

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

FIOCRUZ

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

FLÁVIA FONTENELLE MUYLAERT

**ADAPTAÇÃO DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DE
POLIMERASE (PCR) QUANTITATIVA EM TEMPO REAL PARA O
DIAGNÓSTICO DA LEUCOENCEFALOPATIA MULTIFOCAL
PROGRESSIVA (LMP)**

RIO DE JANEIRO

2009

DISSERTAÇÃO MPCDI/IPEC - FLÁVIA FONTENELLE MUYLAERT - 2009

**ADAPTAÇÃO DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DE
POLIMERASE (PCR) QUANTITATIVA EM TEMPO REAL PARA O
DIAGNÓSTICO DA LEUCOENCEFALOPATIA MULTIFOCAL
PROGRESSIVA (LMP)**

FLÁVIA FONTENELLE MUYLAERT

Dissertação apresentada a Coordenação do
Curso de Pós-Graduação do Instituto de
Pesquisa Clínica Evandro Chagas para fins
de obtenção do Título de Mestrado em
Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Área de Concentração: Virologia Molecular

Orientadores:

Beatriz de Jesus Pereira Vaz
Marcus Tullius Teixeira da Silva

RIO DE JANEIRO

2009

Flávia Fontenelle Muylaert

**ADAPTAÇÃO DA TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DE
POLIMERASE (PCR) QUANTITATIVA EM TEMPO REAL PARA O
DIAGNÓSTICO DA LEUCOENCEFALOPATIA MULTIFOCAL
PROGRESSIVA (LMP)**

Dissertação apresentada a Coordenação do
Curso de Pós-Graduação do Instituto de
Pesquisa Clínica Evandro Chagas para fins
de obtenção do Título de Mestra em
Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientadores:

Beatriz de Jesus Pereira Vaz

Marcus Tullius Teixeira da Silva

Aprovada em: / /2009

Banca Examinadora:

Presidente: Dra. Ana Claudia Celestino Bezerra Leite – IPEC

Membro: Dra. Marize Pereira Miagostovich – IOC

Membro: Aline Fagundes da Silva - IPEC

Membro Suplente: Marco Antonio Sales Dantas de Lima - IPEC

RIO DE JANEIRO

2009

**"O fracasso jamais o surpreenderá se sua decisão
de vencer for suficientemente forte."**

(do livro O Maior Vendedor do Mundo – Og Mandino)

Dedico esta conquista:
a Deus, por cada um dos meus dias
e aos meus pais, pelo amor incondicional.

Agradecimentos

Agradeço aos meus exemplos de vida, o Dr. Raul da Silva Muylaert e a Dra. Flavia Maria Fontenelle Muylaert, pelos incentivos, pelo encorajamento, por todo o apoio tão necessário para que este trabalho se realizasse, sem eles, isso não seria possível. Obrigada por me sustentarem financeira e emocionalmente todos esses anos. Vocês são grandiosos e generosos, são meu orgulho e eu sempre serei grata pelo resto da vida. Agradeço a Deus por tê-los como pais todos os dias.

Agradeço aos meus orientadores Dra. Beatriz Vaz e Dr. Marcus Tullius Teixeira da Silva orientadores desta dissertação, por todo empenho, paciência, sabedoria, compreensão e, acima de tudo, exigência. Gostaria de ratificar a competência de ambos com suas correções e sugestões que fizeram com que concluíssemos este trabalho.

À Dra Ana Claudia Celestino Bezerra Leite pela excelente revisão e críticas construtivas.

À Raquel Carvalhaes Vasconcellos pelo suporte estatístico e pela paciência em inúmeras consultas.

Aos coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas e ao Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas pela oportunidade de crescimento, aprendizado, acolhimento, realização profissional e pessoal e pela confiança em mim depositada.

Ao Programa CNPq-Papes V, da Vice Presidência de Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Processo nº403632/2008-0) pelo financiamento do projeto.

Aos colegas de laboratório Otávio Espíndola, Luciano Oliveira, Ramza Harab, Alexandre Vizzoni, Isaac Lima e Dóris Schor pelo suporte técnico e pelas conversas e confissões que transformam esse ambiente de trabalho em um segundo lar para mim. Agradeço também à Dra. Maria José de Andrada Serpa por sua preocupação, sempre solícita e incentivando carinhosamente o meu progresso.

Aos meus irmãos Hayrthon Fontenelle Muylaert e Raul Fontenelle Muylaert, obrigada por poder sempre contar com vocês.

À cunhada Ana Paula Gonçalves pelos inúmeros momentos de diversão proporcionados com sua presença e por sua atenção nos meus momentos difíceis.

Aos amigos: Janice Subilhaga, Alessandra Bogio, Marcelle Figueira, Anderson Lopes, Raquel de Oliveira, Roberta Álvares pela amizade incondicional sem as quais eu não consigo me ver nesses dias.

Aos amigos de mestrado: Andressa Guimarães, Monique Pimenta, Bernardina Morales, Luanda Neto, Manoel Marques e Wendy Bueno pelo suporte, cumplicidade e incentivo e pelos momentos impagáveis durante essa jornada do mestrado.

Agradeço à Ricardo Chaves pelo apoio, incentivo, por me ouvir, por me fazer rir e por ser tão atencioso durante vários momentos desde o início do curso de mestrado.

Aos amigos de faculdade Fausto Ferraris, Cleber Uzêda, Fernando Olsen e Aline Menezes pelo companheirismo que seguiu apesar das distâncias ocasionadas pela vida.

Agradeço aos novos e fortes amigos Jamile Oazen, Sérgio Oazen e família e amigas da dança que sempre me ajudavam a relaxar nos momentos de lazer.

E sempre agradecerei à melhor experiência que Deus me proporcionou na vida, meu Argus, amor igual, eu nunca mais terei.

RESUMO

A leucoencefalopatia multifocal progressiva (LMP), doença subaguda desmielinizante do sistema nervoso central (SNC), é causada pelo Poliomavirus Humano JC (JCPyV). Devido ao uso de terapias imunossupressoras e à SIDA a frequência de casos de LMP aumentou consideravelmente nas últimas décadas. O padrão ouro para o diagnóstico da LMP é a biópsia cerebral. Entretanto, apesar do elevado poder diagnóstico, este é um método invasivo, com uma taxa custo/benefício elevada. Assim, utiliza-se a tomografia computadorizada ou a ressonância magnética do crânio para o diagnóstico presuntivo de LMP. Métodos moleculares, em especial a reação em cadeia da polimerase (*PCR*), têm se mostrado eficiente no diagnóstico de várias doenças virais do SNC. A *nested-PCR* (*nPCR*) é uma técnica mais eficaz na detecção do DNA do JCPyV no líquido cefalorraqueano (LCR), proporcionando maior sensibilidade e especificidade quando comparada à *PCR* convencional. Entretanto, aproximadamente 15% dos casos prováveis de LMP podem não se confirmar pela *nPCR*. Na era da terapia antiretroviral altamente potente (*HAART*), o percentual de casos não confirmados aumentou, chegando à aproximadamente 42%. Publicações recentes nas quais se utilizou a *PCR* quantitativa (*qPCR*) em tempo real demonstram que esta técnica pode ser 10 vezes mais sensível quando comparada à *PCR* convencional na detecção e quantificação do JCPyV, podendo também ser utilizado como um marcador virológico em pacientes em uso de *HAART* com diagnóstico de LMP. Neste trabalho, elaboramos uma técnica que permite quantificar a carga viral do JCPyV no LCR de pacientes com LMP em razão de acompanhar a resposta do paciente ao tratamento com a *HAART*. O princípio da técnica *qnPCR* em tempo real estabelecida foi semelhante ao da *nPCR*, sendo constituído por dois passos de amplificação sequenciados. O primeiro passo trata-se de uma *PCR* convencional seguido de nova amplificação, agora utilizando a técnica de *qPCR* em tempo real e tendo como molde o produto da primeira amplificação. Foram analisadas amostras de LCR armazenadas pelo Laboratório de Pesquisa Clínica em Neuroinfecções. Destas, 16 eram de pacientes com confirmação diagnóstica pelo método de *nPCR* e 10 eram de casos compatíveis mas sem diagnóstico. Pela *qnPCR* em tempo real, nenhum dos casos compatíveis com LMP apresentou quantificação de carga viral e das 16 amostras positivas, apenas 12 apresentaram sinais de carga que ultrapassaram a linha de base apontando a presença do DNA do JCPyV. Em nossa casuística a *nPCR* teve sensibilidade de 69,6% enquanto a sensibilidade da *qnPCR* foi de 52,2%. Concluímos que a questão diagnóstica da LMP ainda persiste, pois não conseguimos aumentar a sensibilidade de detecção do JCPyV no LCR, entretanto, desenvolvemos um método quantitativo que poderá auxiliar como dado da resposta do paciente ao tratamento com a *HAART*.

Palavras Chave: Leucoencefalopatia multifocal progressiva; JCPyV; *HAART*; *nested-PCR*; *PCR* quantitativa; *nested-PCR* quantitativa em tempo real.

ABSTRACT

Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML), subacute demyelinating disease of the central nervous system (CNS), is caused by the Human Polyomavirus JC (JCPyV). Due to the use of immunosuppressive therapies and AIDS, the frequency of cases of PML has increased considerably in recent decades. The gold standard for the diagnosis of PML is a brain biopsy. However, despite the high diagnostic power, this is an invasive method, with an average cost/benefit ratio. Thus, we use computed tomography or magnetic resonance imaging of the skull to the presumptive diagnosis of PML. Molecular methods, particularly polymerase chain reaction (PCR), have proven effective in the diagnosis of various diseases of the CNS. The nested PCR is a technique more effective in the detection of JCPyV DNA in cerebrospinal fluid, providing greater sensitivity and specificity when compared to conventional PCR. However, approximately 15% of probable cases of PML may not be confirmed by nPCR. In the era of highly active antiretroviral therapy (HAART), the percentage of unconfirmed cases increased, reaching to about 42%. Recent publications in which we used the quantitative realtime PCR (qPCR) show that this technique can be 10 times more sensitive compared to conventional PCR in the detection and quantification of JCV, which can also be used as a virological marker in patients using HAART with a diagnosis of PML. In this work, we elaborated a technique to quantify the viral load of JCPyV in CSF of patients with PML due to monitor patient response to treatment with HAART. The principle of the technique of realtime qnPCR was similar to that of nested PCR, which consists of two amplification steps sequenced. The first step it is a conventional PCR amplification followed by a new, now using the technique of real-time qPCR and taking as template the product of the first amplification. We analyzed CSF samples stored at the Laboratory of Clinical Research in Neuroinfections. Of these, 16 were from patients with diagnosis confirmed by nPCR method and 10 cases were compatible but no diagnosis. For realtime qnPCR, none of the cases compatible with PML showed viral load and in 16 positive samples, only 12 showed signs of load that exceeded the baseline indicating the presence of JCPyV DNA. In our series the nPCR had a sensitivity of 69,6% while the sensitivity of qnPCR was 52,2%. We conclude that the diagnosis of PML issue still persists, because we can't increase the sensitivity of detection of JCPyV in the CSF, however, developed a quantitative method that could support as a given patient's response to treatment with HAART.

Keywords: Progressive multifocal leukoencephalopathy; JCPyV; HAART; nested-PCR; quantitative PCR; realtime quantitative nested PCR.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	13
LISTA DE QUADROS E TABELAS	14
LISTAS DE SIGLAS E ABREVIATURAS	15
1. INTRODUÇÃO	
1.1. BIOLOGIA DO VÍRUS JCPyV	17
1.2. VARIANTES GENOTÍPICAS DO VÍRUS JCPyV	19
1.3. EPIDEMIOLOGIA	22
1.4. PATOGÊNESE	23
1.5. A LEUCOENCEFALOPATIA MULTIFOCAL PROGRESSIVA	27
1.6. LMP E SIDA	29
1.7. POSSÍVEIS TRATAMENTOS PARA A LMP E A TERAPIA ANTIRETROVIRAL ALTAMENTE POTENTE (<i>HAART</i>)	30
1.8. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS	31
1.9. DIAGNÓSTICOS MOLECULARES	32
1.10. FATORES QUE INFLUENCIAM A DETECÇÃO DO VÍRUS JCPyV NO LCR	34
1.11. A PCR QUANTITATIVA E POSSÍVEIS AVANÇOS DIAGNÓSTICOS	35
2. OBJETIVOS	
2.1. GERAL	38
2.2. ESPECÍFICOS	38
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1. POPULAÇÃO ANALISADA	39
3.1.1. Critério de Elegibilidade dos Casos de LMP	39
a. Clínico	39
b. Radiológico	39
3.1.2. Critério de Exclusão	40

3.2. OBTENÇÃO E TRATAMENTO DAS AMOSTRAS PARA EXTRAÇÃO DE DNA	40
3.3. QUANTIFICAÇÃO DE DNA	40
3.4. NESTED-PCR CONVENCIONAL	41
3.4.1. Detecção do produto amplificado	42
3.4.2. Interpretação dos resultados	43
3.5. A <i>qnPCR</i> em Tempo Real	43
3.5.1. Desenho de iniciadores e sonda	43
a. iniciadores	44
b. sonda	45
3.5.2. Construção da curva padrão e otimização da <i>qnPCR</i> em tempo real	46
a. Preparo do DNA molde	46
b. Concentração ótima de iniciadores	46
c. Concentração ótima de sonda	47
3.6. VERIFICAÇÃO DA <i>qnPCR</i> EM TEMPO REAL EM AMOSTRAS DE LCR	50
3.7. BOAS PRÁTICAS DE LABORATÓRIO	52
3.8. PLANO DE ANÁLISE	52
3.8.1. <i>nPCR</i> x <i>qnPCR</i> em tempo real	53
3.9. COMITÊ DE ÉTICA: PARECER APROVADO – sob o número: 015/2008	53
4. RESULTADOS	
4.1. POPULAÇÃO ANALISADA	54
4.2. QUANTIFICAÇÃO E PUREZA DO DNA	54
4.3. NESTED PCR CONVENCIONAL	54
4.3.1. Casos Suspeitos de LMP com confirmação pela <i>nPCR</i>	54
4.3.2. Casos compatíveis com LMP sem confirmação pela <i>nPCR</i>	56
4.4. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE <i>nqPCR</i> EM TEMPO REAL	57
4.4.1. Verificação dos iniciadores	57
4.4.2. Verificação da sonda	58

4.4.3. Preparo de DNA molde	59
4.4.4. Concentração ótima de iniciadores	60
4.4.5. Concentração ótima de sonda	61
4.4.6. Curva-padrão e condições ótimas estabelecidas	61
4.5. VERIFICAÇÃO DA <i>qnPCR</i> EM TEMPO REAL EM AMOSTRAS DE LCR	63
4.6. COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE <i>nPCR</i> e <i>qnPCR</i> EM TEMPO REAL	64
5. DISCUSSÃO	67
6. CONCLUSÃO	72
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	73
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático do genoma do poliomavírus JC.	18
Figura 2. Diversos Tipos e Subtipos do Vírus JCPyV e sua distribuição pelo mundo	22
Figura 3. Percurso dos linfócitos infectados pelo JCPyV na infecção primária e na infecção reativada	25
Figura 4. Micrografia eletrônica mostrando partículas virais esféricas e filamentosas no interior do oligodendrócito	26
Figura 5. Imagem de Ressonância Magnética de um paciente com LMP mostrando evidencia radiológica do progresso da doença	32
Figura 6. Fragmento de 698pb amplificado na primeira etapa da <i>qnPCR</i> em tempo real	44
Figura 7. Esquema mostrando a variação de fluorescência e o C_t	49
Figura 8. Diagrama esquemático do percurso das amostras de casos compatíveis com a leucoencefalopatia multifocal progressiva utilizados na <i>qnPCR</i>	50
Figura 9. Foto do gel dos casos confirmados para a presença do DNA do JCPyV utilizados na <i>qnPCR</i> em tempo real	55
Figura 10. Segundo gel dos casos confirmados para a presença do DNA do JCPyV no LCR	55
Figura 11. Foto do gel de agarose dos casos compatíveis e não confirmados para a leucoencefalopatia multifocal progressiva	56
Figura 12. Geis de agarose revelando a banda plasmidial de 125pb	57
Figura 13. Geis de agarose revelando a banda plasmidial de 114pb	57
Figura 14. Teste com a sonda JC 1R	59
Figura 15: Gel de agarose revelando produto de 698pb da amplificação das diluições seriadas do Plasmídio do JCPyV	60
Figura 16. Resultado do experimento para determinação da concentração ótima de iniciadores	60
Figura 17. Resultado do experimento para determinação da concentração ótima de sonda	61
Figura 18. Eixo y: fluorescência x eixo X: número de ciclos	62
Figura 19. Eixo y: Log da concentração do plasmídio x eixo x: C_t	63

LISTAS DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1: Manifestações neurológicas mais freqüentes na leucoencefalopatia multifocal progressiva	28
Quadro 2: Quadro 2. Iniciadores externos nPCR 1ª etapa	41
Quadro 3. Iniciadores internos nPCR 2ª etapa	42
Quadro 4: Quadro 4: Iniciadores internos da 2ª etapa da qnPCR em tempo real obtidos segundo o software CLC Free	44
Quadro 5. Sondas do 2ª etapa da nPCR em tempo real obtidos segundo o software CLC Free	46
Quadro 6. Reagentes utilizados para otimização do uso dos iniciadores da nqPCR em tempo real	47
Quadro 7. Reagentes utilizados para otimização do uso de sonda da nqPCR em tempo real	48
Quadro 8: Reagentes e concentrações utilizadas nos testes dos iniciadores	58
Quadro 9: Reagentes e concentrações utilizadas nos testes de verificação de sonda	59
Quadro 10: Reagentes e concentrações finais escolhidas para a padronizaçã da qnPCR em tempo real	62
Tabela 1. Distribuição dos Diversos Tipos e Subtipos do Vírus JC em Relação ao Grupo Étnico e Doença de Base	21
Tabela 2: Principais características dos iniciadores e do produto resultante da amplificação com os iniciadores internos da qnPCR em tempo real fornecidas pelo software Oligo6	45
Tabela 3: Resultados obtidos com a qnPCR em tempo real	64
Tabela 4: Tabela de contingência dos métodos quantitativo e qualitativo	65
Tabela 5: Tabela de concordância para Estatística K	66

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-HT_{2A} – Receptor serotoninérgico

°C – graus centígrados

µl – microlitro

µM – micromolar

A – adenina

A_{260/280} - Razão de Absorbância

ARA-A – Vidarabina

ARA-C – Citarabina

BKV – Poliomavírus BK

C – citosina

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTP – desoxirribonucleotídeos (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)

G - Guanina

HAART - Terapia antiretroviral altamente potente, do inglês *Highly Active Antiretroviral Therapy*

HIV – vírus da imunodeficiência humana

IgG – imunoglobulina G

IgM – imunoglobulina M

IPEC – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

JCPyV – Poliomavirus JC

LCR – Líquido cefalorraquidiano

LMP – leucoencefalopatia multifocal progressiva

MC – Poliomavirus MC (Merkel cell)

mg – miligrama

MgCl₂ – cloreto de magnésio

ml – mililitro

mM – milimolar

mmol – milimol

ng – nanograma

nm – nanômetro

nPCR – nested PCR - Reação em cadeia da polimerase aninhada

pb – pares de bases

PCR – Reação em cadeia da polimerase

pg – picograma

pM1TC – plasmídeo obtido pela clonagem de todo o genoma do JCV - protótipo Mad-1 - no vetor pBR322 no sítio *EcoRI*

qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa

qnPCR – Reação em cadeia da polimerase aninhada quantitativa

RCT – região de controle da transcrição

RNM – ressonância magnética

SIDA/AIDS – síndrome da imunodeficiência adquirida

SNC – sistema nervoso central

SV40 – Poliomavirus símio 40

T – timina

Tag – antígeno T maior do poliomavirus JC

tag - antígeno t menor do poliomavirus JC

tat – proteína do HIV

TBE – Tris Borato EDTA

TC – tomografia computadorizada

T_m – temperatura de *melting*

V-T (RIG) – região intergênica

VP – proteína estrutural

1. INTRODUÇÃO

1.1. Biologia molecular do vírus JCPyV

O poliomavírus humano JC (JCPyV), um membro da família *Polyomaviridae*, é o agente etiológico da leucoencefalopatia multifocal progressiva (LMP), uma doença desmielinizante do sistema nervoso central (SNC). O JCPyV é destituído de envelope e apresenta um genoma circular fechado, de duplo filamento de DNA contendo 5.130 pares de nucleotídeos em um capsídeo, exibindo simetria cúbica (icosaédrico) e com 40-45nm de diâmetro (Frisque *et al.*, 1984).

Os vírus da família *Polyomaviridae* exibem uma organização genômica similar consistindo de três regiões funcionais, a saber: (1) uma região inicial, localizada à direita da origem da replicação, onde são codificados os antígenos TAg e tAg e as proteínas reguladoras não estruturais; (2) uma região tardia, localizada no lado distal do sítio de iniciação da replicação responsável pela síntese das proteínas estruturais do capsídeo (VP1, VP2 e VP3) e da agnoproteína, que parece estar envolvida na montagem do capsídeo viral (Frisque *et al.*, 1984); (3) e uma região não codificadora ou regulatória localizada entre as regiões inicial e tardia e que contém o segmento promotor. Esta região regulatória do JCPyV é topograficamente correlata à região regulatória do vírus símio 40 (SV-40)(Gruss e Khoury, 1981). (Figura 1).

O SV-40, que tem 5.243pb e apresenta homologia genética de 69% com o JCPyV, é um poliomavírus possivelmente introduzido na população humana no fim dos anos 50 através de vacinas de pólio contaminadas preparadas a partir de células renais de macacos-rhesus (*Macaca mulatta*) infectados (Shah e Nathanson, 1976). O vírus BK, outro poliomavírus humano e homólogo geneticamente ao JCPyV em 75%, contém 5.153pb e é associado a doenças do trato urinário, tais como a cistite hemorrágica e a nefropatia associada ao poliomavírus BK. Este poliomavírus foi isolado da urina de um paciente que sofrera um transplante de rim e ureter (Gardner *et al.*, 1971). Os novos poliomavírus recentemente descobertos são o Karolinska Institute (KI), o

Washington University (WU) e o Merkel Cell (MC). Os dois primeiros foram isolados a partir de secreções respiratórias de crianças, enquanto o MC está relacionado a um raro tumor humano de origem neuroendócrina (Allander *et al.*, 2007; Gaynor *et al.*, 2007; Feng *et al.*, 2008).

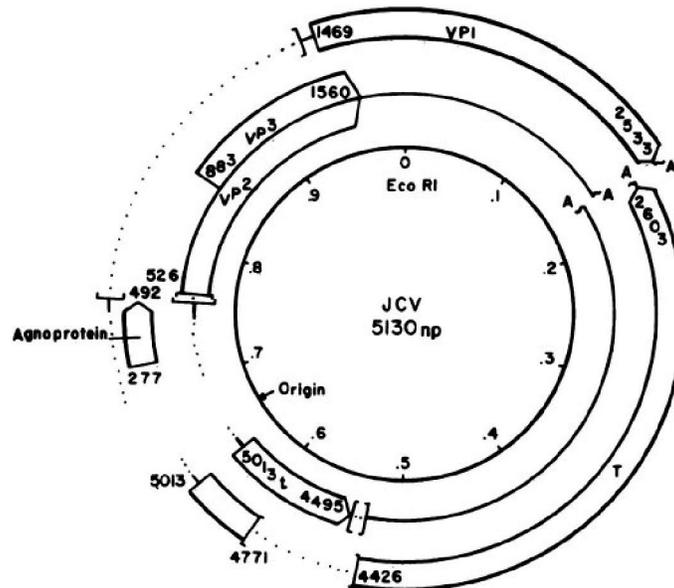


Figura 1. Diagrama esquemático do genoma do JCPyV (Frisque *et al.*, 1984)

O antígeno TAg é uma fosfoproteína não estrutural que regula a transcrição da sequência dos genes iniciais sendo, conseqüentemente, uma proteína autoreguladora. Esta proteína é requerida para a iniciação da replicação do DNA e atividades transreguladoras que induzem lesão lítica de células ou transformação celular. Pouco se sabe sobre a função do antígeno tAg. Alguns estudos com tAg oriundas do SV40 sugerem que esta proteína não teria participação no crescimento lítico do SV40 em cultura de células, mas poderia facilitar eventos de transformação celular, sobretudo quando a concentração da proteína TAg é limitada (Rockwell *et al.*, 1976; Bikel *et al.*, 1987). O sítio de iniciação da expressão destes dois antígenos parece começar no nucleotídeo 5013. Um “*splicing*” gera dois m-RNAs que são os responsáveis pela produção destes dois antígenos reguladores. O sinal de terminação para o tAg é no nucleotídeo 4495, enquanto o TAg é no nucleotídeo 2603. Ambas compartilham a

mesma extremidade 5', mas cada uma tem a sua terminação 3'. As sequências iniciais codificam 688 aminoácidos para o TAg e 172 aminoácidos para o tAg.

A passagem do JCPyV para cultura celular leva ao rearranjo no genoma viral, especialmente das regiões regulatórias (Grinnell, Martin *et al.*, 1983; Martin *et al.*, 1983; Martin e Foster, 1984; Beckmann *et al.*, 1985; Martin *et al.*, 1985). A região de controle da transcrição (RCT) do JCPyV é a região mais variável do genoma viral e é responsável pela restrição do JCPyV em infectar somente humanos e pelo tropismo por células gliais (Padgett *et al.*, 1977; Frisque *et al.*, 1984; Major *et al.*, 1992).

Quanto à diversidade genotípica, até o momento foram identificados oito genótipos do JCPyV. Estes estudos genotípicos baseiam-se na análise de toda a região codificadora do genoma viral, identificando substituições de nucleotídeos na região do gene da proteína principal do capsídeo (VP1) e na chamada região intergênica V-T (RIG), que corresponde a um fragmento de 610pb localizado na extremidade 3' do gene VP1 e TAg (Agostini, Ryschkewitsch *et al.*, 1998b; Jobes *et al.*, 1998; Jobe *et al.*, 2001). Entretanto, a variabilidade gênica entre os vários genótipos não é maior do que 2,6% (Jobe *et al.*, 2001).

1.2. Variantes genotípicas do JCPyV

Infecções humanas com o JCPyV parecem estar relacionadas com a população, ou seja, o genótipo excretado por indivíduos de uma etnia definida é fortemente influenciado pela origem geográfica e seu grupo étnico (Agostini, Yanagihara *et al.*, 1997).

O JCPyV tipo 1 e o tipo 4 são encontrados em europeus e em americanos descendentes de europeus (Agostini, Ryschkewitsch *et al.*, 1998b). O JCPyV tipo 1 é predominante na Europa, principalmente o subtipo 1A na Hungria e 1B na Espanha (Agostini, Ryschkewitsch *et al.*, 1998b). O tipo 4 foi inicialmente encontrado nos Estados Unidos e apresenta uma homologia de aproximadamente 99% com o tipo 1, sendo relacionado como uma forma recombinante da forma Mad 1 (tipo 1A) com o genótipo tipo 3 (Agostini, Ryschkewitsch *et al.*, 1998b). Os tipos 2 e 7 são genótipos asiáticos, sendo o tipo 7 o genótipo de maior predomínio

no sul da China e sudoeste da Ásia (Sugimoto *et al.*, 1997; Guo *et al.*, 1998; Jobes *et al.*, 1998; Cui *et al.*, 2004). O genótipo 2 do JCPyV é subdividido em 2A, 2B, 2C e 2D e apresenta a seguinte distribuição: o 2A é predominante no nordeste da Ásia e também sendo encontrado em nativos americanos; o subtipo 2B é observado em uma minoria euro-asiática; o subtipo 2C parece constituir, do ponto de vista filogenético, uma única cepa juntamente com o 2A. Todavia, esta diferença entre 2A e 2C pode ser útil para delinear variantes virais com significâncias geográficas (Agostini, Yanagihara *et al.*, 1997). O tipo 2D foi encontrado em dois grupos da Mongólia e na costa do sul da Índia (Cui *et al.*, 2004). O tipo 7 também foi subdividido em 7A, 7B e 7C, sendo o 7A mais prevalente no sul da China, o 7B predominante no nordeste da China e no interior da Mongólia e o 7C disseminado pelo norte e sul da China (Cui *et al.*, 2004). Os tipos 3 e 6 são genótipos africanos (Guo *et al.*, 1996; Chima *et al.*, 1998). Os genótipos africanos são também observados entre afro-americanos, com um maior predomínio do genótipo 3 (Agostini, Ryschkewitsch *et al.*, 1998a; Chima *et al.*, 2000). O JCPyV do tipo 5 é provavelmente originário de um efeito recombinante entre o subtipo 2B (euro-asiático) e o tipo 6 (africano) e trata-se de um caso isolado, detectado em um paciente caucasiano com esclerose múltipla na Califórnia (Jobes *et al.*, 1998; Hatwell e Sharp, 2000). O mais recente JCPyV identificado é designado como tipo 8 e foi encontrado nas “Terras Altas” de Papua Nova Guiné. O subtipo 2E também é encontrado em uma ilha próxima à Papua Nova Guiné, denominada Nova Bretanha. Tanto o JCPyV tipo 8 quanto o JCPyV tipo 2E são filogeneticamente relacionados às cepas asiáticas, mas apresentam homologia maior com o subtipo 2A do que com o subtipo 7 (Jobe *et al.*, 2001) (Tabela 1). Na figura 2, é apresentada em mapa mundi a distribuição dos principais tipos do JCPyV conforme as referências citadas anteriormente. No Brasil, o primeiro estudo realizado em amostras de esgoto sanitário descreveu a incidência e a diversidade do JCPyV pela análise de sequências da região intergênica e mostrou a presença dos tipos 1 e 4, de origem européia; 3 e 6, de origem africana; e o subtipo asiático 2A; corroborando com a estrutura da população brasileira (Fumian *et al.*, 2010)

Tabela 1. Distribuição dos Diversos Tipos e Subtipos do Vírus JCPyV em Relação ao Grupo Étnico e Doença de Base (modificado de Jobe *et al.*, 2001)

Genótipo	Grupo Étnico	Doença de Base	Referências
Tipo 1			
1A	Caucasiano	Hodgkin, EM, ND	(Frisque <i>et al.</i> , 1984; Agostini, Ryschkewitsch <i>et al.</i> , 1998b; Agostini <i>et al.</i> , 2001)
1B	Caucasiano	EM, ND	(Agostini, Ryschkewitsch <i>et al.</i> , 1998b; Agostini <i>et al.</i> , 2001)
Tipo 2			
2A	Japonês Hispanico Americano-Nativo	TB\LMP EM ND	(Agostini, Shishido-Hara <i>et al.</i> , 1998)
2B	Caucasiano Americano-Africano	Linfoma\LMP, EM HIV	(Loeber e Dorries, 1988; Agostini, Shishido-Hara <i>et al.</i> , 1998)
2C	Americano-Nativo Caucasiano	ND HIV	(Agostini, Shishido-Hara <i>et al.</i> , 1998)
2D	Americano-Africano	EM	(Agostini, Shishido-Hara <i>et al.</i> , 1998)
2E	Tolai Chamorro	ND ND	(Jobes <i>et al.</i> , 1998)
Tipo 3			
3A	Africano Americano-Africano	ND EM	(Agostini, Ryschkewitsch <i>et al.</i> , 1997)
3B	Americano-Africano	ND	(Agostini, Ryschkewitsch <i>et al.</i> , 1997)
Tipo 4	Caucasiano	EM	(Agostini <i>et al.</i> , 1996)
Tipo 5	Caucasiano	EM	(Agostini, Shishido-Hara <i>et al.</i> , 1998)
Tipo 6	Americano-Africano	LES\LMP	(Agostini, Ryschkewitsch <i>et al.</i> , 1998a)
Tipo 7			
7A	Chinês Vietnamês	ND	(Chima <i>et al.</i> , 2000; Cui <i>et al.</i> , 2004)
7B	Chinês Mongólia Hong Kong Coréia do Sul	AR\ND	(Ou <i>et al.</i> , 1997; Jobes <i>et al.</i> , 1998; Chima <i>et al.</i> , 2000; Cui <i>et al.</i> , 2004)
7C	Sul Chinês	ND	(Cui <i>et al.</i> , 2004)
Tipo 8			
8A			
8B	“Highlander” PNG	ND	(Jobes <i>et al.</i> , 1998)

Abreviações: PNG-Papua Nova Guiné; EM-esclerose múltipla; ND-nenhuma doença; TB-tuberculose;

LMP-leucoencefalopatia multifocal progressiva; LES-lupus eritematoso sistêmico; AR-artrite reumatóide



Figura 2. Diversos Tipos e Subtipos do Vírus JCPyV e sua distribuição pelo mundo

1.3. Epidemiologia

O JCPyV infecta estritamente a população humana, não havendo evidências de que exista outro reservatório. Em estudos realizados com uma variedade de animais, inclusive os domésticos, não se encontraram evidências da presença do JCPyV (Padgett *et al.*, 1977).

O JCPyV é ubíquo, com uma prevalência de aproximadamente 85% em áreas urbanas (Candeias *et al.*, 1977). Por volta dos 10 anos de idade, a soroprevalência é de 40% a 60%, sugerindo que a via inicial de transmissão é intrafamiliar e entre comunidades vizinhas (Taguchi *et al.*, 1982; Walker e Padgett, 1983; Kunitake *et al.*, 1995). Em populações adultas, até 80% possui anticorpos IgG para o JCPyV, sendo que em grandes centros urbanos esta soroprevalência pode exceder os 90% (Walker e Padgett, 1983).

Depois da infecção primária, que ocorre na infância e não apresenta manifestação clínica, o JCPyV persiste latente no tecido renal até sua reativação. A reativação viral é freqüente em adultos, tendo sido mostrada por detecção do JCPyV em amostras de urina de 20-80% de populações adultas jovens a partir dos 30 anos de idade (Kitamura *et al.*, 1990; Chang *et al.*, 2002). A maior porcentagem de virúria foi relatada em populações descendentes de asiáticos

(Agostini, Yanagihara *et al.*, 1997), enquanto que a menor detecção ocorreu em africanos (Chima *et al.*, 1998) e tribos do Ártico (Sugimoto *et al.*, 2002).

Em um estudo realizado em Wisconsin, EUA, 65% dos indivíduos com idade média de 14 anos de idade tinham anticorpos contra o JCPyV (Padgett e Walker, 1973). Essa porcentagem aumenta vagarosamente depois dos 14 anos, chegando até os 75% entre as idades de 50 a 59 anos. Uma prevalência também elevada de anticorpos contra o JCPyV foi encontrada em muitas outras populações (Gardner, 1977; Taguchi *et al.*, 1982; Walker e Padgett, 1983). Em populações pequenas e isoladas, entretanto, uma considerável variação na exposição ao JCPyV foi relatada, indicando que esta infecção é mais largamente distribuída em áreas urbanas (Brown *et al.*, 1975; Candeias *et al.*, 1977).

É importante ressaltar que mais de 92% dos soros coletados de adultos jovens em Wisconsin na década de 1950 apresentavam anticorpos contra o JCPyV, indicando o quão comum é a infecção mesmo antes da vacinação para o poliovírus ou adenovírus contaminadas pelo SV-40. Este dado descarta a hipótese de que a prevalência do anticorpo para JCPyV possa ser atribuída à contaminação de algumas destas vacinas preparadas com o SV40 (Padgett *et al.*, 1977).

1.4. Patogênese

Infecções primárias pelo JCPyV usualmente ocorrem na infância e são, em sua maioria, assintomáticas ou subclínicas. Sugere-se que a infecção inicial pelo JCPyV possa ocorrer por inalação do vírus seguida de disseminação por linfócitos B das amígdalas para outros órgãos e tecidos (Monaco *et al.*, 1998). De fato, um estudo demonstrou a presença do genoma viral em amígdalas de crianças e adultos imunocompetentes (Monaco *et al.*, 1998). Outro estudo, publicado em 2006, pesquisou pela de PCR uma composição de fluidos corpóreos, tais como saliva, lavado orofaríngeo, sangue e urina. Estes fluidos poderiam revelar as possíveis fontes para a disseminação do JCPyV. A análise destes fluidos mostrou que a ocorrência da detecção do JCPyV em fluidos orofaríngeos é rara frente à detecção em urina que chegou a 70% dos indivíduos pesquisados.

Adicionalmente, a detecção do JCPyV em redes de esgoto fortalece a hipótese de transmissão através da urina (Bofill-Mas *et al.*, 2003; Berger *et al.*, 2006).

A possibilidade de infecção em mulheres grávidas despertou a atenção para a possibilidade de uma transmissão congênita (Daniel *et al.*, 1981; Gibson *et al.*, 1981; Andrews *et al.*, 1983). A procura de IgM específica no soro do cordão umbilical de 300 crianças, filhas de mães imunocompetentes, falhou em demonstrar qualquer evidência de infecção “*in utero*”. Quantidades mínimas de IgM específica para JCPyV podem estar presentes no soro do cordão umbilical de uma entre 83 crianças nascidas de mães que mostraram evidências de reativação viral (Daniel *et al.*, 1981; Gibson *et al.*, 1981; Andrews *et al.*, 1983). Esses dados, juntos com a inabilidade de se detectar vírus no tecido fetal, contrariaram a hipótese da via transplacentária como uma das maneiras de transmissão (Walker e Padgett, 1983). Entretanto, em 1983, Andrews e colaboradores indicaram muitas limitações destes dados negativos, sugerindo que técnicas mais sensíveis devam ser utilizadas (Andrews *et al.*, 1983).

Após a infecção o vírus alcança o rim, onde permanece em estado de latência, podendo se replicar e ser excretado durante uma condição de imunossupressão (Rockwell *et al.*, 1976; Arthur *et al.*, 1989; Arthur e Shah, 1989). Alterações no estado imune do indivíduo possivelmente levam a reativação do vírus e a uma infecção persistente, comprovada por aumento nos títulos de anticorpos para o JCPyV e virúria. Esta reativação foi relatada em receptores de transplantes renal e de medula óssea, mulheres grávidas, indivíduos idosos, pacientes com câncer e pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (Coleman *et al.*, 1980; Hogan *et al.*, 1980; Daniel *et al.*, 1981; Gibson *et al.*, 1981; Miller *et al.*, 1982; Coleman *et al.*, 1983; Hogan *et al.*, 1983; Gardner *et al.*, 1984; Andrews *et al.*, 1988; Arthur *et al.*, 1988; Kitamura *et al.*, 1990). O JCPyV pode também ser isolado em pulmão, fígado, baço, medula óssea e linfonodos (Grinnell, Padgett *et al.*, 1983; Houff *et al.*, 1988). O cérebro também pode ser considerado como um órgão de latência viral, embora existam evidências tanto a favor quanto contra esta hipótese (Elsner e Dorries, 1992; White *et al.*, 1992; Vago *et al.*, 1996). (Figura 3)

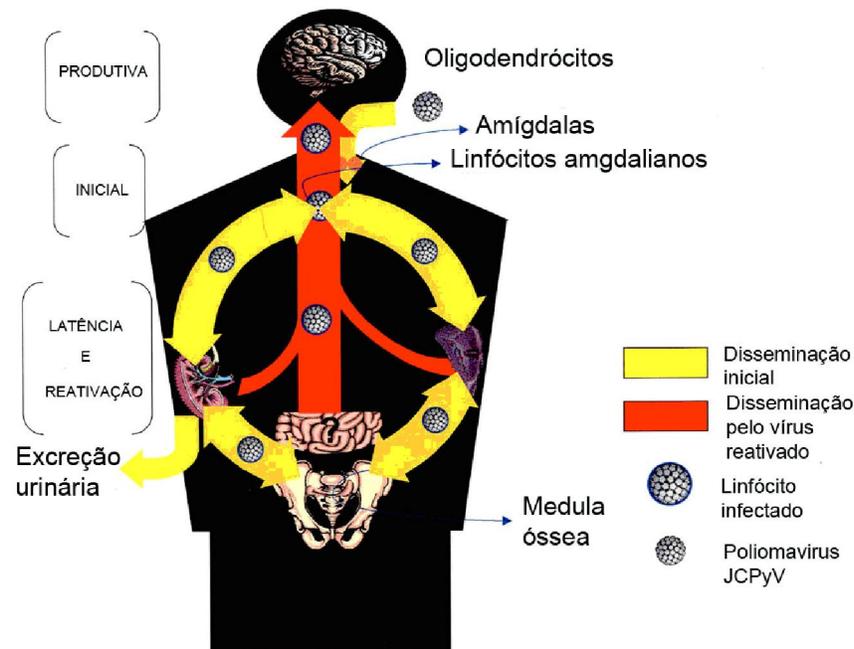


Figura 3. Percurso dos linfócitos infectados pelo JCPyV na infecção primária (amarelo) e na infecção reativada (vermelho) (Seth *et al.*, 2003)

Baseado na presença do JCPyV em células sanguíneas, a disseminação por via hematogênica é sugerida e esta hipótese é sustentada pela detecção do DNA viral em células mononucleares da medula óssea, baço e espaço de Virchow-Robin (Houff *et al.*, 1988). Os linfócitos infectados poderiam abrigar o vírus em latência e, durante uma condição de imunossupressão, as células B infectadas alcançariam a região perivascular do cérebro, infectando células gliais. Dessa forma, o JCPyV atravessa a barreira hemato-encefálica até o SNC e infecta os oligodendrócitos (células responsáveis pela produção de mielina), possivelmente através do receptor serotoninérgico 5-HT_{2A}, replicando-se e acumulando-se em altas concentrações até a citólise (Berger e Concha, 1995; Elphick *et al.*, 2004) (Figura 4).

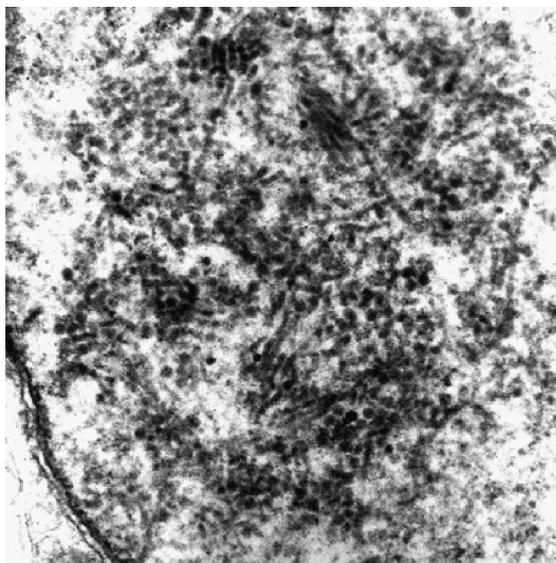


Figura 4. Micrografia eletrônica mostrando partículas virais esféricas e filamentosas no interior do oligodendrócito (Kharfan-Dabaja *et al.*, 2007)

De fato, as lesões desmielinizantes são geralmente encontradas na junção subcortical superficial da substância cinzenta e branca, considerado o território vascular final para as doenças infecciosas hematogênicas do cérebro (Aksamit, 1995).

Muitas tentativas mal sucedidas de detectar JCPyV em amostras de tecido cerebral de pacientes sem LMP foram feitas utilizando-se uma variedade de técnicas imunológicas, de hibridização de ácidos nucléicos e de amplificação molecular (Chesters *et al.*, 1983; Coleman *et al.*, 1983; Carter *et al.*, 1987; Telenti *et al.*, 1990). Muitos destes estudos analisaram um número limitado de espécimes que serviam como controles normais durante o exame do tecido cerebral com LMP. A falha em se identificar o JCPyV no SNC pode indicar que o JCPyV somente alcança este compartimento quando a doença se reativa, ao contrário do que ocorre em uma infecção primária. Entretanto, pela técnica de PCR alguns estudos demonstraram a presença de sequências do JCPyV no cérebro de muitos indivíduos normais, desta forma concluindo que o cérebro também seria um reservatório para a latência viral (White *et al.*, 1992).

1.5. A leucoencefalopatia multifocal progressiva

A LMP foi inicialmente identificada pelo patologista alemão Harllevoden em trabalho publicado em 1930, intitulado “Processo único não classificado” (Hallervorden, 1930). A descrição de uma doença desmielinizante do SNC, mais tarde denominada LMP, foi feita por Astrom e colaboradores que identificaram a presença de desmielinização multifocal anormal, oligodendrócitos com núcleos aumentados e astrócitos bizarros e alargados no tecido cerebral de pacientes que apresentavam distúrbios linfoproliferativos, leucemia linfocítica crônica e doença de Hodgkin (Astrom *et al.*, 1958; Richardson, 1961). Foi sugerida como uma patologia viral com base na análise microscópica de células infectadas por Zu Rheine e Chou e por Silverman e Rubinstein, em 1965 (Silverman e Rubinstein, 1965; Zurhein e Chou, 1965). O isolamento do vírus JCPyV em cultura de células fetais gliais ocorreu em 1971, quando Padgett e colaboradores relataram o isolamento e cultivo de um vírus a partir de um fragmento de tecido cerebral obtido por autópsia de um paciente com LMP. Partículas semelhantes a vírus presentes nos núcleos alterados dos oligodendrócitos foram visualizadas por microscopia eletrônica, sendo designadas com as iniciais do paciente do qual foram isoladas (JC – John Cunningham) (Padgett *et al.*, 1971).

A LMP é caracterizada por um desenvolvimento disseminado de placas de desmielinização na substância branca cerebral e áreas adjacentes. Através do exame macroscópico do cérebro, encontramos a desmielinização da substância branca, tipicamente vistas em focos múltiplos. Estes focos são progressivos tanto em tamanho quanto em número. As lesões predominam na substância branca, mas em fases avançadas da doença podem também estar presentes na substância cinzenta e tendem a coalescer (Editorial Lancet, 1992; Von Einsiedel *et al.*, 1993). Embora estes focos de desmielinização possam ocorrer em qualquer área do cérebro, as regiões mais frequentemente comprometidas são os hemisférios cerebrais, especialmente a região parieto-occipital, o cerebelo e o tronco cerebral (Von Einsiedel *et al.*, 1993).

Clinicamente, a LMP é uma doença subaguda e insidiosa e de poucos aspectos inflamatórios. As manifestações neurológicas se correlacionam com a localização das lesões no SNC e os sinais e sintomas mais comuns na

apresentação da doença são hemiparesia, distúrbios cognitivos e déficits visuais (Berger e Concha, 1995; Fong e Toma, 1995). Em pacientes com outras condições imunossupressoras, excluindo a SIDA, a hemiparesia foi a forma de apresentação mais comum, ocorrendo em 39,2% no momento do diagnóstico (Walker e Padgett, 1983). Uma frequência semelhante de hemiparesia (40 a 44%) foi relatada em pacientes com SIDA e LMP (Berger *et al.*, 1987; Von Einsiedel *et al.*, 1993). Distúrbios cognitivos podem se manifestar por alterações da personalidade ou memória, confusão, distúrbios da linguagem e, em fases avançadas da doença, por demência (Von Einsiedel *et al.*, 1993; Berger e Concha, 1995). Hemianopsia homônima (cegueira de uma mesma metade do campo visual para cada olho) ou quadrantopsia são as alterações visuais mais frequentes. Cegueira cortical está presente em 5 a 8% dos casos no momento do diagnóstico clínico (Brooks e Walker, 1984; Berger e Concha, 1995). Outras manifestações clínicas menos observadas são vertigem, cefaléia, alterações sensoriais, envolvimento de nervos cranianos e convulsões (Brooks e Walker, 1984; Berger e Concha, 1995). A disfunção cerebelar resultante do envolvimento da substância branca cerebelar tem sido mais frequentemente observada em pacientes com SIDA, caracterizando-se por ataxia, disartria e fala escandida (mal articulada, lenta e hesitante) (Berger *et al.*, 1987). Os sinais e sintomas neurológicos mais frequentes na literatura e dentre os pacientes do IPEC estão relatados no quadro 1 abaixo.

Quadro 1. Manifestações neurológicas mais frequentes na leucoencefalopatia multifocal progressiva de acordo com a literatura e com dados do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC) (Berger e Concha, 1995)

SINTOMA	DADOS LITERATURA	IPEC	
		(n)	%
Déficit motor	52%	2	8,0
Déficit cognitivo	45%	12	48,0
Déficit visual	36%	-	-
Afasia	31%	1	4,0
Ataxia	22%	4	16,0
Cefaléia	16%	2	8,0
Crise convulsiva	14%	4	16,0
Déficit sensitivo	11%	-	-

A LMP apresenta grave prognóstico e o curso da doença é usualmente rapidamente progressivo. A sobrevida média dos pacientes com SIDA com LMP era de 4 a 6 meses a partir do início dos sinais e sintomas neurológicos e mais de 80% sucumbiam dentro de um ano a partir do diagnóstico (Brooks e Walker, 1984; Berger *et al.*, 1987; Kuchelmeister *et al.*, 1993; Von Einsiedel *et al.*, 1993). Com o estabelecimento da terapia antiretroviral altamente potente (HAART), em usuários, observou-se maior sobrevida com melhora do quadro neurológico (Miralles *et al.*, 1998). Entretanto, em raras ocasiões, indivíduos com a LMP experimentaram da melhora clínica e radiográfica e até mesmo remissão da doença (Berger e Mucke, 1988). A explicação para a prolongada sobrevida deve estar relacionada com o estado imune. Publicações recentes sugerem um curso clínico significativamente prolongado em pacientes com relativa preservação da contagem de células CD4⁺, sem imunodeficiência detectável, em casos com achados histopatológicos de intensa resposta inflamatória ou elevados títulos de anticorpos para o JCPyV (Berger *et al.*, 1998).

1.6. LMP e SIDA

No passado, a LMP era considerada uma doença rara, sendo mais observada em pacientes com doença linfoproliferativa (Brooks e Walker, 1984). Entre estes distúrbios encontrávamos a doença de Hodgkin, a leucemia linfocítica crônica e o linfossarcoma, ocorrendo em cerca de 60% dos casos de LMP (Brooks e Walker, 1984); desordens mieloproliferativas em 6,5% dos casos; carcinomas em 2,2%; outros estados de imunodeficiência eram responsáveis por 16,1% dos casos de LMP. Doenças granulomatosas e inflamatórias como a tuberculose, Doença de Whipple causavam imunossupressão em 7,4% dos pacientes que desenvolviam a LMP e em 5,2% dos casos não se podia encontrar a doença de base para o desenvolvimento de LMP (Brooks e Walker, 1984).

Durante os últimos anos, a frequência da LMP aumentou dramaticamente, o que podemos atribuir à utilização freqüente de terapias imunossupressoras em transplante de órgãos e em doenças autoimunes e, principalmente, com o surgimento da SIDA (Berger e Concha, 1995). A LMP em associação com a SIDA

foi relatada após o primeiro ano do reconhecimento inicial da SIDA, em 1981 (Gillespie *et al.*, 1991). Desde então, antes considerada uma doença rara, com a pandemia da SIDA, a LMP veio a se tornar uma doença mais frequentemente observada. Estima-se que a SIDA venha a ser a doença de base em mais de 85% dos casos atuais de LMP e que 2% a 8% dos pacientes infectados pelo HIV irão desenvolver LMP (Berger *et al.*, 1987; Major *et al.*, 1992). Além disto, ao invés de afetar indivíduos mais velhos como o observado em estudos anteriores, a LMP se tornou uma doença de adultos jovens entre os 20 e 50 anos de idade (Holman *et al.*, 1991).

1.7. Possíveis tratamentos para a LMP e a terapia antiretroviral altamente potente (HAART)

Uma variedade de tratamentos tem sido proposta para a terapia da LMP, mas até o momento nenhuma droga mostrou eficácia comprovada contra o JCPyV. A droga mais comumente utilizada é o ARA-C ou citarabina (Hall *et al.*, 1998). Os outros nucleosídeos análogos também preconizados seriam a ARA-A ou vidarabina. O uso de interferons no tratamento da LMP é controverso. Alfa-interferon provou ser eficiente no tratamento do papilomavírus humano (HPV) e baseado nesta observação foi também proposto como uma possibilidade terapêutica para a LMP. Alguns estudos sugerem que o tratamento com alfa-interferon aumenta a sobrevivência de pacientes co-infectados pelo HIV e JCPyV, mas nenhum ensaio clínico utilizou um número suficiente de pacientes necessários para avaliação da eficácia terapêutica da droga (Counihan *et al.*, 1996; Hou e Major, 1998). Relatos de casos isolados e um pequeno número de estudos sugerem a eficácia da droga cidofovir para a LMP, apesar da mesma não inibir a replicação do JCPyV em cultura de tecidos (Kraemer *et al.*, 2008).

Estudos mais recentes indicam que a terapia antiretroviral *HAART* determina um aumento da sobrevivência do doente, com estabilização da doença e até mesmo remissão dos sinais e sintomas neurológicos. De fato, desde a introdução da *HAART*, muitos casos de remissão foram relatados (Baqi *et al.*, 1997; Elliot *et al.*, 1997; Power *et al.*, 1997). Esta terapia melhora o prognóstico da

doença que está claramente correlacionada com a redução da carga viral do HIV e o aumento de células CD4⁺ (Albrecht *et al.*, 1998; Clifford *et al.*, 1999). Acredita-se que na ausência de tratamento as defesas do hospedeiro poderiam, por algum tempo, exercer um controle sobre a replicação viral do JCPyV no SNC. Em função do comprometimento do sistema imune pela SIDA ocorre a instalação e rápida progressão da LMP. Entretanto, com o advento da HAART pode-se verificar o retorno do controle da replicação viral (Bossolasco *et al.*, 2005).

Diferente de outras infecções oportunistas do SNC, a prevalência da LMP em pacientes de SIDA aumentou. Anteriormente figurava entre 0,7% a 3,8% (Krupp *et al.*, 1985; Berger *et al.*, 1987; Gillespie *et al.*, 1991; Holman *et al.*, 1991), mas estudos recentes apontam uma taxa de incidência que varia de 5,3% a 8% (Whiteman *et al.*, 1993; Berger e Concha, 1995; Major e Ault, 1995; Martinez *et al.*, 1995).

1.8. Métodos diagnósticos

O diagnóstico presuntivo da LMP é realizado através da história clínica, do exame neurológico e de exames de neuroimagem, tais como tomografia computadorizada (TC) e ressonância magnética (RNM) do crânio. Contudo, o diagnóstico de certeza só é alcançado com métodos confirmatórios, tais como a biópsia cerebral ou a pesquisa do DNA viral no LCR, através de biologia molecular (Whiteman *et al.*, 1993).

A TC de crânio mostra lesões hipodensas na substância branca com uma predileção pela área parieto-occipital, sem a presença de edema ou efeito de massa (Krupp *et al.*, 1985). Geralmente as lesões não captam contraste, mas um estudo demonstrou leve captação de contraste nas lesões desmielinizantes após administração de uma dose dupla do contraste com um retardo na realização do exame (Saxton *et al.*, 1984).

A RM de crânio é mais sensível do que a TC de crânio (TC) para demonstrar o número, tamanho e extensão das lesões. As lesões desmielinizantes demonstradas pela RM são imagens hiperintensas na sequência ponderada em T2 e FLAIR e hipointensas em T1. Estas lesões raramente mostram captação de gadolínio ou efeito de massa (Figura 5).

Para o diagnóstico definitivo da LMP, a biópsia cerebral ou a autópsia é necessária (Editorial Lancet, 1992; Whiteman *et al.*, 1993). A sensibilidade desse

método varia de 80 a 90% e sua precisão é de 67 a 96%. Entretanto, a biópsia cerebral é um método invasivo com uma taxa custo/benefício elevada, apresentando uma taxa de morbidade de 8,4 a 12% e de letalidade entre 2 a 2,9% (Karahalios *et al.*, 1992).

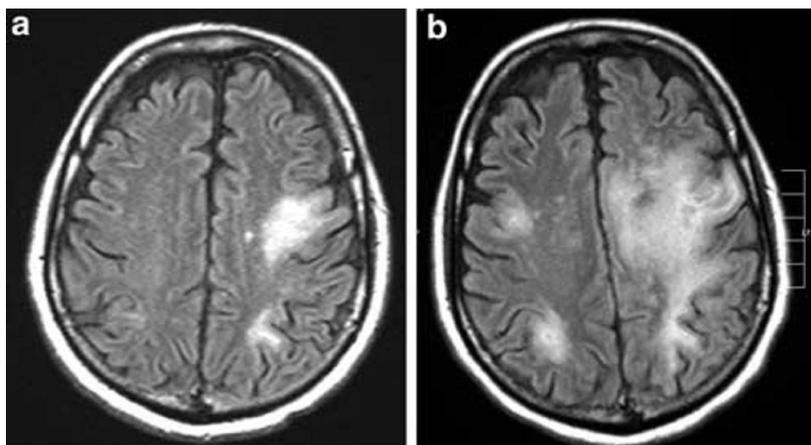


Figura 5. Imagem de Ressonância Magnética de um paciente com leucoencefalopatia multifocal progressiva mostrando evidencia radiológica do progresso da doença: a) Imagem ressonância magnética do paciente com 168 dias de acompanhamento; b) imagem de ressonância magnética deste mesmo paciente com 233 dias de acompanhamento (Kharfan-Dabaja *et al.*, 2007)

Devido à elevada soroprevalência do JCPyV, testes sorológicos não são diagnósticos de LMP.

A análise do líquido cefalorraquiano (LCR) é geralmente normal na ausência de infecção pelo HIV. Ocasionalmente, leve pleocitose linfocítica pode ser observada em 15% dos casos, a proteína total pode estar ligeiramente aumentada em 20 a 30% dos casos (Brooks e Walker, 1984; Berger e Concha, 1995).

1.9. Diagnósticos moleculares

A introdução de métodos moleculares determinou significativos avanços na pesquisa sobre o JCPyV e o diagnóstico de LMP. Vários estudos demonstram a eficiência da análise do LCR utilizando-se da reação em cadeia da polimerase (*PCR*) no diagnóstico de doenças virais agudas, subagudas e crônicas do SNC (Weber *et al.*, 1996). A *PCR* amplifica a partir de poucas cópias de sequências específicas de ácidos nucleicos. Por esse motivo, é um exame que tem a

capacidade de detectar microorganismos que são de difícil isolamento. Esta ferramenta tem sido crescentemente empregada em alternativa à biópsia cerebral, pois a presença do vírus no LCR junto a laudos radiológicos compatíveis é suficiente para se estabelecer o diagnóstico de LMP (Weber *et al.*, 1994; Weber *et al.*, 1996; Weber *et al.*, 1997). Além disto, a punção lombar é minimamente invasiva se comparada à biópsia cerebral (Albrecht *et al.*, 1998).

Estudos anteriores demonstraram a eficiência da PCR. Sua sensibilidade possui ampla variação nos diversos estudos podendo estar entre 17% até 92%, com a especificidade variando de 92% a 100% (Tornatore *et al.*, 1992; Gibson *et al.*, 1993; Moret *et al.*, 1993; Weber, Turner, Frye, Luke *et al.*, 1994; Fong *et al.*, 1995; Mcguire *et al.*, 1995). Segundo dados da literatura, essa variação decorre das diferentes estratégias para a detecção do JCPyV no LCR por métodos moleculares. A ausência de padronização deste exame permitiu encontrar diversos rendimentos dentre os métodos descritos (Weber, Turner, Frye, Luke *et al.*, 1994; Mcguire *et al.*, 1995; De Luca *et al.*, 1996; Dubois *et al.*, 1996; Hammarin *et al.*, 1996; Cinque *et al.*, 1997; Matsiota-Bernard *et al.*, 1997; Sugimoto *et al.*, 1998).

Entretanto, foi com o uso da *nested-PCR* (*nPCR*) que observamos um marcado aumento na sensibilidade e especificidade da *PCR* quando comparada com a *PCR* convencional. A *nPCR* consiste de duas etapas de amplificação sucessivas. Uma alíquota do produto da primeira etapa é transferido para uma segunda reação, que recebe um par iniciadores internos ao fragmento obtido na primeira etapa potencializando a amplificação e fornecendo mais sensibilidade ao diagnóstico. (Tornatore *et al.*, 1992; Moret *et al.*, 1993; Weber, Turner, Frye, Luke *et al.*, 1994; Fong *et al.*, 1995; Mcguire *et al.*, 1995; De Luca *et al.*, 1996). Devido à baixa concentração de DNA viral no LCR, nunca excedendo 50 genoma eq/ μ l, a detecção pela *PCR* convencional se mostrou pouco eficiente quando a *nPCR*, sendo os limites de detecção destas metodologias respectivamente 20 genoma eq/ μ l e 2 genoma eq/ μ l (De Luca *et al.*, 1996). A sensibilidade e especificidade da *nPCR* para a detecção do DNA do JCV no LCR em casos suspeitos de LMP é variável nos diversos estudos, sendo em média de 85% e 98,5%, respectivamente.

1.10. Fatores que influenciam a detecção do JCPyV no LCR

Atualmente, com o estabelecimento da *HAART*, o percentual de casos não confirmados parece ter aumentando, chegando a 42,5% (De Luca *et al.*, 2000; Marzocchetti *et al.*, 2005). Apesar da provável relação entre o uso da terapia antiretroviral e a redução da positividade da *PCR* no LCR para a detecção do JCPyV, os mecanismos envolvidos não estão esclarecidos. Acredita-se que a *HAART* possa inibir tanto a entrada no cérebro de linfócitos B infectados pelo JCPyV quanto a transativação do JCPyV pela proteína *tat* do HIV (Berger *et al.*, 2001).

A reconstituição imune decorrente do controle da replicação do HIV pela terapia implica estabilização da contagem de células T CD4, o que parece indicar um controle na replicação do JCPyV. Todavia, a contagem de células CD4 apresenta um fraco valor preditivo se relacionado com a carga viral do JCPyV. A carga do JCPyV no LCR, em

vários estudos, é apresentada como uma referência de prognóstico para o paciente. Após um acompanhamento de alguns pacientes sob *HAART*, o *clearance* do DNA do JCPyV do LCR foi relatado após aproximadamente dois meses de tratamento, mostrando melhora do prognóstico juntamente com a negatização do exame de PCR (Matsiota-Bernard *et al.*, 1997; Eggers *et al.*, 1999; De Luca *et al.*, 2000; Marzocchetti *et al.*, 2005). Foi demonstrado também que pacientes com as maiores cargas de DNA do JCPyV no LCR apresentam rápida progressão da LMP e piores prognósticos (De Luca *et al.*, 1999).

Diversas abordagens estratégicas para aumentar a sensibilidade de detecção do JCPyV no LCR por *PCR* foram propostas. Questionou-se o método de purificação do DNA, utilizando diversos métodos de extração ou ainda a amostra clínica tratada por altas temperaturas na reação (Gibson *et al.*, 1993; Moret *et al.*, 1993). Em relatos da literatura, sugere-se examinar amostras seriadas de LCR de um mesmo paciente, preferencialmente uma amostra por semana, pois com o passar dos dias e com a progressão da doença, uma maior carga de vírus é liberada no LCR, desta forma facilitando a detecção (Landry *et al.*, 2008). Outros estudos demonstraram que para a amplificação por *PCR*, a síntese de oligonucleotídeos de diversas regiões do genoma viral (região VP1, antígeno T menor, antígeno T maior ou regiões não-codificantes) apresenta os mais diversos rendimentos na *PCR* ou na *PCR* aninhada (Weber, Turner, Frye, Luke *et al.*, 1994; Mcguire *et al.*, 1995; De Luca *et al.*, 1996; Dubois *et al.*, 1996; Hammarin *et al.*, 1996; Cinque *et al.*, 1997; Matsiota-Bernard *et al.*, 1997; Sugimoto *et al.*, 1998). Como exemplo, um recente estudo relatou o caso de uma paciente com LMP que teve suas amostras de LCR testadas sucessivamente para detecção da região VP1 do genoma viral apresentando resultado negativo. Quando examinada para um fragmento da região do antígeno T maior, apresentou elevada carga viral (70.000 cópias/ml do LCR), evidenciando desta forma que a variabilidade genotípica e possíveis mutações podem levar a um resultado mais fraco ou a um falso negativo. A escolha da região do antígeno T maior por parte do laboratório que obteve o resultado positivo se deve ao fato desta região do genoma do JCPyV ser mais conservada do que a região VP1 (Landry *et al.*, 2008).

Ainda não se sabe o motivo da redução da detecção do JCPyV. É possível que essa doença seja diagnosticada com maior frequência em países que tenham estabelecidos os corretos procedimentos diagnósticos. Em países em desenvolvimento, a dificuldade de acesso por parte do serviço público de saúde a exames incluindo os de neuroimagem e moleculares e a falta de neurocirurgiões qualificados para a execução da biópsia cerebral são alguns dos possíveis fatores desta redução. Outra possível explicação pode ser a ocorrência de outras doenças oportunistas que levam à morte antes da instalação da LMP, como a tuberculose, ou a sobreposição com outras doenças oportunistas do SNC, levando ao diagnóstico de apenas uma das morbidades e mascarando a LMP (Vidal *et al.*, 2008).

1.11. A PCR quantitativa e possíveis avanços diagnósticos

Publicações utilizando a *PCR* quantitativa (*qPCR*) em tempo real para detecção e quantificação do JCPyV são escassas, mas demonstram que esta ferramenta pode ser de 10 a 100 vezes mais sensível quando comparada com a *PCR* convencional, mantendo a especificidade e podendo também ser utilizada como um marcador virológico em pacientes em uso de *HAART* com diagnóstico de LMP (Bossolasco *et al.*, 2005; Mcnees *et al.*, 2005; Elfaitouri *et al.*, 2006; Pal *et al.*, 2006; Sehbani *et al.*, 2006). Este procedimento permite, de forma simultânea, a detecção de um fragmento específico de RNA ou DNA como também a sua quantificação. A detecção do aumento do produto da *PCR* em tempo real, ao longo de cada ciclo, ocorre a partir do aumento da fluorescência emitida, decorrente da ligação do fluoróforo (marcador presente na reação) ao DNA que está sendo amplificado. Os métodos de detecção são baseados nas alterações da proporção de fluorescência com o aumento do produto específico ou não específico. A emissão crescente de sinal luminoso é monitorada em cada reação/tubo de *PCR* a cada ciclo para gerar curvas de amplificação típicas da *PCR* quantitativa.

Pela necessidade crescente de um aprimoramento diagnóstico relacionado à redução da sensibilidade da *nPCR* para detecção do JCPyV no LCR e tendo em vista que a carga viral é um possível marcador de prognóstico para pacientes de LMP que recebem a terapia antiretroviral, elaboramos uma nova técnica calcada no conceito da *nPCR* convencional. Neste trabalho, como segunda etapa, utilizamo-nos da técnica de *PCR* em tempo real. Na primeira etapa da *nPCR* convencional amplifica-se um fragmento de 698pb do genoma, que codifica o antígeno T maior. Para a segunda, foi composto um novo par de iniciadores para um fragmento de 125pb interno ao fragmento produzido na primeira etapa. Empregamos a tecnologia *TaqMan*[™] na composição da sonda específica para a detecção deste fragmento. Dados publicados na literatura mostram que esta adaptação desenvolvida com finalidade diagnóstica para a meningite tuberculosa em LCR de pacientes suspeitos obteve sucesso na a detecção do DNA de *Mycobacterium Tuberculosis* (Takahashi e Nakayama, 2006). Desta forma, a proposta do projeto **Adaptação da Técnica de PCR Quantitativa em Tempo Real para o Diagnóstico da Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva** é diagnosticar a LMP com mais rapidez e precisão. Poderemos monitorar a presença e a progressão da infecção com um método conveniente por ser menos invasivo, com maior sensibilidade e mantendo a especificidade da *nPCR* tradicional, então se tornando uma ferramenta mais confiável e adequada para o acompanhamento da atividade da LMP. A questão que estamos por responder é se o método da *qnPCR* em tempo real poderá detectar mínimas quantidades de

carga viral no caso dos pacientes com infecção subclínica. O desafio da nova técnica é identificar possíveis casos falso-negativos e oferecer um prognóstico a todos os pacientes que apresentarem no LCR o DNA do JCPyV , pois o exame proposto será quantitativo e poderá estimar a carga viral do paciente.

Outra vantagem deste método será eliminar a necessidade do uso de produtos carcinogênicos como o brometo de etídeo para corar o DNA para a eletroforese ao final da *nPCR* convencional. Com a adaptação da ferramenta de detecção do vírus JCPyV, não será preciso o preparo de géis de agarose para visualização do produto do segundo *round*. A carga viral é fornecida pelo próprio aparelho que capta a fluorescência da sonda no momento em que ela se liga ao DNA viral durante a sua amplificação, o que faz desta técnica um método rápido, seguro, de aplicabilidade imediata por parte do laboratório e fornecedora de dados quantitativos ao invés de qualitativos.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Desenvolver e padronizar uma metodologia de diagnóstico laboratorial da LMP baseada na *nested-PCR* quantitativa (*qnPCR*) em tempo real para a detecção e quantificação do DNA do vírus JCPyV no LCR de pacientes com suspeita de LMP.

2.2.ESPECÍFICOS

- Desenvolver e Padronizar a técnica de *qnPCR* em tempo real;

- Verificar o desempenho da técnica padronizada no LCR de pacientes com suspeita de LMP;

- Comparar a sensibilidade e a especificidade obtidas com a *qnPCR* em tempo real com a sensibilidade e especificidade da *PCR* aninhada convencional.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. POPULAÇÃO ANALISADA

Trata-se de um estudo seccional, cuja amostragem utilizada foi não-probabilística selecionada com base nos critérios clínicos de inclusão, utilizando-se de amostras de LCR coletadas pelo Laboratório de Pesquisa Clínica em Neuroinfecção e armazenadas pelo Laboratório de Pesquisa Clínica em Patogenia Viral no período de janeiro de 2002 a setembro de 2008. Foram selecionados 29 pacientes com diagnóstico possível de LMP para investigação com base em dados clínicos e de neuroimagem identificados e selecionados por neurologista do Laboratório de Pesquisa Clínica em Neuroinfecção, Dr. Marcus Tullius Teixeira da Silva. Os critérios de elegibilidade e exclusão foram estabelecidos em trabalho anterior e encontram-se descritos abaixo. Neste mesmo trabalho, foram confirmados 19 casos de LMP pela presença do DNA viral no LCR, utilizando-se o método de *nPCR* (Silva et al., 2006). O grupo controle foi constituído de 24 amostras de LCR de pacientes sem evidência clínica de LMP.

3.1.1. Critério de Elegibilidade dos Casos de LMP

a) Clínico:

Apresentar um ou mais dos sinais e sintomas relacionados ao SNC de instalação subaguda, abaixo relacionados:

- Déficit neurológico focal – hemiparesia, ataxia, afasias, crise convulsiva, envolvimento de nervos cranianos;
- Alterações cognitivas
- Vertigem
- Cefaléia

b) Radiológico:

Tomografia Computadorizada (TC) e/ou Ressonância Nuclear Magnética (RNM) de Crânio:

- TC com lesões hipodensas difusas na substância branca, com ou sem captação de contraste, sem edema ou efeito de massa;

- RNM com lesões hiperintensas nas imagens de T2 e FLAIR, e hipointensas em T1, com ou sem captação de contraste com gadolínio, sem efeito de massa.

3.1.2. Critério de Exclusão

Pacientes com tumores do SNC e sinais de hipertensão intracraniana que contra-indicariam a punção lombar.

3.2. OBTENÇÃO E TRATAMENTO DAS AMOSTRAS PARA EXTRAÇÃO DE DNA

As amostras de LCR foram coletadas por punção lombar e transportadas ao laboratório à temperatura ambiente. Estas foram então centrifugadas e armazenadas a -20°C em ambiente livre de produtos de *PCR*.

O DNA genômico foi extraído de uma alíquota de 200µl de LCR. Utilizou-se o kit *QIAamp Blood Kit* (Qiagen – Duesseldorf, Germany), segundo as especificações do protocolo para extração do DNA genômico de sangue ou fluidos corporais. O DNA foi eluído em 60µl de H₂O. Os DNAs purificados e concentrados foram armazenados a -20°C em tubos *ependorf* 1,5ml.

3.3. QUANTIFICAÇÃO DE DNA

Em função de verificar a pureza do DNA as concentrações de DNA foram determinadas com espectrofotômetro (*Eppendorf Spectrophotometer* 000576 – Hamburgo, Alemanha), sendo a leitura feita no comprimento de onda de 260nm. Os valores da razão A₂₆₀/280 indicavam a pureza dos DNAs extraídos, tendo valores ideais maiores ou iguais a 1,8. As amostras foram armazenadas a -20°C.

3.4. NESTED PCR CONVENCIONAL

Uma região conservada de 698pb do gene que codifica o antígeno T maior do protótipo Mad-1 do JCPyV foi amplificada com os iniciadores externos JC 4284U e JC 4961L na primeira etapa de uma *nPCR* (do inglês, *nested-PCR*). A mistura para esta reação foi preparado “*in house*” conforme condições estabelecidas em trabalho anterior concentrações ideais eram: 100pmoles de cada iniciador (quadro 2), solução tampão para *PCR*, 1,5mM MgCl₂, 2,5mmol dNTPs, 2,5U *Taq DNA* polimerase (*Invitrogen*) (Califórnia, USA) e H₂O UltraPure (*Invitrogen*) para completar o volume de 40µl/tubo (Weber, Turner, Frye, Luke *et al.*, 1994).

Quadro 2. Iniciadores externos *nPCR* 1ªetapa

Iniciadores externos <i>nPCR</i> 1ª etapa	Sequências (5' – 3')	Posição
JC 4284U	TTT TTA GGT GGG GTA GAG TGT T	4284 – 4305
JC 4961L	TGG AGC TTA TGG ATT TAT TAG G	4982 – 4961

A esta mistura foi adicionado 10µl do DNA extraído, totalizando 50µl em cada tubo. Em todos os experimentos foram incluídos controles positivo (diluições do plasmídeo pM1TC, obtido pela clonagem de todo o genoma do JCPyV - protótipo Mad-1 - no vetor pBR322 no sítio *EcoRI*, fornecido por Dr. Eugene O. Major, do Instituto Nacional da Saúde, Laboratório de Medicina Molecular e Neurociências - Maryland, EUA), negativo água *UltraPure*- (*Invitrogen*) e controle da reação.

Os parâmetros de ciclagem foram uma etapa prévia de desnaturação de 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 1 minuto, extensão a 70°C por 1 minuto com um prolongamento de 1 segundo, a cada ciclo e uma etapa adicional de extensão

a 70°C por 2 minutos após o último ciclo. As reações do primeiro passo foram realizadas no termociclador *Endurance TC-412 (TECHNE - Minnesota, EUA)*.

Uma alíquota de 2µl do produto da primeira etapa foi transferida para a segunda reação. Para esta mistura, de volume igual a 48µl, foram usados os iniciadores internos JC 36U e JC 39L para amplificação de um fragmento de 389pb (quadro 3). Usou-se a concentração de 100pmoles para cada iniciador, tampão padrão para *PCR*, 1,5mM MgCl₂, 2,5mmol dNTPs, 2,5U *Taq DNA* polimerase (*Invitrogen*) e água - *UltraPure (Invitrogen)*.

Quadro 3. Iniciadores internos *nPCR* 2ª etapa

Iniciadores internos <i>nPCR</i> 2ª etapa	Sequencias (5' – 3')	Posição
JC 36U	AGA TCC CTG TAG GGG GTG TCT CC	4505 – 4527
JC 39L	ACT CCA CCC TGA TAA AGG TGG	4874 – 4894

Os parâmetros da segunda ciclagem foram uma etapa prévia de desnaturação de 95°C por 5 minutos, seguida de 25 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 1 minuto, extensão a 70°C por 1 minuto com um prolongamento de 1 segundo a cada ciclo e uma etapa adicional de extensão a 70°C por 2 minutos após o último ciclo. Todas as reações da segunda etapa de amplificação foram realizadas no termociclador *Endurance TC-412 (TECHNE)*.

3.4.1. Detecção do produto amplificado

Após amplificação, 10µl de cada produto foi analisado por eletroforese em gel de agarose *UltraPure (Invitrogen)* a 2%. O preparo do gel foi feito com 1,0g de agarose diluída em 50 ml de tampão de eletroforese Tris-borato-EDTA (TBE). No gel foi adicionado um volume de 3µl de brometo de etídeo para uma concentração final de 0,5µg/ml. A corrida eletroforética foi realizada utilizando a corrente de 100

V por aproximadamente 30 minutos. O gel foi visualizado e fotografado em transiluminador em sistema digital de captura de imagens *L-Pix-HE* (Loccus Biotecnologia – São Paulo, Brasil). O *software L-Pix Image* foi utilizado para edição das imagens.

3.4.2. Interpretação dos resultados

Para verificar a eficiência da primeira etapa de amplificação, foram utilizadas alíquotas dos controles positivos (plasmídeo) e negativo, junto ao controle de peso molecular e os produtos do controle visualizadas no gel possuíam 698pb. Os produtos das amostras clínicas somente eram visualizados em gel após a segunda etapa de *PCR*. Uma *nPCR* era considerada positiva para presença do DNA do JCPyV quando apresentava, na eletroforese, uma banda de 398pb relativa ao fragmento flanqueado pelo par de *primes* internos 36U e 39L.

3.5. A *qnPCR* em Tempo Real

A técnica utilizada neste trabalho é semelhante à *nPCR*, sendo constituída por duas etapas de amplificação, onde após a realização de uma *PCR* convencional, utilizou-se uma alíquota do produto amplificado como molde para a nova amplificação utilizando a técnica de *qPCR* em tempo real.

3.5.1. Desenho dos iniciadores e sonda

A partir da seqüência do plasmídeo pM1TC, protótipo Mad-1 foram desenhados iniciadores senso e anti-senso específicos para o JCPyV, internos ao fragmento amplificado na primeira etapa da *nPCR*, e duas sondas específicas utilizando a tecnologia *TaqManTM*. A seleção destes oligonucleotídeos (dispostos nos quadros 4 e 5) foi obtida utilizando-se os softwares *CLC Combined Workbench (CLC bio)*, *CLC Free (CLC bio)* e *Oligo 6,0 (National Biosciences)*. O *software CLC Free* permitiu o desenho dos iniciadores e sonda. O *software Oligo 6,0* foi posteriormente utilizado para certificar-se da eficiência dos iniciadores selecionados assim como para o cálculo da temperatura de anelamento dos

mesmos, relacionados no tabela 2. Para a realização da padronização, a combinação escolhida foi a composta pelos iniciadores JC 4773U + JC 4881L e sonda JC 1R. A figura 6 mostra o fragmento de 125pb amplificado na segunda etapa da *qnPCR*.

```

4141 taagtttctt atataaaatt tgagcttttt ctttagtggt atacacagca aaagaagcaa
4201 cagttctatt actaaacaca gcttgactga ggaatgcatg cagatctaca ggaaggtctt
4261 tagggctctc tacctttttt tcttttttag gtggggtaga gtggtgggat cctgtgtttt
4321 catcatcact ggcaaacatt tcttcatggc aaaacaggtc ttcattccac ttctcattaa
4381 atgtattcca ccaggattcc cattcatctg ttccataggt tggcacctaa aaaaaaacia
4441 ttaagtttat tgtaaaaaac aaaatgcctt gcaaaagaaa aatagtggtt taccttaaag
4501 ctttagatcc ctgtaggggg tgttccaag aactttctcc cagcaatgaa gagcttcttg
4561 ggtaagtca caccacaacc attgtctgaa gcaatcaaag caatagcaat ctatccacac
4621 aagtgggctg cttcttaaaa atttctgtt tctatgctt aattttagca tgcacattaa
4681 acaggggcaa tgcactgaag gattagtggc acagtttagc cattccttgc aataaagggt
4741 atcagaatta ggaggaaaat cacaaccaac ctctgaacta ttccatgtac caaaatcagg
4801 ctgatgagca acttttacac cttgttccat ttttttatat aaaaaatcca ttctcttcat
4861 cttgtctctg tccccaacct tctcagggtg gagttctttg cattttttca gataagctt
4921 tctcatgaca ggaatgttcc cccatgcaga cctatcaagg cctaataaat ccataagctc
4981 catggattcc tccctattca gcactttgtc cattttagct ttttgacga aaaaattact
5041 gcaaaaaagg gaaaaacaag ggaatttccc tggcctccta aaaagcctcc acgcccctac
5101 tacttctgag taagcttggg ggaggaggcg

```

Figura 6. Fragmento de 698pb amplificado na primeira etapa da *qnPCR* em tempo real (em azul), demarcação do fragmento amplificado na segunda etapa da *qnPCR* em tempo real pelos iniciadores JC4773U e JC 4881L (em amarelo) e o sítio de hibridização da sonda *TaqMan* JC 1R (em vermelho)

a) Iniciadores:

Quadro 4: Iniciadores internos da 2ª etapa da *qnPCR* em tempo real obtidos segundo o *software* CLC Free

Iniciadores internos <i>qnPCR</i>	Sequencias (5' – 3')	Posição
JC 4773U	CTG AAC TAT TCC ATG TAC C	4773 – 4791
JC 4881L	AAG AAC TCC ACC CTG ATA	4898 – 4881
JC 4784U	CAT GTA CCA AAA TCA GGC	4784 – 4801

O conjunto de iniciadores e sonda selecionados contemplavam as recomendações estabelecidas pelo sistema *TaqMan*TM (*Applied Biosystems* – Califórnia, EUA), ou seja iniciadores com 15 a 30 nucleotídeos, concentração de guanina e citosina ideal de 30% não excedendo duas moléculas de C ou G entre

os cinco últimos nucleotídeos na terminação 3', a temperatura de desnaturação aproximada entre os iniciadores devendo ser 10°C inferior à da sonda, e o produto formado com esses iniciadores não deve exceder 400pb, sendo o tamanho ideal de 150pb. As características dos iniciadores selecionados no que diz respeito à tamanho, temperatura de desnaturação e porcentagem de bases guanina/citosina estão sumarizadas a seguir (Tabela 2):

Tabela 2. Principais características dos iniciadores e do produto resultante da amplificação com os iniciadores internos da *qnPCR* em tempo real fornecidas pelo software Oligo 6

	TAMANHO (pb)	TEMPERATURA DE DESNATURAÇÃO (°C)	GC[%]
JC4773U	19	56,0	42,1
JC4881L	18	58,5	44,4
Produto	126	78,4	36,5

b) Sondas:

A tecnologia baseada no sistema *TaqMan*TM utiliza sonda construída com uma sequência de nucleotídeos específica e complementar ao alvo, marcada na extremidade 5' com um fluoróforo “*repórter*” (*FAM*TM) e com outro fluoróforo “*quencher*” (abafador) na extremidade 3' (*TAMRA*TM). Devido à conformação da sonda e à proximidade dos dois fluoróforos, a energia liberada pelo “*repórter*” é absorvida pelo abafador, reduzindo grandemente a sua fluorescência. Durante a *PCR*, enquanto o produto é formado, a sonda se anela à sequência alvo e a atividade nucleásica 5'- 3' da polimerase (*Invitrogen*) cliva a ligação da sequência de nucleotídeos com o fluoróforo “*repórter*”, durante a extensão, permitindo o afastamento do abafador e portanto sua fluorescência. Consequentemente, a captação do produto é feita pelo sistema óptico do termociclador no momento que este é formado. Essa fluorescência é aumentada a cada ciclo pela amplificação decorrente da própria *PCR* até que a intensidade de luminosidade ultrapasse o sinal de resíduo delimitado pela linha de base (*Threshold*), identificando a amostra como positiva.

Quadro 5. Sondas do 2ª etapa da *nPCR* em tempo real obtidos segundo o *software CLC Free*

Sondas <i>Applied Biosystems</i>	Sequência (5' – 3')	Posição
JC 1R	TGG GGA CGA AGA CAA GAT GAA	4856 – 4876
JC 2F	CTT CAT CTT GTC TTC GTC CCC	4855 – 4874

3.5.2. Construção da curva padrão e otimização da *qnPCR* em tempo real

a) Preparo do DNA molde:

A primeira etapa na construção da curva padrão foi o preparo do DNA molde para o ajuste dos parâmetros críticos da *qnPCR* em tempo real. O plasmídeo foi diluído para uma concentração de 0,1µg/µl. A partir da diluição mãe contendo 0,1µg/µl, usou-se uma alíquota de 10µl (1µg ~1,4x10⁵cópias/µl) em 11 diluições seriadas de 1:5. As concentrações destas 11 diluições variavam em número de cópias desde 2,8x10⁴cópias/µl até 2,8x10⁻⁴cópias/µl aproximadamente. Alíquotas de 10µl destas diluições seguiram para a primeira etapa de amplificação da *nPCR* segundo o descrito anteriormente (item 3.4). A eficiência desta amplificação foi verificada por eletroforese, correspondendo a uma banda de 698pb. Os produtos amplificados foram purificados com o *QIAquick PCR Extraction Kit* (Qiagen) segundo as especificações do fabricante, sendo quantificado por espectrofotometria e armazenado a -20°C.

b) Concentração ótima de iniciadores:

Com a finalidade de melhorar a concentração de iniciadores, utilizamos o produto purificado e quantificado em espectrofotômetro que continha 42ng/µl e razão $A_{260/280} = 1,86$. Diluiu-se este produto purificado ajustando-o para a concentração estimada de 2pg/3µl. Nesta etapa, seis diluições dos iniciadores JC 4773U e JC 4881L contendo diferentes concentrações foram verificadas em seis

reações distintas. Cada reação constava de 12,5µl do *TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)*, 2µl da sonda *JC 1R TaqMan™ TAMRA™ (Applied Biosystems)* na concentração de 10pmoles/reação, 3,5µl de *H₂O UltraPure - (Invitrogen)* e 2µl de cada diluição dos iniciadores, segundo o protocolo do quadro 6.

Quadro 6. Reagentes utilizados para otimização do uso dos iniciadores da *nqPCR* em tempo real

Reagentes/Iniciadores (pmoles)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
	12,5	25	50	100	200	500
<i>2x TaqMan Master Mix</i>	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
Iniciador JC 4773U	2	2	2	2	2	2
Iniciador JC 4881L	2	2	2	2	2	2
Sonda <i>Taq Man JC 1R (10 pmoles)</i>	2	2	2	2	2	2
H ₂ O	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
DNA molde	3	3	3	3	3	3
Volume final	25	25	25	25	25	25

c) Concentração ótima da sonda:

Para a padronização do uso da sonda foram feitas três reações distintas com as concentrações seguintes: 5pmoles/µl, 2,5pmoles/µl e 1,25pmoles/µl. Nestas reações eram acrescentados 12,5µl de *TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)*, 2µl (200pmoles) dos iniciadores *JC 4773U* e *JC 4881L*, 3,5µl de *H₂O UltraPure (Invitrogen)*. Como DNA molde utilizou-se a mesma diluição usada na curva de concentração de iniciadores. O protocolo de padronização da sonda está descrito no quadro 7.

Quadro 7. Reagentes utilizados para otimização do uso de sonda da *mqPCR* em tempo real.

Reagentes/ Sonda <i>TaqMan FAM-TAMRA</i> (pmoles)	(1)	(2)	(3)
	5	2,5	1,25
<i>2x TaqMan Master Mix</i>	12,5	12,5	12,5
Iniciador JC 4773U (100pmoles)	2	2	2
Iniciador JC 4881L (100pmoles)	2	2	2
Sonda <i>Taq Man JC 1R</i>	2	2	2
H ₂ O	3,5	3,5	3,5
DNA molde	3	3	3
Volume final	25	25	25

Os experimentos seguintes foram destinados à construção da curva-padrão e à determinação das condições ideais de amplificação, pela da avaliação da precisão da curva-padrão. A partir do produto da primeira etapa purificado e quantificado por espectrofotometria, como descrito anteriormente, foram feitas 11 diluições seriadas de 1:10. Dessas diluições, sete foram utilizadas como DNA molde para construção da curva-padrão da *qnPCR* em tempo real, sendo a última diluição o limite de detecção do experimento. As diluições foram usadas com a finalidade de encontrar faixa de detecção do vírus JCPyV no LCR através da *qnPCR* em tempo real.

Ao final deste bloco de experimentos, com a faixa de detecção da *qnPCR* ajustada, foram necessários cálculos matemáticos para a transformação do limite de detecção para número de cópias ou fragmentos específicos do antígeno T maior do JCPyV. Conforme formula a seguir:

$$\text{Nº de cópias} = (X \text{ g/uL DNA} / [\text{tamanho do plasmideo em pb} \times 660]) \times 6,022 \times 10^{23}$$

Um ciclo limiar arbitrário (C_t) foi escolhido com base na variação da linha de base (*Background*). Os valores de C_t para cada amostra foram calculados da seguinte maneira: uma fluorescência residual é própria da *PCR* em tempo real e pode ser definida como uma fluorescência derivada da sonda que não se hibridizou ao fragmento alvo ou que não sofreu clivagem. O *background*

representa uma fluorescência basal residual que não é produzida por produto amplificado e deve ser subtraída para que o sinal de cada amostra tenha origem no ponto zero. O *software SmartCycler®* (Cepheid - Califórnia, EUA) subtrai os valores de fluorescência alcançada por cada amostra, em cada ciclo, dos valores residuais até que o sinal emitido exceda esse limiar escolhido. O C_t é definido como o número de ciclos neste ponto (Figura 7). O valor de diferença da fluorescência em cada ciclo (R_n+) subtraído pelo valor da fluorescência residual (R_n-) fornece o intervalo ΔR_n que representa a magnitude da fluorescência de cada amostra. Os valores dessas diferenças são *plotados* contra o número de ciclos para produzir a curva de amplificação. Todos estes cálculos foram feitos com o programa do Sistema *SmartCycler®* (Cepheid).

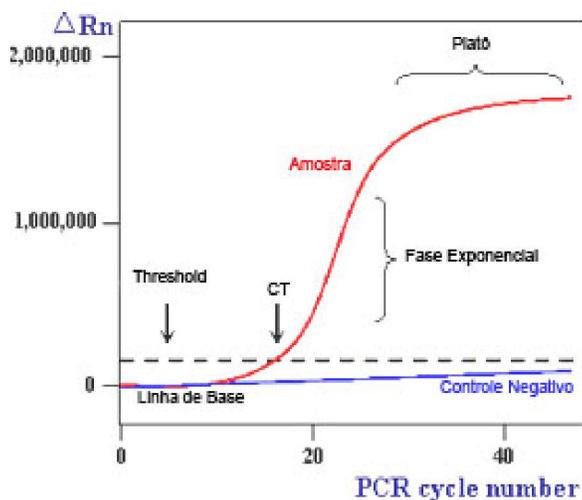


Figura 7. Esquema mostrando a variação de fluorescência (linha vermelha) e o C_t .

A fórmula 2^n usada para calcular a amplificação da *PCR* descreve o processo onde ocorre uma sucessão de eventos duplicantes; 1 se torna 2, 2 em 4, 4 em 8, 8 em 16 e assim por diante, se considerássemos uma reação 100% eficiente. Na reação de *PCR*, a perda de eficiência da amplificação se dá por várias razões, incluindo perda de atividade da DNA polimerase, depleção dos reagentes ou desnaturação incompleta dos moldes. Estes são problemas conseqüentes do acúmulo de produtos nos ciclos mais tardios. Desta forma, a eficiência expressa em números decimais variará de 0 até 1, sendo 1 o

equivalente a uma reação 100% eficaz.

$$X_n = X_0(1 + E)^n$$

Onde:

X_n = Nº final de cópias;

X_0 = Nº inicial de cópias;

n = Nº de ciclos;

E = Eficiência

A inclinação da curva-padrão foi usada em razão de determinar a amplificação exponencial (AE) e a Eficiência (E) através das formulas:

$$AE = 10^{(-1/\text{inclinação})}$$

$$E = 10^{(-1/\text{inclinação})} - 1$$

3.6. A VERIFICAÇÃO DA *qnPCR* EM TEMPO REAL EM AMOSTRAS DE LCR

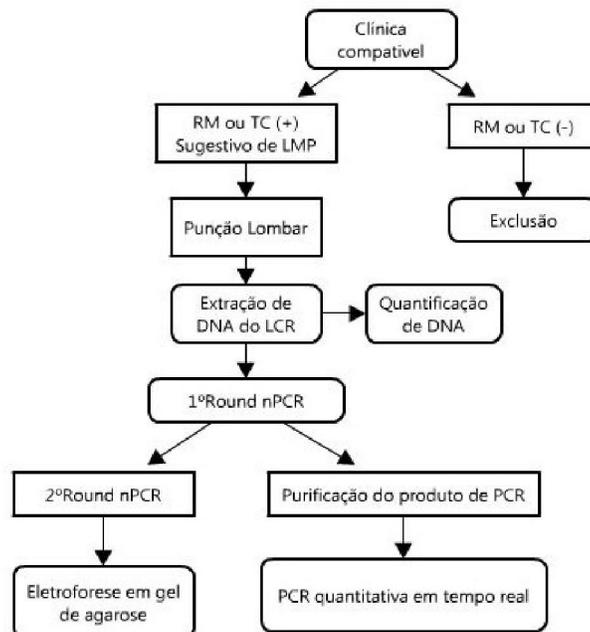


Figura 8. Diagrama esquemático do percurso das amostras de casos compatíveis com a leucoencefalopatia multifocal progressiva utilizados na *qnPCR*

No diagrama da figura 8, é apresentado o caminho dos pacientes suspeitos e das amostras de DNA extraídas dos casos suspeitos de LMP e do grupo controle foram primeiramente usadas como molde na primeira etapa da *nPCR* convencional para amplificação do fragmento do gene codificante do antígeno T maior de 698pb do JCPyV. Neste experimento, adicionou-se uma alíquota das diluições do plasmídeo pM1TC como controle positivo. Os produtos da primeira *PCR* foram aplicados em gel para eletroforese conforme o descrito no item 3.4.1 (Eletroforese em gel de agarose) para verificação da eficiência da *PCR* pela visualização do produto amplificado, uma vez que os produtos das amostras clínicas não são visíveis após a primeira etapa de amplificação.

Em seguida, o produto era purificado com o *QIAquick PCR Extraction Kit* (Qiagen) segundo as especificações do fabricante. O volume final do produto purificado era de 30µl, volume de hidratação mínimo recomendado pelo fabricante. Este produto era diluído na razão de 1:10, ou seja, era utilizado apenas 1µl do produto da primeira etapa, purificado e acrescido de 9µl de água, homogeneizando em *vórtex*. Essas medidas minimizaram a presença de fatores de inibição para a *qnPCR* em tempo real.

Para a segunda etapa da *qnPCR* foram utilizados 12,5µl do *TaqMan™ Universal PCR Master Mix* - Applied Biosystems, 1µl de cada primer contendo 100 pmoles/µl, a sonda JC 1R na concentração de 5pmoles/µl. foram acrescentados 4,5µl de água *UltraPure – DNAase/RNAase Free Gibco* (Invitrogen). Esta etapa era realizada em fluxo laminar. Em seguida, adicionava-se uma alíquota de 5µl da diluição amostra teste totalizando 25µl em cada tubo. Todas as amostras foram analisadas em duplicata. Em cada ciclagem eram incluídas duas diluições do plasmídeo, utilizadas na padronização da curva-padrão como controle positivo, e um tubo contendo somente a reação, utilizado como controle negativo.

O número de cópias do gene de interesse foi determinado relacionando-se o sinal da *PCR* com a curva-padrão. Este método tem a vantagem de que a curva-padrão incluída em cada *PCR* fornece um controle extra e correção na eficiência da *PCR* da cada amostra individual, tornando mais confiáveis as comparações entre experimentos.

3.7. BOAS PRÁTICAS DE LABORATÓRIO

Para evitar contaminações de amostras clínicas e reagentes, certos cuidados como separação física das áreas de pré e pós-PCR, utilização restrita de reagentes e uso de pipetas e luvas descartáveis nos respectivos ambientes foram respeitados. Todos os reagentes de PCR foram utilizados no fluxo laminar e aliquotados para uso único. Os tubos contendo a reação para a segunda etapa eram levados até a sala de amplificadas onde era adicionada a alíquota de 2 μ l do produto da reação anterior. Luvas descartáveis, pipeta e ponteiros eram separadas apenas para o preparo da segunda etapa de amplificação.

A área de pós-PCR era utilizada exclusivamente para a amplificação, a eletroforese e a transferência do produto da primeira PCR para a segunda PCR. A etapa de amplificação da *qnPCR* foi realizada em fluxo laminar, em sala específica. Em todos os ensaios foram incluídos controles positivos, controle negativo e da reação.

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Virologia do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC), FIOCRUZ. O laboratório dispôs de quatro ambientes separados fisicamente, estando em conformidade com as normas de qualidade.

3.8. PLANO DE ANÁLISE

As diluições do plasmídeo pM1TC linearizado para construção da curva-padrão foram analisadas em duplicata. Após obtenção da curva-padrão, esta foi repetida cinco vezes. Os valores da Ct determinados nos experimentos iniciais foram avaliados por métodos estatísticos como regressão linear simples (coeficiente de correlação intra-ensaio e entre ensaios) e análise de variância (ANOVA) construídos com o programa do sistema *Smart Cycler*® (*Cepheid*) (Giulietti *et al.*, 2001; Ginzinger, 2002).

3.8.1. *nPCR* x *qnPCR* em tempo real

A *qnPCR* utilizando as amostras de DNA do LCR dos casos suspeitos de LMP e grupo controle eram analisados em duplicata e os ensaios repetidos duas vezes. A correlação entre os resultados da *qnPCR* e da *nPCR* foi determinada pelo cálculo do coeficiente de contingência. A estatística de Kappa de Cohen (Landis e Koch, 1977) foi o procedimento estatístico utilizado para se avaliar a confiabilidade entre os métodos.

3.9. COMITÊ DE ÉTICA: PARECER APROVADO – sob o número: 015/2008

Atendendo à resolução da CNS 196/96, foi formulado um termo de compromisso onde os pesquisadores responsáveis se comprometeram a manter a confidencialidade e a privacidade dos pacientes participantes do projeto, utilizando os dados e materiais coletados apenas para fins previstos no protocolo 0069.0.0009.000-07. Este foi aprovado no dia 11 de fevereiro de 2008.

4. RESULTADOS

4.1. POPULAÇÃO ANALISADA

O grupo de amostras analisado pelos dois métodos foi composto de 53 amostras de LCR armazenadas pelo Laboratório de Pesquisa Clínica em Neuroinfecções desde 2002 até 2008 avaliadas por critérios clínicos e radiológicos identificados pelo neurologista Dr. Marcus Tullius Teixeira da Silva, conforme item 3.1 da metodologia. Deste grupo, 29 amostras eram de pacientes que apresentavam evidências de LMP e 24 amostras constituíram o grupo controle. Dos 29 casos considerados suspeitos de LMP, 19 tinham confirmação pela *nPCR* em exame anterior.

Os produtos da primeira etapa da *nPCR* foram purificados, diluídos e utilizados na *qnPCR* em tempo real segundo descrito no item 3.6 da metodologia.

4.2. QUANTIFICAÇÃO E PUREZA DO DNA

A razão média de pureza A_{260}/A_{280} das amostras foi de 1,60 sendo considerada satisfatória. Os valores de quantificação do DNA (ng/ μ l) das amostras clínicas estão dispostos nas figuras 9, 10 e 11.

4.3. NESTED PCR CONVENCIONAL

4.3.1. Casos Suspeitos de LMP com confirmação pela *nPCR*

Nas figuras 9 e 10 estão ilustradas as 19 amostras previamente testadas como positivas para a presença do JCPyV, apresentando banda de 389pb que corresponde ao fragmento amplificado na 2ª etapa da *nPCR*. As amostras 21, 22 e 23 correspondem a amostras que não funcionaram no exame de *nPCR* realizado durante este trabalho, entretanto em exames anteriores estas amostras apresentaram produtos e foram confirmadas como positivas.

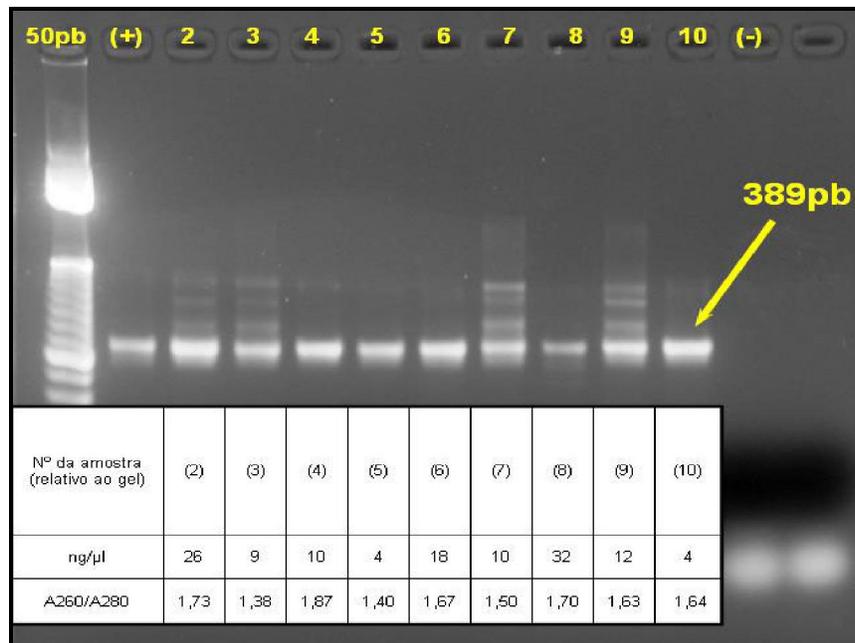


Figura 9. Foto do gel de agarose dos casos confirmados para a presença do DNA do JCPyV mostrando no 1º poço banda plasmidial de 389pb (controle positivo), poços 2º ao 10º amostras clínicas utilizadas na *qnPCR* em tempo real apresentando bandas de mesmo tamanho e controle negativo no 11º poço e controle da reação no 12º poço. Os valores de quantificação de DNA (ng/µl) e a razão A_{260}/A_{280} encontram-se relacionados abaixo

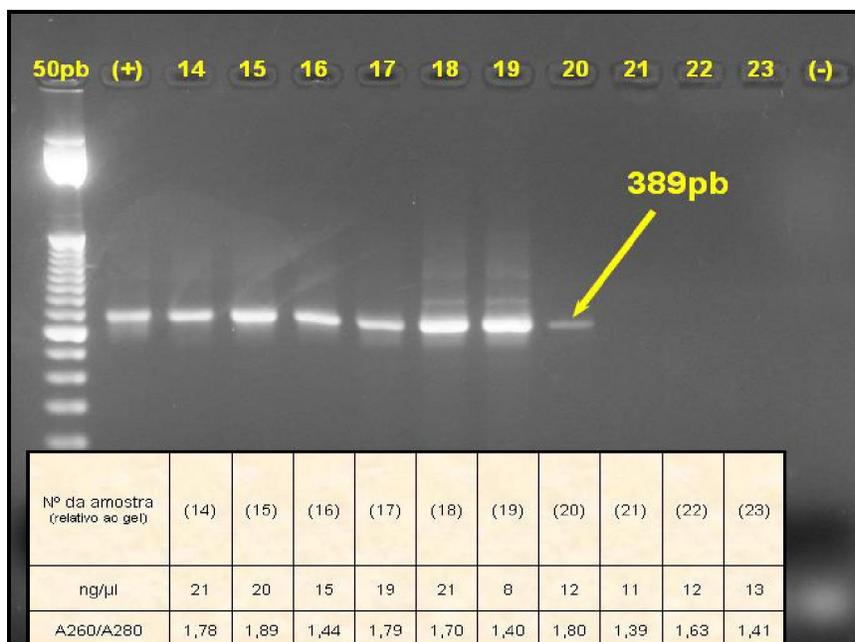


Figura 10. Foto do gel de agarose, continuação dos casos confirmados para a presença do DNA do JCPyV mostrando no 13º poço banda plasmidial de 389pb (controle positivo), poços 14º ao 20º amostras clínicas utilizadas na *qnPCR* em tempo real apresentando produtos de mesmo tamanho, nos poços 21, 22 e 23 amostras previamente confirmadas para a presença do JCPyV mas que não apresentaram produtos visíveis em novo teste e o controle negativo no 24º poço. Os valores de quantificação de DNA (ng/µl) e a razão A_{260}/A_{280} encontram-se relacionados abaixo

4.3.2. Casos compatíveis com a leucoencefalopatia multifocal progressiva sem confirmação pela *nPCR*

Os casos suspeitos não confirmados apresentavam o perfil de um paciente de LMP. Entretanto, o resultado da *nPCR* foi negativo, conforme demonstrado na figura 11. Baseado nos critérios clínicos de inclusão e exclusão e para fins de cálculos de sensibilidade, de 10 amostras compatíveis com LMP não confirmados, 3 foram excluídas em função de diagnóstico neurológico diferente de LMP.

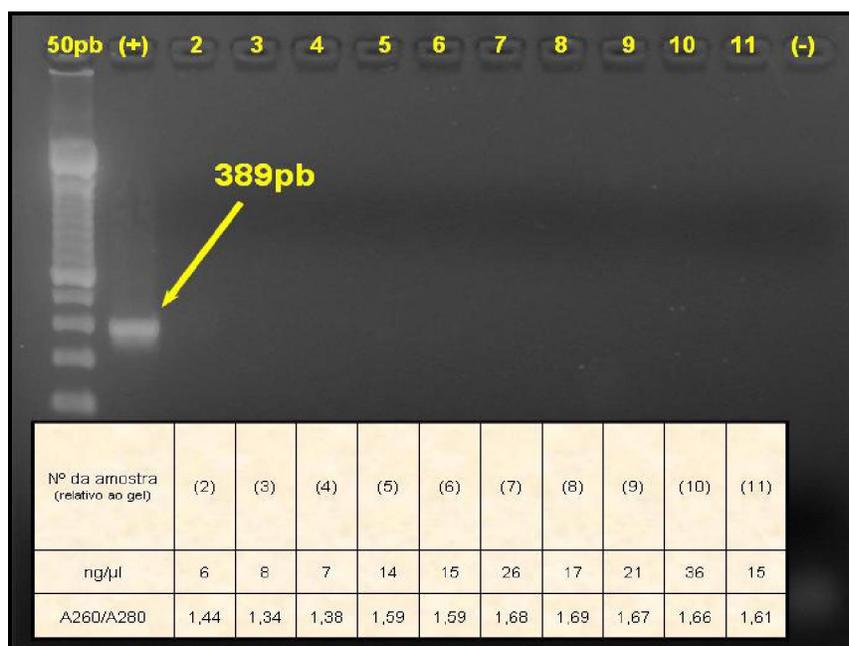
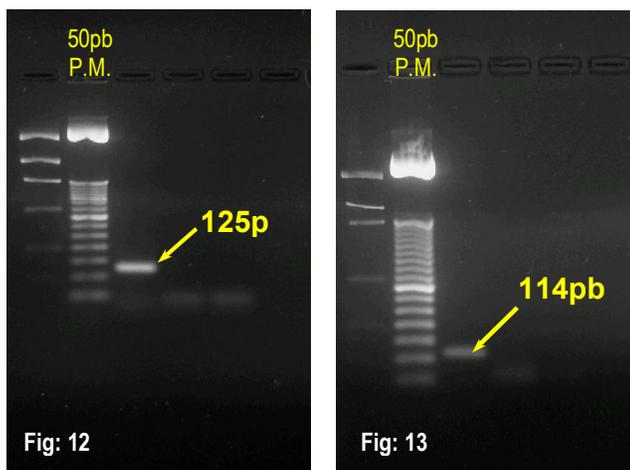


Figura 11. Foto do gel de agarose dos casos compatíveis e não confirmados mostrando no 1º poço a banda plasmidial de 389pb (controle positivo), nos poços 2º ao 11º amostras clínicas utilizadas na *qnPCR* em tempo real e o controle negativo no 12º poço. Os valores de quantificação de DNA (ng/µl) e a razão A_{260}/A_{280} encontram-se relacionados abaixo

4.4. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE *qnPCR* EM TEMPO REAL

4.4.1. Verificação dos iniciadores

Para verificar a eficiência dos iniciadores desenhados para a *qnPCR* em tempo real, uma alíquota de 10 μ l da 5^a diluição do plasmídeo (utilizada no preparo do DNA molde conforme o descrito no item 4.4.3 a seguir) contendo aproximadamente 4,48cópias/ μ l foi utilizada em *PCR* convencional conforme os parâmetros da primeira etapa da *nPCR* (item 3.4). Substituíram-se os iniciadores da primeira etapa da *nPCR* pelos pares de iniciadores 4773U e 4881L e 4784U e 4881L formando fragmentos de 125pb e 114pb respectivamente. Os iniciadores foram diluídos para apresentar a mesma concentração da primeira etapa da *nPCR* (100pmoles/ μ l), conforme quadro 8. Nas figuras 12 e 13 ilustra-se a eficiência dos dois pares de iniciadores com os fragmentos esperados de 125pb e 114pb. Entretanto, foi escolhido o par de iniciadores de 125pb (4773U e 4881L) para a continuidade dos testes, tendo em vista a intensidade da banda obtida nesses experimentos.



Figuras 12 e 13. Geis de agarose revelando as bandas plasmidiais de 125 (Fig: 12) e 114 (Fig: 13) pares de bases obtidas através de *PCR* adaptada utilizando os iniciadores sintetizados para a *qnPCR*

Quadro 8. Reagentes e concentrações utilizadas nos testes dos iniciadores

Reagentes	µl/tubo
10x Tampão	5
2mM MgCl ₂	2
2,5mmol dNTPs	1
Iniciador JC 4773U/4784U (100pmoles)	1
Iniciador JC 4881L (100pmoles)	1
2,5u Taq Pol	0,5
H ₂ O	29,5
DNA molde	5
Volume final	40

4.4.2. Verificação da sonda

A figura 14 mostra o primeiro sinal obtido com a sonda JC 1R em experimento realizado com protocolo descrito no quadro 9. Neste experimento, as condições de ciclagem ainda não haviam sido estabelecidas e, para este teste, a ciclagem constava de uma etapa prévia de desnaturação de 95°C por 120 segundos e 45 ciclos de desnaturação por 15 segundos, anelamento a 49°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, com a leitura da fluorescência na etapa de extensão.

Quadro 9. Reagentes e concentrações utilizadas nos testes de verificação de sonda

Reagentes	µl/tubo
2x <i>TaqMan Master Mix</i>	12,5
Iniciador JC 4773U (200pmoles)	1
Iniciador JC 4881L (200pmoles)	1
<i>TaqMan Probe</i> JC 1R (5pmoles)	1
H ₂ O	1,5
DNA molde (purificado) [C]=23ng/µl – A _{260/280} =1,89	8,0
Volume final	25

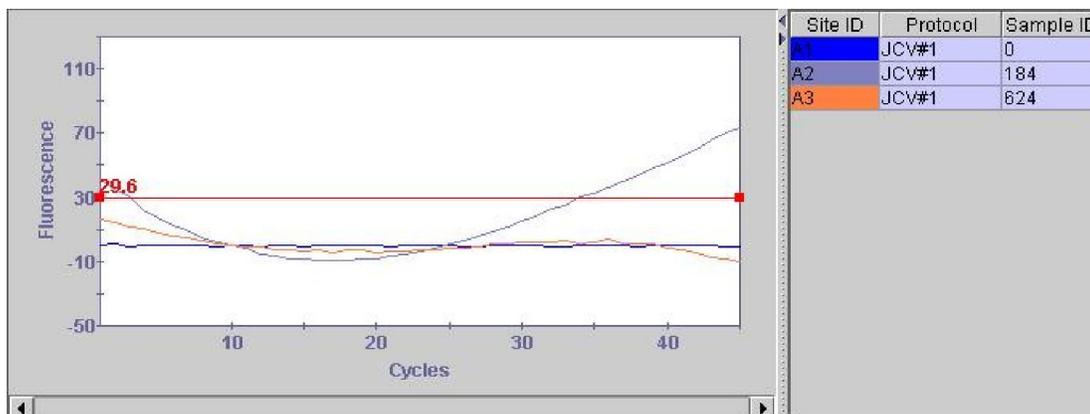


Figura 14. Teste com a sonda JC 1R ((fonte: programa do Sistema SmartCycler® (Cepheid))

4.4.3. Preparo de DNA molde

A figura 13 mostra o produto da amplificação das diluições do plasmídeo pM1TC (diluições seriadas de 1:5 a partir de 1µg de DNA). As condições para a primeira etapa da *nPCR* estão descritas no item 3.4 da metodologia. Nesta etapa da *PCR*, obtivemos a amplificação de um fragmento de 698pb do plasmídeo, correspondente à região do antígeno T do genoma do JCPyV. O produto amplificado do 2º poço foi escolhido arbitrariamente e purificado para utilização na padronização da *qnPCR* em tempo real. Esta etapa do procedimento foi importante, pois é sabido que o uso de um vetor pode resultar na diminuição da eficiência da reação de amplificação de até 100 cópias por reação em função da conformação plasmidial. Com uma prévia etapa de amplificação, o produto resultante é linear e é o DNA molde para ambos os testes que foram comparados. Por espectrofotometria, determinou-se a concentração final e grau de pureza do produto purificado, sendo de 42ng/µl e razão $A_{260/280} = 1,86$.

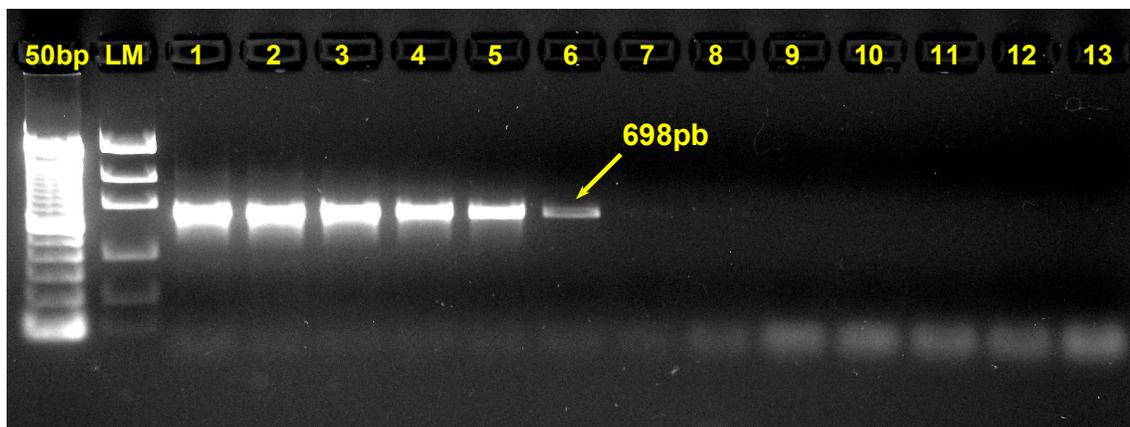


Figura 15. Gel de agarose mostrando o produto de 698pb da amplificação das diluições seriadas do Plasmídio do JCPyV

4.4.4. Concentração ótima de iniciadores

Para estabelecer a melhor concentração de iniciadores para a *qnPCR* em tempo real foram preparadas seis reações e a cada reação foi adicionada uma concentração dos iniciadores variando desde 12,5pmols/ μ l até 500pmols/ μ l, conforme descrito no item 3.5.2 da metodologia. Os sinais obtidos com as concentrações de 500, 200 e 100pmoles/ μ l foram próximos. Para minimizar os custos, foi escolhida a concentração de 100pmoles/ μ l, conforme ilustrado na figura 16.

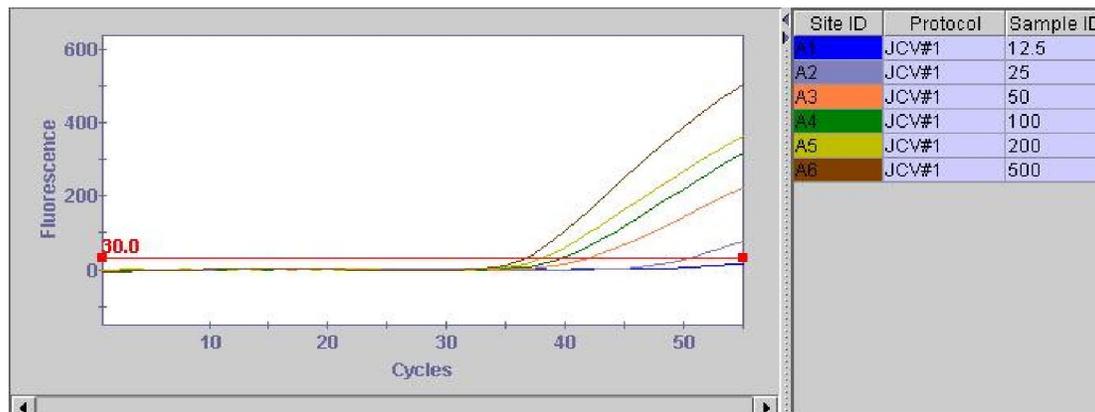


Figura 16. Resultado do experimento para determinação da concentração ótima de iniciadores (fonte: programa do Sistema *SmartCycler*®(Cepheid))

4.4.5. Concentração ótima de sonda

Para otimização da concentração de sonda foi realizado um experimento constando de três diluições distintas da sonda JC 1R para cada reação (5pmoles/ μ l, 2,5pmoles/ μ l e 1,25pmoles/ μ l). A figura 17 demonstra o resultado mais eficiente para a padronização, que ocorreu com a diluição que apresentava a maior concentração de sonda (5pmoles/ μ l).

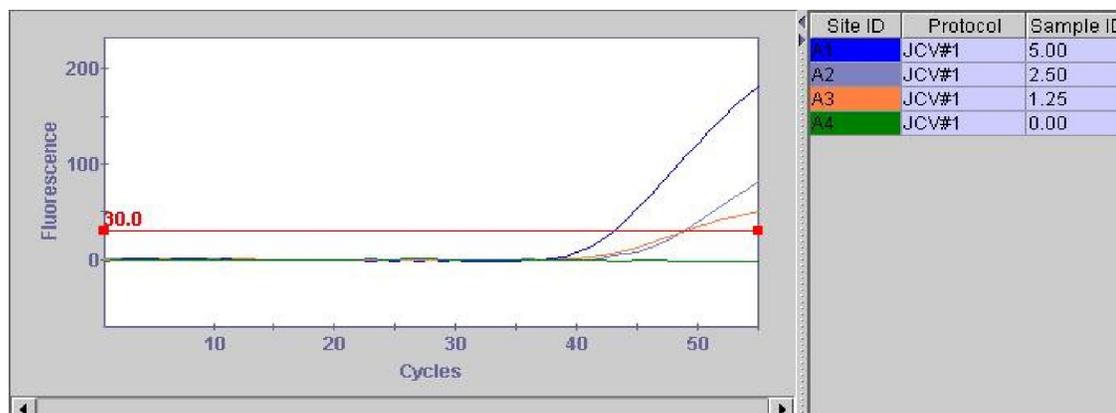


Figura 17. Resultado do experimento para determinação da concentração ótima de sonda (fonte: programa do Sistema SmartCycler® (Cepheid))

4.4.6. Curva-padrão e condições ótimas estabelecidas

Após otimização da concentração dos reagentes conforme descrito no quadro 10, seguiram-se os experimentos para verificação da precisão da curva-padrão e da faixa de detecção da *qnPCR* em tempo real.

A partir do produto do plasmídeo purificado, etapa descrita no item 3.4.3 (preparo do DNA molde), foram preparadas diluições seriadas de fator 10 que variaram de 10pg/ μ L até 100ag/ μ L, sendo sempre utilizadas em duplicata, para a construção da curva-padrão. Foram feitas três repetições da curva-padrão com as mesmas concentrações de DNA molde para certificar-se da reprodutibilidade da curva.

Pela fórmula matemática utilizada para transformar unidade de massa em número de cópias (item 2.5.2) temos que o limiar de detecção atingido foi de aproximadamente 10^3 cópias/ μ l. O valor máximo obtido em nossa curva foi de 10^8 cópias/ μ l. A curva-padrão obtida apresentou coeficiente de regressão linear (R^2) de 0,997 e *slope* de -2,49.

As condições de ciclagem estabelecidas para este ensaio, no Sistema de detecção *TaqMan* da *Smart Cycler*® (*Cepheid*), foram: uma etapa prévia de desnaturação a 95°C por 120 segundos, seguida de 58 ciclos de desnaturação à 95°C por 15 segundos e anelamento e extensão a 60°C por um minuto. A leitura óptica da fluorescência emitida ocorria na etapa de extensão a cada ciclo (figura 18).

Quadro 10. Reagentes e concentrações finais escolhidas para a padronização da *qPCR* em tempo real

Reagentes	µl/tubo
2x <i>TaqMan Master Mix</i>	12,5
Iniciador JC 4773U (100pmoles)	1
Iniciador JC 4881L (100pmoles)	1
<i>TaqMan Probe FAM-TAMRA JC 1R</i> (5pmoles)	1
H ₂ O	3,5
DNA molde	3
Volume final	25

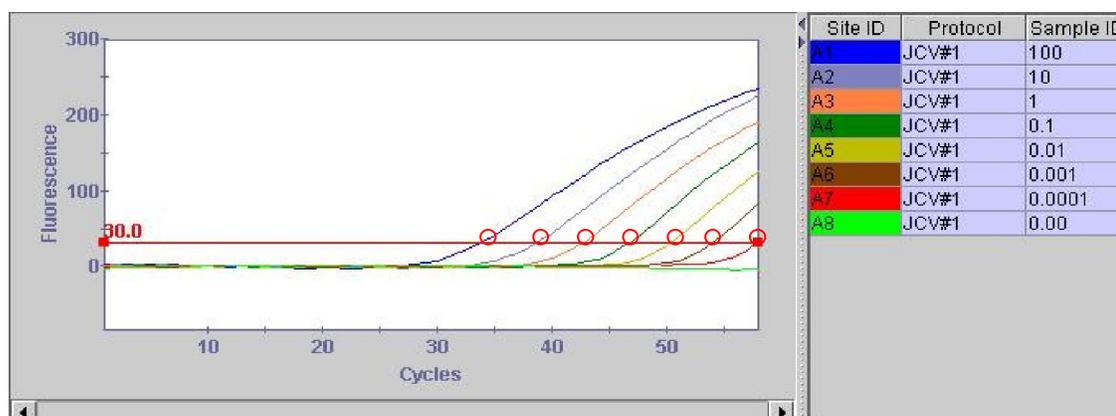


Figura 18. Eixo y: fluorescência x eixo X: número de ciclos (fonte: programa do Sistema *SmartCycler*® (*Cepheid*))

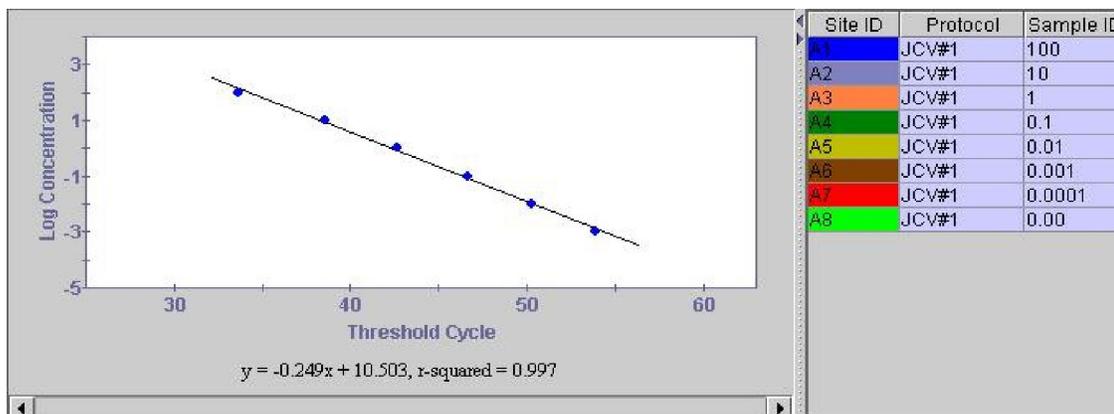


Figura 19. Eixo y: Log da concentração do plasmídio (10^3 a 10^8 cópias/ μ l) x eixo x: Ct (ciclo inicial de detecção da amostra) (fonte: programa do Sistema *SmartCycler*TM (Cepheid))

4.5. VERIFICAÇÃO DA *qnPCR* EM TEMPO REAL EM AMOSTRAS DE LCR

Conforme descrito na metodologia, os DNAs das amostras foram novamente extraídos para os casos confirmados de LMP, para os casos compatíveis, mas não confirmados e para as amostras do grupo controle e usadas como DNA molde. Todas as 53 amostras foram submetidas à *nPCR* convencional (primeira e segunda etapas). Diluições 1:10 contendo 1 μ l do produto purificado da primeira etapa da *nPCR* foram utilizadas como molde, sempre em duplicata na *qnPCR* em tempo real. Duas amostras controle, nas concentrações de 100pg/2 μ l e 1pg/2 μ l, foram adicionadas a todos os experimentos. As amplificações obtidas na *qnPCR* em tempo real foram comparadas às amplificações da curva-padrão (curva de calibração) que possuem diluições/número de cópias do gene de interesse conhecidos. A tabela 3 demonstra os resultados obtidos com a *qnPCR* em tempo real pelo método de quantificação absoluta de 12 amostras que apresentaram valores de quantificação de carga viral.

Tabela 3. Resultados obtidos com a *qnPCR* em tempo real

Nº	Média Ct	Desvio Padrão	JCV Load(log cópias/ μ l) (Média)
2	29,83	0,035	1229,894
3	33,73	1,209	199,709
4	44,49	0,339	0,2815
5	41,89	0,884	1,564
9	51,32	1,273	0,006
10	45,82	1,117	0,144
14	46,63	0,827	0,087
15	40,74	0,255	2,395
16	44,85	0,078	0,228
18	43,94	0,368	0,3855
19	34,38	2,036	123,231
20	48,56	0,403	0,0275
Total	44,23	0,083	0,334

4.6. COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE *nPCR* e *qnPCR* EM TEMPO REAL

Na tabela 4 estão os dados para a comparação entre as técnicas utilizadas neste trabalho. Pela *nPCR* convencional, de 19 amostras previamente testadas como positivas para o vírus JCPyV e estocadas pelo Laboratório de Patogenia Viral, 3 não apresentaram resultado positivo quando submetidas à uma nova *nPCR*. Apenas 16 das 19 apresentaram produto de peso equivalente ao seguimento de 389pb. Para o exame de *qnPCR*, 12 amostras confirmaram a presença do JCPyV. Entre os 10 casos compatíveis, mas não confirmados, foram retiradas 3 amostras que apresentaram diagnóstico neurológico confirmado, que não a LMP, em nenhuma destas amostras detectou-se a presença do JCPyV pelo método quantitativo e nem pelo método qualitativo. Os 24 casos controle foram negativos para ambos os testes. Para razão de sensibilidade, excluímos as amostras que não amplificaram em ambos os testes, os casos com diagnóstico diferencial, que não a LMP.

Tabela 4. Tabela de contingência dos métodos quantitativo e qualitativo

		<i>nPCR</i>			
		Positivos	Negativos	Total	
<i>qnPCR</i>	Sensibilidade: 52,2%	Positivos	12	0	12
	Negativos	4	37	41	
	Total	16	37	53	

Para avaliar a variação intra-observações e entre observações de variáveis categóricas, utilizou-se o percentual de concordância e a estatística de Kappa de Cohen (Landis e Koch, 1977) (tabela 5). A Concordância é uma medida usada em escalas categóricas que nos fornece uma idéia do quanto as observações se afastam daquelas esperadas, fruto do acaso, indicando-nos assim o quão legítimas as interpretações são. A proporção de concordância nos dois tipos de observação é obtida dividindo-se o número total de observações concordantes pelo número total de observações.

$$(\%C) \text{ Concordância} = \frac{a+d}{i} = \frac{12+37}{53} = 0,92$$

Para valor de porcentagem, temos que a concordância observada entre os métodos foi de 92%. Entretanto, considerando-se a maior proporção de resultados negativos (37/53) e, portanto, uma provável alta concordância devido unicamente ao acaso, utilizou-se a estatística de Kappa, que permite medir o grau de concordância não aleatória entre medidas repetidas da mesma variável categórica. O índice Kappa ajusta o valor de concordância ao tamanho da amostra e à chance de concordância devido ao acaso. O valor de Kappa é obtido através da diferença da concordância observada pela concordância esperada dividido por 1 menos a concordância esperada. A concordância esperada é obtida através da multiplicação dos valores totais marginais, ou seja, o produto do total

de positivos para os dois métodos (12x16) somados ao produto do total de negativos para os dois métodos (41x37) e dividido pelo quadrado do total de observações (53²).

$$\text{Índice Kappa (IK)} = \frac{(P_o - P_c)}{1 - P_c}, \text{ sendo:}$$

$$P_o = \frac{a+d}{i} = \frac{12+37}{53} = \rightarrow \text{concordância} = 0,92$$

$$P_c = \frac{[(exg)+(fxh)]}{i^2} = \frac{[(12 \times 16) + (41 \times 37)]}{(53)^2} = 0,60$$

P_o = concordância observada

P_c = concordância esperada

$$(IK) = \frac{(0,92 - 0,60)}{1 - 0,60} = \frac{0,32}{0,40} = 0,80$$

Desta forma temos que o Índice Kappa resultante na comparação entre a *qnPCR* e a *nPCR* foi de 0,80. Por essa análise, temos que o índice de concordância entre estes métodos, *nPCR* e *nqPCR*, permaneceu em um nível considerado de substancial a excelente.

Tabela 5. Tabela de concordância para Estatística K
Valor de Kappa **Concordância**

0	Pobre
0 – 0,20	Ligeira
0,21 – 0,40	Considerável
0,41 – 0,60	Moderada
0,61 – 0,80	Substancial
0,81 – 1	Excelente

5. DISCUSSÃO

Antes do estabelecimento da *HAART*, o prognóstico dos pacientes acometidos pela LMP era muito ruim (De Truchis *et al.*, 1993; Moreno *et al.*, 1996; Garcia De Viedma *et al.*, 1999). Desde o início da introdução desta terapia, muitos pacientes com LMP têm apresentado sobrevida prolongada (Baqi *et al.*, 1997; Elliot *et al.*, 1997; Power *et al.*, 1997). O crescente número de casos de LMP de longa duração e de pacientes em uso de *HAART* que apresentam os sinais e sintomas compatíveis com LMP, mas sem confirmação diagnóstica apontam para a necessidade de um refinamento nas técnicas de diagnóstico disponíveis em busca de maior sensibilidade.

O marcador virológico da LMP que possivelmente indica a gravidade da infecção pelo JCPyV é a presença e a quantidade do DNA do JCPvV no LCR. A PCR em tempo real, por permitir a quantificação do DNA viral no LCR, potencialmente auxiliará na análise da atividade da LMP juntamente com avaliações clínicas e radiológicas (Bossolasco *et al.*, 2005). Neste estudo, apresentamos uma comparação das técnicas de *nPCR* e *qnPCR* em tempo real e desenvolvemos um exame que poderá monitorar os pacientes de LMP durante o tratamento com a *HAART*.

O padrão-ouro para diagnóstico da LMP é a biópsia cerebral, apresentando uma sensibilidade de 80 a 90% e especificidade de 67 a 96%, com morbidade de 8 a 12% e mortalidade de até 3% (Editorial 1992). Apesar do poder diagnóstico, é um procedimento invasivo com alta complexidade/custo, estando na maioria das vezes, contra-indicado devido às condições clínicas do paciente. Neste estudo, utilizamos como modelo para comparação o método molecular eleito como diagnóstico confirmativo da LMP, a *nPCR*. Após o advento da PCR, foi com o estabelecimento da *nPCR* que encontramos um exame suficientemente sensível para a detecção do DNA do JCPyV no LCR. Desde então, dados da literatura sugerem que a sensibilidade de ensaios de PCR para a detecção do JCPyV no LCR pode variar de 17% até 92% e a especificidade de 92% até 100% (Karahalios *et al.*, 1992; Weber *et al.*, 1994; Marzocchetti *et al.*, 2005). A falta de uma padronização para a *nPCR* é um possível motivo para a ampla faixa de variabilidade na sensibilidade do método descrita na literatura. Diferentes regiões

do genoma do JCPyV, como a do gene da proteína VP1 e do antígeno T maior, foram as mais usadas nestes testes, tendo sido observado uma maior variabilidade gênica na região VP1, resultando em taxas de detecção variadas para cada um dos fragmentos utilizados (Ryschkewitsch *et al.*, 2004; Landry *et al.*, 2008). Outro dado importante é que antes da HAART a frequência de detecção era em média de 89,5% pela *nPCR* e após esta terapia a sensibilidade da *nPCR* apresentou queda significativa para em torno de 57,5% (Giudici *et al.*, 2000; Marzocchetti *et al.*, 2005).

Embora poucos, os ensaios de *PCR* em tempo real para a detecção do JCPyV têm sido desenvolvidos. A *qPCR* é apresentada em diversos artigos como um método mais rápido, menos laborioso e mais específico que a *nPCR* (Bossolasco *et al.*, 2005; Elfaitouri *et al.*, 2006; Glass e Venter, 2009). Alguns estudos disponíveis na literatura, para a pesquisa do JCPyV no LCR, descrevem uma sensibilidade em torno de 76% na era HAART, até dez vezes mais sensível que a *nPCR*, com 100% de especificidade (Bossolasco *et al.*, 2005; Elfaitouri *et al.*, 2006).

Visando a melhoria da sensibilidade do método empregado atualmente, a *nPCR*, desenvolvemos o método de *qnPCR* em tempo real. Este método consiste em uma modificação da *nPCR* convencional, substituindo a segunda etapa por uma *PCR* em tempo real utilizando o produto da 1ª etapa como molde para uma segunda reação, baseada no sistema *TaqMan*[™] (Applied Biosystems) de detecção. De fato, a combinação das técnicas de *nPCR* e *qPCR* mostrou-se eficaz para a detecção do DNA do *Mycobacterium tuberculosis* em amostras de LCR de casos suspeitos de meningite tuberculosa. Neste estudo, a sensibilidade para ambos os métodos, *nPCR* e *qnPCR* foram considerados equivalentes (Takahashi e Nakayama, 2006).

Nos nossos resultados, com a *nPCR in house* obtivemos a sensibilidade de 69,6% especificidade de 100%, pois nenhuma das 24 amostras controle apresentaram testes positivos. De 29 amostras estocadas, 19 eram de pacientes com LMP confirmada e 10 de pacientes com diagnóstico provável, mas sem confirmação. Três amostras anteriormente positivas para a presença do JCPyV, mesmo com sucessivos testes, não apresentaram amplificação. As condições de

estocagem a -20°C podem ter contribuído para a perda significativa de qualidade deste material a longo prazo (Smith e Morin, 2005). Entre 10 das amostras de pacientes com quadro clínico compatível, mas sem a confirmação molecular da doença, tivemos a exclusão de três pacientes por motivo de diagnósticos diferenciados confirmados. Com a *nPCR*, obtivemos 16 casos confirmados em 23 amostras de possíveis doentes, perfazendo uma razão de 69,6%. A especificidade da *nPCR* previamente padronizada foi de 100%, pois nenhum paciente controle apresentou teste positivo dentre as 24 amostras controle analisadas em nosso estudo.

Neste estudo, de 19 amostras previamente confirmadas para presença do JCV, três não apresentaram quantificação de carga e nem apresentaram bandejamento compatível com o diagnóstico pela *nPCR*. Outras quatro amostras (6,7,8,17), apesar de apresentarem banda de tamanho compatível, nítido e intenso pela *nPCR*, não produziram amplificadores pela *qnPCR*. Entre as amostras estudadas, apenas 12 amostras apresentaram quantificação e produtos específicos, sendo consideradas positivas para ambos os testes. A sensibilidade da *qnPCR* foi menor do que a sensibilidade obtida com a *nPCR*, alcançando 52,2%. A especificidade deste método foi a mesma da *nPCR*, 100%, pois nenhuma das 24 amostras controle apresentou teste positivo.

Não sabemos, ainda, a razão desta diferença entre a sensibilidade da *qnPCR* e da *nPCR*. Esta discrepância pode ser atribuída a um resultado falso-positivo ainda na *nPCR*, este explicado pela probabilidade remota de contaminação por amplificadores de amostras positivas no momento da transferência dos produtos da primeira *PCR* para a segunda *PCR*. No entanto, todos os procedimentos a fim de se evitar contaminação foram tomados, tais como o uso de pipeta específica para esta etapa de transferência e o uso de ponteiros com filtro (Aslanzadeh, 2004). Outra possibilidade seria a amplificação de produtos inespecíficos, uma vez que a detecção tradicional dos amplicons da *nPCR* é feita na fase tardia ou fase de platô da reação. Nesta fase, produtos amplificados e produtos inespecíficos que estavam sendo amplificados com uma menor eficiência ao longo da termociclagem vão se acumulando. Portanto, a certeza completa da especificidade dos produtos obtidos na *nPCR* só seria

comprovada pelo seqüenciamento cíclico destes produtos, demonstrando tratar-se de seqüências específicas do gene do antígeno T do JCV. Em contrapartida, a *qnPCR* utiliza uma sonda específica baseada no princípio de transferência de energia, sendo marcada com um corante de alta energia “*repórter*” localizado na extremidade 5’ e outro corante de baixa energia “*quencher*” localizado na extremidade 3’. Neste sistema de detecção, a sonda se anelará após o reconhecimento da seqüência alvo, entretanto a emissão da fluorescência ocorrerá somente durante a atividade exonucleásica da enzima DNA polimerase, com a clivagem da sonda e a separação dos fluoróforos, “*repórter*” e “*quencher*”, garantindo uma maior especificidade dos resultados e evitando falso-positivos (Aslanzadeh, 2004; Mackay, 2004; Elfaitouri *et al.*, 2006).

Falso-negativos na *qnPCR* poderiam ser resultantes da possível presença de fatores inibidores. Inibidores da *PCR* são substâncias que podem reduzir a atividade da polimerase diretamente ou podem competir com o fragmento alvo limitando a disponibilidade de polimerase e outros elementos da reação. Uma acurada quantificação não é possível em amostras que contenham inibidores que possam reduzir a eficiência da reação antes desta ultrapassar a linha de base *threshold*. Um possível inibidor da reação é o excesso de amplificadores resultantes da primeira etapa da *qnPCR*. Por esse motivo, os produtos da primeira reação eram purificados e diluídos para utilização na segunda etapa de *PCR* em tempo real. Para avaliar a possibilidade de substâncias inibidoras, foram feitas diluições pareadas do produto do 1ª etapa das amostras (6,7,8 e 17). Em cada par de diluições, uma das amostras recebia o controle interno (diluição do plasmídeo) e a outra apenas a diluição do produto da primeira etapa. As amostras pareadas eram então submetidas a segunda etapa da *qnPCR* em tempo real. As amostras que apresentavam controle interno amplificaram, ao passo que as amostras que não continham esse controle não emitiram sinal, portanto confirmando a eficácia da purificação e ausência de inibidores na reação.

Um outro possível motivo para a menor sensibilidade do exame quantitativo pode ser a redução acentuada da titularidade do JCPyV na amostra após a etapa de purificação, em conseqüência de perdas decorrentes do procedimento.

Quando os ensaios de *PCR* foram desenvolvidos para uso clínico, áreas

conservadas do genoma foram escolhidas. Entretanto, essas informações são baseadas num limitado número de sequências que mudam continuamente. Apesar da região do antígeno T maior ser apontada como a região mais conservada entre os genomas do JCV e a mais apropriada para desenvolver testes moleculares se comparada com a região anteriormente selecionada (Vp1) (Mcguire *et al.*, 1995; Ryschkewitsch *et al.*, 2004), existe um risco potencial de perder variantes do vírus especialmente se este genoma viral apresentar variabilidade (Landry *et al.*, 2008; Glass e Venter, 2009). Uma hipótese plausível para a não detecção de algumas amostras pela *qnPCR* é o possível não anelamento da sonda altamente específica ao fragmento a ser amplificado em razão de variações da sequência do genoma alvo na região de ligação com o *amplicon*, não hibridizando propriamente e gerando resultados falso negativos (Landry *et al.*, 2008; Whiley *et al.*, 2008; Glass e Venter, 2009).

Apesar da diferença de resultados entre as técnicas de *nPCR* e *qnPCR*, a concordância entre os métodos foi de 92%. Este elevado percentual, deve-se à correlação de 100% de casos negativos, podendo ser unicamente ao acaso. Entretanto ao utilizarmos a estatística Kappa, que ajusta o valor de concordância ao tamanho da amostra e a chance devido ao acaso, obtivemos concordância de 0,80, considerada substancial, mostrando que ambas as técnicas permitem a detecção do JCV em amostras de LCR.

6.CONCLUSÃO

- Elaboramos um método de *nested-PCR* quantitativa em tempo real para a detecção do JCPyV no LCR.
- A *qnPCR* foi padronizada e validada. Verificou-se o desempenho deste método através da comparação dos resultados obtidos entre as duas metodologias.
- Não houve ganho de sensibilidade para o novo exame diagnóstico visto que em nossos resultados obtivemos 80,0% para a *nPCR* e 60,0% para a *qnPCR*.
- Este novo método será capaz de indicar o progresso do paciente frente à tratamentos com antiretrovirais, visto que com este método, poderemos fornecer uma quantificação de carga viral com faixa de detecção de 10^3 cópias/ μ l até 10^8 cópias/ μ l.
- A curva-padrão obtida apresentou coeficiente de regressão linear (R^2) de 0,997 e *slope* de -2,49.
- A concordância encontrada foi de 92% entre os métodos *nPCR* e *qnPCR*, entretanto, ao ajustar as chances devido ao acaso ao tamanho amostral, pela estatística de Kappa, a concordância cai para 80% entre as duas metodologias, entretanto, permanecendo substancial a elevada.

7.PERSPECTIVAS FUTURAS

- Realizar testes de reação cruzada com outros poliomavirus
- Seqüenciar as amostras que não amplificaram pelo teste quantitativo
- Correlacionar os dados clínicos com os resultados obtidos com as duas metodologias
- Os resultados serão divulgados em congressos e submetidos a publicações em revistas especializadas

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agostini, H. T., A. Deckhut, D. V. Jobes, R. Girones, G. Schlunck, M. G. Prost, C. Frias, E. Perez-Trallero, C. F. Ryschkewitsch e G. L. Stoner. Genotypes of JC virus in East, Central and Southwest Europe. J Gen Virol, v.82, n.Pt 5, May, p.1221-331. 2001.

Agostini, H. T., C. F. Ryschkewitsch, G. R. Brubaker, J. Shao e G. I. Stoner. Five complete genomes of JC virus type 3 from Africans and African Americans. Arch Virol, v.142, n.4, p.637-55. 1997.

Agostini, H. T., C. F. Ryschkewitsch e G. L. Stoner. Genotype profile of human polyomavirus JC excreted in urine of immunocompetent individuals. J Clin Microbiol, v.34, n.1, Jan, p.159-64. 1996.

Agostini, H. T., C. F. Ryschkewitsch e G. L. Stoner. Complete genome of a JC virus genotype type 6 from the brain of an African American with progressive multifocal leukoencephalopathy. J Hum Virol, v.1, n.4, May-Jun, p.267-72. 1998a.

Agostini, H. T., C. F. Ryschkewitsch e G. L. Stoner. JC virus Type 1 has multiple subtypes: three new complete genomes. J Gen Virol, v.79 (Pt 4), Apr, p.801-5. 1998b.

Agostini, H. T., Y. Shishido-Hara, R. W. Baumhefner, E. J. Singer, C. F. Ryschkewitsch e G. L. Stoner. JC virus Type 2: definition of subtypes based on DNA sequence analysis of ten complete genomes. J Gen Virol, v.79 (Pt 5), May, p.1143-51. 1998.

Agostini, H. T., R. Yanagihara, V. Davis, C. F. Ryschkewitsch e G. L. Stoner. Asian genotypes of JC virus in Native Americans and in a Pacific Island population: markers of viral evolution and human migration. Proc Natl Acad Sci U S A, v.94, n.26, Dec 23, p.14542-6. 1997.

Aksamit, A. J., Jr. Progressive multifocal leukoencephalopathy: a review of the pathology and pathogenesis. Microsc Res Tech, v.32, n.4, Nov 1, p.302-11. 1995.

Albrecht, H., C. Hoffmann, O. Degen, A. Stoehr, A. Plettenberg, T. Mertenskotter, C. Eggers e H. J. Stellbrink. Highly active antiretroviral therapy significantly improves the prognosis of patients with HIV-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. AIDS, v.12, n.10, Jul 9, p.1149-54. 1998.

Allander, T., K. Andreasson, S. Gupta, A. Bjerkner, G. Bogdanovic, M. A. Persson, T. Dalianis, T. Ramqvist e B. Andersson. Identification of a third human polyomavirus. J Virol, v.81, n.8, Apr, p.4130-6. 2007.

Andrews, C. A., R. W. Daniel e K. V. Shah. Serologic studies of papovavirus infections in pregnant women and renal transplant recipients. Prog Clin Biol Res, v.105, p.133-41. 1983.

Andrews, C. A., K. V. Shah, R. W. Daniel, M. S. Hirsch e R. H. Rubin. A serological investigation of BK virus and JC virus infections in recipients of renal allografts. J Infect Dis, v.158, n.1, Jul, p.176-81. 1988.

Arthur, R. R., S. Dagostin e K. V. Shah. Detection of BK virus and JC virus in urine and brain tissue by the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol, v.27, n.6, Jun, p.1174-9. 1989.

Arthur, R. R. e K. V. Shah. Occurrence and significance of papovaviruses BK and JC in the urine. Prog Med Virol, v.36, p.42-61. 1989.

Arthur, R. R., K. V. Shah, P. Charache e R. Saral. BK and JC virus infections in recipients of bone marrow transplants. J Infect Dis, v.158, n.3, Sep, p.563-9. 1988.

Aslanzadeh, J. Preventing PCR amplification carryover contamination in a clinical laboratory. Ann Clin Lab Sci, v.34, n.4, Autumn, p.389-96. 2004.

Astrom, K. E., E. L. Mancall e E. P. Richardson, Jr. Progressive multifocal leukoencephalopathy; a hitherto unrecognized complication of chronic lymphatic leukaemia and Hodgkin's disease. Brain, v.81, n.1, Mar, p.93-111. 1958.

Baqi, M., W. Kucharczyk e S. L. Walmsley. Regression of progressive multifocal encephalopathy with highly active antiretroviral therapy. AIDS, v.11, n.12, Oct, p.1526-7. 1997.

Beckmann, A. M., K. V. Shah e P. Mounts. Genetic heterogeneity of the human papovaviruses BK and JC. J Med Virol, v.15, n.3, Mar, p.239-50. 1985.

Berger, J. R., A. Chauhan, D. Galey e A. Nath. Epidemiological evidence and molecular basis of interactions between HIV and JC virus. J Neurovirol, v.7, n.4, Aug, p.329-38. 2001.

Berger, J. R. e M. Concha. Progressive multifocal leukoencephalopathy: the evolution of a disease once considered rare. J Neurovirol, v.1, n.1, Mar, p.5-18. 1995.

Berger, J. R., B. Kaszovitz, M. J. Post e G. Dickinson. Progressive multifocal leukoencephalopathy associated with human immunodeficiency virus infection. A review of the literature with a report of sixteen cases. Ann Intern Med, v.107, n.1, Jul, p.78-87. 1987.

Berger, J. R., R. M. Levy, D. Flomenhoft e M. Dobbs. Predictive factors for prolonged survival in acquired immunodeficiency syndrome-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. Ann Neurol, v.44, n.3, Sep, p.341-9. 1998.

Berger, J. R., C. S. Miller, Y. Mootoor, S. A. Avdiushko, R. J. Kryscio e H. Zhu. JC virus detection in bodily fluids: clues to transmission. Clin Infect Dis, v.43, n.1, Jul 1, p.e9-12. 2006.

Berger, J. R. e L. Mucke. Prolonged survival and partial recovery in AIDS-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. Neurology, v.38, n.7, Jul, p.1060-5. 1988.

Bikel, I., X. Montano, M. E. Agha, M. Brown, M. McCormack, J. Boltax e D. M. Livingston. SV40 small t antigen enhances the transformation activity of limiting concentrations of SV40 large T antigen. Cell, v.48, n.2, Jan 30, p.321-30. 1987.

Bofill-Mas, S., P. Clemente-Casares, E. O. Major, B. Curfman e R. Girones. Analysis of the excreted JC virus strains and their potential oral transmission. J Neurovirol, v.9, n.4, Aug, p.498-507. 2003.

Bossolasco, S., G. Calori, F. Moretti, A. Boschini, D. Bertelli, M. Mena, S. Gerevini, A. Bestetti, R. Pedale, S. Sala, A. Lazzarin e P. Cinque. Prognostic significance of JC virus DNA levels in cerebrospinal fluid of patients with HIV-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. Clin Infect Dis, v.40, n.5, Mar 1, p.738-44. 2005.

Brooks, B. R. e D. L. Walker. Progressive multifocal leukoencephalopathy. Neurol Clin, v.2, n.2, May, p.299-313. 1984.

Brown, P., T. Tsai e D. C. Gajdusek. Seroepidemiology of human papovaviruses. Discovery of virgin populations and some unusual patterns of antibody prevalence among remote peoples of the world. Am J Epidemiol, v.102, n.4, Oct, p.331-40. 1975.

Candeias, J. A. N., R. G. Baruzzi, S. Pripas e M. Iunes. Prevalence of antibodies to the BK and JC papovaviruses in isolated populations. Rev. de Saúde Pública, v.11, n.n.4, p.510-4. 1977.

Carter, G. I., G. R. Taylor e T. J. Crow. Search for viral nucleic acid sequences in the post mortem brains of patients with schizophrenia and individuals who have committed suicide. J Neurol Neurosurg Psychiatry, v.50, n.3, Mar, p.247-51. 1987.

Chang, H., M. Wang, R. T. Tsai, H. S. Lin, J. S. Huan, W. C. Wang e D. Chang. High incidence of JC viruria in JC-seropositive older individuals. J Neurovirol, v.8, n.5, Oct, p.447-51. 2002.

Chesters, P. M., J. Heritage e D. J. Mccance. Persistence of DNA sequences of BK virus and JC virus in normal human tissues and in diseased tissues. J Infect Dis, v.147, n.4, Apr, p.676-84. 1983.

Chima, S. C., C. F. Ryschkewitsch, K. J. Fan e G. L. Stoner. Polyomavirus JC genotypes in an urban United States population reflect the history of African origin

and genetic admixture in modern African Americans. Hum Biol, v.72, n.5, Oct, p.837-50. 2000.

Chima, S. C., C. F. Ryschkewitsch e G. L. Stoner. Molecular epidemiology of human polyomavirus JC in the Biaka Pygmies and Bantu of Central Africa. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.93, n.5, Sep-Oct, p.615-23. 1998.

Cinque, P., P. Scarpellini, L. Vago, A. Linde e A. Lazzarin. Diagnosis of central nervous system complications in HIV-infected patients: cerebrospinal fluid analysis by the polymerase chain reaction. AIDS, v.11, n.1, Jan, p.1-17. 1997.

Clifford, D. B., C. Yiannoutsos, M. Glicksman, D. M. Simpson, E. J. Singer, P. J. Piliero, C. M. Marra, G. S. Francis, J. C. McArthur, K. L. Tyler, A. C. Tselis e N. E. Hyslop. HAART improves prognosis in HIV-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. Neurology, v.52, n.3, Feb, p.623-5. 1999.

Coleman, D. V., S. D. Gardner, C. Mulholland, V. Fridiksdottir, A. A. Porter, R. Lilford e H. Valdimarsson. Human polyomavirus in pregnancy. A model for the study of defence mechanisms to virus reactivation. Clin Exp Immunol, v.53, n.2, Aug, p.289-96. 1983.

Coleman, D. V., M. R. Wolfendale, R. A. Daniel, N. K. Dhanjal, S. D. Gardner, P. E. Gibson e A. M. Field. A prospective study of human polyomavirus infection in pregnancy. J Infect Dis, v.142, n.1, Jul, p.1-8. 1980.

Counihan, T., N. Venna, D. Craven e T. D. Sabin. Alpha Interferon in AIDS-Related Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. J NeuroAIDS, v.1, n.4, p.79-88. 1996.

Cui, X., J. C. Wang, A. Deckhut, B. C. Joseph, P. Eberwein, C. L. Cubitt, C. F. Ryschkewitsch, H. T. Agostini e G. L. Stoner. Chinese strains (Type 7) of JC virus are afro-asiatic in origin but are phylogenetically distinct from the Mongolian and Indian strains (Type 2D) and the Korean and Japanese strains (Type 2A). J Mol Evol, v.58, n.5, May, p.568-83. 2004.

Daniel, R., K. Shah, D. Madden e S. Stagno. Serological Investigation of the possibility of congenital transmission of papovavirus JC. Infect Immun, v.33, n.1, Jul, p.319-21. 1981.

De Luca, A., A. Cingolani, A. Linzalone, A. Ammassari, R. Murri, M. L. Giancola, G. Maiuro e A. Antinori. Improved detection of JC virus DNA in cerebrospinal fluid for diagnosis of AIDS-related progressive multifocal leukoencephalopathy. J Clin Microbiol, v.34, n.5, May, p.1343-6. 1996.

De Luca, A., M. L. Giancola, A. Ammassari, S. Grisetti, M. G. Paglia, M. Gentile, A. Cingolani, R. Murri, G. Liuzzi, A. D. Monforte e A. Antinori. The effect of potent antiretroviral therapy and JC virus load in cerebrospinal fluid on clinical outcome of patients with AIDS-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. J Infect Dis, v.182, n.4, Oct, p.1077-83. 2000.

De Luca, A., M. L. Giancola, A. Cingolani, A. Ammassari, L. Gillini, R. Murri e A. Antinori. Clinical and virological monitoring during treatment with intrathecal cytarabine in patients with AIDS-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. Clin Infect Dis, v.28, n.3, Mar, p.624-8. 1999.

De Truchis, P., M. Flament-Saillour, J. A. Urtizbera, D. Hassine e B. Clair. Inefficacy of cytarabine in progressive multifocal leukoencephalopathy in AIDS. Lancet, v.342, n.8871, Sep 4, p.622-3. 1993.

Dubois, V., M. E. Lafon, J. M. Ragnaud, J. L. Pellegrin, F. Damasio, C. Baudouin, V. Michaud e H. J. Fleury. Detection of JC virus DNA in the peripheral blood leukocytes of HIV-infected patients. AIDS, v.10, n.4, Apr, p.353-8. 1996.

Editorial Lancet. PML: more neurological bad news for AIDS patients. Lancet, v.340, n.8825, Oct 17, p.943-4. 1992.

Eggers, C., H. J. Stellbrink, T. Buhk e K. Dorries. Quantification of JC virus DNA in the cerebrospinal fluid of patients with human immunodeficiency virus-associated progressive multifocal leukoencephalopathy--a longitudinal study. J Infect Dis, v.180, n.5, Nov, p.1690-4. 1999.

Elfaitouri, A., A. L. Hammarin e J. Blomberg. Quantitative real-time PCR assay for detection of human polyomavirus infection. J Virol Methods, v.135, n.2, Aug, p.207-13. 2006.

Elliot, B., I. Aromin, R. Gold, T. Flanigan e M. Mileno. 2.5 year remission of AIDS-associated progressive multifocal leukoencephalopathy with combined antiretroviral therapy. Lancet, v.349, n.9055, Mar 22, p.850. 1997.

Elphick, G. F., W. Querbes, J. A. Jordan, G. V. Gee, S. Eash, K. Manley, A. Dugan, M. Stanifer, A. Bhatnagar, W. K. Kroeze, B. L. Roth e W. J. Atwood. The human polyomavirus, JCV, uses serotonin receptors to infect cells. Science, v.306, n.5700, Nov 19, p.1380-3. 2004.

Elsner, C. e K. Dorries. Evidence of human polyomavirus BK and JC infection in normal brain tissue. Virology, v.191, n.1, Nov, p.72-80. 1992.

Feng, H., M. Shuda, Y. Chang e P. S. Moore. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. Science, v.319, n.5866, Feb 22, p.1096-100. 2008.

Fong, I. W., C. B. Britton, K. E. Luinstra, E. Toma e J. B. Mahony. Diagnostic value of detecting JC virus DNA in cerebrospinal fluid of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. J Clin Microbiol, v.33, n.2, Feb, p.484-6. 1995.

Fong, I. W. e E. Toma. The natural history of progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with AIDS. Canadian PML Study Group. Clin Infect Dis, v.20, n.5, May, p.1305-10. 1995.

Frisque, R. J., G. L. Bream e M. T. Cannella. Human polyomavirus JC virus genome. J Virol, v.51, n.2, Aug, p.458-69. 1984.

Fumian, T., F. Guimarães, B. Vaz, M. T. Silva, F. F. Muylaert, S. Bofill-Mas, R. Gironés, J. P. Leite e M. Miagostovich. Molecular detection, quantification and characterization of human polyomavirus JC from wastewater in Rio de Janeiro, Brazil. Journal of Water and Health No prelo. 2010

Garcia De Viedma, D., R. Alonso, P. Miralles, J. Berenguer, M. Rodriguez-Creixems e E. Bouza. Dual qualitative-quantitative nested PCR for detection of JC virus in cerebrospinal fluid: high potential for evaluation and monitoring of progressive multifocal leukoencephalopathy in AIDS patients receiving highly active antiretroviral therapy. J Clin Microbiol, v.37, n.3, Mar, p.724-8. 1999.

Gardner, S. D. The new human papovaviruses: Their nature and significance. Recent advances in clinical virology. Waterson, A.P., ed., Churchill Livingstone, Edinburgh p.93-115. 1977.

Gardner, S. D., A. M. Field, D. V. Coleman e B. Hulme. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. Lancet, v.1, n.7712, Jun 19, p.1253-7. 1971.

Gardner, S. D., E. F. Mackenzie, C. Smith e A. A. Porter. Prospective study of the human polyomaviruses BK and JC and cytomegalovirus in renal transplant recipients. J Clin Pathol, v.37, n.5, May, p.578-86. 1984.

Gaynor, A. M., M. D. Nissen, D. M. Whiley, I. M. Mackay, S. B. Lambert, G. Wu, D. C. Brennan, G. A. Storch, T. P. Sloots e D. Wang. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. PLoS Pathog, v.3, n.5, May 4, p.e64. 2007.

Gibson, P. E., A. M. Field, S. D. Gardner e D. V. Coleman. Occurrence of IgM antibodies against BK and JC polyomaviruses during pregnancy. J Clin Pathol, v.34, n.6, Jun, p.674-9. 1981.

Gibson, P. E., W. A. Knowles, J. F. Hand e D. W. Brown. Detection of JC virus DNA in the cerebrospinal fluid of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. J Med Virol, v.39, n.4, Apr, p.278-81. 1993.

Gillespie, S. M., Y. Chang, G. Lemp, R. Arthur, S. Buchbinder, A. Steimle, J. Baumgartner, T. Rando, D. Neal, G. Rutherford e Et Al. Progressive multifocal leukoencephalopathy in persons infected with human immunodeficiency virus, San Francisco, 1981-1989. Ann Neurol, v.30, n.4, Oct, p.597-604. 1991.

Ginzinger, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. Exp Hematol, v.30, n.6, Jun, p.503-12. 2002.

Giudici, B., B. Vaz, S. Bossolasco, S. Casari, A. M. Brambilla, W. Luke, A. Lazzarin, T. Weber e P. Cinque. Highly active antiretroviral therapy and progressive multifocal leukoencephalopathy: effects on cerebrospinal fluid markers of JC virus replication and immune response. Clin Infect Dis, v.30, n.1, Jan, p.95-9. 2000.

Giulietti, A., L. Overbergh, D. Valckx, B. Decallonne, R. Bouillon e C. Mathieu. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. Methods, v.25, n.4, Dec, p.386-401. 2001.

Glass, A. J. e M. Venter. 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. J Med Virol, v.81, n.11, Nov, p.1929-37. 2009.

Grinnell, B. W., J. D. Martin, B. L. Padgett e D. L. Walker. Naturally occurring and passage-induced variation in the genome of JC virus. Prog Clin Biol Res, v.105, p.61-77. 1983.

Grinnell, B. W., B. L. Padgett e D. L. Walker. Distribution of nonintegrated DNA from JC papovavirus in organs of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. J Infect Dis, v.147, n.4, Apr, p.669-75. 1983.

Gruss, P. e G. Khoury. Expression of simian virus 40-rat preproinsulin recombinants in monkey kidney cells: use of preproinsulin RNA processing signals. Proc Natl Acad Sci U S A, v.78, n.1, Jan, p.133-7. 1981.

Guo, J., T. Kitamura, H. Ebihara, C. Sugimoto, T. Kunitake, J. Takehisa, Y. Q. Na, M. N. Al-Ahdal, A. Hallin, K. Kawabe, F. Taguchi e Y. Yogo. Geographical distribution of the human polyomavirus JC virus type A and B and isolation of a new type from Ghana. J Gen Virol, v.77 (Pt 5), May, p.919-27. 1996.

Guo, J., C. Sugimoto, T. Kitamura, H. Ebihara, A. Kato, Z. Guo, J. Liu, S. P. Zheng, Y. L. Wang, Y. Q. Na, M. Suzuki, F. Taguchi e Y. Yogo. Four geographically distinct genotypes of JC virus are prevalent in China and Mongolia: implications for the racial composition of modern China. J Gen Virol, v.79 (Pt 10), Oct, p.2499-505. 1998.

Hall, C. D., U. Dafni, D. Simpson, D. Clifford, P. E. Wetherill, B. Cohen, J. McArthur, H. Hollander, C. Yainnoutsos, E. Major, L. Millar e J. Timpone. Failure of cytarabine in progressive multifocal leukoencephalopathy associated with human immunodeficiency virus infection. AIDS Clinical Trials Group 243 Team. N Engl J Med, v.338, n.19, May 7, p.1345-51. 1998.

Hallervorden, J. Eigennartige und nicht rubrizierbare Prozesse. In: Bumke O, ed. Handbuch der Geisteskrankheiten., v.Vol. 11, n.Die Anatomie der Psychosen. Berlin: Springer 1930, p.1063-1107. 1930.

Hammarin, A. L., G. Bogdanovic, V. Svedhem, R. Pirskanen, L. Morfeldt e M. Grandien. Analysis of PCR as a tool for detection of JC virus DNA in cerebrospinal fluid for diagnosis of progressive multifocal leukoencephalopathy. J Clin Microbiol, v.34, n.12, Dec, p.2929-32. 1996.

Hatwell, J. N. e P. M. Sharp. Evolution of human polyomavirus JC. J Gen Virol, v.81, n.Pt 5, May, p.1191-200. 2000.

Hogan, T. F., B. L. Padgett, D. L. Walker, E. C. Borden e Z. Frias. Survey of human polyomavirus (JCV, BKV) infections in 139 patients with lung cancer, breast cancer, melanoma, or lymphoma. Prog Clin Biol Res, v.105, p.311-24. 1983.

Hogan, T. F., B. L. Padgett, D. L. Walker, E. C. Borden e J. A. Mcbain. Rapid detection and identification of JC virus and BK virus in human urine by using immunofluorescence microscopy. J Clin Microbiol, v.11, n.2, Feb, p.178-83. 1980.

Holman, R. C., R. S. Janssen, J. W. Buehler, M. T. Zelasky e W. C. Hooper. Epidemiology of progressive multifocal leukoencephalopathy in the United States: analysis of national mortality and AIDS surveillance data. Neurology, v.41, n.11, Nov, p.1733-6. 1991.

Hou, J. e E. O. Major. The efficacy of nucleoside analogs against JC virus multiplication in a persistently infected human fetal brain cell line. J Neurovirol, v.4, n.4, Aug, p.451-6. 1998.

Houff, S. A., E. O. Major, D. A. Katz, C. V. Kufra, J. L. Sever, S. Pittaluga, J. R. Roberts, J. Gitt, N. Saini e W. Lux. Involvement of JC virus-infected mononuclear cells from the bone marrow and spleen in the pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy. N Engl J Med, v.318, n.5, Feb 4, p.301-5. 1988.

Jobe, D. V., J. S. Friedlaender, C. S. Mgone, H. T. Agostini, G. Koki, R. Yanagihara, T. C. N. Ng, S. C. Chima, C. F. Ryschkewitsch e G. L. Stoner. New JC virus (JCV) genotypes from papua new guinea and micronesia (type 8 and type 2E) and evolutionary analysis of 32 complete JCV genomes. Arch Virol, v.146, n.11, p.2097-113. 2001.

Jobes, D. V., S. C. Chima, C. F. Ryschkewitsch e G. L. Stoner. Phylogenetic analysis of 22 complete genomes of the human polyomavirus JC virus. J Gen Virol, v.79 (Pt 10), Oct, p.2491-8. 1998.

Karahalios, D., R. Breit, M. C. Dal Canto e R. M. Levy. Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with HIV infection: lack of impact of early diagnosis by stereotactic brain biopsy. J Acquir Immune Defic Syndr, v.5, n.10, Oct, p.1030-8. 1992.

Kharfan-Dabaja, M. A., E. Ayala, J. Greene, A. Rojiani, F. R. Murtagh e C. Anasetti. Two cases of progressive multifocal leukoencephalopathy after allogeneic hematopoietic cell transplantation and a review of the literature. Bone Marrow Transplant, v.39, n.2, Jan, p.101-7. 2007.

Kitamura, T., Y. Aso, N. Kuniyoshi, K. Hara e Y. Yogo. High incidence of urinary JC virus excretion in nonimmunosuppressed older patients. J Infect Dis, v.161, n.6, Jun, p.1128-33. 1990.

Kraemer, C., S. Evers, T. Nolting, G. Arendt e I. W. Husstedt. Cidofovir in combination with HAART and survival in AIDS-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. J Neurol, v.255, n.4, Apr, p.526-31. 2008.

Krupp, L. B., R. B. Lipton, M. L. Swerdlow, N. E. Leeds e J. Llana. Progressive multifocal leukoencephalopathy: clinical and radiographic features. Ann Neurol, v.17, n.4, Apr, p.344-9. 1985.

Kuchelmeister, K., F. Gullotta, M. Bergmann, G. Angeli e T. Masini. Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). A neuropathological autopsy study of 21 cases. Pathol Res Pract, v.189, n.2, Mar, p.163-73. 1993.

Kunitake, T., T. Kitamura, J. Guo, F. Taguchi, K. Kawabe e Y. Yogo. Parent-to-child transmission is relatively common in the spread of the human polyomavirus JC virus. J Clin Microbiol, v.33, n.6, Jun, p.1448-51. 1995.

Landis, J. R. e G. G. Koch. The measurement of observer agreement for categorical data. Biometrics, v.33, n.1, Mar, p.159-74. 1977.

Landry, M. L., T. Eid, S. Bannykh e E. Major. False negative PCR despite high levels of JC virus DNA in spinal fluid: Implications for diagnostic testing. J Clin Virol, v.43, n.2, Oct, p.247-9. 2008.

Loeber, G. e K. Dorries. DNA rearrangements in organ-specific variants of polyomavirus JC strain GS. J Virol, v.62, n.5, May, p.1730-5. 1988.

Mackay, I. M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clin Microbiol Infect, v.10, n.3, Mar, p.190-212. 2004.

Major, E. O., K. Amemiya, C. S. Tornatore, S. A. Houff e J. R. Berger. Pathogenesis and molecular biology of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain. Clin Microbiol Rev, v.5, n.1, Jan, p.49-73. 1992.

Major, E. O. e G. S. Ault. Progressive multifocal leukoencephalopathy: clinical and laboratory observations on a viral induced demyelinating disease in the immunodeficient patient. Curr Opin Neurol, v.8, n.3, Jun, p.184-90. 1995.

Martin, J. D. e G. C. Foster. Multiple JC virus genomes from one patient. J Gen Virol, v.65 (Pt 8), Aug, p.1405-11. 1984.

Martin, J. D., D. M. King, J. M. Slauch e R. J. Frisque. Differences in regulatory sequences of naturally occurring JC virus variants. J Virol, v.53, n.1, Jan, p.306-11. 1985.

Martin, J. D., B. L. Padgett e D. L. Walker. Characterization of tissue culture-induced heterogeneity in DNAs of independent isolates of JC virus. J Gen Virol, v.64 (Pt 10), Oct, p.2271-80. 1983.

Martinez, A. J., M. Sell, T. Mitrovics, G. Stoltenburg-Didinger, J. R. Iglesias-Rozas, M. A. Giraldo-Velasquez, G. Gosztonyi, V. Schneider e J. Cervos-Navarro. The neuropathology and epidemiology of AIDS. A Berlin experience. A review of 200 cases. Pathol Res Pract, v.191, n.5, Jun, p.427-43. 1995.

Marzocchetti, A., S. Di Giambenedetto, A. Cingolani, A. Ammassari, R. Cauda e A. De Luca. Reduced rate of diagnostic positive detection of JC virus DNA in cerebrospinal fluid in cases of suspected progressive multifocal leukoencephalopathy in the era of potent antiretroviral therapy. J Clin Microbiol, v.43, n.8, Aug, p.4175-7. 2005.

Matsiota-Bernard, P., P. De Truchis, F. Gray, M. Flament-Saillour, E. Voyatzakis e C. Nauciel. JC virus detection in the cerebrospinal fluid of AIDS patients with progressive multifocal leukoencephalopathy and monitoring of the antiviral treatment by a PCR method. J Med Microbiol, v.46, n.3, Mar, p.256-9. 1997.

Mcguire, D., S. Barhite, H. Hollander e M. Miles. JC virus DNA in cerebrospinal fluid of human immunodeficiency virus-infected patients: predictive value for progressive multifocal leukoencephalopathy. Ann Neurol, v.37, n.3, Mar, p.395-9. 1995.

Mcnees, A. L., Z. S. White, P. Zanwar, R. A. Vilchez e J. S. Butel. Specific and quantitative detection of human polyomaviruses BKV, JCV, and SV40 by real time PCR. J Clin Virol, v.34, n.1, Sep, p.52-62. 2005.

Miller, J. R., R. E. Barrett, C. B. Britton, M. L. Tapper, G. S. Bahr, P. J. Bruno, M. D. Marquardt, A. P. Hays, J. G. Mcmurtry, 3rd, J. B. Weissman e M. S. Bruno. Progressive multifocal leukoencephalopathy in a male homosexual with T-cell immune deficiency. N Engl J Med, v.307, n.23, Dec 2, p.1436-8. 1982.

Miralles, P., J. Berenguer, D. Garcia De Viedma, B. Padilla, J. Cosin, J. C. Lopez-Bernaldo De Quiros, L. Munoz, S. Moreno e E. Bouza. Treatment of AIDS-associated progressive multifocal leukoencephalopathy with highly active antiretroviral therapy. AIDS, v.12, n.18, Dec 24, p.2467-72. 1998.

Monaco, M. C., P. N. Jensen, J. Hou, L. C. Durham e E. O. Major. Detection of JC virus DNA in human tonsil tissue: evidence for site of initial viral infection. J Virol, v.72, n.12, Dec, p.9918-23. 1998.

Moreno, S., P. Miralles, M. D. Diaz, J. Berenguer, J. C. Bernaldo De Quiros, R. Blazquez, J. Cosin e E. Bouza. Cytarabine therapy for progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with AIDS. Clin Infect Dis, v.23, n.5, Nov, p.1066-8. 1996.

Moret, H., M. Guichard, S. Matheron, C. Katlama, V. Sazdovitch, J. M. Huraux e D. Ingrand. Virological diagnosis of progressive multifocal leukoencephalopathy: detection of JC virus DNA in cerebrospinal fluid and brain tissue of AIDS patients. J Clin Microbiol, v.31, n.12, Dec, p.3310-3. 1993.

Ou, W. C., R. T. Tsai, M. Wang, C. Y. Fung, T. H. Hseu e D. Chang. Genomic cloning and sequence analysis of Taiwan-3 human polyomavirus JC virus. J Formos Med Assoc, v.96, n.7, Jul, p.511-6. 1997.

Padgett, B. L., C. M. Rogers e D. L. Walker. JC virus, a human polyomavirus associated with progressive multifocal leukoencephalopathy: additional biological characteristics and antigenic relationships. Infect Immun, v.15, n.2, Feb, p.656-62. 1977.

Padgett, B. L. e D. L. Walker. Prevalence of antibodies in human sera against JC virus, an isolate from a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. J Infect Dis, v.127, n.4, Apr, p.467-70. 1973.

Padgett, B. L., D. L. Walker, G. M. Zurhein, R. J. Eckroade e B. H. Dessel. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. Lancet, v.1, n.7712, Jun 19, p.1257-60. 1971.

Pal, A., L. Sirota, T. Maudru, K. Peden e A. M. Lewis, Jr. Real-time, quantitative PCR assays for the detection of virus-specific DNA in samples with mixed populations of polyomaviruses. J Virol Methods, v.135, n.1, Jul, p.32-42. 2006.

Power, C., A. Nath, F. Y. Aoki e M. D. Bigio. Remission of progressive multifocal leukoencephalopathy following splenectomy and antiretroviral therapy in a patient with HIV infection. N Engl J Med, v.336, n.9, Feb 27, p.661-2. 1997.

Richardson, E. P., Jr. Progressive multifocal leukoencephalopathy. N Engl J Med, v.265, Oct 26, p.815-23. 1961.

Rockwell, D., F. L. Ruben, A. Winkelstein e H. Mendelow. Absence of immune deficiencies in a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. Am J Med, v.61, n.3, Sep, p.433-6. 1976.

Ryschkewitsch, C., P. Jensen, J. Hou, G. Fahle, S. Fischer e E. O. Major. Comparison of PCR-southern hybridization and quantitative real-time PCR for the detection of JC and BK viral nucleotide sequences in urine and cerebrospinal fluid. J Virol Methods, v.121, n.2, Nov, p.217-21. 2004.

Saxton, C. R., P. Gailunas, Jr., J. H. Helderman, R. A. Farkas, R. McCoy, J. Diehl, A. Sagalowsky, F. K. Murphy, E. D. Ross, F. R. Silva e Et Al. Progressive multifocal leukoencephalopathy in a renal transplant recipient. Increased diagnostic sensitivity of computed tomographic scanning by double-dose contrast with delayed films. Am J Med, v.77, n.2, Aug, p.333-7. 1984.

Seh bani, L., B. Kabamba-Mukadi, A. T. Vandembroucke, M. Bodeus e P. Goubau. Specific and quantitative detection of human polyomaviruses BKV and JCV by LightCycler real-time PCR. J Clin Virol, v.36, n.2, Jun, p.159-62. 2006.

Seth, P., F. Diaz e E. O. Major. Advances in the biology of JC virus and induction of progressive multifocal leukoencephalopathy. J Neurovirol, v.9, n.2, Apr, p.236-46. 2003.

Shah, K. e N. Nathanson. Human exposure to SV40: review and comment. Am J Epidemiol, v.103, n.1, Jan, p.1-12. 1976.

Silva, M. T., M. C. Pacheco, Jr. e B. Vaz. Inflammatory progressive multifocal leukoencephalopathy after antiretroviral treatment. AIDS, v.20, n.3, Feb 14, p.469-71. 2006.

Silverman, L. e L. J. Rubinstein. Electron microscopic observations on a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. Acta Neuropathol, v.5, n.2, Nov 18, p.215-24. 1965.

Smith, S. e P. A. Morin. Optimal storage conditions for highly dilute DNA samples: a role for trehalose as a preserving agent. J Forensic Sci, v.50, n.5, Sep, p.1101-8. 2005.

Sugimoto, C., M. Hasegawa, H. Y. Zheng, V. Demenev, Y. Sekino, K. Kojima, T. Honjo, H. Kida, T. Hovi, T. Vesikari, J. A. Schalken, K. Tomita, Y. Mitsunobu, H. Ikegaya, N. Kobayashi, T. Kitamura e Y. Yogo. JC virus strains indigenous to northeastern Siberians and Canadian Inuits are unique but evolutionally related to those distributed throughout Europe and Mediterranean areas. J Mol Evol, v.55, n.3, Sep, p.322-35. 2002.

Sugimoto, C., D. Ito, K. Tanaka, H. Matsuda, H. Saito, H. Sakai, K. Fujihara, Y. Itoyama, T. Yamada, J. Kira, R. Matsumoto, M. Mori, K. Nagashima e Y. Yogo. Amplification of JC virus regulatory DNA sequences from cerebrospinal fluid: diagnostic value for progressive multifocal leukoencephalopathy. Arch Virol, v.143, n.2, p.249-62. 1998.

Sugimoto, C., T. Kitamura, J. Guo, M. N. Al-Ahdal, S. N. Shchelkunov, B. Otova, P. Ondrejka, J. Y. Chollet, S. El-Safi, M. Ettayebi, G. Gresenguet, T. Kocagoz, S. Chaiyarasamee, K. Z. Thant, S. Thein, K. Moe, N. Kobayashi, F. Taguchi e Y. Yogo. Typing of urinary JC virus DNA offers a novel means of tracing human migrations. Proc Natl Acad Sci U S A, v.94, n.17, Aug 19, p.9191-6. 1997.

Taguchi, F., J. Kajioka e T. Miyamura. Prevalence rate and age of acquisition of antibodies against JC virus and BK virus in human sera. Microbiol Immunol, v.26, n.11, p.1057-64. 1982.

Takahashi, T. e T. Nakayama. Novel technique of quantitative nested real-time PCR assay for Mycobacterium tuberculosis DNA. J Clin Microbiol, v.44, n.3, Mar, p.1029-39. 2006.

Telenti, A., A. J. Aksamit, Jr., J. Proper e T. F. Smith. Detection of JC virus DNA by polymerase chain reaction in patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. J Infect Dis, v.162, n.4, Oct, p.858-61. 1990.

Tornatore, C., J. R. Berger, S. A. Houff, B. Curfman, K. Meyers, D. Winfield e E. O. Major. Detection of JC virus DNA in peripheral lymphocytes from patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. Ann Neurol, v.31, n.4, Apr, p.454-62. 1992.

Vago, L., P. Cinque, E. Sala, M. Nebuloni, R. Caldarelli, S. Racca, P. Ferrante, G. Trabottoni e G. Costanzi. JCV-DNA and BKV-DNA in the CNS tissue and CSF of AIDS patients and normal subjects. Study of 41 cases and review of the literature. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, v.12, n.2, Jun 1, p.139-46. 1996.

Vidal, J. E., A. C. Penalva De Oliveira, M. C. Fink, C. S. Pannuti e J. R. Trujillo. Aids-related progressive multifocal leukoencephalopathy: a retrospective study in a referral center in Sao Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v.50, n.4, Jul-Aug, p.209-12. 2008.

Von Einsiedel, R. W., T. D. Fife, A. J. Aksamit, M. E. Cornford, D. L. Secor, U. Tomiyasu, H. H. Itabashi e H. V. Vinters. Progressive multifocal leukoencephalopathy in AIDS: a clinicopathologic study and review of the literature. J Neurol, v.240, n.7, Jul, p.391-406. 1993.

Walker, D. L. e B. L. Padgett. The epidemiology of human polyomaviruses. Prog Clin Biol Res, v.105, p.99-106. 1983.

Weber, T., S. Frye, M. Bodemer, M. Otto e W. Luke. Clinical implications of nucleic acid amplification methods for the diagnosis of viral infections of the nervous system. J Neurovirol, v.2, n.3, Jun, p.175-90. 1996.

Weber, T., P. E. Klapper, G. M. Cleator, M. Bodemer, W. Luke, W. Knowles, P. Cinque, A. M. Van Loon, M. Grandien, A. L. Hammarin, M. Ciardi e G. Bogdanovic. Polymerase chain reaction for detection of JC virus DNA in cerebrospinal fluid: a quality control study. European Union Concerted Action on Viral Meningitis and Encephalitis. J Virol Methods, v.69, n.1-2, Dec, p.231-7. 1997.

Weber, T., R. W. Turner, S. Frye, W. Luke, H. A. Kretzschmar, W. Luer e G. Hunsmann. Progressive multifocal leukoencephalopathy diagnosed by amplification of JC virus-specific DNA from cerebrospinal fluid. AIDS, v.8, n.1, Jan, p.49-57. 1994.

Weber, T., R. W. Turner, S. Frye, B. Ruf, J. Haas, E. Schielke, H. D. Pohle, W. Luke, W. Luer, K. Felgenhauer e Et Al. Specific diagnosis of progressive multifocal leukoencephalopathy by polymerase chain reaction. J Infect Dis, v.169, n.5, May, p.1138-41. 1994.

Whiley, D. M., S. B. Lambert, S. Bialasiewicz, N. Goire, M. D. Nissen e T. P. Sloots. False-negative results in nucleic acid amplification tests-do we need to routinely use two genetic targets in all assays to overcome problems caused by sequence variation? Crit Rev Microbiol, v.34, n.2, p.71-6. 2008.

White, F. A., 3rd, M. Ishaq, G. L. Stoner e R. J. Frisque. JC virus DNA is present in many human brain samples from patients without progressive multifocal leukoencephalopathy. J Virol, v.66, n.10, Oct, p.5726-34. 1992.

Whiteman, M. L., M. J. Post, J. R. Berger, L. G. Tate, M. D. Bell e L. P. Limonte. Progressive multifocal leukoencephalopathy in 47 HIV-seropositive patients: neuroimaging with clinical and pathologic correlation. Radiology, v.187, n.1, Apr, p.233-40. 1993.

Zurhein, G. e S. M. Chou. Particles Resembling Papova Viruses in Human Cerebral Demyelinating Disease. Science, v.148, Jun 11, p.1477-9. 1965.