- Distribuição da positividade para JC por PCR para VP1, segundo faixas etárias.

Faixa etária	N	Positivos para VJC(%)
24 - 34	13	7 (53,9)
35 - 45	32	23 (71,9)
≥ 46	30	23 (76,7)
TOTAL	75	53 (100,0)

Tabela 2 - Distribuição genotípica do vírus JC em amostras de urina de pacientes com aids, sem LEMP.

Genótipos VJC	n (%)
1	4 (9,0)
2	12 (26,0)
3	20 (43,0)
4	5 (11,0)
6	6 (13,0)
TOTAL	n = 47 (100)

Tabela 3 - Distribuição dos subtipos do VJC em amostras de urina de pacientes com aids, sem sintomas neurológicos e amostras de líquido de pacientes com LEMP

Subtipos de VJC	n (%)
1B	4 (8,5)
2A	2 (4,5)
2B	9 (19,0)
2D	1 (2,0)
3A	10 (21,0)
3B	10 (21,0)
4	5 (11,0)
6	6 (13,0)
TOTAL	n = 47 (100)

DISCUSSÃO

Com este estudo tentamos caracterizar a excreção do VJC em um grupo de pacientes com aids sem LEMP, em São Paulo, Brasil. Há poucos relatos a respeito da prevalência de VJC desta população no mundo todo.

O vírus JC está presente em grande parte da população adulta mundial, infectando crianças assintomaticamente e permanecendo latente no tecido renal e trato urinário, onde eventualmente pode se replicar e ser excretado na urina [35,25]. A reativação do VJC nos rins não pode ser usada como um preditor de LEMP, pois comparando-se a prevalência da excreção de VJC entre os casos de LEMP e os de indivíduos HIV-positivos e HIV-negativos que nunca desenvolveram LEMP verificou-se que a virúria foi similar entre os casos e controles [19]. A reativação em indivíduos normais não está associada com danos ou lise de células renais e a excreção na urina desses indivíduos não gera qualquer sintoma clínico. Rossi et al., em 2007, confirmaram este achado observando que nas mulheres a taxa de presença do VJC decai quando a quantidade de células renais na urina aumenta [37]. Contudo, em indivíduos imunocomprometidos, os poliomavírus podem ser patogênicos [9].

O primeiro contato com esses vírus provavelmente ocorre na infância e juventude. Nesta faixa etária a soroprevalência para o VJC varia de 20% a 70%, sendo relatada em diferentes estudos [13,23,31]. Estes valores de soroprevalência são semelhantes aos dos adultos, segundo estudo de Kean et al., em 2009 [23]. O DNA do VJC é detectado na urina de 19-80% da população humana e desse modo, a urina pode ser considerada como uma valiosa fonte para investigação dos aspectos epidemiológicos e dos genótipos desse vírus neurotrópico [13,4,3]. Behzad-Behbahani et al., em 2004, sugeriram que a infecção pelo HIV pode estar associada com a reativação dos poliomavírus pois verificou-se que a excreção urinária de pacientes HIV-positivos que excretavam ambos VJC e VBK (25,5%) era significativamente mais frequente do que o grupo controle (10%). Contudo, o nível de imunossupressão (níveis de CD4+) não estava associado à excreção urinária de VJC [9]. Um estudo feito por Shah et al., em 1997, analisou a urina de homens homossexuais sendo 88 HIV-positivos e 78 HIV-negativos para detectar a presença dos poliomavirus humanos e verificou que a proporção de excreção de VJC em pacientes HIV-negativos (37%) foi maior do que nos HIV-positivos, verificando o oposto pra o vírus BK [39]. Em 1999, Knowels et al. pesquisaram marcadores virológicos e sorológicos do vírus JC na urina de 94 pacientes HIV-positivos e verificaram que de 81 pacientes, apenas 18 (22%) excretavam JC na urina. Em relação aos marcadores sorológicos (CD4+ e CD8+), a excreção do VJC não mostrou associação com o número de células CD4+, o que foi confirmado por estudos posteriores [9,19], nos quais a excreção do VJC foi independente da contagem de células CD4+. Estes achados sugerem que a imunossupressão causada pelo HIV parece não aumentar a frequência de excreção de VJC [27,3]. No nosso estudo verificamos que a incidência da excreção de DNA do VJC em pacientes com aids, sem LEMP é mais alta (70,7%) do que a encontrada por Ferrante et al.(2001) e Grabowski et al.(2009) para pacientes com essas mesmas características (46,7% e 42,3%, respectivamente) [16,19].

No nosso estudo encontramos diferenças na frequência de excreção do VJC de acordo com a faixa etária, sendo maior nos indivíduos acima dos 46 anos (81,3%), embora essa diferença não seja estatisticamente significativa ($p_{\text{trend}} = 0.16$). Este achado está de acordo com o encontrado na literatura para indivíduos saudáveis e imunocomprometidos [25,4,33,13,1,21,3,38]. Pagani et al., em 2003, estudaram a excreção de JC na população saudável italiana e verificaram que a excreção nos indivíduos acima de 40 anos foi significativamente maior em comparação ao grupo com idades entre 20 a 39 [33]. Segundo Pagani et. al, neste mesmo estudo, a grande detecção da presença do VJC na urina em indivíduos mais idosos poderia ser explicada pelo decaimento da resposta imune nesses indivíduos em comparação ao mais novos, levando à reativação da infecção latente. Nesse mesmo estudo compararam a excreção entre os sexos, não encontrando diferenças significativas entre mulheres(43,1%) e homens(50%) [33]. Kean et al., em 2009, também não detectaram diferença na soroprevalencia dos poliomavírus entre os sexos [23]. No presente estudo encontramos semelhanças ente os achados de Pagani (2003) e Kean (2009), tanto na questão da idade, maior excreção em indivíduos acima dos 46 anos; como em relação ao sexo, não havendo diferenças significativas na excreção entre homens e mulheres ($p_{\text{trend}} = 0.43$). Entretanto, um estudo feito por Rodrigues et col. (2007) para caracterizar a excreção de VJC em indivíduos saudáveis, em Portugal, verificou uma diferença significativa na excreção entre os sexos, sendo maior número de amostras positivas (29,5%) em indivíduos do sexo masculino [36], de acordo com outros estudos[6]. Segundo o autor, uma hipótese seria a diferença fisiológica que ocorre entre homens e mulheres [36]. Agostini et al., em 1996, verificaram que a excreção em indivíduos saudáveis dos EUA

é maior nos homens (49%) do que nas mulheres (33%), mas essa relação não foi estatisticamente significativa [4].

Acredita-se que os genótipos do VJC reflitam uma co-evolução dos vírus com o homem moderno desde o tempo estimado da origem do homem na África [1,2,40], e que eles estejam envolvidos em regiões geográficas específicas, nos permitindo a partir desse conhecimento, traçar as migrações geográficas humanas [6,40]. As qualidades do VJC como um marcador dessas migrações incluem o fato de ser um vírus de distribuição ubíqua, enquanto que os tipos e subtipos permanecem particularmente associados a grupos étnicos, até mesmo nos locais onde os mesmos tenham sofrido trocas casuais e contatos sociais por muitos anos [40]. O genótipo mais detectado nas populações italiana e irlandesa saudáveis é o tipo 1 e é maior entre os homens do que as mulheres [37,36,38]. Um estudo com a população americana encontrou os mesmos resultados [4]. Na Coreia, o genótipo que prevalece nos indivíduos saudáveis é o CY (sem classificação por Stoner), seguido pelos tipos 2A e tipo 1 [21]. Com relação ao genótipo e progressão para LEMP, estudos na Europa verificaram que os genótipos que prevalecem são o tipo 1 ou o tipo 2, sendo que o tipo 1 está correlacionado a um maior risco de desenvolvimento da LEMP, segundo Dubois et. al, em 2001 [12]. Alguns estudos também encontram o genótipo 2 associado ao desenvolvimento da LEMP como os estudos de Agostini et al. (1997b e 1998a) [3,5] e Ferrante et al. [16] nos quais foi verificado que o genótipo 2 e seus subtipos são frequentemente encontrados em tecido cerebral de pacientes com AIDS e influenciam a neurovirulência e neurotropismo do VJC. No presente estudo verificamos que entre os pacientes com aids, sem LEMP, o genótipo que mais prevaleceu na urina foi o 3 (43,0%), seguido dos genótipos 2 (26,0%) e 6 (13,0%), e por último os tipos 4 (11,0%) e 1 (9,0%), diferentemente do achado por Dubois et al. [12] que encontrou o tipo 1 como dominante (52,3%) na urina de 65 pacientes franceses, sendo 54 pacientes imunocomprometidos sem sinais de LEMP e 11 imunocompetentes. O segundo mais prevalente foi o tipo 4 (30,8%), seguidos dos tipos 2 (12,3%) e 3 (4,6%). Ferrante et al., em 2001, também encontraram o tipo 1 como o mais prevalente na urina de pacientes italianos com aids, sem LEMP (100%) [16], em concordância com estudo de Dubois et al. [12]. A discordância dos achados entre países europeus e o Brasil pode ser explicada pela diferença na composição étnica entre França e Itália (origem tipicamente européia) e o Brasil que possui uma população bastante heterogênea, formada a partir de africanos, imigrantes europeus e indígenas. Agostini et al. (1997b) analisaram a urina de 32 pacientes americanos HIV-positivos sem LEMP, sendo que destes, 12 eram VJC positivos, encontrando os genótipos 1, 2 e 4, sendo o tipo 1 o mais prevalente (67%), seguido do tipo 2 (25%) e por último o tipo 4 (8%) [3]. Nossos dados mostram que o genótipo 3 é mais prevalente provavelmente devido à origem africana de grande parte da população brasileira e sugere ser menos patogênico. Um estudo sugere que a prevalência dos diferentes genótipos pode estar relacionada à origem étnica da população em estudo [revisado por 2].

Contudo devemos ficar atentos aos resultados, pois no estudo de Dubois et al. (2001) não foram encontradas diferenças na comparação da distribuição dos genótipos do VJC entre as pessoas imunocompetentes e os HIV-infectados, residentes em uma única cidade [12]. Para isso, é necessário maiores estudos que englobem diversas regiões do país a fim de se chegar a um resultado mais fiel à nossa realidade.

Verificamos que para a detecção do DNA do poliomavírus JC, a PCR utilizando o protocolo da VP1, na qual acrescentamos o glicerol, é mais simples e rápida do que o protocolo que usa a enzima de restrição *Bam* H1, pois em 10 amostras a PCR que amplifica o Ag T formou uma banda de fraca intensidade, sendo necessário repeti-la com as alterações mencionadas anteriormente. Mesmo assim, ainda 8 amostras dessa

repetição formaram bandas de fraca intensidade. Observamos também que em algumas amostras o fragmento maior do VJC de 120pb é bem visível no gel de agarose, mas o fragmento menor (53pb) ficou, em alguns casos (10), obscurecido por bandas de primer não específicas (*nonspecific primer bands*), de acordo com o observado por Arthur et al. (1989) [7]. Em outras amostras, os dois fragmentos gerados não ficaram bem nítidos no gel de agarose. No nosso protocolo da enzima de restrição, todas as amostras que positivaram para o VJC com a enzima foram compatíveis às positivas ao protocolo de PCR da VP1, ou seja, 53 amostras. Porém devemos levar em conta que o protocolo que utiliza apenas a PCR específica para a proteína VP1 do vírus JC é um método mais atrativo para o diagnóstico de infecção para este poliomavírus por sua sensibilidade, especificidade e rapidez [7]. O método que utiliza a enzima de restrição, além de mais demorado e trabalhoso, é mais instável porque a enzima pode degradar e não digerir o fragmento de interesse.

Devemos ter atenção especial quando comparamos a prevalência da excreção urinária do VJC nas populações, porque há vários aspectos que devem ser minuciosamente lembrados, como as técnicas usadas em cada trabalho e características populacionais [36]. No Brasil, a heterogeneidade populacional e miscigenação devem ser levadas em conta na hora de analisarmos os genótipos encontrados.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Cláudio Sérgio Pannuti, por assumir a orientação e me dar a oportunidade de realizar este trabalho; à Prof. Dra. Maria Cristina Domingues da Silva Fink, por seu grande apoio, auxílio e valiosas contribuições; aos meus companheiros de trabalho Luiz Nali e Paulo Urbano; aos médicos do Instituto de Infectologia Emílio Ribas, pela seleção de pacientes e por permitirem a coleta de amostras; a todos os funcionários do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, que de uma forma ou outra contribuíram para o desenvolvimento deste projeto e meu crescimento profissional.

Referências

1. AGOSTINI, H.T.; DECKHUT A.; JOBES D.V.; GIRONES R.; SCHLUNCK G.; PROST M.G.; FRIAS C.; PÉREZ-TRALLERO E.; RYSCHKEWITSCH C.F.; STONER G.L. Genotypes of JC virus in East, Central and Southwest Europe. **J. Gen. Virol.**, v. 82, p. 1221-1331, 2001.
2. AGOSTINI, H.T.; RYSCHKEWITSCH, C.F.; SINGER, E.J.; STONER, G.L. Co-infection with two JC virus genotypes in brain, cerebrospinal fluid and urinary tract detected by direct cycle sequencing of PCR products. **J. Neurovirol.**, v. 2, p. 259-267, 1996a.
3. AGOSTINI, H.T.; RYSCHKEWITSCH, C.F.; MORY, R.; SINGER, E.J.; STONER, G.L. JC virus (JCV) genotypes in brain tissue from patients with progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) and in urine from controls without PML: increased frequency of type 2 in PML. **J. Infect. Dis.**, v. 176, p. 1-8, 1997b.
4. AGOSTINI, H.T.; RYSCHKEWITSCH, C.F.; STONER, G.L. Genotype profile of human polyomavirus JC excreted in urine of immunocompetent individuals. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n° 1, p. 159-164, 1996b.

5. AGOSTINI, H.T.; SHISHIDO-HARA, Y.; BAUMHEFNER, R.W.; SINGER, E.J.; RYSCHKEWITSCH, C.F.; STONER, G.L. JC virus type2: definition of subtypes based on DNA sequence analysis of ten complete genomes. *J. Gen. Virol.*, v. 79, p. 1143-1151, 1998.
6. AGOSTINI, H.T.; YANAGIHARA, R.; DAVIS, V.; RYSCHKEWITSCH, C.F.; STONER, G.L. Asian genotypes of JC virus in native Americans and in Pacific island population: markers of viral evolution and human migration. **Proc. Natl. Sci.**, v. 94, p. 14542-14546, 1997a.
7. ARTHUR, R.R.; DAGOSTIN, S.; SHAH, K.V. Detection of BK virus and JC virus in urine and brain tissue by the polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v. 27, n°. 6, p. 1174-1179, 1989.
8. ATWOOD, W.J. Genotypes, archetypes, and tandem repeats in the molecular epidemiology and pathogenesis of JC virus induced disease. **J. Neurovirol.**, v. 9, p. 519-521, 2003.
9. BEHZAD-BEHBAHANI, A.; KLAPPER, P.E.; VALLELY, P.J.; CLEATOR, G.M.; KHOO, S.H. Detection of BK virus and JC virus DNA in urine samples from immunocompromised (HIV-infected) and immunocompetent (HIV-non-infected) patients using polymerase chain reaction and microplate hybridization. **J. Clin. Virol.**, v. 29, p. 224-229, 2004.
10. CHOU, Q.; RUSSELL, M.; BIRCH, D.E.; RAYMOND, J.; BLOCH, W. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. **Nucleic Ac. Res.**, v. 20, p. 1717- 1723, 1992.
11. DRUMMOND, A.J.; RAMBAUT, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. **BMC Evol. Biol.**, v. 7, p. 214, 2007.
12. DUBOIS, V.; MORET, H.; LAFON, M.E.; BRODARD, V.; ICART, J.; RUFFAULT, A.; GUIST'HAU, O.; BUFFET-JANVRESSE; ABBED, K.; DUSSAIX, E.; INGRAND, D. JC virus genotypes in France: molecular epidemiology and potencial significance for progressive multifocal leukoencephalopathy. **J. Infect. Dis.**, v. 183, p. 213-217, 2001.
13. 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. **J. Infect. Dis.**, v. 199, p. 837-46, 2009.
14. EVANS, A.S. Viral Infections of Human: epidemiology and control. 3th Edition. New York and London. **Plenum Medical Book Company**, cap. 1-9.5, p. 14; cap.30-3, p. 786-788, 1991.
15. FEDELE, C.G.; POLO, C.; TENORIO, A.; NIUBÒ, J.; CIARDI, M.R.; PÉREZ, J.L. Analysis of the transcriptional control region of JC polyomavirus in cerebrospinal fluid from HIV-negative patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. **J. Med. Virol.**, v. 78, p. 1271-1275, 2006.
16. FERRANTE, P.; MEDIATI, M.; CALDARELLI-STEFANO, R.; LOSCIALE, L.; MANCUSO, R.; CAGNI, A.E.; MASERATTI, R. Increased frequency of JC virus type 2 and of dual infection with JC virus type 1 and 2 in Italian progressive multifocal leukoencephalopathy patients. **J. Neurovirol.**, v. 7, p. 35-42, 2001.
17. FINK, M.C.D.S.; PENALVA DE OLIVEIRA, A.C.; MILAGRES, F.A.P.; VIDAL, J.E.; PICERNO-POUZA, A.F.; DUARTE NETO, A.; PANNUTI, C.S. JC virus DNA in cerebrospinal fluids samples from Brazilian AIDS patients with focal brain lesions without mass effect. **J. Infect.**, v. 52, p.30-36, 2006.

18. FINK, M.C.D.S. **Detecção do DNA do poliomavírus humano JC em amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes com AIDS e lesões não expansivas de substância branca do sistema nervoso central.** 2004. 101f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.
19. GRABOWSKI, M.K.; VISCIDI, R.P.; MARGOLICK, J.B.; JACOBSON, L.P.; SHAH, K.V. Investigation of pre-diagnostic virological markers for Progressive Multifocal Leukoencephalopathy in human immunodeficiency virus-infected patients. **J. Med. Virol.**, v. 81, p. 1140-1150, 2009.
20. HOPPE, B.L.; CONTI-TRONCONI, B.M.; HORTON, R.M. Gel-loading dyes compatible with PCR. *Biotech.*, v.12, p.679-680, 1992.
21. JEONG, B.H.; LEE, K.H.; CHOI, E.K.; KIM, K.; KIM, Y.S. Genotyping of the JC virus in urine samples of healthy Korean individuals. **J. Med. Virol.**, v. 72, p. 281-289, 2004.
22. JIANG, M.; ABEND, JR; JOHNSON, S.F.; IMPERIALE, M.J. The role of polyomaviruses in human disease. **Virol.**, v. 384, p. 266-273, . 2009.
23. KEAN, J.M.; RAO, S.; WANG, M.; GARCEA, R.L. Seroepidemiology of human polyomaviruses. **PLoS Pathogens**, v. 5, n° 3, p. 1-10, 2009.
24. KHALILI, K.; CROUL, S.; DEL VALLE, L.; KRYNSKA, B.; GORDON, J. Oncogenic potencial of human neurotropic virus: laboratory and clinical observations. **IMAJ**, v. 3, p. 210-215, 2001.
25. KITAMURA, T.; KUNITAKE, T.; GUO, J.; TOMINAGA, T.; KAWABE, K.; YOGO, Y. Transmission of the human polyomavirus JC virus occurs both within the family and outside the family. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, n°. 10, p. 2359-2363, 1994.
26. IMPERIALE, M.J.; MAJOR, E.O. Polyomavirus. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**. 5th Edition, Vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 2263-2289.
27. KNOWLES, W.A.; PILLAY, D.; JOHNSON, M.A.; HAND, J.F.; BROWN, D.W.G. Prevalence of long-term BK and JC excretion in HIV-infected adults and lack of correlation with serological markers. **J. Med. Virol.**, v. 59, p. 474-479, 1999.
28. MAGINNIS, M.S.; ATWOOD, W.J. JC virus: an oncogenic virus in animals and humans?. **Seminars Cancer Biology**, v.19, p. 261-269, 2009.
29. MARZOCCHETTI, A.; SANGUINETTI, M.; DI GIAMBENEDETTO, S.; CINGOLANI, A.; FADDA, G.; CAUDA, R.; DE LUCA A. Characterization of JC vírus in cerebrospinal fluid from HIV-1 infected patients with progressive multifocal leukoencephalopathy: insights into viral pathogenesis and disease prognosis. **J. Neurovirol.**, v.13, p. 338-346, 2007.
30. MONTAGNER, J.M.; MICHELON, T.F.; SCHROEDER, R.B.; FONTANELLE, B.T.; OLIVEIRA, A.T.D.; SILVEIRA, J.G.; GRAUDENZ, M.S.; ALEXANDRE, O.P.; NEUMANN, J. Poliomavírus - um patógeno emergente para receptores de transplantes. **Einstein**, v. 5, n°. 2, p. 184-189, 2007.
31. PADGETT, B.L.; WALKER, D.L. Prevalence of antibodies in human sera against JC virus, an isolate from a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. **J. Infect. Dis.**, v. 127, p. 467-470, 1973.
32. PADGETT, B.L.; ZURHEIN, G.; WALKER, D.L.; ECKROADE, R.J. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. **The Lancet**, v. 19, p. 1257-1260, 1971.

33. PAGANI, E.; DELBUE, S.; MANCUSO, R.; BORGHI, E.; TARANTINI, L.; FERRANTE, P. Molecular analysis of JC virus genotypes circulating among the Italian healthy population. **J Neuro. Virol.**, v. 9, p. 559-566, 2003.
34. PHO, M.T.; ASHOK, A.; ATWOOD, W.J. JC virus enters human glial cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. **J. Virol.**, v. 74, n° 5, p. 2288-2292, 2000.
35. POLO, C.; PÉREZ, J.L.; MIELNICHUCK, A.; FEDELE, C.G.; NIUBÒ, J.; TENÓRIO, A. Prevalence and patterns of polyomavirus urinary excretion in immunocompetent adults and children. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.10, p. 640-644, 2004.
36. RODRIGUES, C.; PINTO, D.; MEDEIROS, R. Molecular epidemiology characterization of the urinary excretion of polyomavirus in healthy individuals from Portugal – A southern european population. **J. Med. Virol.**, v. 79, p. 1194-1198, 2007.
37. ROSSI, A.; DELBUE, S.; MAZZIOTTI, R.; VALLI, M.; BORGHI, E.; MANCUSO, R.; CALVO, M.G.; FERRANTE, P. Presence, quantitation and characterization of JC Virus in the urine of Italian immunocompetent subjects. **J. Med. Virol.**, v. 79, p. 408-412, 2007.
38. SCHAFFER, K.; SHEEHY, N.; COUGHLAN, S.; BERGIN, C.; HALL, W.W. JC virus in the Irish population: significant increase of genotype 2 in immunocompromised individuals. **J. Neurovirol.**, v. 12, p. 39-46, 2006.
39. SHAH, K.V.; DANIEL, R.W.; STRICKLER, H.D.; GOEDERT, J.J. Investigation of human urine for genomic sequences of the primate polyomaviruses simian virus 40, BK virus, and JC virus. **J. Infect. Dis.**, v. 176, p. 1618-1621, 1997.
40. STONER, G.L.; JOBES, D.V.; COBO, M.F.; AGOSTINI, H.T.; CHIMA, S.C.; RYSCHKEWITSCH, C.F. JC virus as a marker of human migration to the Americas. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 1905-1911, 2000.
41. TAN, C.S.; DEZUBE, B.J.; BHARGAVA, P.; AUTISSIER, P.; WÜTHRICH, C.; MILLER, J.; KORALNIK, I.J. Detection of JC virus DNA and proteins in the bone marrow of HIV-positive and HIV-negative patients: implications for viral latency and neurotropic transformation. **J. Infect. Dis.**, v. 199, p. 881-8, 2009.
42. THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The ClustalX Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 4876-4882, 1997.