

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E
TOXICOLÓGIAS

MARTA LAMOUNIER MOURA VARGAS CORGOZINHO

**AVALIAÇÃO RETROSPECTIVA E TRANSVERSAL DE
PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAISS ASSOCIANDO OS
POLIOMAVÍRUS BKPyV E JCPyV COM A EVOLUÇÃO DO
ENXERTO**

Belo Horizonte

2019

MARTA LAMOUNIER MOURA VARGAS CORGOZINHO

**AVALIAÇÃO RETROSPECTIVA E TRANSVERSAL DE
PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAISS ASSOCIANDO OS
POLIOMAVÍRUS BKPyVC E JCPyV COM A EVOLUÇÃO DO
ENXERTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientadora: Ana Paula Lucas Mota

Co-orientador: Bruno Eduardo Fernandes Mota

Belo Horizonte

2019

C797a	<p>Corgozinho, Marta Lamounier Moura Vargas. Avaliação retrospectiva e transversal de paciente transplantados renais associando os poliomavírus BKPyV e JCPyV com a evolução do enxerto / Marta Lamounier Moura Vargas Corgozinho. – 2019. 152 f. : il.</p> <p>Orientadora: Ana Paula Lucas Mota. Coorientador: Bruno Eduardo Fernandes Mota.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.</p> <p>1. Rins – Doenças – Teses. 2. Rins – Transplante – Teses. 3. Transplante renal – Teses. 4. Vírus BK – Teses. 5. Rejeição de enxertos – Teses. 6. Nefropatia – Teses. 7. Vírus JC – Teses. I. Mota, Ana Paula Lucas. II. Mota, Bruno Eduardo Fernandes. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD: 617.75</p>
-------	---



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

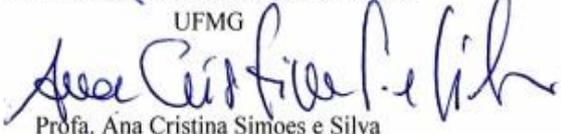
AVALIAÇÃO RETROSPECTIVA E TRANSVERSAL DE PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAI ASSOCIANDO OS POLIOMAVÍRUS BKPyV E JCPyV COM A EVOLUÇÃO DO ENXERTO

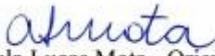
MARTA LAMOUNIER MOURA VARGAS CORGOZINHO

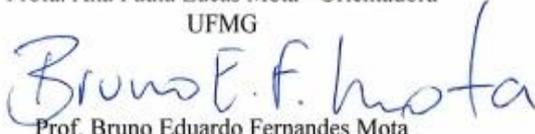
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, área de concentração ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS.

Aprovada em 30 de setembro de 2019, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis
UFMG


Profa. Ana Cristina Simoes e Silva
UFMG


Profa. Ana Paula Lucas Mota - Orientadora
UFMG


Prof. Bruno Eduardo Fernandes Mota
UFMG

Belo Horizonte, 30 de setembro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Um trabalho de mestrado é uma longa caminhada, que inclui uma trajetória permeada por inúmeros desafios, dificuldades, tristezas e incertezas mas também de muitas alegrias, aprendizado, amadurecimento e que nos traz muito orgulho pelo caminho percorrido, principalmente pelas contribuições à saúde humana proporcionadas pelos nossos estudos. Trilhar este caminho só foi possível com o apoio, energia e força de vários envolvidos, a quem dedico especialmente este projeto de vida!

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus, por ser o meu guia e a minha luz. A fonte inesgotável de amor e sabedoria, meu suporte primordial nas horas difíceis. Agradeço também a Nossa Senhora Aparecida pela serenidade e resiliência que me permitiram chegar até aqui e não desanimar!

Aos meus pais, Jaime e Nanci, e minha irmã, Ana Clara, agradeço pelo apoio, confiança e amor incondicional depositados em mim. Sem vocês eu não teria chegado até aqui! Vocês não apenas foram instrumentos de amor como também se prontificaram a me auxiliar em todas as minhas atividades, gastando tempo e sendo suporte financeiro em toda esta caminhada. Eu amo muito vocês! Muito obrigada por tudo! Essa vitória também é de vocês!

Aos meus orientadores, Ana Paula Lucas Mota e Bruno Eduardo Fernandes Mota, agradeço pela amizade, aprendizado, visão crítica e os conhecimentos partilhados comigo que permitiram enriquecer e amadurecer as minhas ideias. Vocês contribuíram para a minha formação e o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Aos pacientes e equipe multiprofissional do Hospital Felício Rocho por abrirem as portas e cederem o seu tempo para a realização deste trabalho, em especial, à nefrologista Sandra Simone Vilaça pelo incentivo e por compartilhar seu conhecimento clínico.

À Bianca Vieira e Victor Gomes que me auxiliaram diretamente na realização experimental e no estudo epidemiológico realizado no Hospital Felício Rocho.

Aos nefropatologistas Stanley de Almeida Araújo e David Campos Wanderley pela colaboração com o trabalho auxiliando nas análises citológicas. Agradeço por cederem o seu tempo e prestarem seus conhecimentos e serviços.

À Doutora Juliana Comerlato por ceder gentilmente amostras biológicas para o estudo.

À equipe do laboratório de Patologia Molecular da Faculdade de Odontologia da UFMG pela colaboração com o trabalho e auxílio na coloração das lâminas para análises citológicas.

Aos colegas do laboratório de Bioquímica e Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFMG, Lorraine Alves, Suellen Martins, Alessandra Lovato e Jéssica Tosatti, pela amizade, companheirismo, auxílio em minhas análises estatísticas e conhecimentos compartilhados.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas pela contribuição para o desenvolvimento do meu trabalho.

Aos meus amigos queridos, em especial, à Izabela Martins, Ana Carolina Almeida, Luciana Duarte, Paula Vasconcelos, Rodrigo Romero, Gabriel Lopes, Kátia Vital, Jéssica Neves, Philippe Saldanha, Carla Cândido, Daniela Freitas, Nathália Cristina, Henrique Zurlo e Kíssila Thomaz. Agradeço pelo apoio, torcida e por compartilharem comigo bons momentos e alegrias.

Aos demais colegas e familiares agradeço pelo carinho, incentivo e torcida.

À Capes pelo apoio financeiro.

Termino meu agradecimento com o trecho de uma música que marcou a minha vida e foi a minha inspiração para a minha entrada no Mestrado há dois anos atrás e que continua me inspirando e representa este momento final de defesa da dissertação: *“Sonhar, nunca desistir, ter fé, pois fácil não é nem vai ser, tentar até se esgotarem suas forças. Se hoje eu tenho quero dividir, ostentar pra esperança levar e o mundo sorrir...”*.

*A mente que se abre a uma nova ideia,
jamais voltará ao seu tamanho
original" (Albert Einstein)*

RESUMO

Introdução: Os Poliomavírus são considerados vírus onipresentes na população permanecendo em estado de latência em diversos tecidos. Em indivíduos imunocomprometidos pode ocorrer a reativação viral sendo a leucoencefalopatia multifocal progressiva principalmente associada ao Poliomavírus JC (JCPyV) e a estenose ureteral, cistite hemorrágica e a nefropatia crônica do enxerto (NCE) as principais manifestações clínicas associadas ao Poliomavírus BK (BKPyV). O diagnóstico precoce é a peça-chave a fim de prevenir a evolução da infecção. Diversos testes diagnósticos têm sido desenvolvidos, mas ainda sem uma padronização bem estabelecida. O BKPyV é considerado um patógeno emergente nos transplantes renais e está fortemente relacionado à gênese da NCE. **Objetivo:** Realizar uma avaliação retrospectiva e transversal de pacientes transplantados renais associando os poliomavírus BKPyV e JCPyV com a evolução do enxerto. **Metodologia:** Foram avaliados 247 transplantados renais em dois momentos, um estudo retrospectivo de 2013-2014 ($n=155$) e um estudo transversal-observacional ($n=92$). Para a determinação viral foi realizada a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase *Semi-Nested*. Avaliou-se a relação entre as infecções virais e os parâmetros hematológicos e bioquímicos. Avaliou-se a presença de células *decoy* na urina por citologia urinária, bem como a associação do BKPyV com o desenvolvimento de rejeição (aguda ou crônica) e NCE. **Resultados e discussões:** Houve uma baixa associação entre a positividade de células *decoy* na urina e a infecção por BKPyV. Os pacientes com viremia para BKPyV apresentaram níveis elevados de ureia plasmática e valores diminuídos da global de leucócitos. A maior frequência de pacientes do estudo foram verdadeiros negativos para BKPyV (60%), com raros casos de rejeição (aguda ou crônica) e sem o desenvolvimento de NCE e esta relação apresentou uma boa sensibilidade (82,8%). Os resultados para JCPyV não apresentaram diferenças significativas. Após análise de regressão, apenas os níveis de creatinina plasmática, as taxas de rejeição pós-transplante e a infecção viral por citomegalovírus permaneceram independentemente associados ao desenvolvimento da NCE. **Conclusões:** os testes diagnósticos empregados no estudo mostraram-se mais sensíveis que específicos e a infecção por BKPyV foi capaz de influenciar na função renal e hematológica dos pacientes avaliados.

Palavras-chave: Vírus BK. Vírus JC. Rejeição. Transplante renal. Nefropatia.

ABSTRACT

Introduction: Polyomaviruses are considered ubiquitous viruses in the population, remaining in a latency state in several tissues. In immunocompromised individuals, viral reactivation may occur, with progressive multifocal leukoencephalopathy mainly associated with JC polyomavirus (JCPyV) and ureteral stenosis, hemorrhagic cystitis and chronic graft nephropathy (NCE) being the main clinical manifestations associated with BKPyV polyomavirus. Early diagnosis is the key in order to prevent the evolution of the infection. Several diagnostic tests have been developed, but still without a well-established standardization. BKPyV is considered an emerging pathogen in renal transplantation and is strongly related to the genesis of NCE.

Objective: To perform a retrospective and cross-sectional evaluation of renal transplanted patients associating BKPyV and JCPyV polyomavirus with graft evolution.

Methodology: We assessed 247 kidney transplants at two moments, a retrospective study from 2013-2014 ($n=155$) and a cross-sectional observational study ($n=92$). For viral determination, the *Semi-Nested* Polymerase Chain Reaction technique was used. The relationship between viral infections and hematological and biochemical parameters was assessed. The presence of *decoy cells* in urine was evaluated by urinary cytology, as well as the association of BKPyV with the development of rejection (acute or chronic) and NCE.

Results and discussions: There was a low association between the positivity of *decoy cells* in urine and BKPyV infection. Patients with viremia for BKPyV presented high levels of plasma urea and decreased values of global leukocytes. The highest frequency of patients in the study were true negative for BKPyV (60%), with rare cases of rejection (acute or chronic) and without the development of NCE and this relationship showed a good sensitivity (82.8%). The results for JCPyV showed no significant differences. After regression analysis, only plasma creatinine levels, post-transplant rejection rates and cytomegalovirus viral infection remained independently associated with the development of NCE.

Conclusions: The diagnostic tests used in the study were more sensitive than specific and BKPyV infection was able to influence renal and hematological function of the patients evaluated.

Keywords: BK Virus. JC Virus. Rejection. Renal transplantation. Nephropathy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Partícula viral.....	20
Figura 2 – Organização genômica do BKPyV	23
Figura 3 – Ciclo Replicativo do BKPyV.....	25
Figura 4 – Tamanho do produto da 1ª e 2ª snPCR	47
Figura 5 – Avaliação da 2ª reação da snPCR para BKPyV e JCPyV e 1ª reação de β -actina	63
Figura 6 – Resultados da snPCR de BKPyV e JCPyV na urina e no plasma.....	66
Figura 7 – Evolução da creatinina em pacientes com diagnóstico positivo e negativo para BKPyV.....	68
Figura 8 – Evolução da ureia plasmática em pacientes com diagnóstico positivo e negativo para BKPyV	69
Figura 9 – Evolução da creatinina plasmática em pacientes com diagnóstico positivo e negativo para JCPyV.....	70
Figura 10 – Evolução da ureia plasmática em pacientes com diagnóstico positivo e negativo para JCPyV.....	71
Figura 11 – Avaliação dos níveis de creatinina e ureia e eRFG em função dos pacientes diagnosticados como BKPyV- e BKPyV+.....	72
Figura 12 – Avaliação dos níveis de creatinina e ureia e eRFG em função dos pacientes diagnosticados como JCPyV- e JCPyV+	73
Figura 13 – Avaliação dos níveis de creatinina e ureia e eRFG em função dos pacientes diagnosticados como BKPyV+ e JCPyV+	74
Figura 14 – Avaliação da contagem global de leucócitos, hemoglobina e plaquetas em função dos pacientes diagnosticados como BKPyV- e BKPyV+	75
Figura 15 – Avaliação da contagem global de leucócitos, hemoglobina e plaquetas em função dos pacientes diagnosticados como JCPyV- e JCPyV+	76
Figura 16 – Avaliação da contagem global de leucócitos, hemoglobina e plaquetas em função dos pacientes diagnosticados como BKPyV+ e JCPyV+.....	77
Figura 17 – Célula <i>decoy</i> observada no estudo transversal-observacional.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Poliomavírus associados a doenças humanas.	19
Tabela 2 – Fatores de risco potenciais para replicação viral do BKPyV e o desenvolvimento da nefropatia crônica do enxerto	31
Tabela 3 – Iniciadores e posição no genoma de BKPyV e JCPyV	46
Tabela 4 – Iniciadores e posição no genoma de BKPyV e JCPyV da segunda reação	47
Tabela 5 – Caracterização demográfica do estudo retrospectivo	53
Tabela 6 – Caracterização clínica e laboratorial do estudo retrospectivo	54
Tabela 7 – Evolução da creatinina e ureia plasmáticas dos pacientes do estudo retrospectivo.....	57
Tabela 8 – Caracterização demográfica do estudo transversal-observacional	58
Tabela 9 – Caracterização clínica do estudo transversal-observacional	59
Tabela 10 – Resultado do diagnóstico molecular de β -actina.....	64
Tabela 11 – Resultado do diagnóstico molecular de BKPyV e JCPyV	65
Tabela 12 – Frequência de células <i>decoy</i> após diagnóstico de BKPyV na urina ...	79
Tabela 13 – Frequência de células <i>decoy</i> após diagnóstico de BKPyV no plasma	79
Tabela 14 – Levantamento de dados das variáveis clínicas e laboratoriais de pacientes com NCE.....	81
Tabela 15 – Resultados da análise de regressão univariada.....	82
Tabela 16 – Resultados da análise de regressão multivariada.....	83
Tabela 17 – Frequência de nefropatas crônicos ou não relacionando a infecção por BKPyV na urina e no plasma.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AZA – Azatioprina

BKPyV – Poliomavírus BK

BKVN – nefropatia associada à infecção por BKPyV

CKD EPI – Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration

CMV – Citomegalovírus

COEP – Comitê de Ética em Pesquisa

DM – Diabetes mellitus

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DP – Diálise peritoneal

DRC – Doença renal crônica

DRPAD – Doença renal policística do adulto dominante

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – Ensaio imunoenzimático

eRFG – Ritmo de filtração glomerular estimado

EUA – Estados Unidos da América

EVE – Everolimus

HA – Hipertensão arterial

HD – Hemodiálise

HLA – Antígeno leucocitário humano

HPyV – Poliomavírus Humanos

IQ – Intervalo interquartilico

ITU – Infecções do Trato Urinário

IVIG – Imunoglobulina intravenosa

JCPyV – Poliomavírus JC

LES – Lúpus eritematoso sistêmico

MiRNA – MicroRNA

MMF_{Na} – MofetilMicofenolato de sódio

mRNA – RNA mensageiro

NCCR – Região de controle não codificante

NCE – Nefropatia crônica do enxerto

nsPCR – PCR *Semi-nested*

ORI – Origem de replicação

Pb – Pares de bases

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PDN – Prednisona

PML – Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva

qPCR – PCR quantitativa

RBT – Registro Brasileiro de Transplante

RFG – Ritmo de filtração glomerular

SIRO – Sirolimus

TAC – Tacrolimus

TAg – Antígeno tumoral grande

tAg – Antígeno tumoral pequeno

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

THYMO – Timoglobulina

Trunc-TAg – Segmento truncado do antígeno tumoral grande

Tx – Transplante

β-actina – Beta-actina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1.Poliomavírus	18
2.1.2. Organização genômica	22
2.1.3.Ciclo de multiplicação.....	24
2.1.4. Epidemiologia e modo de transmissão	26
2.1.5. Fatores de risco.....	28
2.1.6. Manifestações clínicas.....	32
2.1.7. Diagnóstico	34
2.1.8. Tratamento.....	37
3. OBJETIVOS	40
3.1 Objetivo geral.....	40
3.2 Objetivos específicos.....	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1. Aspectos éticos	41
4.2. Casuística	41
4.2.2. Estudo retrospectivo de 2013-2014	41
4.2.3. Estudo transversal-observacional	42
4.3. População do estudo retrospectivo.....	43
4.3.1. Critérios de inclusão	43
4.3.2. Critérios de exclusão	43
4.4. População do estudo transversal-observacional	43
4.4.1. Critérios de inclusão	43
4.4.2. Critérios de exclusão	43
4.5. Coleta de dados.....	44
4.6. Coleta das amostras do estudo transversal-observacional	44
4.6.1. Extração de DNA	45
4.6.2. Análises Moleculares	46
4.6.3. Otimização das condições de amplificação da PCR	49
4.6.4. Limite de detecção do BKPyV e JCPyV.....	49
4.6.5. Purificação do DNA	50

4.6.6. Sequenciamento do DNA.....	50
4.6.7. Análises citológicas	51
4.7 Análises estatísticas	51
5. RESULTADOS.....	53
5.1. Resultados do estudo retrospectivo de 2013 e 2014	53
5.2. Resultados do estudo transversal-observacional.....	58
5.2.1. Avaliação da PCR <i>Semi-Nested</i> (nsPCR) para detecção de BKPyV e JCPyV	62
5.2.2. Avaliação da prevalência de BKPyV e JCPyV na população estudada.....	64
5.2.3. Marcadores clínicos e laboratoriais.....	67
5.2.3.1. Evolução da creatinina e ureia plasmáticas.....	67
5.2.3.2. Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos em função do diagnóstico dos poliomavírus.....	72
5.2.3.3. Análises citológicas	78
5.2.3.4. Análise das biópsias renais.....	80
5.2.3.5. Análise de regressão.....	80
5.2.3.6. Fluxograma do estudo transversal-observacional	83
5.2.3.7. Desenvolvimento da NCE após análise de fluxograma.....	85
6. DISCUSSÃO	87
6.1. Caracterização clínica e demográfica do estudo retrospectivo de 2013-2014	87
6.2. Caracterização clínica, demográfica e laboratorial do estudo transversal-observacional	92
6.3. Diagnóstico molecular	96
6.4. Análises citológicas	99
6.5. Avaliação das biópsias renais.....	100
6.6. Análises de regressão	101
7. CONCLUSÕES	104
8. PERSPECTIVAS DO ESTUDO	105
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
ANEXO A – APROVAÇÃO COEP-UFMG	131
ANEXO B – APROVAÇÃO DO COEP DO HOSPITAL FELÍCIO ROCHO.....	134
ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	140

APÊNDICE A – CONDIÇÕES DA PCR <i>SEMI-NESTED</i>.....	147
APÊNDICE B – CONDIÇÕES DA PCR CONVENCIONAL DE B-ACTINA.....	148
APÊNDICE C – FLUXOGRAMA DO ESTUDO TRANSVERSAL-OBSERVACIONAL	149
APÊNDICE D – PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS.....	150

1 INTRODUÇÃO

O transplante renal representa a melhor opção de tratamento aos pacientes que sofrem de doença renal crônica terminal. Tem como vantagem a melhoria na qualidade de vida, permitindo maior liberdade na rotina diária do paciente (SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2017). O Brasil é o segundo país que mais realiza transplantes renais no mundo. Entre janeiro a março de 2019, o Registro Brasileiro de Transplantes (RBT) identificou 1.448 transplantes renais realizados no país, sendo 1.192 provenientes de doadores falecidos e 256 de doadores vivos. No ano de 2018 foram realizados 5.941 transplantes renais (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTES DE ORGÃOS - ABTO, 2019).

Alguns receptores permanecem com os rins transplantados e funcionantes por mais de 10 anos, mas em alguns casos o tempo de funcionamento do órgão não é tão longo. Um importante fator que influencia o tempo de funcionamento é o uso correto de imunossupressores. O rim transplantado também pode ser acometido por algumas doenças que poderão alterar sua função, como as infecções urinárias, infecções virais, obstruções na via de saída de urina e rejeições agudas ou crônicas. O organismo do paciente passa a reconhecer o rim recebido como estranho. Características relacionadas ao paciente que recebeu o órgão, como número de transfusões sanguíneas, transplantes anteriores, intercorrências no momento do transplante renal, além de características relacionadas ao próprio enxerto que foi doado terão impacto na duração do funcionamento do órgão (SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA, 2017). A disponibilidade de um grande número de drogas imunossupressoras auxiliou, significativamente, na redução dos casos de rejeição aguda do órgão transplantado. Entretanto, o mesmo fato favoreceu um aumento das complicações causadas por agentes virais nos pacientes transplantados renais, dentre eles podemos citar a influência dos poliomavírus nesta população (OLIVEIRA, 2012).

Os poliomavírus são considerados vírus onipresentes na população humana. São vírus não envelopados, genoma de DNA dupla fita, pertencentes à família *Polyomaviridae* (ICTV, 2018). Geralmente encontrados em estado de infecção assintomática e persistindo em diferentes tecidos. Em indivíduos

imunocomprometidos são capazes de causar doenças graves, a infecção pelo poliomavírus BK (BKPyV) pode ocasionar a estenose ureteral, cistite hemorrágica, nefropatia crônica do enxerto (NCE) ou mesmo a perda do enxerto renal e a infecção pelo poliomavírus JC (JCPyV) tem como principal manifestação clínica a leucoencefalopatia multifocal progressiva (PML), mas há relatos de sua relação com a nefropatia crônica do enxerto (PIRES, 2009; PINTO & DOBSON, 2014; VARELLA *et al.*, 2014; BICALHO, 2017).

O BKPyV é encontrado especialmente no trato urinário atingindo os transplantados renais. A infecção é considerada emergente nos transplantes, com potencial risco de rejeição ao enxerto e desenvolvimento da NCE (ICTV, 2018; VARELLA *et al.*, 2014). Enquanto o JCPyV acomete principalmente o sistema nervoso central (ASSETTA & ATWOOD, 2017; PINTO & DOBSON, 2014). Como o BKPyV permanece latente no tecido renal e está relacionado à imunossupressão, pacientes com insuficiência renal crônica e transplantados renais representam grupos de riscos potenciais, nos quais o diagnóstico precoce é essencial na prevenção desta infecção (ALVES, 2015).

A infecção primária pelos vírus ocorre durante a primeira década de vida sem sinais clínicos aparentes, com soroprevalência acima de 90% e, na população adulta, é encontrada em cerca de 80% dos indivíduos (VARELLA *et al.*, 2014; PINTO & DOBSON, 2014; BICALHO, 2017). A transmissão natural ainda não foi completamente esclarecida, mas suspeita-se que ocorra por via oral ou respiratória podendo ser reativados a partir de variações no estado imunológico. A virúria por BKPyV é encontrada entre 35-40% dos transplantados renais e a viremia, por sua vez, está presente entre 11-20% desta população. A viremia geralmente precede o desenvolvimento da NCE, sendo esta encontrada entre 0-8% dos transplantados (VARELLA *et al.*, 2014).

Considerando-se que a população de pacientes transplantados renais é altamente suscetível a quadros clínicos irreversíveis e com alta morbidade, faz-se necessária uma estratégia diagnóstica para identificar precocemente os casos de infecção por BKPyV e JCPyV, a fim de minimizar o risco de perda do enxerto dentre outras complicações (MONTAGNER *et al.*, 2007). Vale destacar que eles apresentam 75% de homologia entre seus nucleotídeos e devido a esta semelhança

genômica o diagnóstico representa um grande desafio. Além disso, não há uma metodologia molecular padronizada para identificação destes vírus existindo variações intralaboratoriais e interlaboratoriais que dificultam o seu diagnóstico (TROFE-CLARK & SAWINSKI, 2016). Embora para identificação da nefropatia crônica a biópsia renal e a histologia do aloenxerto permanecem como método de diagnóstico padrão-ouro (SHARMA *et al.*, 2016). A escolha de se fazer a biópsia deve ser individualizada em função do contexto e morfologia renal. Sabe-se que o benefício obtido com a realização da biópsia renal não é uniforme, sendo discutível o seu valor em diferentes situações clínicas (ANTUNES, 2013). Para JCPyV, a imuno-histoquímica de biópsias cerebrais e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de líquido são as metodologias mais precisas no diagnóstico da PML (DE SOUZA *et al.*, 2018). Entretanto, devido à dificuldade e o risco envolvidos na obtenção de tecido cerebral, a análise do líquido frequentemente é usada como teste substituto (PINTO & DOBSON, 2014).

Além disso, ainda não há terapia antiviral específica para BKPyV e JCPyV. Portanto, toda a terapêutica deve ser realizada de maneira cuidadosa com a utilização de imunossupressão adequada e individualizada para cada indivíduo. O diagnóstico tardio está geralmente associado ao declínio irreversível da função do enxerto com o desenvolvimento da nefropatia crônica do enxerto (ANTINORI *et al.*, 2003; CASTRO, 2006; VARELLA *et al.*, 2014).

Diante deste contexto e dada a relevância do assunto, a influência da infecção viral associada ao BKPyV e JCPyV sobre a função renal de pacientes transplantados, em especial o BKPyV, podem gerar grande impacto à saúde pública e ao desfecho clínico dos pacientes. Estudos contemplando o transplante renal e o uso de medicamentos imunossupressores utilizados no controle e prevenção da rejeição (aguda ou crônica) e perda do enxerto devem ser considerados. Além disso, a infecção por BKPyV parece menos comum e/ou menos relatada em prontuários médicos, o que poderia lançar o olhar sobre sua subnotificação (VAN AALDEREN *et al.*, 2012; VARELLA *et al.*, 2014).

O delineamento do estudo foi dividido em dois com o intuito de avaliar duas populações de transplantados renais do Hospital Felício Rocho. Um estudo retrospectivo para avaliação epidemiológica de pacientes submetidos ao transplante renal em 2013 e 2014. E um estudo transversal de receptores do transplante com o

intuito de realizar uma caracterização epidemiológica mas também avaliar a prevalência dos poliomavírus em amostras de urina e plasma em função do diagnóstico molecular por PCR *Semi-Nested* bem como identificar por citologia urinária a presença de inclusões virais em células epiteliais presentes na urina, relacionando os resultados moleculares aos parâmetros bioquímicos, hematológicos e citológicos avaliados. Estes pacientes do estudo transversal foram escolhidos aleatoriamente e realizaram o transplante em épocas distintas, há pacientes transplantados entre 1983 e 2019. Dessa forma, acredita-se que o presente estudo poderá contribuir para um melhor entendimento sobre o mecanismo de ação dos poliomavírus BKPyV e JCPyV relacionados a evolução do enxerto, especialmente associados à função renal e hematológica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Poliomavírus

Os poliomavírus representam uma família de pequenos vírus, não envelopados, com genomas de DNA de dupla fita de aproximadamente 5.000 pares de bases. A família *Polyomaviridae* é dividida em quatro gêneros que são *Alphapolyomavirus*, *Betapolyomavirus*, *Gammapolyomavirus* e *Deltapolyomavirus* (ICTV, 2018). Sendo formada por vírus que infectam o ser humano e diferentes espécies de animais, como macacos, bovinos, coelhos, peixes e camundongos (OLIVEIRA, 2012).

Até pouco tempo atrás, apenas dois poliomavírus eram identificados como vírus patogênicos em humanos, sendo estes representados pelo *JC polyomavirus* (JCPyV) e pelo BKPyV (MONTAGNER *et al.*, 2007; ICTV, 2018).

Um terceiro vírus conhecido pelo seu potencial patogênico em macacos *Rhesus*, o vírus SV40, também é relatado na literatura. Este vírus foi o primeiro da família *Polyomaviridae* a ser identificado como um contaminante das vacinas contra a poliomielite (MONTAGNER *et al.*, 2007).

O BKPyV é considerado o agente causal da NCE, cistite hemorrágica e estenose ureteral que acometem, principalmente, os pacientes imunocomprometidos, a exemplo dos transplantados (VAN AALDEREN *et al.*, 2012). Já o JCPyV é o agente etiológico da leucoencefalopatia multifocal progressiva (PML), que é uma doença neurodegenerativa fatal (ASSETTA & ATWOOD, 2017). Mas há relatos de associação do JCPyV com o desenvolvimento da NCE, porém em baixa proporção, mas os estudos ainda são pouco esclarecedores (BOUKOUM *et al.*, 2015).

A **Tabela 1** contém a espécie e as principais manifestações clínicas associadas aos poliomavírus. Entretanto, recentemente, como resultado de testes de sequenciamento, onze novos poliomavírus foram identificados em humanos, além do JCPyV e BKPyV. Na tabela estão listadas as novas espécies de poliomavírus encontradas em humanos.

O SV40 não foi incluído, uma vez que permanece em debate sobre as reais ações patogênicas em humanos (TROFE-CLARK & SAWINSKI, 2016).

Tabela 1 – Poliomavírus associados a doenças humanas

Espécie	Doenças humanas associadas
BK polyomavirus (<i>Human polyomavirus 1</i>)	Nefropatia, cistite hemorrágica e estenose ureteral
JC polyomavirus (<i>Human polyomavirus 2</i>)	Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva (PML) e nefropatia
<i>Human polyomavirus 3</i> “KI vírus”	Não associado a nenhuma doença até o momento
<i>Human polyomavirus 4</i> “WU vírus”	Associado a infecções respiratórias. No entanto, seu papel não é claro em crianças com insuficiência respiratória grave.
<i>Human polyomavirus 5</i> “Merkel cell polyomavirus”	Associado a carcinoma de células de Merkel
<i>Human polyomavirus 6</i>	Não associado a nenhuma doença até o momento
<i>Human polyomavirus 7</i>	Associado a rash, erupção cutânea pruriginosa e viremia em receptores de transplante pulmonar
<i>Human polyomavirus 8</i> “trichodysplasia spinulosa polyomavirus”	Associado a tricodisplasiaspinulosa
<i>Human polyomavirus 9</i>	Encontrado em transplantados renais de forma assintomática
<i>Human polyomavirus 10</i> “Malawi or MW polyomavirus”	Associado à diarreia
<i>Human polyomavirus 11</i> “Saint Louis polyomavirus”	Não associado a nenhuma doença até o momento
<i>Human polyomavirus 12</i>	Não associado a nenhuma doença, mas encontrado em transplantados renais e em tecidos hepáticos ressecados
<i>Human polyomavirus 13</i> “New Jersey polyomavirus”	Associado aos receptores de transplante de pâncreas que apresentaram cegueira e miopatiavasculítica

Fonte: TROFE-CLARK & SAWINSKI, 2016 (modificado); UDA *et al.*, 2018 (modificado).

O BKPyV pertence à família *Polyomaviridae* (anteriormente *Papovaviridae*), gênero *Betapolyomavirus*, espécie *Human polyomavirus 1*. Da qual também pertence o *JC polyomavirus*, gênero *Betapolyomavirus*, espécie *Human polyomavirus 2* (ICTV, 2018).

Estudos mais recentes, consideram que o JCPyV e o BKPyV apresentam 75% de homologia entre seus nucleotídeos (TROFE-CLARK & SAWINSKI, 2016). O JCPyV e o BKPyV partilham como características comuns a presença de genoma de DNA de dupla fita, o formato icosaédrico do capsídeo, a ausência de envelope, além da homologia (KHALILI & STONER, 2001).

O BKPyV foi isolado pela primeira vez em 1971, após a inoculação de células vero em amostras de urina de um homem sudanês de 39 anos que tinha sido submetido ao transplante renal devido a pielonefrite crônica, estenose ureteral e insuficiência renal avançada (HELLE *et al.*, 2017). As letras B e K correspondem as iniciais do nome do paciente (GARDNER *et al.*, 1971). Nesse mesmo ano, o JCPyV, também nomeado pelas iniciais J e C, foi relatado em paciente com linfoma de Hodgkin e leucoencefalopatia multifocal progressiva (TROFE-CLARK & SAWINSKI, 2016). Na **Figura 1**, foi ilustrada a partícula viral.

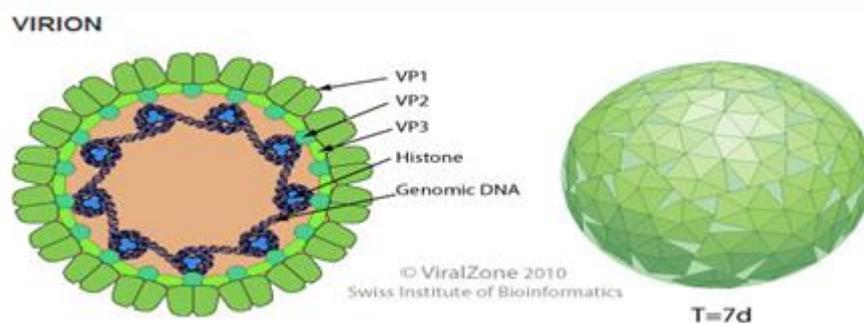


Figura 1: Partícula viral. VP1, VP2 e VP3 são proteínas virais do capsídeo. Genomic DNA= DNA genômico. Fonte: Viral Zone (2010).

No caso do BKPyV, a infecção inicial ocorre nas amígdalas com os monócitos infectados espalhando o vírus para outros tecidos e órgãos, particularmente o rim (HELLE *et al.*, 2017). Durante a infecção primária, esse vírus pode infectar células epiteliais e endoteliais de diversos órgãos e, a seguir, desenvolver latência no trato urinário, linfócitos B, glândulas salivares e nas células epiteliais da próstata

(SHINOHARA *et al.*, 1993; KNOWLES *et al.*, 2003; JEFFERS; MADDEN; WEBSTER-CYRIAQUE, 2009; COMAR *et al.*, 2011; COMERLATO, 2012).

Segundo Van Aalderen e colaboradores (2012), em indivíduos imunocompetentes, os reservatórios celulares encontrados da infecção latente por BKPyV incluem as células epiteliais escamosas cervicais, leucócitos do sangue periférico, células das glândulas salivares, células epiteliais glandulares da próstata e células uroteliais. Enquanto que o JCPyV está presente nos tecidos tonsilares de indivíduos saudáveis, nas células tubulares renais, medula óssea e cérebro (PINTO & DOBSON, 2014).

A maioria das infecções primárias associadas aos poliomavírus são assintomáticas e adquiridas na infância, sendo adquiridas através de contato direto pessoa a pessoa ou por exposição a superfícies contaminadas, alimentos e água (HIRSCH *et al.*, 2014). No caso do BKPyV, após a infecção primária, o vírus persiste nas células epiteliais do rim e do trato urogenital em um verdadeiro estado de latência viral (HELLE *et al.*, 2017). Em 5% a 10% da população saudável, o BKPyV pode ser reativado a partir de variações no estado imunológico e ser liberado em baixos títulos pela via urinária de forma assintomática (VARELLA *et al.*, 2014).

Embora sejam encontrados em indivíduos saudáveis, esses poliomavírus têm sido comumente relacionados com infecções virais oportunistas em indivíduos imunocomprometidos. Dentre as doenças mais comumente descritas para o BKPyV estão a cistite hemorrágica e nefropatia (COMERLATO, 2012). A infecção em receptores de transplante renal está associada à nefropatia e à estenose ureteral, ao passo que em receptores de transplante de células-tronco hematopoiéticas a associação ocorre com a cistite hemorrágica (VARELLA *et al.*, 2014). Enquanto que a leucoencefalopatia multifocal progressiva é a principal manifestação clínica associada ao JCPyV (PINTO & DOBSON, 2014).

Em transplantados renais, alguns genótipos de BKPyV ocasionam complicações importantes podendo levar inclusive à falência do rim enxertado. Além disso, o BKPyV têm demonstrado potencial oncogênico (COMERLATO, 2012). Devido à capacidade de latência no rim, não é de se surpreender que o doador possa ser uma importante fonte de infecção em transplantes renais. A soropositividade do doador tem sido relacionada ao desenvolvimento de virúria, viremia e, ainda,

nefropatia em crianças e adultos submetidos a transplantes desta natureza (NICKELEIT *et al.*, 2000; BOHL *et al.*, 2005). Os estudos sobre o papel do doador na transmissão do BKPyV ainda são pouco esclarecedores. Diante deste contexto, no presente estudo serão maior detalhados a organização genômica, ciclo de multiplicação, principais manifestações clínicas, diagnóstico e tratamento do BKPyV em relação aos demais poliomavírus.

2.1.2 Organização genômica

O JCPyV e BKPyV, assim como todos os poliomavírus humanos, são pequenos, medindo aproximadamente 45nm de diâmetro, não envelopados e com genoma de dupla fita de DNA circular composto de aproximadamente 5 mil pares de bases (pb) (SHAH, 1996; NEU; STEHLE; ATWOOD, 2009).

O genoma dos poliomavírus se replica bidirecionalmente a partir de uma origem única, conhecida como origem de replicação (ORI). Sendo composto por duas regiões altamente conservadas que codificam as proteínas das regiões inicial e tardia, separadas por uma região de controle não codificante (NCCR) de aproximadamente 400pb (HELLE *et al.*, 2017). Ou seja, composto por uma região codificante inicial, região codificante tardia e a região de controle não codificante, a qual contém os promotores virais e a origem da replicação do DNA genômico (COMERLATO, 2012; HELLE *et al.*, 2017).

Os genes precoces codificam o grande antígeno tumoral (TAg), os pequenos antígenos tumorais (tAg) e o segmento truncado do TAg (truncTAg) que é expresso por *splicings* alternativos de RNAs mensageiros (mRNAs) gerados logo após a infecção da célula hospedeira (HELLE *et al.*, 2017). O segmento truncTAg é derivado de um *splicing* alternativo do transcrito da proteína TAg (BOLLAG, 1989).

Os genes tardios, codificam as proteínas estruturais VP1, VP2, VP3, bem como a Agnoproteína (proteína não-estrutural), que são expressas após a replicação genômica ter sido iniciada. Estas proteínas são traduzidas de duas classes de RNAs tardios, 16S e 19S, que são gerados por *splicings* alternativos de um pré-mRNA comum. O RNA 19S é traduzido para produzir VP2 e VP3, enquanto as espécies de RNA 16S são traduzidos para produzir VP1 e Agnoproteína (HELLE *et al.*, 2017).

Enquanto as proteínas VP1, VP2 e VP3 compõem a estrutura do vírus, as proteínas T (TAg, tAg e truncTAg) estão relacionadas à multiplicação viral (JIN *et al.*, 1993).

A **Figura 2** ilustra a organização genômica do BKPyV, sendo as regiões inicial e tardia transcritas em direções opostas, a partir das fitas complementares de DNA.

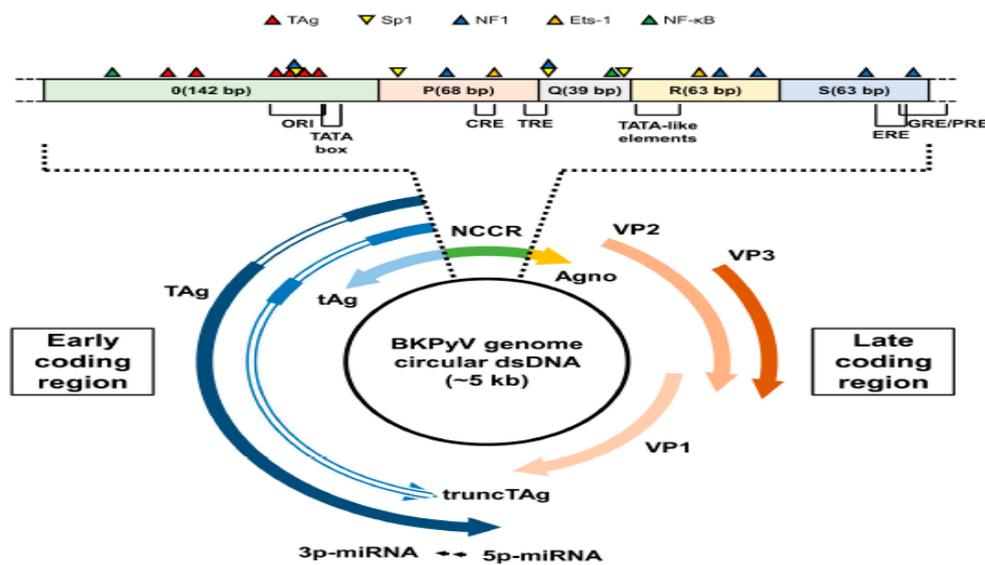


Figura 2: Organização genômica do BKPyV. Early coding region: região codificante inicial; Late coding region: região codificante tardia; BKPyV genome circular dsDNA (~5kb): DNA dupla fita circular do genoma de BKPyV (5kb); miRNA: micro-RNA; CRE: elemento responsivo do cAMP (AMP cíclico); TRE: elemento responsivo a éster de forbol; GRE / PRE: elemento responsivo a glicocorticóide/progesterona; ERE: elemento responsivo ao estrogênio; TATA box: sequência consenso promotora de eucariotos que leva à produção de RNAs mensageiros, conhecida como sequência -10 de procaríotos (TATAAT); ORI: origem de replicação; TATA-like elements: elementos semelhantes à sequência TATA (timina e adenina), NF1, Ets-1 e fator nuclear kB (NF-kB): fatores de transcrição. A) O genoma do BKPyV é uma cadeia fechada, circular, de dupla-fita. A transcrição de regiões de codificação inicial e tardia ocorrem de maneira bidirecional da origem de replicação (ORI) que está localizada dentro da NCCR. A região codificante inicial codifica o antígeno tumoral grande (Tag), antígeno tumoral pequeno (tAg) e o segmento truncado TAg (truncTAg). A região de codificação tardia codifica as proteínas do capsídeo viral VP1, VP2 e VP3, bem como a proteína Agno. Estas proteínas são traduzidas através dos RNAs tardios, 16S e 19S. O genoma do BKPyV também codifica dois miRNAs, 5p-miRNA e 3p-miRNA. A organização esquemática da NCCR do arquétipo BKPyV foi dividida em cinco blocos de sequência (O, P, Q, R e S) que inclui a origem de replicação (ORI), a TATA box e TATA-like elements. As posições de diferentes sítios para a ligação da TAg e os fatores de transcrição Sp1, NF1, Ets-1 e fator nuclear kB (NF-kB), bem como cAMP-, éster de forbol-, glicocorticóide/progesterona e elementos responsivos ao estrogênio (CRE, TRE, GRE / PRE e ERE, respectivamente) também foram mencionados. Fonte: HELLE *et al.*, 2017 (modificado).

A **Figura 2** ilustra os sítios de ligação dos fatores de transcrição (Sp1, NF1, Ets-1 e fator nuclear kB (NF-kB)) e os blocos de sequências (O, P, Q, R e S) existentes na NCCR.

2.1.3 Ciclo de multiplicação

O capsídeo viral é composto pelas proteínas estruturais VP1, VP2 e VP3. Os pentâmeros de VP1, dispostos em formato icosaédrico, formam o capsídeo externo. Em seu interior, os pentâmeros de VP1 possuem um sulco central na qual a VP2 e VP3 estão inseridas. O ciclo de multiplicação dos poliomavírus é bastante semelhante, mas difere no local de contato do vírus com os receptores da célula hospedeira e também o local de permanência do vírus na fase latente (ICTV, 2018; VAN AALDEREN *et al.*, 2012; PINTO & DOBSON, 2014; ASSETA & ATWOOD, 2017).

O ciclo de multiplicação do BKPyV é iniciado pela ligação da VP1 aos resíduos de ácido siálico na região $\alpha(2,3)$ " $\alpha(2,3)$ - linked sialic acids" com especificidade para a glicoproteína "*N-linked glycoproteins*" e/ou em gangliosídeos GD1b e GT1b presentes na membrana celular, processo conhecido como adsorção. Enquanto o JCPyV se liga aos resíduos de ácido siálico na região $\alpha(2,6)$ " $\alpha(2,6)$ - linked sialic acids" mas também pode se ligar na região $\alpha(2,3)$ citada (ICTV, 2018; VAN AALDEREN *et al.*, 2012; PINTO & DOBSON, 2014; ASSETA & ATWOOD, 2017).

Após o acoplamento, o vírus é internalizado por endocitose mediada por cavéolas. As cavéolas surgem de "bolsas lipídicas" (regiões da membrana plasmática enriquecidas em colesterol e gangliosídios), processo conhecido como penetração (VAN AALDEREN *et al.*, 2012).

Em seguida, transportado em direção ao retículo endoplasmático e complexo de Golgi via microtúbulos, onde será iniciado o processo de desnudamento. O capsídeo viral (parte externa) é desmontado para exposição de VP2 e VP3 que medeiam a entrada do poliomavírus no núcleo via importinas. O mecanismo preciso de desnudamento do capsídeo viral não é conhecido, mas parece envolver uma etapa de acidificação precoce e, em última análise, leva à clivagem de moléculas

VP1 e rearranjo do capsídeo. No núcleo, será iniciado o processo de multiplicação (HELLE *et al.*, 2017 ; VAN AALDEREN *et al.*, 2012).

A transcrição no sentido anti-horário da região de codificação inicial é o primeiro passo de replicação e leva à produção das proteínas TAg, tAg e truncTAg. Em seguida, múltiplas moléculas de TAg formam um complexo dodecamérico que se liga à origem viral de multiplicação do DNA agindo como uma helicase abrindo e desenrolando o DNA para iniciar a transcrição no sentido horário das regiões tardias (HELLE *et al.*, 2017; VAN AALDEREN *et al.*, 2012).

Após a multiplicação acontecer, os novos vírions formados vão se acumulando intranuclearmente, resultando na ruptura das membranas celulares, liberando a progênie do vírus para o espaço extracelular (HELLE *et al.*, 2017; VAN AALDEREN *et al.*, 2012). A **Figura 3** mostra o ciclo de multiplicação do vírus.

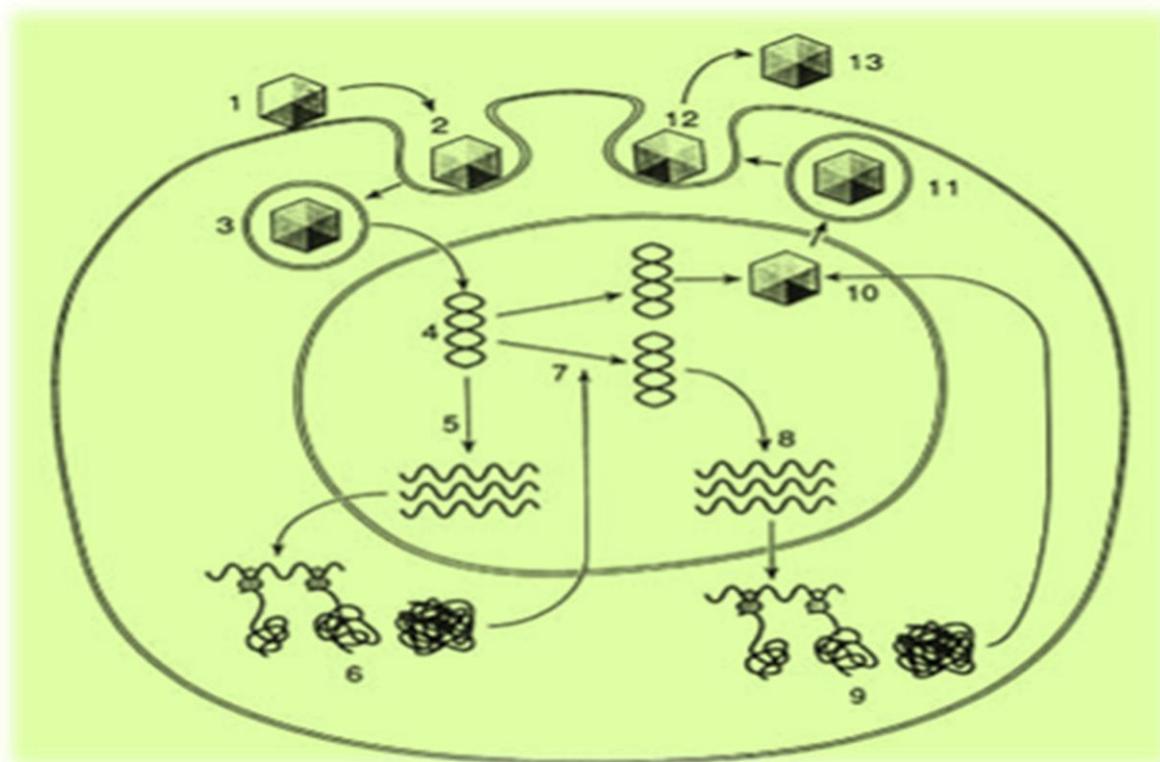


Figura 3: Ciclo replicativo do BKPyV. 1) Adsorção: ligação do BKPyV aos resíduos de ácido siálico na região “ $\alpha(2,3)$ -linked” com especificidade para as glicoproteínas N-ligadas “N-linked glycoproteins” e gangliosídeos. 2) Internalização/Penetração: entrada do BKPyV por endocitose utilizando mediadores de cavéolas lipídicas, com fosforilação da tirosina e acidificação ensossomal, se necessária. O vírus é transportado intracelularmente usando microtúbulos polimerizados. 3) Desnudamento: ocorre a desencapsidação e seu genoma é exposto, vesículas contendo BKPyV se fundem com o retículo endoplasmático e complexo de Golgi, onde ocorre o desnudamento de VP1 e exposição das partículas virais VP2 e VP3 que medeiam a entrada do

genoma no núcleo. 4) No núcleo será iniciado o processo de síntese e replicação do genoma viral. 5) Transcrição dos RNAs precoces. 6) Tradução proteínas precoces 7) Replicação do DNA genômico 8) Transcrição dos RNAs tardios 9) Tradução proteínas tardias. 10) Os novos vírions formados começam a se acumular intranuclearmente e nas regiões perinucleares, levando a ruptura das membranas nucleares. 11) Vírions transportados ao citoplasma. 12) Liberação das partículas virais para o exterior da célula. 13) Novas partículas virais iniciam um novo ciclo. Fonte: COMERLATO, 2012 (adaptado).

2.1.4 Epidemiologia e modo de transmissão

A soroprevalência do BKPyV em adultos é superior a 80% da população (EGLI *et al.*, 2009). Segundo estudos, os anticorpos séricos podem ser detectados em mais de 80% dos indivíduos com 21 anos, sugerindo que a maioria da população adulta no mundo tenha a infecção latente corroborando com a literatura, observa-se que aproximadamente 80% da população adulta é soropositiva para BKPyV e JCPyV (VARELLA *et al.*, 2014; PINTO & DOBSON, 2014; BICALHO, 2017; HELLE *et al.*, 2017). Em um estudo com 400 doadores de sangue, a soroprevalência do vírus BKPyV em pacientes com idade entre 20 a 29 anos foi de 87%, e diminuiu para 71% em pacientes com idade entre 50 a 59 anos. Enquanto que a soroprevalência de JCPyV em pacientes com idade entre 20 a 29 anos foi de 50% e aumentou para 68% em pacientes com idade entre 50 a 59 anos (TROFE-CLARK & SAWINSKI, 2016).

A prevalência do JCPyV varia no mundo, afetando cerca de 80% da população mundial. No estudo de Imperiale e colaboradores (2007) foi mostrado uma prevalência da excreção urinária de JCPyV de aproximadamente 40% nos Estados Unidos e 75% no Japão. Os pacientes infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) correspondem a quase 80% dos casos de PML, sendo que apenas 1% a 3% desses pacientes desenvolvem a PML. Contudo, pouco se sabe a respeito da prevalência da excreção urinária do poliomavírus em indivíduos com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), sem PML no Brasil (IMPERIALE & MAJOR, 2007; KEAN *et al.*, 2009, CENTRONE, 2009).

A nefropatia crônica associada à infecção por BKPyV ocorre em cerca de 5% dos receptores do transplante renal, a maioria sendo acometida um ano após o transplante. Casos de estenose ureteral apresentam uma prevalência de 2 a 6% dos transplantados renais. A reativação do BKPyV é comum em receptores do

transplante de células tronco hematopoiéticas, ocorrendo a virúria em cerca de 47 a 94% dos receptores e viremia em cerca de 23 a 53%. O desenvolvimento da cistite hemorrágica está presente em 6 a 29% destes pacientes, geralmente dentro dos dois primeiros meses após o transplante de células-tronco hematopoiéticas (VAN AALDEREN *et al.*, 2012). Em 5% a 10% da população saudável, o BKPyV pode ser reativado a partir de variações no estado imunológico e ser excretado em baixos níveis pela via urinária de forma assintomática. No entanto, alterações histopatológicas não são observadas no parênquima renal e a função dos rins permanece intacta (VARELLA *et al.*, 2014). O BKPyV pode ser encontrado na urina em 7% dos indivíduos saudáveis, mas nunca no plasma (VAN AALDEREN *et al.*, 2012).

Quatro genótipos distintos do BKPyV foram identificados (I-IV), sendo o genótipo I, o mais comum em todas as regiões geográficas (TROFE-CLARK & SAWINSKI, 2016). A distribuição geográfica dos subtipos sugere uma relação estreita entre o BKPyV e a migração de populações humanas, embora não tenha qualquer significado clínico aparente (VARELLA *et al.*, 2014). O tipo I é o mais prevalente mundialmente e é dividido em quatro subtipos (Ia, Ib-1, Ib-2 e Ic) (SHARMA *et al.*, 2006; TAKASAKA *et al.*, 2004; IKEGAYA *et al.*, 2006; ZHENG *et al.*, 2007, 2008; NISHIMOTO *et al.*, 2007; ZHONG *et al.*, 2009; COMERLATO, 2012).

O subgrupo Ib2 é mais prevalente na Europa e no oeste da Ásia. O subgrupo Ia na África, o Ic no nordeste asiático e o Ib1 no sudeste asiático. O subtipo IV apresenta seis subgrupos IVa1, IVa2, IVb1, IVb2, IVc1, IVc2 (CHEHADEH & NAMPOORY, 2013). O tipo IV tem sua distribuição geográfica limitada ao leste asiático, enquanto que os tipos II e III são pouco distribuídos mundialmente (SHARMA *et al.*, 2006; TAKASAKA *et al.*, 2004; IKEGAYA *et al.*, 2006; ZHENG *et al.*, 2007; NISHIMOTO *et al.*, 2007; ZHONG *et al.*, 2009; COMERLATO, 2012). No Brasil, no estudo de Zalona e colaboradores (2011) com pacientes no Rio de Janeiro, identificou maior prevalência do genótipo I, com predomínio dos subtipos Ib1 e Ia, detectados em 67% e 29% das amostras estudadas, respectivamente. O genótipo II esteve presente em 4% das amostras e os sorotipos III e IV não foram encontrados (ZALONA *et al.*, 2011). Já a distribuição dos genótipos do JCPyV mostra-se heterogênea em regiões geográficas específicas. O JCPyV tipo 1 predomina na Europa e nos Estados Unidos da América (EUA) (SUGIMOTO *et al.*, 1997), enquanto

que o tipo 2 é encontrado na Ásia, subtipo-2a predomina no nordeste da Ásia e o 2b no oeste deste continente (JOBES *et al.*, 1998). O JCPyV tipos 3 e 6 são mais prevalentes na Tanzânia (AGOSTINI *et al.*, 1995) e em Gana (GUO *et al.*, 1996), respectivamente. O tipo 4, o qual é encontrado apenas nos EUA, parece ser um recombinante da maior parte do genoma do genótipo 1 com um curto segmento do gene VP1 do tipo 3 (AGOSTINI; RYSCHKEWITSCH; STONER, 1996; AGOSTINI *et al.*, 1997). O JCPyV tipo 5 é um resultado da recombinação entre o subtipo 2b e o tipo 6 (HATWELL & SHARP, 2000). A estirpe dominante no sul da China e no sudeste da Ásia é o JCPyV tipo 7 que é, filogeneticamente, mais próximo do tipo 2 (JOBES *et al.*, 1998).

O modo de transmissão dos poliomavírus na população é, ainda, pouco compreendido, porém múltiplas rotas de infecção provavelmente estejam envolvidas (RANDHAWA, *et al.*, 2005). Suspeita-se que ela ocorra por via respiratória ou oral (VARELLA, *et al.*, 2014). Devido à excreção viral através da urina, é muito provável que a transmissão por fômites, comida ou água contaminada sejam importantes meios de transmissão (BOFIL-MAS; PINA; GIRONES, 2000).

Outro estudo demonstrou que a transmissão pode ocorrer por via fecal-oral, respiratória, por meio de transfusões de sangue, transplante de órgãos, via transplacentária e por fluido seminal. Após a infecção primária, os vírus entram numa fase latente podendo ser detectado em diversos tecidos (PINTO & DOBSON, 2014). A maioria das infecções primárias são assintomáticas e adquiridas na infância (HIRSCH *et al.*, 2014).

2.1.5 Fatores de Risco

Os fatores de risco associados com a replicação viral e o desenvolvimento da nefropatia crônica do enxerto ocasionada pelos poliomavírus incluem determinantes do doador, do enxerto e do receptor (KROTH, 2007).

Elevados níveis séricos de anticorpos para BKPyV em doadores de rim estão associados com aumento do risco de doenças associadas ao BKPyV no receptor, uma vez que a presença de anticorpos séricos é um indicativo de sensibilização do doador ao vírus e a presença de níveis elevados possivelmente está relacionada a

replicação ativa pelo BKPyV. Além disso, ainda não está definido o papel da incompatibilidade HLA entre doador e receptor na patogênese da nefropatia crônica associada ao BKPyV (HIRSCH *et al.*, 2002; AWADALLA *et al.*, 2004).

Foi mostrado na literatura que a NCE associada ao BKPyV está significativamente associada ao número de incompatibilidades HLA entre o doador e o receptor. Parece haver uma relação entre incompatibilidade HLA e risco aumentado de rejeição e infecção por BKPyV devido à liberação de fatores relacionados à rejeição e injúria, bem como aumento da imunossupressão (HIRSCH *et al.*, 2002; AWADALLA *et al.*, 2004).

Com relação ao receptor, a idade avançada e o sexo masculino parecem estar relacionados com maior incidência de infecção por poliomavírus. Além do uso de imunossupressores, o desenvolvimento da NCE tem sido associado ao uso destes medicamentos, como o tacrolimus (inibidor de calcineurina), o micofenolato mofetil (MMF) que é inibidor da inosina monofosfato desidrogenase e terapia com anticorpos policlonais anti-célula T que são administrados para o tratamento de rejeição ao enxerto. Segundo dados da literatura, o tacrolimus está associado a maior ocorrência de virúria e viremia (KROTH, 2007; VAN AALDEREN *et al.*, 2012).

No estudo de Huang e colaboradores (2010) em uma população chinesa foi relatado uma taxa significativamente menor de infecção por BKPyV associada ao uso de ciclosporina (inibidor de calcineurina) em relação ao tacrolimus quando ambos foram administrados em combinação com MMF. A ciclosporina parece exercer um efeito antiviral sobre o BKPyV através da supressão da replicação viral, o que não é observado com o tacrolimus que é um imunossupressor muito mais potente que a ciclosporina (HUANG *et al.*, 2010; SUWELACK *et al.*, 2012).

Outros estudos sugerem que a intensidade, o uso contínuo e cumulativo de agentes imunossupressores aumentam o risco de desenvolvimento da NCE, ao invés de estar vinculado a um único medicamento. Ainda não está claro se o desenvolvimento da nefropatia crônica é atribuível a fatores qualitativos e/ou quantitativos relacionados à supressão imunológica (RAMOS *et al.*, 2002; KROTH, 2007; VAN AALDEREN *et al.*, 2012).

Toyoda e colaboradores (2005), mostraram que a infecção por citomegalovírus (CMV) está significativamente associada à infecção por BKPyV. Em

12 pacientes com viremia positiva para BKPyV, seis apresentaram concomitantemente positividade para CMV, uma associação significativamente positiva ($p=0,001$) quando comparados a pacientes sem viremia para BKPyV (3 CMV positivos em 57 BKPyV negativos).

A co-infecção com o CMV é sugestivo de uma possível associação de fatores de risco entre as duas infecções. Segundo dados da literatura, a co-infecção com CMV representa um possível ativador associado à replicação viral de BKPyV. Como as infecções por CMV são comuns no transplante renal e as células epiteliais tubulares são afetadas tanto pelo BKPyV quanto pelo CMV, esta relação poderia representar um potencial fator de risco para o desenvolvimento de doenças associadas com o BKPyV (HOWELL *et al.*, 1999; HIRSCH *et al.*, 2002; TOYODA *et al.*, 2005).

Embora a co-infecção de CMV com BKPyV tenha sido relatada nos rins, medula óssea e transplante de células-tronco, uma significativa associação entre eles e a ativação sinérgica destes vírus em receptores de transplante de órgãos sólidos ainda não está bem estabelecido (HOWELL *et al.*, 1999; HIRSCH *et al.*, 2002; TOYODA *et al.*, 2005).

O nível de imunossupressão é o fator de risco mais consistente para o desenvolvimento da viremia causada pelo BKPyV em receptores do transplante renal, sendo, também, o principal fator para o desenvolvimento da infecção sintomática por BKPyV (TROFE-CLARK & SAWINSKI, 2016).

Na **Tabela 2** foram listados alguns fatores de risco potencialmente relacionados à replicação viral e a nefropatia crônica do enxerto que incluem o tipo de transplante (renal ou outro), a sorologia e genótipo do receptor/doador, função renal prejudicada, sexo masculino, infecções oportunistas, raça não-afro-americana, idade avançada do receptor, tratamento para rejeição, terapia imunossupressora, o grau de incompatibilidade do antígeno leucocitário humano (HLA), a presença de alelos de HLA C7, tempo prolongado de isquemia fria, status sorológico de BKPyV do doador/receptor, uso de stents ureterais, co-infecção por citomegalovírus, lesões adquiridas, diabetes pré-existente, entre outras variáveis (TROFE-CLARK & SAWINSKI, 2016).

Tabela 2 – Fatores de risco potenciais para replicação viral do BKPyV e o desenvolvimento da nefropatia crônica do enxerto

Fatores de risco potenciais para replicação viral do BKPyV e desenvolvimento da NCE		
Fatores de riscos relacionados ao doador	Fatores de riscos relacionados ao procedimento do transplante	Fatores de riscos relacionados ao receptor
Tipo de transplante (renal ou outro)	Intensidade da imunossupressão (mais comumente associada com regimes com tacrolimus/ mofetil micofenolato)	Idade (pediátrica, adulta ou idoso), sendo a idade avançada a população de maior risco
Sorologia do BKPyV (doador soropositivo)	Função renal prejudicada	Sorologia do BKPyV
Genótipo do BKPyV	Episódios de rejeição aguda (imunossupressão aumentada para tratar)	Genótipo do BKPyV
Presença ou ausência do HLA C7	Outras infecções oportunistas Tempo prolongado de isquemia fria	Presença ou ausência do HLA C7 Recebeu o aloenxerto incompatível com ABO (imunossupressão mais intensa)
Lesão adquirida	Colocação de stent ureteral	Sexo masculino
Rim proveniente de doador falecido	Duração da avaliação de acompanhamento pós-transplante	Etnicidade (não Americano-Africano); Diabetes pré-existente Co-infecção com Citomegalovírus

Fonte: TROFE-CLARK & SAWINSKI, 2016 (modificado).

Assim como para BKPyV, a infecção pelo JCPyV está associada as alterações no estado imunológico. Condições como síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), tratamento quimioterápico, terapias biológicas para doenças auto-imunes, como lúpus, esclerose múltiplas, artrite reumatóide, psoríase, doença de Crohn foram associadas à infecção sintomática pelo JCPyV (TROFE-CLARK & SAWINSKI, 2016).

Os mecanismos de persistência e reativação viral ainda são uma verdadeira incógnita, as características de cada proteína viral devem ser levadas em

consideração e os tipos de células que servem como reservatórios virais. Também deve-se perguntar se a infecção e persistência em estado latente desses vírus, geralmente benignos, conferem alguma proteção ao hospedeiro (DeCAPRIO & GARCEA, 2013).

2.1.6 Manifestações clínicas

A leucoencefalopatia multifocal progressiva (PML) é a principal manifestação clínica associada ao JCPyV. A PML é uma doença neurodegenerativa fatal caracterizada pela infecção lítica de JCPyV que acomete os oligodendrócitos e astrócitos no sistema nervoso central. Após a lise celular, o JCPyV se espalha para áreas vizinhas destruindo os oligodendrócitos e levando à desmielinização. A falta de mielina leva à disfunção axonal e, finalmente, pode resultar na perda permanente de neurônios. Os sintomas mais comuns são caracterizados por disfunção motora, defeitos visuais e dificuldades de fala. Outras doenças associadas ao JCPyV são a neuropatia de células granulares, encefalite, meningite e nefropatia crônica associada ao JCPyV. Mas poucos casos são observados de sintomatologia associada ao JCPyV em pacientes transplantados renais (PINTO & DOBSON, 2014). Mas o seu estudo nesta população é importante, uma vez que há tropismo pelo trato urinário e apesar da baixa associação com alterações renais, existe homologia nucleotídica com o BKPyV de cerca de 75%, o que dificultaria o diagnóstico específico do vírus BKPyV. Portanto, o estudo molecular de ambos os vírus nesta população se faz necessária.

A infecção pelo BKPyV em pacientes imunocomprometidos tem sido associada com várias manifestações clínicas, sendo as mais proeminente a nefropatia crônica, estenose ureteral e cistite hemorrágica. Também pode estar associado a malignidades. Outras manifestações clínicas menos aparentes incluem a encefalite, retinite, infecções do trato respiratório e vasculopatia (VAN AALDEREN *et al.*, 2012).

A estenose ureteral e a cistite hemorrágica são alterações renais fortemente associadas à infecção pelo BKPyV. A estenose ureteral ocorre principalmente nos pacientes transplantados renais e seu desenvolvimento está diretamente relacionado com a viremia destes pacientes (COLEMAN *et al.*, 1978; GEDDES *et al.*,

2011; COMERLATO, 2012). As manifestações clínicas ocorrem em, aproximadamente, 2 a 6% dos pacientes transplantados renais e se desenvolve, geralmente, vários meses após o transplante. O vírus pode exercer um efeito citopático direto sobre o epitélio do ureter, resultando em inflamação e ulceração, o que causa uropatia obstrutiva (BOHL & BRENNAN, 2007; WESTERVELT *et al.*, 2013; VARELLA *et al.*, 2014).

Na estenose ureteral, observa-se que o segmento do ureter parece ser isquêmico e fibrótico, e numerosos virions são encontrados no revestimento de células epiteliais do lúmen do ureter (VAN AALDEREN *et al.*, 2012).

A cistite hemorrágica é uma condição clínica que acomete principalmente os pacientes transplantados de medula óssea. Outros vírus vinculados com a imunossupressão, tais como o citomegalovírus e o adenovírus, também podem desencadear esta doença. A forma grave da cistite hemorrágica é a falência renal em função do desenvolvimento secundário da nefropatia. A doença pode ter uma remissão natural. Se isso não ocorrer, se faz uso de tratamento suporte, já que não há tratamento específico (HARKENSEE *et al.*, 2008; GAZIEV *et al.*, 2010).

Ela ocorre em 6% a 29% dos pacientes receptores de transplante de células-tronco hematopoiéticas, geralmente dentro dos primeiros dois meses após o transplante. Os pacientes apresentam hematúria, micção dolorosa, cólica vesical e/ou dor no flanco (BOHL & BRENNAN, 2007; VARELLA *et al.*, 2014). Quatro graus de gravidade da doença são atualmente reconhecidos: grau I: hematúria microscópica; grau II: hematúria macroscópica; grau III: hematúria e coágulos; e grau IV: hematúria com coágulos, retenção de coágulo e insuficiência renal devido a nefropatia obstrutiva (VAN AALDEREN *et al.*, 2012).

O BKPyV tem sido associado a várias neoplasias humanas, entre as quais se destacam o carcinoma de bexiga e de próstata, tumores cerebrais, tumores de ilhotas pancreáticas, Sarcoma de Kaposi, Sarcoma de Ewing e Sarcoma Osteogênico (VAN AALDEREN, *et al.*, 2012).

Na NCE o diagnóstico é histopatológico sendo dividido em três estágios de gravidade (A, B e C). O estágio A é caracterizado por alterações citopáticas virais do parênquima renal quase normal e sem atrofia tubular mínima, fibrose intersticial ou inflamação, seguido do estágio B onde há progressão desses sinais clínicos citados

e estágio C onde o tecido renal está difusamente cicatrizado com extensa atrofia, fibrose intersticial e inflamação (VAN AALDEREN, *et al.*, 2012).

A nefropatia crônica resulta da multiplicação viral no tecido renal e é caracterizada por infecção histologicamente manifesta do aloenxerto renal e deterioração da função do enxerto (DHARNIDHARKA; ABDULNOUR; ARAYA, 2011). Em torno de 5% dos casos de rejeição devido a NCE ocorrem no primeiro ano após o transplante (HIRSCH *et al.*, 2002). O desenvolvimento da nefropatia crônica associada ao poliomavírus está relacionado com uma gama de agentes imunossupressores em combinação com diferentes dosagens da imunossupressão (HIRSCH *et al.*, 2002; COMERLATO, 2012). O desenvolvimento da doença é inicialmente observado através da virúria, precedida pela viremia e, posteriormente, pelas lesões renais irreversíveis ao enxerto renal, podendo, então, levar à perda do rim transplantado (BABEL *et al.*, 2009). Sendo assim, detectar e acompanhar a virúria precocemente principalmente nos pacientes transplantados são as principais formas de se identificar o desenvolvimento da nefropatia crônica associada ao poliomavírus (SAUNDH *et al.*, 2012).

2.1.7 Diagnóstico

Os poliomavírus podem ser detectados na urina, no sangue total, no plasma, no soro, nos tecidos e no líquido cefalorraquidiano. Os métodos diagnósticos incluem exame citológico, imunofluorescência, ensaio imunoenzimático (ELISA), hibridização *in situ*, imuno-histoquímica, exame histológico, microscopia eletrônica e reação em cadeia da polimerase (PCR). A PCR é o método de escolha para detectar a replicação ativa na urina ou no sangue (DE SOUZA *et al.*, 2018).

Para JCPyV, a imuno-histoquímica de biópsias cerebrais e PCR de líquido são as metodologias mais precisas para se diagnosticar leucocencefalopatia multifocal progressiva (DE SOUZA *et al.*, 2018). A biópsia cerebral é considerada o diagnóstico padrão-ouro, com sensibilidade de 64-96% e especificidade de 100%. Devido à dificuldade e o risco envolvidos na obtenção de tecido cerebral, a análise do líquido freqüentemente é usada como teste substituto (PINTO & DOBSON, 2014).

Não existem terapias antivirais eficazes para prevenir ou tratar a replicação viral ou a nefropatia crônica associada ao vírus. Recomenda-se a pesquisa de vírus

no sangue e/ou na urina para identificar os receptores de transplante renal em risco de adquirirem complicações, permanecendo a biópsia renal como método padrão ouro para o diagnóstico de nefropatia crônica associada ao poliomavírus. Apesar do leque de exames disponíveis, a metodologia ideal não foi padronizada, acredita-se que o diagnóstico molecular seria o melhor método. As normas e diretrizes nacionais e internacionais publicadas para monitorizar a multiplicação viral recomendam uma triagem mais intensa no primeiro ano pós-transplante e quando uma disfunção renal de causa inexplicada for identificada (TROFE-CLARK & SAWINSKI, 2016).

Diferentes testes de triagem para o diagnóstico do poliomavírus têm sido desenvolvidos, entre os quais se destacam a detecção de DNA viral ou mRNA do gene VP1 na urina, a detecção do DNA no plasma e por microscopia eletrônica, a citologia com demonstração de células contendo inclusões virais, a exemplo das *células decoy* encontradas na urina de pacientes infectados pelo BKPyV que podem ser analisadas por coloração em papanicolau e imuno-histoquímica e as células de *Haufen* que podem ser detectadas na urina por microscopia eletrônica. Assim como ensaios quantitativos de carga viral oriundos de ácidos nucléicos provenientes de amostras de urina ou sangue que estão sendo amplamente utilizados no diagnóstico (OLIVEIRA, 2012; VARELLA *et al.*, 2014).

No caso do BKPyV, a detecção da viremia é considerada mais preditiva de infecção associada à nefropatia do que apenas a detecção da virúria. No entanto, alguns centros médicos optam por utilizar a citologia como a principal técnica de triagem (OLIVEIRA, 2012).

Estudos têm demonstrado que as alterações citológicas (detecção de células *decoy*) e o DNA de poliomavírus são detectados na urina algumas semanas antes de ocorrerem as lesões renais. As células *decoy* podem ser observadas no sedimento urinário como o resultado de células renais e uroteliais infectadas por BKPyV (PINTO *et al.*, 2016).

As células *decoy* são células epiteliais do trato urinário. Vale ressaltar que o termo célula *decoy* se aplica exclusivamente às células epiteliais que exibem citomorfologia característica em espécimes urinários. Independentemente se essas células são de origem tubular renal ou de origem urotelial vesical, o modelo

citomorfológico de células *decoy* inclui características citoplasmáticas e nucleares específicas (CHANTZANTONIOU; JOUDEH; AL-ABBADI, 2016).

Estas células apresentam alta relação núcleo/citoplasma e quatro tipos morfológicos destas foram descritos na literatura, sendo elas: células *decoy* do tipo 1 (clássicas), caracterizadas como corpos de inclusão intranucleares semelhante a um vidro fosco grande, homogêneo e amorfo, e uma borda de cromatina condensada; células *decoy* do tipo 2 que possuem inclusões intranucleares granulares circundadas por um halo claro, isto é, semelhante ao citomegalovírus (CMV); células *decoy* do tipo 3, células multinucleadas com cromatina granular; células *decoy* do tipo 4, células que possuem núcleo vesicular com cromatina e nucléolos agrupados. Essas inclusões podem parecer morfológicamente semelhantes às inclusões de CMV e adenovírus. No entanto, existem diferenças morfológicas triviais que ajudam a diferenciá-las. Apesar de ser um exame relativamente barato, a detecção de células *decoy* requer habilidade considerável (GEETHA *et al.*, 2012; PINTO *et al.*, 2016).

O diagnóstico da nefropatia crônica associada ao BKPyV é a biópsia renal, considerada técnica de diagnóstico padrão-ouro, porém a escolha de se fazer a biópsia é discutível e deve ser individualizada em função do contexto e morfologia renal do paciente, além de ser um procedimento invasivo. A biópsia renal pode ser realizada por microscopia eletrônica, imunofluorescência e hibridização *in situ*. Por ter uma distribuição irregular que afeta principalmente a medula renal, duas amostras de biópsia de fragmento incluindo a medula devem ser obtidas, a fim de se confirmar a presença do BKPyV por hibridização *in situ* ou imunohistoquímica para antígeno T. Os padrões histológicos foram divididos em três tipos, caracterizados pela presença de inclusões nucleares (Tipo A), inflamação aguda com pouca fibrose crônica (Tipo B) ou fibrose crônica significativa e atrofia (Tipo C). Em 25-40% dos pacientes com altos níveis de virúria/positividade para células *decoy* há o desenvolvimento de viremia (NICKELEIT & MIHATSCH, 2006; DHARNIDHARKA; ABDULNOUR; ARAYA, 2011; VARELLA *et al.*, 2014).

O monitoramento da carga viral por PCR quantitativo representa uma importante ferramenta no manejo da nefropatia associada ao vírus em pacientes transplantados. Contudo, existe uma variabilidade nos resultados da PCR devido a polimorfismos em genes virais entre os diferentes subtipos do vírus, além da falta de

padronização dos ensaios de PCR entre os diferentes laboratórios (HASAN *et al.*, 2016).

Ainda não há um ensaio padrão universal de monitoramento dos poliomavírus por PCR em tempo real, o que leva a variabilidade dos ensaios intralaboratorial e interlaboratorial para quantificação viral e uma variação nos limites de detecção, como descrito anteriormente, dificultando a padronização diagnóstica. Por este motivo, recomenda-se a comparação da carga viral pelo mesmo ensaio de teste de ácido nucleico, de preferência no mesmo laboratório, que também deve estar operando de acordo com programas de garantia de qualidade e certificados para o diagnóstico de transplantes (TROFE-CLARK & SAWINSKI, 2016). A PCR *Semi-Nested* é um método molecular de triagem sensível e de baixo custo, podendo ser útil especialmente em centros com poucos recursos financeiros para custeio dos materiais e reagentes da PCR em tempo real (DE SOUZA *et al.*, 2018).

No entanto, devido à semelhanças genéticas (acima de 70%) e diversidade de sorotipos e genótipos do vírus, a diferenciação de BKPyV e JCPyV por métodos moleculares representa um desafio (DE SOUZA *et al.*, 2018). Por outro lado, a PCR quantitativa oferece vantagens como rapidez, alta sensibilidade e alta especificidade, permite a diferenciação viral pelo uso de oligonucleotídeos espécie-específicos, facilita a caracterização de diferentes espécies, apenas pela avaliação do tamanho do produto amplificado pela reação (KAMMERER; KUNKEL; KORN, 1994; HASAN *et al.*, 2016). Apesar da variedade de métodos de rastreamento disponíveis, a metodologia ideal ainda não foi definida (TROFE-CLARK & SAWINSKI, 2016).

2.1.8 Tratamento

Não existe um algoritmo de tratamento padronizado para infecções por BKPyV pós-transplante. A intensidade do tratamento imunossupressor após o transplante renal parece ser a questão chave na patogênese da replicação do BKPyV. Reduzir a imunossupressão tornou-se prática atual na maioria dos centros de transplantes contra o desenvolvimento da infecção por BKPyV (VAN AALDEREN, *et al.*, 2012; AHLENSTIEL-GRUNOW & PAPE, 2018).

Terapias antivirais como de uso de cidofovir, leflunomida, fluoroquinolonas e imunoglobulina intravenosa (IVIG) são tratamentos a serem considerados. Alguns estudos *in vitro* mostraram inibição da replicação do DNA dos vírus por essas estratégias antivirais, mas ainda faltam estudos controlados e randomizados *in vivo* mais aprofundados. Em contraste com o cidofovir, leflunomida e IVIG, as fluoroquinolonas podem estar associadas a alguma eficácia profilática (AHLENSTIEL-GRUNOW & PAPE, 2018).

A imunossupressão baseada no uso de tacrolimus está associada com um risco aumentado de viremia e de desenvolvimento de complicações como a nefropatia associada ao BKPyV. Em um estudo recente, as terapias contendo inibidor de mTOR mostraram uma incidência reduzida de viremia após o transplante renal, especialmente em combinação com baixas doses de ciclosporina em oposição ao tacrolimus. Além disso, as replicações de BKPyV em células epiteliais tubulares renais podem ser inibidas pelo uso de ciclosporina, inibidor de mTOR, sirolimus, mas ativadas pelo uso de tacrolimus (AHLENSTIEL-GRUNOW & PAPE, 2018).

A maioria dos pacientes com viremia para BKPyV desenvolverá NCE, sendo as triagens regulares de análise da reativação de BKPyV, principalmente durante os primeiros dois anos após o transplante, o procedimento mais comumente adotado pelos centros transplantadores. A eliminação ou redução bem-sucedida da viremia é realizada em mais de 80% dos pacientes após quatro a seis meses de tratamento de redução da imunossupressão. E a viremia deve ser continuamente monitorada a cada duas a quatro semanas, juntamente com os níveis de creatinina sérica e também deve ser realizada a biópsia do enxerto. Após a redução da imunossupressão, a função renal deve ser cuidadosamente monitorada por conta do risco de rejeição (KDIGO, 2009; SCHAUB *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2014; VARELLA *et al.*, 2014).

Com base nestas observações, a redução preventiva e modificação da imunossupressão de manutenção (por exemplo, mudar para ciclosporina e/ou inibidor de mTOR) é atualmente recomendado para pacientes com nefropatia crônica (AHLENSTIEL-GRUNOW & PAPE, 2018).

Assim como acontece com o BKPyV, não há terapia antiviral específica para JCPyV. O principal alvo terapêutico de pacientes com PML é a otimização da terapia

anti-retroviral (ANTINORI *et al.*, 2003). Ainda não existe tratamento com eficácia comprovada para PML. As estratégias adotadas até o momento são derivadas de relatos de casos ou pequenas séries analisadas, mas sem avaliações padronizadas de resultados, o que limita a generalização e a aplicabilidade clínica. Algumas citocinas parecem exercer efeitos benéficos contra o desenvolvimento da PML, a exemplo da interleucina-2 (IL-2) que estimula células T e infusões de células T citotóxicas adotivas para pacientes com deficiências de células T, não relacionadas ao HIV, têm sido bem-sucedidas na luta contra a PML, no entanto a infusão de células T não é recomendada para pacientes com esclerose múltipla que desenvolveram a PML. A Interleucina-7 (IL-7) estimula a proliferação de todas as células da linhagem linfóide e tem apresentado efeitos benéficos em relatos de casos individuais analisados. Outras citocinas, como interferons (IFNs), têm sido estudados mas ainda sem evidências comprovadas. E estudos com vacinas contendo antígenos adaptados em desencadear uma resposta imune específica contra JCPyV no hospedeiro têm sido relatados (WILLIAMSON & BERGER, 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar uma avaliação retrospectiva e transversal dos pacientes transplantados renais associando os poliomavírus BKPyV e JCPyV com a evolução do enxerto.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar demograficamente e clinicamente a população dos receptores de transplante renal do Hospital Felício Rocho entre os anos de 2013 e 2014 ($n=155$) por meio da análise de prontuários médicos;
- Avaliar a prevalência através dos prontuários médicos dos poliomavírus BKPyV e JCPyV nesta população e sua relação com a função do enxerto no pós-transplante por meio da análise de prontuários médicos;
- Realizar uma caracterização demográfica, clínica e laboratorial de receptores do transplante renal do Hospital Felício Rocho no ano de 2019 ($n=92$) por meio da análise de prontuários médicos;
- Avaliar a reprodutibilidade das condições da PCR convencional *Semi-Nested* e a prevalência dos poliomavírus BKPyV e JCPyV nestes pacientes;
- Avaliar a positividade para citologia urinária (células *decoy*) nestes pacientes;
- Associar os resultados com o desenvolvimento ou não de nefropatia crônica nestes pacientes, buscando avaliar os fatores de risco para o desenvolvimento desta doença.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP-UFMG), CAAE 917.55918.9.3001.5125, sob número 2.832.853 e pelo Comitê de Ética do Hospital Felício Rocho, sob número 3.010.946 (**ANEXOS A e B**). Aos indivíduos selecionados como participantes foi realizado o esclarecimento da pesquisa e aqueles que aceitaram participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), sob o ponto de vista ético e formal com o título original “Avaliação de receptores do transplante renal associando o Poliomavírus BK com complicações pós-transplante e rejeição ao enxerto.” (**ANEXO C**).

4.2 Casuística

Foi realizado um estudo observacional analítico transversal em que foram avaliados 247 pacientes da Unidade de Transplantes do Hospital Felício Rocho, sendo realizados dois estudos, um retrospectivo de 2013-2014 e um transversal-observacional. No estudo retrospectivo foram selecionados apenas os pacientes submetidos ao transplante renal nos anos de 2013 e 2014 e no estudo transversal foram avaliados pacientes submetidos ao transplante em diferentes épocas (transplantados entre 1983 e 2019). Além disso, o estudo transversal incluiu a coleta de amostras de sangue e urina, enquanto o estudo retrospectivo foi realizado apenas para análise de dados a partir de prontuários médicos.

4.2.2 Estudo retrospectivo de 2013-2014

Foram avaliados 155 pacientes transplantados renais no estudo retrospectivo de 2013 e 2014, visando realizar uma caracterização clínica, demográfica e laboratorial nesta população de estudo.

Os parâmetros clínicos incluíram a avaliação da doença de base, comorbidades, tempo de transplante, tipo de doador, terapia renal substitutiva,

imunossupressão e indução pós-transplante, infecções virais adquiridas e avaliação da presença ou não de nefropatia crônica. Os parâmetros demográficos incluíram idade, sexo e cor autodeclarada.

E os parâmetros laboratoriais incluíram a avaliação dos níveis de creatinina e ureia plasmáticas, ritmo de filtração glomerular estimado (eRFG CKD-EPI) quando comparado os pacientes no pré e pós-transplante renal (até um mês pós-cirúrgico).

4.2.3 Estudo transversal-observacional

Foram avaliados 92 pacientes transplantados renais no estudo transversal-observacional, cuja coleta de amostras biológicas foi realizada no ano de 2019 (fevereiro a março de 2019).

Foi realizada uma caracterização clínica, demográfica e laboratorial dos transplantados renais.

Os parâmetros clínicos incluíram a avaliação da doença de base, comorbidades, tempo de transplante, tipo de doador, terapia renal substitutiva, imunossupressão e indução pós-transplante, infecções virais adquiridas e avaliação da presença ou não de nefropatia crônica e rejeição ou não do enxerto. Os parâmetros demográficos incluíram idade, sexo e cor autodeclarada.

Os parâmetros bioquímicos incluíram o ritmo de filtração glomerular estimado (eRFG CKD-EPI), os níveis plasmáticos de creatinina e ureia analisados no pré-transplante e no pós-transplante até um mês pós-cirúrgico, após 6 meses de transplante e no dia da coleta (fevereiro a março de 2019). Os parâmetros bioquímicos obtidos no dia da coleta foram associados ao diagnóstico molecular encontrado para BKPyV e JCPyV.

Os parâmetros hematológicos incluíram a contagem global de leucócitos, hemoglobina e plaquetas obtidos no dia da coleta de sangue, os quais foram associados ao diagnóstico molecular encontrado para BKPyV e JCPyV.

Além dos dados disponíveis nos prontuários médicos, também foram analisados por PCR convencional *Semi-Nested* (nsPCR) a prevalência dos poliomavírus BKPyV e JCPyV em amostras de urina e plasma. Bem como foram

analisados por PCR convencional o controle endógeno de beta-actina (β -actina) em amostras de urina e plasma dos pacientes transplantados renais.

Já os parâmetros citopatológicos, incluindo as biópsias renais para diagnóstico de nefropatia crônica e a citologia urinária na identificação de células *decoy* que foram analisadas no Instituto de Nefropatologia do Hospital Felício Rocho, o qual será mais bem detalhado a no **item 4.6.7**.

4.3 População do estudo retrospectivo

4.3.1 Critérios de inclusão

Foram selecionados os prontuários médicos do Hospital Felício Rocho que incluíam homens e mulheres receptores do transplante renal no ano de 2013 e 2014, com faixa etária maior ou igual a 18 anos, proveniente de doadores vivos (relacionados ou não relacionados) ou falecidos.

4.3.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo prontuários médicos que possuíam pouca informação.

4.4 População do estudo transversal-observacional

4.4.1 Critérios de inclusão

Foram selecionados homens e mulheres receptores do transplante renal, com faixa etária maior ou igual a 18 anos, proveniente de doadores vivos (relacionados ou não relacionados) ou falecidos, atendidos na rotina ambulatorial da Unidade de Transplantes, sendo as coletas realizadas no posto de coleta do Hospital Felício Rocho, os pacientes foram escolhidos de forma aleatória, sendo incluídos os pacientes que assinaram o TCLE.

4.4.2 Critérios de exclusão

Receptores do transplante renal com dificuldade de coleta seriada de amostras de urina pós-transplante, como pacientes com cateterismo vesical

intermitente ou com dificuldades de locomoção ou que apresentavam infecções agudas especificadas. Além disso, foram excluídos aqueles que não assinaram o TCLE.

4.5 Coleta de dados

A coleta de dados foi realizada na Unidade de Transplantes do Hospital Felício Rocho após a aprovação dos Comitês de Ética. Foram avaliados prontuários médicos físicos no setor de arquivos da unidade.

Foi fornecida pela instituição a lista anual de transplantes realizados na unidade a partir do ano de 2013, o que facilitou a coleta de dados da população do estudo epidemiológico.

A lista de nomes da população do estudo transversal foi construída no dia da coleta de amostras biológicas e os prontuários foram analisados posteriormente, seguindo os critérios de inclusão e exclusão pré-estabelecidos.

4.6 Coleta das amostras do estudo transversal-observacional

As amostras de sangue dos voluntários da pesquisa foram coletadas pela própria equipe do hospital, a partir de punções venosas nas veias mediana, basílica ou cefálica, sendo coletadas amostras de sangue venoso dos pacientes diretamente em tubos do Sistema S-Monovette® (SARSTEDT).

Foram coletadas amostras de sangue em tubo contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) de potássio (volume 2,6mL, concentração de 1,6 mg/mL). Os tubos coletados foram armazenados em caixa de isopor contendo gelo e transportados imediatamente ao laboratório de hematologia da Faculdade de Farmácia da UFMG. As amostras foram homogeneizadas e uma alíquota de 500µL de sangue total colhido em EDTA foi armazenada no freezer à -20°C. Outra alíquota foi utilizada para a realização do hemograma utilizando o contador automático Coulter® T-890 do laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFMG.

O restante do sangue coletado em EDTA foi centrifugado à 2.000 x g, por 15 minutos (Centrifuga SIGMA® Laborzentrifugen, modelo 2K15) e o sobrenadante foi

aliquotado e armazenado no freezer à -80°C . O EDTA-plasma obtido dessa centrifugação foi utilizado para extração de DNA. Além disso, cerca de $5\ \mu\text{L}$ de sangue total coletado em EDTA foi colocado em lâminas para confecção de esfregaços sanguíneos utilizados na contagem diferencial de leucócitos.

Amostras aleatórias de urina foram coletadas para uroanálise, sedimentoscopia, exame citológico e análise molecular. Todos os pacientes receberam lenço umedecido antibacteriano para limpeza da região genital a fim de evitar a contaminação da amostra no momento da coleta. As amostras de urina foram refrigeradas no congelador, na temperatura de -20°C , e, em seguida, utilizadas no procedimento de extração do DNA. Para as análises moleculares e citológicas, uma alíquota de urina (aproximadamente 10mL) foi centrifugada à $3.500\ \text{x g}$ por 5 minutos (centrífuga EXCELSA BABY II, modelo 206-R (FANEM®) para obtenção do sedimento urinário, o qual foi utilizado na confecção de lâminas para citologia urinária, também usado para sedimentoscopia e extração de DNA para análises moleculares.

4.6.1 Extração de DNA

Amostras de plasma e urina dos pacientes foram utilizadas para a obtenção de DNA. Foi utilizado o kit de extração DNeasy® Blood & tissue Kit (QIAGEN). Em eppendorf estéril de $1,5\text{mL}$ foram adicionados $20\ \mu\text{L}$ de Proteinase K, $100\ \mu\text{L}$ de amostra (EDTA-plasma ou urina) e $220\ \mu\text{L}$ de solução de PBS. Em seguida, foi adicionado $200\ \mu\text{L}$ de tampão de lise. Após homogeneização e incubação à 56°C por dez minutos, foi adicionado $200\ \mu\text{L}$ de álcool etílico absoluto PA (SYNTH®).

Em seguida, as amostras foram colocadas em colunas de sílica e centrifugadas (Centrífuga SIGMA® Laborzentrifugen, modelo 2K15) à $8.000\ \text{x g}$, por um minuto. O sobrenadante foi descartado e o DNA foi lavado por duas vezes com os tampões de lavagem e posteriormente com tampão de eluição. A concentração do DNA foi estimada no espectrofotômetro NanoDrop Lite da ThermoScientific™ no Laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Farmácia da UFMG e armazenado a -20°C até posterior utilização.

4.6.2 Análises Moleculares

O PCR convencional foi realizado pela técnica de *Semi-Nested* sendo utilizado a mesma sequência de iniciadores descritos no estudo de De Souza e colaboradores (2018), Foi feito o planejamento dos iniciadores através da empresa IDT (*Integrated DNA Technologies*) e estes foram desenhados para atingir a região conservada do gene VP2 que está entre 639 a 1516 nucleotídeos.

A sequência de VP2 foi obtida da base de dados GenBank, como descrita abaixo: para BKPyV [amostra Dunlop V01108(1a)] e genótipos de JCPyV [amostra Mad-1 (J02226)].

A padronização do experimento foi realizada no laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Farmácia da UFMG. O DNA extraído das amostras de plasma e urina dos transplantados foi utilizado na PCR *Semi-Nested* para avaliação da prevalência dos vírus BKPyV e JCPyV na população de estudo.

A primeira reação utilizou os iniciadores externos, iniciador senso (forward) BKJcF e iniciador anti-senso (reverse) BKJcR, como mostra a **Tabela 3**.

O fragmento genômico completo esperado contendo BKPyV e JCPyV da primeira reação é de aproximadamente 870pb que correspondem à sequência de nucleotídeos entre 639-1516, sendo o fragmento de BKPyV de 872pb e JCPyV de 875pb da região conservada do gene VP2.

Tabela 3 – Iniciadores e posição no genoma de BKPyV e JCPyV

Iniciadores externos	Sequência nucleotídica	Posição dos nucleotídeos	Tamanho do amplicon
BKJcF (FOWARD)	5'-GCACTTTTGGGGGACCTAGT-3'	Entre 639-657 (para BKPyV) e entre 541-559 (para JCPyV)	872pb
BKJcR (REVERSE)	5'-GGCAACATCCATTGAGGAG-3'	Entre 1511-1492 (para BKPyV) e entre 1416-1397 (para JCPyV)	875pb

Na segunda reação foram utilizados iniciadores internos para a diferenciação de BKPyV e JCPyV.

O iniciador interno senso BKf juntamente com o iniciador anti-senso BKJCr da primeira reação para diagnóstico de BKPyV (DE SOUZA *et al.*, 2018).

Na segunda reação para JCPyV, foram utilizados o iniciador interno senso JCf e o mesmo iniciador anti-senso BKJCr da primeira reação. Na segunda reação, o fragmento esperado de BKPyV é de 284pb e 190pb para JCPyV, como mostra a **Tabela 4** (DE SOUZA *et al.*, 2018).

Tabela 4 – Iniciadores e posição no genoma de BKPyV e JCPyV da segunda reação

Iniciadores internos	Sequência	Posição dos nucleotídeos	Tamanho do amplicon
BKf (FOWARD)	5'- GGACAATTGTAAATGCCCCYAT-3'	Entre 1228-1249 (para BKPyV)	284pb
JCf (FOWARD)	5' -CCAAAGGGAGGGAACCTATATT-3'	Entre 1227-1248 (para JCPyV)	190pb

A **Figura 4** mostra o tamanho do produto da primeira e da segunda PCR *Semi-Nested* do BKPyV e do JCPyV.

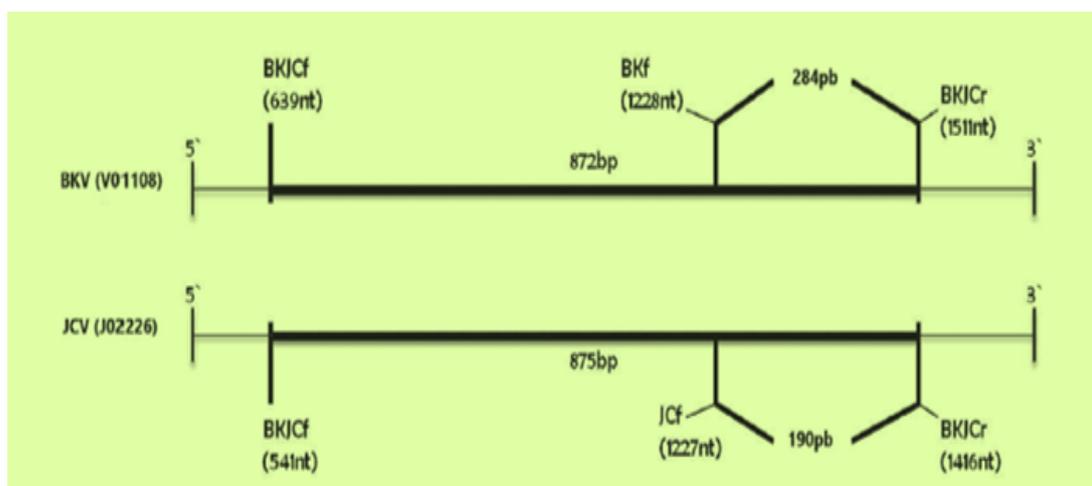


Figura 4: Tamanho do produto da 1ª e 2ª nsPCR. Tamanhos do produto da 1ª e 2ª PCR (nsPCR) na seqüência de VP2 de BKPyV (V01108, amostra Dunlop) e JCPyV (J02226, amostra Mad-1). Fonte: DE SOUZA *et al.*, 2018.

A PCR *Semi-Nested* foi realizada utilizando Tampão 10X (2µL por reação), 0,5µM de cada iniciador (1µL por reação), 2mM de MgCl₂ (1,6 µL por reação), 0,2mM

de cada nucleotídeo (0,4 μ L por reação) e 5U de Taq polimerase (0,2 μ L por reação), 1 μ L de DNA molde e água deionizada totalizando um volume final de 20 μ L.

As condições ótimas da PCR *Semi-Nested* para a primeira e segunda reação de BKPyV e JCPyV estão demonstradas no **APÊNDICE A**.

Como controle de reação interna (controle endógeno) foram construídos iniciadores de β -actina (IDT), baseados no estudo de De Souza e colaboradores (2018). O DNA extraído das amostras de plasma e urina dos transplantados foi utilizado para a realização desta PCR convencional.

A sequência dos primers construídos do controle endógeno foram BAF1 (5' - AAGAGAGGCATCCTCACCT-3') e BAR2 (5' -TACATGGCTGGGGTGTGAA-3'), sendo o fragmento do gene de β -actina amplificado equivalente a 220pb.

A PCR do controle endógeno seguindo as mesmas condições e utilizando a mesma quantidade de reagentes da PCR *Semi-Nested* citada anteriormente. As condições ótimas da PCR do controle endógeno estão contidas no **APÊNDICE B**.

A amostra controle positiva selecionada para a realização da PCR de BKPyV foi obtida da extração de urina e plasma coletados de um receptor do transplante renal do Hospital Felício Rocho com infecção ativa por BKPyV confirmada por biópsia renal.

A amostra controle positiva selecionada para a realização da PCR de JCPyV foi cedida gentilmente pela pesquisadora Dra. Juliana Comerlato da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo esta amostra proveniente de um plasmídeo contendo o genoma completo do vírus, denominada amostra Mad-1 clonada no pBR322. Para a verificação de contaminantes nas PCRs foi utilizado um branco, também chamado por alguns autores de controle negativo, amostra que contém água no lugar de DNA em toda reação de PCR.

A interpretação dos resultados foi baseada na presença ou ausência do fragmento de DNA de BKPyV, JCPyV e β -actina. Os resultados de todas as PCRs foram analisados em gel de agarose 1,5-2%, corados em Brometo de Etídio (0,5 μ g/mL) e visualizados sob a luz ultravioleta. Por outro lado, algumas amostras da PCR de β -actina cujo DNA estava com concentração inferior a 5ng/ μ L apresentaram limitações na visualização em gel de agarose. Nestes casos

específicos, foi confeccionado gel de poliacrilamida a 6%, corado em nitrato de prata, com o intuito de aumentar a sensibilidade.

4.6.3 Otimização das condições de amplificação da PCR

A PCR *Semi-Nested* e PCR de β -actina foram padronizadas no laboratório visando especialmente alta especificidade e sensibilidade. Para isto, várias concentrações de $MgCl_2$ (1,0 a 2mM) e de oligonucleotídeos (0,1 a 1 μ M) foram testadas em diferentes temperaturas de anelamento (45°C, 50°C, 55°C e 60°C).

A condição ótima de amplificação foi obtida com 2mM de $MgCl_2$, 0,5 μ M de oligonucleotídeos senso e anti-senso (internos e externos), 0,2mM de cada nucleotídeo, 5U de Taq Polimerase e 10% de tampão de PCR por reação. Além disso, foram utilizados em todas as reações 1 μ L de DNA (0,1 – 30ng/ μ L).

4.6.4 Limite de detecção do BKPyV e JCPyV

Foi realizada uma PCR convencional utilizando os dois iniciadores externos BKJcF e BKJcR, seguindo o mesmo protocolo da primeira reação *Semi-Nested*, com o intuito de obter fragmentos do genoma de aproximadamente 870pb. Os fragmentos obtidos desta primeira reação foram novamente amplificados com os mesmos iniciadores externos. As amostras obtidas foram purificadas e quantificadas no espectrofotômetro NanoDrop Lite da ThermoScientific™ no Laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Farmácia da UFMG. A partir desta quantificação e através do programa de cálculo de cópia de genoma “*URI Genomics and Sequencing Center*” foi possível quantificar o número de cópias de vírus por molde de reação. Para o BKPyV foi obtido $3,71 \times 10^{10}$ cópias do produto de PCR/ μ L e para o JCPyV foi obtido $8,06 \times 10^{10}$ cópias do produto de PCR/ μ L. Após a escolha das condições ótimas de amplificação das PCRs, sua sensibilidade foi determinada utilizando diluições decimais seriadas de quantidades conhecidas das moléculas dos controles positivos de BKPyV e JCPyV, também conhecidas como teste de limite de detecção. O DNA foi diluído 10^{10} até 10^1 cópias/ μ L. As diluições dos controles foram submetidas à PCR *Semi-Nested* nas condições otimizadas e o limite de detecção foi

determinado considerando a maior diluição em que foi observada a amplificação dos controles.

4.6.5 Purificação do DNA

As amostras de DNA utilizadas nos testes de padronização das PCRs foram quantificadas e purificadas para a realização do limite de detecção e para o sequenciamento. O kit de purificação utilizado foi o Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA®). Em eppendorf estéril de 1,5mL, foram adicionados 10µL de amostra amplificada e 10µL de solução de ligação à membrana “*Membrane Binding Solution*”. A mistura foi aplicada em coluna com filtro “*SV Minicolumn*” que foi centrifugada à 14.000 x g, por 1 minuto, à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 700µL de solução de lavagem de membrana “*Membrane Wash Solution*”, já previamente diluída em etanol 95% (Fmaia) na coluna e, novamente, centrifugada à 14.000 x g, por 1 minuto, à temperatura ambiente (Centrífuga SIGMA® Laborzentrifugen, modelo 2K15). O sobrenadante foi descartado. A mesma etapa foi repetida, mas com a adição de 500µL de solução de lavagem de membrana e centrifugação por 5 minutos, à 14.000 x g, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e a coluna re-centrifugada por 1 minuto, só que desta vez com a tampa da microcentrífuga aberta para a evaporação de resíduos de etanol. Cuidadosamente, a coluna foi colocada em um novo eppendorf estéril de 1,5mL, onde foi aplicado 50µL de água livre de nucleases direcionados para o centro da coluna sem contato com a membrana. As amostras foram incubadas por 1 minuto e centrifugadas por 1 minuto à 14.000 x g. Em seguida, a coluna foi descartada e o sobrenadante contendo o ácido desoxirribonucleico (DNA) eluído e purificado foi armazenado à 4°C para utilização no sequenciamento e no teste de limite de detecção do BKPyV e JCPyV.

4.6.6 Sequenciamento do DNA

Para garantir que os produtos gerados na PCR *Semi-Nested* eram específicos dos vírus BKPyV e JCPyV, foram escolhidas três amostras positivas de BKPyV e três amostras positivas para JCPyV. Os produtos de PCR provenientes destas

amostras foram purificadas utilizando o *kit* Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (PROMEGA). Os produtos purificados foram encaminhados para sequenciamento automático utilizando 10 µM (10pmol) de iniciadores internos (BKf ou JCf) ou anti-senso (BKJCr) e água de injeção para um volume final de 7,5 µL. O sequenciamento de DNA foi realizado na empresa MYLEUS (<http://myleus.com/>), utilizando o método de Sanger automatizado.

4.6.7 Análises citológicas

O exame citológico de urina foi realizado para diagnóstico de células *decoy* que foram identificadas por coloração de Papanicolaou em urina fixada em amostras citocentrifugadas. As lâminas para citologia foram obtidas após a obtenção do sedimento de urina de amostras centrifugadas à 3.500 x g, por 5 minutos, na centrífuga EXCELSA BABY II, modelo 206-R (FANEM®). O sedimento formado na lâmina da sedimentoscopia urinária foi fixado em álcool etílico PA absoluto (SYNTH®) por, no mínimo, 24 horas. Este sedimento embebido em álcool foi corado em Papanicolau para análise das células *decoy*. As lâminas foram coradas pela equipe do Laboratório de Patologia Molecular da Faculdade de Odontologia da UFMG. A análise da citologia urinária foi realizada em parceria com o Instituto de Nefropatologia, sob a direção técnica do nefropatologista Stanley de Almeida Araújo e do nefropatologista David Campos Wanderley, que gentilmente analisaram as lâminas. Adicionalmente, estes pesquisadores forneceram o resultado das biópsias renais dos pacientes avaliados no presente estudo.

4.7 Análises Estatísticas

A análise estatística foi realizada utilizando o programa *GraphPadPrism* (versão 8.0) e IBM SPSS Software (versão 23.0). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. As variáveis normais foram avaliadas pelo teste T-Student ou ANOVA para dois ou três grupos, respectivamente, e expressas como média ± desvio padrão. Já as variáveis não-paramétricas foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis, seguido pela correção de Bonferroni, para dois ou três grupos, respectivamente, e expressas como mediana e intervalo

interquartilício (IQ). As variáveis categóricas foram comparadas pelo teste de Qui-quadrado (χ^2) de frequências ou Fisher quando aplicável. Foram consideradas significativas diferenças cujo valor de p foi $<0,05$.

A associação entre a nefropatia crônica e as variáveis independentes foi investigada por meio de regressão logística univariada. Como as variáveis podem atuar como fator de confusão, posteriormente foi feita uma análise multivariada por bloco, com todas aquelas variáveis independentes que apresentaram nível de significância de $p \leq 0,20$ na análise univariada. Foram consideradas diferenças significativas valores de $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Resultados do estudo retrospectivo de 2013 e 2014

O presente estudo incluiu 155 pacientes submetidos ao transplante renal no ano de 2013 e 2014. Os principais dados demográficos (idade, sexo e cor) dos participantes do estudo estão apresentados na **Tabela 5**, sendo os valores dados em número absoluto, frequência (%) e a mediana da idade em anos com intervalo interquartilício.

Tabela 5 – Caracterização demográfica do estudo retrospectivo

Parâmetros	Valores
Idade (anos)	
Receptor	45 (33-56)
Doador	44 (31-53)
Sexo do doador [n(%)]	
Masculino	82 (52,9%)
Feminino	73 (47,1%)
Sexo do receptor [n(%)]	
Masculino	88 (56,8%)
Feminino	67 (43,2%)
Cor autodeclarada do receptor [n(%)]	
Branca	54 (34,8%)
Preta	26 (16,8%)
Parda	64 (41,3%)
Não especificada	11 (7,1%)

A mediana de idade foi representada em anos com intervalo interquartilício; os dados de frequência foram apresentados como valores absolutos (frequência em %); n: quantidade de pacientes transplantados renais.

A mediana de idade prevalente dos receptores do transplante renal foi de 45 anos, com intervalo interquartilício variando entre 33-56 anos. A mediana de idade prevalente dos doadores foi de 44 anos, com intervalo interquartilício variando entre 31-53 anos.

Com relação ao sexo do doador, foram mais frequentes os doadores do sexo masculino (52,9%) em relação ao sexo feminino (47,1%). Em relação ao sexo do receptor, foram mais frequentes os receptores do sexo masculino (56,8%) em relação ao sexo feminino (43,2%). No que se refere à cor autodeclarada do receptor, a população parda (41,3%) foi a mais frequente submetida ao transplante renal nos anos de 2013 e 2014. Os principais dados clínicos e laboratoriais dos participantes do estudo estão apresentados na **Tabela 6**. Sendo os valores dados em número absoluto e frequência (%).

Tabela 6 – Caracterização clínica e laboratorial do estudo retrospectivo

Parâmetros	Valores
Causa primária de DRC [n(%)]	
Hipertensão	18 (11,6%)
Diabetes mellitus	32 (20,7%)
DRPAD	15 (9,7%)
Glomerulopatias	55 (35,5%)
Litíase renal	1 (0,6%)
Indeterminada	28 (18%)
Outras	6 (3,9%)
Tempo pós-Tx (anos) [n(%)]	
Tempo do Tx < ou igual a 5 anos	71 (45,8%)
Tempo do Tx entre 6 a 10 anos	70 (45,2%)
Tempo do Tx indeterminado	14 (9%)
Tipo de doador [n(%)]	
Falecido	106 (68,4%)
Vivo Relacionado	39 (25,2%)
Vivo Não Relacionado	10 (6,5%)
Comorbidades adquiridas pós-Tx [n(%)]	
Hipertensão	1 (0,6%)
ITU	1 (0,6%)
Glomerulopatias	3 (1,9%)
Múltiplas (HA, DM, ITU, dislipidemias e/ou glomerulopatias)	108 (69,7%)
Não relatado	13 (8,4%)
Outras (hiperuricemia, gota, distúrbios psiquiátricos, policitemia)	29 (18,7%)
Terapia renal pré-Tx [n(%)]	
HD	124 (80%)
Conservador	7 (4,5%)
DP	5 (3,2%)
Diálise não especificada	10 (6,5%)
Não informada	7 (4,5%)
HD + DP	2 (1,3%)
Imunossupressão pós-Tx [n(%)]	
MMFNa +TAC+ PDN	137 (88,4%)
MMFNa +AZA+ PDN	4 (2,6%)

/Continua

MMFNa+ SIRO+ PDN	8 (5,2%)
MMFNa+ EVE+ PDN	1 (0,6%)
MMF+ TAC+ PDN	3 (1,9%)
Outros	2 (1,3%)
Indução pós-Tx [n(%)]	
Thymo	34 (21,9%)
Simulect	52 (33,6%)
Solumedrol	1 (0,6%)
Sem indução	36 (23,2%)
Thymo + solumedrol	18 (11,6%)
Simulect + solumedrol	10 (6,5%)
Simulect + thymo	4 (2,6%)
Infecções virais adquiridas [n(%)]	
Herpes vírus tipo 1 (HHV-1)	13 (8,4%)
Poliomavírus	5 (3,2%)
Citomegalovírus (HHV-5)	28 (18%)
Hepatites virais	1 (0,6%)
Papilomavírus	1 (0,6%)
Arbovírus	5 (3,2%)
Múltiplas (arbovírus, herpes vírus, poliomavírus e/ou hepatites)	12 (7,7%)
Outras (Varicella Zoster, HIV)	1 (0,6%)
Sem infecção	89 (57,4%)
Compatibilidade HLA [n (%)]	
0 a 3 matchs/compatibilidade	122 (78,7%)
4 a 6 matchs/compatibilidade	25 (16,1%)
Não relatado	8 (5,2%)
Rejeição prévia [n(%)]	
Rejeição aguda	24 (15,5%)
Rejeição crônica	11 (7,1%)
Não	120 (77,4%)
Nefropatia crônica do enxerto [n(%)]	
Sim	53 (34,2%)
Não	102 (65,8%)
Dados laboratoriais	
eRFG CKD-EPI (mL/min/1,73m ²)***	54,9 (± 22,7)
Creatinina (mg/dL)**	1,3 (1,1-1,9)
Ureia (mg/dL)**	43 (36-59)

Os dados de frequência foram apresentados como valores absolutos (frequência em %); n: quantidade de pacientes transplantados renais. Os valores de referência do Hospital Felício Rocho para creatinina são divididos por sexo, para homens com valores entre 0,7 a 1,3mg/dL e mulheres entre 0,6 a 1,2mg/dL. E os valores de referência de ureia entre 15 a 54mg/dL para ambos os sexos**. Os dados não paramétricos estão apresentados como mediana e intervalo interquartil (Mann-Whitney) ***. Os dados paramétricos estão apresentados como média e desvio padrão (T-Student). N: quantidade de pacientes transplantados renais; DRG: Doença renal crônica; DRPAD: Doença Renal Policística Autossômica Dominante; LES: Lúpus eritematoso sistêmico; Tx: transplante; ITU: Infecções do trato urinário; HA: Hipertensão; DM: Diabetes mellitus; HD: Hemodiálise; DP: Diálise peritoneal; MMF_{Na}: Mofetil Micofenolato de sódio; TAC: Tacrolimus; PDN: Prednisona; AZA: Azatioprina; SIRO: Sirolimus; EVE: Everolimus; MMF: Micofenolato mofetil; Thymo: Timoglobulina; HIV: Vírus

da imunodeficiência humana; HLA: Antígeno leucocitário humano; eRFG: Ritmo de Filtração Glomerular Estimado.

Em relação às doenças primárias que levaram ao desenvolvimento da doença renal crônica (DRC), as Glomerulopatias representaram a doença mais frequente na população total (35,5%) seguidas pelo Diabetes mellitus (20,7%) como mostra a **Tabela 6**. No que diz respeito à presença de comorbidades detectadas após o transplante renal, as múltiplas comorbidades foram as mais comuns e incluíam pacientes que apresentaram duas ou mais doenças (69,7%). Foram incluídas neste grupo os pacientes que apresentaram Hipertensão, Diabetes mellitus, Dislipidemias e/ou Glomerulopatias. Cerca de 8,4% dos pacientes não apresentaram comorbidades ou não possuíam o dado disponível nos prontuários. Foram raros (0,6%) os casos de pacientes que apresentaram apenas uma doença.

Com relação ao tempo pós-transplante, o mesmo foi dividido em categorias, sendo 71 pacientes com tempo inferior ou igual a 5 anos (45,8%), 70 pacientes com tempo entre 6 a 10 anos (45,2%) e 14 pacientes com tempo de Tx indeterminado (9%). O doador falecido foi o tipo mais frequente (68,4%), seguido do doador vivo relacionado (25,2%) e, por último, o doador vivo não relacionado (6,5%). A terapia renal substitutiva pré-transplante foi dividida em categorias, sendo a hemodiálise a mais frequente (80%). As demais categorias apresentaram o tratamento conservador (tratamento medicamentoso) (4,5%), a diálise peritoneal (3,2%), a diálise não especificada (6,5%) e hemodiálise em conjunto com diálise peritoneal (1,3%), e uma categoria representando a não informação a respeito da terapia renal substitutiva no pré-transplante (4,5%). A terapia imunossupressora tripla com Micofenolato Mofetil de Sódio (MMF_{Na}), Tacrolimus (TAC) e Prednisona (PDN) foi a mais utilizada nos pacientes avaliados no presente estudo (88,4%). A menos comum era composta por tratamento triplo com MMF_{Na}, Everolimus e PDN (0,6%). Com relação à indução pós-transplante, na maioria dos pacientes foi utilizado o medicamento Simulect (33,6%). Vale ressaltar que em 23,2% da população estudada não foi realizado tratamento de indução pós-transplante.

Com relação às infecções virais adquiridas no pós-transplante, em 57,4% dos pacientes não foi relatado a presença de infecções. O Citomegalovírus (HHV-5) foi o vírus mais prevalente (18%), seguido do Herpes Vírus tipo 1 (HHV-1) (8,4%). Os

poliomavírus foram relatados em 5 pacientes da população do estudo (3,2%). É importante ressaltar que o diagnóstico de poliomavírus no hospital onde os pacientes do presente estudo foram selecionados é realizado apenas por biópsia renal. Esta técnica é executada somente em pacientes que apresentam significativas complicações pós-transplante e também naqueles em que a equipe médica julgue necessária a realização do procedimento.

Com relação à compatibilidade HLA (antígeno leucocitário humano), a maioria dos pacientes apresentaram entre 0 a 3 matchs/compatibilidade HLA entre doador e receptor (78,7%).

Com relação à nefropatia crônica do enxerto, a maioria dos pacientes não apresentou nenhuma complicação diagnosticada nas biópsias renais analisadas (65,8%), Corroborando com este dado, a maioria dos pacientes não apresentou rejeição prévia ao enxerto (77,4%).

Com relação aos dados laboratoriais foi possível obter uma média de 54,9mL/min/1,73m² em relação ao ritmo de filtração glomerular estimado dos pacientes analisados. A mediana dos níveis de creatinina plasmática foi de 1,3mg/dL e dos níveis de ureia de 43mg/dL (**Tabela 6**). Sendo os valores de referência do Hospital Felício Rocho para creatinina divididos por sexo, para homens com valores entre 0,7 a 1,3mg/dL e mulheres entre 0,6 a 1,2mg/dL. E os valores de referência de ureia entre 15 a 54mg/dL para ambos os sexos.

A evolução da creatinina e ureia plasmática dos pacientes do estudo retrospectivo estão mostradas na **Tabela 7**.

Tabela 7 – Evolução da creatinina e ureia plasmáticas dos pacientes do estudo retrospectivo

Dosagens séricas	Pré-Tx	Pós-Tx (< 1 mês)	Pós-Tx (6 meses)	p
Creatinina (mg/dL)	8,5 (6,7-10,7)	1,4 (1-1,8)	1,2 (1-1,6)	<0,0001*
Ureia (mg/dL)	102 (83-143,5)	46 (36-61)	40 (33-51)	<0,0001*

Teste Kruskal-Wallis seguido pela correção de Bonferroni para três grupos. *O valor de p<0,05 foi considerado significativo.

As medianas dos níveis de creatinina e ureia no pré-transplante foram significativamente maiores em relação ao pós-transplante (até um mês pós-cirúrgico) e após 6 meses de transplante dos pacientes avaliados no presente estudo ($p < 0,0001$) (**Tabela 7**).

5.2 Resultados do estudo transversal-observacional

O presente estudo transversal-observacional incluiu 92 pacientes submetidos ao transplante renal. Os principais dados demográficos (sexo, idade e cor) dos participantes do estudo estão apresentados na **Tabela 8**. Sendo os valores dados em número absoluto, frequência (%) e a mediana da idade em anos.

Tabela 8 – Caracterização demográfica do estudo transversal-observacional

Parâmetros	Valores
Idade (anos)	
Receptor	40 (34,5-53,5)
Doador	40 (33-50)
Sexo do doador [n(%)]	
Masculino	46 (50%)
Feminino	41 (44,6%)
Não especificado	5 (5,4%)
Sexo do receptor [n(%)]	
Masculino	49 (53,3%)
Feminino	43 (46,7%)
Cor autodeclarada do receptor [n(%)]	
Branca	56 (60,9%)
Preta	9 (9,8%)
Parda	23 (25%)
Amarela	1 (1%)
Não especificada	3 (3,3%)

A mediana de idade foi representada em anos com intervalo interquartil; os dados de frequência foram apresentados como valores absolutos (frequência em %); n: quantidade de pacientes transplantados renais.

A mediana de idade prevalente dos receptores do transplante renal foi de 40 anos, com intervalo interquartil variando entre 34,5-53,5 anos. A mediana de

idade prevalente dos doadores foi de 40 anos, com intervalo interquartil variando entre 33-50 anos.

Com relação ao sexo do doador, os doadores do sexo masculino foram mais frequentes (50%) em relação ao sexo feminino (44,6%). Em relação ao sexo do receptor, foram mais frequentes os receptores do sexo masculino (53,3%) em relação ao sexo feminino (46,7%), mas observa-se que praticamente é homogênea as quantidades de pacientes submetidos ao transplante quando relacionados ao sexo.

Quanto à cor autodeclarada do receptor, a população branca foi a mais frequente (60,9%), apesar da população parda também ser considerada comum, já que estava presente em 25% dos casos, como mostra a **Tabela 8**. Os principais dados clínicos dos participantes do estudo transversal-observacional estão apresentados na **Tabela 9**. Sendo os valores dados em frequência (%) e número absoluto.

Tabela 9 – Caracterização clínica do estudo transversal-observacional

Parâmetros	Valores
Causa primária de DRC [n(%)]	
Hipertensão	10 (10,9%)
Diabetes mellitus	15 (16,3%)
DRPAD	6 (6,5%)
Glomerulopatias	26 (28,3%)
Indeterminada	23 (25%)
Outras	12 (13%)
Tempo pós-Tx (anos) [n(%)]	
Tempo do Tx < ou igual a 5 anos	41 (44,6%)
Tempo do Tx entre 6 a 10 anos	28 (30,4%)
Tempo do Tx > 10 anos	23 (25%)
Tipo de doador [n(%)]	
Falecido	49 (53,3%)
Vivo Relacionado	39 (42,4%)
Vivo Não Relacionado	4 (4,3%)
Comorbidades adquiridas pós-Tx [n(%)]	
ITU	2 (2,2%)
Múltiplas (HA, DM, ITU, dislipidemias e/ou glomerulopatias)	75 (81,5%)
Não relatado	1 (1,1%)
Outras (hiperuricemia, gota, distúrbios psiquiátricos, policitemia)	14 (15,2%)
Terapia renal pré-Tx [n(%)]	
HD	72 (78,3%)
Conservador	1 (1,1%)

/Continua

DP	5 (5,4%)
Diálise não especificada	3 (3,3%)
Não informada	5 (5,4%)
HD + DP	6 (6,5%)
Imunossupressão pós-Tx [n(%)]	
MMFNa +TAC+ PDN	62 (67,4%)
MMFNa+ EVE+ PDN	1 (1,1%)
Outros	17 (18,5%)
Não relatado	12 (13%)
Indução pós-Tx [n(%)]	
Thymo	34 (37%)
Simulect	17 (18,5%)
Solumedrol	1 (1%)
Sem indução	31 (33,7%)
Thymo + solumedrol	5 (5,5%)
Simulect + solumedrol	3 (3,3%)
Simulect + thymo	1 (1%)
Infecções virais adquiridas [n(%)]	
Herpes vírus tipo 1 (HHV-1)	10 (10,9%)
Poliomavírus	2 (2,2%)
Citomegalovírus (HHV-5)	16 (17,4%)
Papilomavírus	1 (1%)
Arbovírus	9 (9,8%)
Múltiplas (Arbovírus, herpes vírus, poliomavírus e/ou papilomavírus)	3 (3,3%)
Outras (Varicella Zoster, HIV)	1 (1%)
Sem infecção	50 (54,4%)
Compatibilidade HLA [n (%)]	
0 a 3 matchs/compatibilidade	48 (52,2%)
4 a 6 matchs/compatibilidade	19 (20,7%)
Não relatado	25 (27,2%)
Rejeição prévia [n(%)]	
Rejeição aguda	15(16,3%)
Rejeição crônica	4 (4,3%)
Não	73 (79,4%)
Nefropatia crônica do enxerto [n(%)]	
Sim	24 (26,1%)
Não	68 (73,9%)

Os dados de frequência foram apresentados como valores absolutos (frequência em %); n: quantidade de pacientes transplantados renais; DRC: Doença renal crônica; DRPAD: Doença Renal Policística Autossômica Dominante; LES: Lúpus eritematoso sistêmico; Tx: transplante; ITU: Infecções do trato urinário; HA: Hipertensão; DM: Diabetes mellitus; HD: Hemodiálise; DP: Diálise peritoneal; MMF_{Na}: Mofetil Micofenolato de sódio; TAC: Tacrolimus; PDN: Prednisona; AZA: Azatioprina; SIRO: Sirolimus; EVE: Everolimus; Thymo: Timoglobulina; HIV: Vírus da imunodeficiência humana; HLA: Antígeno leucocitário humano.

Em relação às doenças primárias que levaram ao desenvolvimento da DRC, é importante destacar que grande parte dos pacientes não possuía causas primárias definidas (25%). Dentre as doenças de base citadas, vale ressaltar que as Glomerulopatias apresentaram a maior prevalência com 28,3% da população do estudo.

Com relação ao tempo pós-transplante, o mesmo foi dividido em categorias, sendo 41 pacientes com tempo inferior ou igual a cinco anos (44,6%), 28 pacientes com tempo entre 6 a 10 anos (30,4%) e 23 pacientes com tempo superior a 10 anos (25%). O doador falecido foi o tipo mais frequente (53,3%), seguido do doador vivo relacionado (42,4%) e, por último, o doador vivo não relacionado (4,3%).

No que diz respeito à presença de comorbidades detectadas após o transplante renal, as comorbidades múltiplas foram as mais comuns e incluíram pacientes que apresentaram duas ou mais patologias (81,5%). Foram incluídas neste grupo, os pacientes que apresentaram Hipertensão, Diabetes mellitus, Dislipidemias e/ou Glomerulopatias. Cerca de 15,2% dos pacientes apresentaram outras comorbidades, ou seja, pacientes com hiperuricemia, gota, distúrbios psiquiátricos e policitemia. Foram raros os casos de pacientes que apresentaram apenas uma patologia, como observado na **Tabela 9**.

A terapia renal substitutiva pré-transplante foi dividida em categorias, sendo a hemodiálise a mais frequente (78,3%). Demais categorias apresentaram o tratamento conservador (1,1%), a diálise peritoneal (5,4%), a diálise não especificada (3,3%), hemodiálise em conjunto com a diálise peritoneal (6,5%) e casos não informados (5,4%).

A terapia imunossupressora tripla com Mofetil Micofenolato de Sódio (MMF_{Na}), Tacrolimus (TAC) e Prednisona (PDN) foi a mais utilizada nestes pacientes (67,4%), sendo a menos comum o tratamento triplo com MMF_{Na}, Everolimus e PDN (1,1%).

Com relação à indução pós-transplante, na maioria dos pacientes foi utilizado o medicamento Timoglobulina (37%). É importante ressaltar que em 33,7% da população estudada não foi realizado tratamento de indução pós-transplante.

Com relação às infecções virais adquiridas pós-transplante, em 54,4% dos pacientes não foi relatado a presença de infecções. O Citomegalovírus (HHV-5) foi

o mais prevalente dos vírus relatados (17,4%), seguido do Herpes Vírus tipo 1 (HHV-1) (10,9%). Os poliomavírus foram relatados em apenas dois pacientes da população do estudo (2,2%).

Com relação à compatibilidade HLA, a maioria dos pacientes apresentaram entre 0 a 3 matchs/compatibilidade HLA entre doador e receptor (52,2%).

Por fim, a maioria dos pacientes não apresentou rejeição prévia ao enxerto (79, 4%) e a maioria também não apresentou nenhuma complicação diagnosticada relacionada à nefropatia crônica do enxerto nas biópsias renais analisadas (73,9%), como mostra a **Tabela 9**.

5.2.1 Avaliação da PCR *Semi-Nested* (nsPCR) para detecção do BKPyV e JCPyV

Em 2018, Souza e colaboradores desenvolveram uma técnica de PCR convencional *Semi-Nested* para detecção simultânea dos poliomavírus BKPyV e JCPyV em amostras clínicas (DE SOUZA *et al.*, 2018).

Para avaliar o desempenho desta reação em nosso laboratório, foi otimizada as condições ótimas da PCR, utilizando nestas reações os controles positivos para BKPyV e JCPyV descritos no **item 4.6.2**.

Primeiramente, foi realizada a reação como descrita por De Souza e colaboradores (2018) utilizando diferentes temperaturas de anelamento dos iniciadores, sendo observada a amplificação do fragmento de 284pb do BKPyV nas temperaturas de 45°C (canaletas 2 e 4), 55°C (canaleta 6) e 60°C (canaleta 7). Para o JCPyV, observamos a amplificação do fragmento de 190pb do JCPyV com bandas específicas nas temperaturas de 45°C (canaleta 10), 50°C (canaleta 11), 55°C (canaleta 12) e 60°C (canaleta 13), como mostra a **Figura 5**.

Para o controle interno (β -actina), foi obtido o fragmento com tamanho esperado (220pb) nas temperaturas de 50°C (canaleta 16), 55°C (canaleta 17) e 60°C (canaleta 18). O gel de avaliação da nsPCR para BKPyV e JCPyV e da PCR convencional de β -actina foi ilustrado na **Figura 5**.

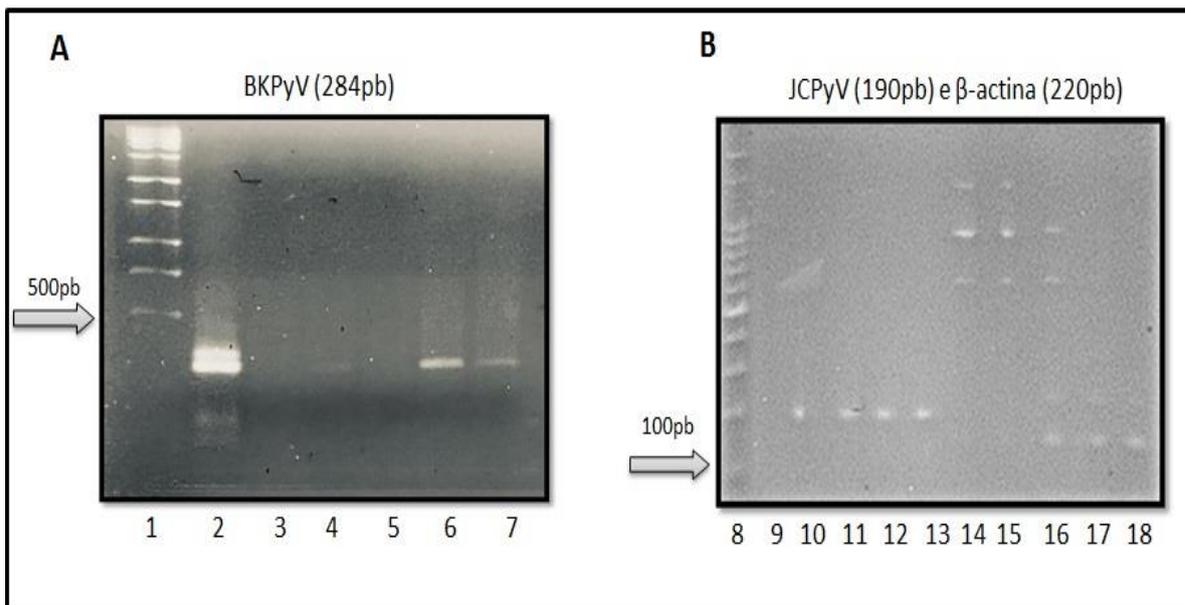


Figura 5: Avaliação da 2ª reação da nsPCR para BKPyV e JCPyV e 1ª reação de β -actina. A) As temperaturas de anelamento foram testadas para amplificação do BKPyV. Foram obtidos os fragmentos de BKPyV (284pb) da nsPCR visualizado em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. 1) Padrão de tamanho molecular 1Kb 2) Controle positivo de BKPyV com temperatura de anelamento a 45°C. 3) Branco. 4) Controle positivo de BKPyV com temperatura de anelamento a 45°C. 5) Controle positivo de BKPyV com temperatura de anelamento a 50°C. 6) Controle positivo de BKPyV com temperatura de anelamento a 55°C. 7) Controle positivo de BKPyV com temperatura de anelamento a 60°C. Observação: o controle positivo de BKPyV foi realizado em duplicata, pois foi a temperatura de anelamento escolhida para a padronização. B) As temperaturas de anelamento foram testadas para amplificação do JCPyV e β -actina. Foram obtidos os fragmentos de JCPyV (190pb) da nsPCR e de β -actina (220pb) da PCR convencional, visualizados em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. 8) Padrão de tamanho molecular 100pb. 9) Branco. 10) Amostra positiva de JCPyV com temperatura de anelamento a 45°C. 11) Amostra positiva de JCPyV com temperatura de anelamento a 50°C. 12) Amostra positiva de JCPyV com temperatura de anelamento a 55°C. 13) Amostra positiva de JCPyV com temperatura de anelamento a 60°C. 14) Branco de β -actina. 15) Amostra negativa de β -actina com temperatura de anelamento a 45°C. 16) Amostra positiva de β -actina com temperatura de anelamento a 50°C. 17) Amostra positiva de β -actina com temperatura de anelamento a 55°C. 18) Amostra positiva de β -actina com temperatura de anelamento a 60°C.

Após avaliar as melhores temperaturas de anelamento, realizamos um teste para determinação do limite de detecção das reações. Para o BKPyV, o limite de detecção foi semelhante ao encontrado no estudo de Souza e colaboradores (2018) com 10^1 cópias do genoma por μL . Porém em nosso experimento, o resultado foi diferente para o JCPyV que apresentou um limite de 10^2 cópias de genoma por μL .

(dados não-mostrados). Portanto, o JCPyV apresentou maior número de cópias com limite mínimo de detecção em relação ao BKPyV.

5.2.2 Avaliação da prevalência de BKPyV e JCPyV na população estudada

Posteriormente à avaliação da PCR, foram analisadas as amostras coletas dos pacientes incluídos em nosso estudo. A primeira avaliação foi da amplificação do nosso controle interno (β -actina).

Das 92 amostras de plasma coletadas, em apenas uma não foi possível a amplificação da β -actina. Por outro lado, das 89 amostras de urina incluídas (três pacientes não conseguiram coletar a urina), somente 45 apresentaram amplificação do controle interno, conforme observado na **Tabela 10**.

Tabela 10 – Resultado do diagnóstico molecular de β -actina

Resultado	β -actina (urina)	β -actina (plasma)
Não amplificação	44 (47,8%)	1 (1,1%)
Com amplificação	45 (48,9%)	91 (98,9%)
Sem amostra coletada*	3 (3,3%)	0 (0%)
Total	92	92

*Observação: sem amostra coletada de urina.

Uma vez que a amplificação da β -actina é utilizada como controle interno da reação para avaliar possíveis inibições na matriz da amostra ou para avaliar possíveis erros no processo da extração de DNA, foram retiradas das análises as amostras que não apresentaram amplificação para os alvos (JCPyV e BKPyV) e que também não apresentaram amplificação para β -actina na urina ou no plasma.

Entretanto, foram incluídas nas análises, as amostras que apresentaram amplificação para os alvos (JCPyV e BKPyV) e que não apresentaram amplificação para β -actina na urina ou no plasma, visto que a amplificação do vírus alvo confirma a correta execução dos processos de extração do DNA e de amplificação na PCR.

Além disso, ao se comparar a PCR de β -actina com a *Semi-Nested* de BKPyV e JCPyV, a do controle endógeno é uma única reação, enquanto a dos vírus são duas reações.

Dos pacientes incluídos no estudo, 39 (43,8%) deles apresentaram virúria por BKPyV (amplificação do fragmento de BKPyV na urina) e 41 (46%) apresentaram virúria por JCPyV (lembrando que o total de amostras de urina foi de 89). Já para a viremia (a amplificação do fragmento no plasma), 27 (29,4%) dos pacientes apresentaram viremia por BKPyV e 27 (29%) apresentaram viremia pelo JCPyV. Os dados descritos acima estão sumarizados na **Tabela 11**.

Tabela 11 – Resultado do diagnóstico molecular do BKPyV e JCPyV

Resultado	BKPyV urina	BKPyV plasma	JCPyV urina	JCPyV plasma
Negativo	29 (32,6%)	64 (69,6%)	24 (27%)	65 (71%)
Positivo	39 (43,8%)	27 (29,4%)	41 (46%)	27 (29%)
Inconclusivo	21 (23,6%)	1 (1%)	24 (27%)	0 (0%)
Total	89	92	89	92

Foram considerados resultados inconclusivos as amostras de urina e plasma dos pacientes que não apresentaram amplificação para fragmentos de β -actina, BKPyV e JCPyV.

Em algumas amostras houve a amplificação de mais de uma banda (bandas inespecíficas) tanto na urina quanto no plasma (**Figura 6**).

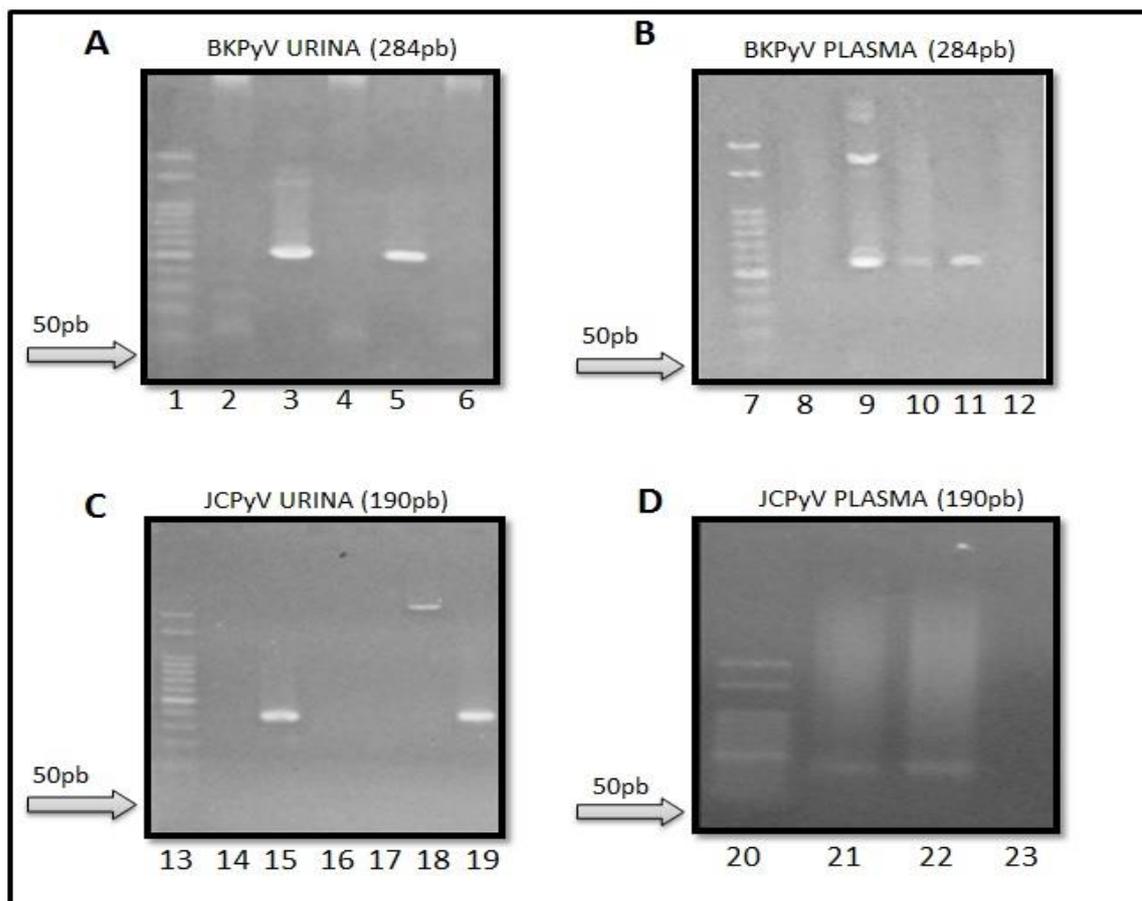


Figura 6: Resultados da nsPCR de BKPyV e JCPyV na urina e no plasma. Visualização em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. A) Resultados da PCR do BKPyV de DNA extraído de urina, fragmento de 284pb. 1) Padrão de tamanho molecular 50pb. 2) Branco. 3) Controle positivo de BKPyV com banda inespecífica. 4) Paciente 40 sem amplificação para BKPyV. 5) Paciente 41 com amplificação para BKPyV. 6) Paciente 42 sem amplificação para BKPyV. B) Resultados da PCR do BKPyV de DNA extraído de plasma, fragmento de 284pb. 7) Padrão de tamanho molecular 50pb. 8) Branco. 9) Controle positivo de BKPyV com banda inespecífica. 10) Paciente 64 com amplificação para BKPyV. 11) Paciente 65 com amplificação para BKPyV. 12) Paciente 66 sem banda/sinal positivo para BKPyV. C) Resultados da PCR do JCPyV de DNA extraído de urina, fragmento de 190pb. 13) Padrão de tamanho molecular 50pb. 14) Branco. 15) Controle positivo de JCPyV. 16) Paciente 1 sem banda/sinal positivo para JCPyV. 17) Paciente 2 sem banda/sinal positivo para JCPyV. 18) Paciente 3 sem banda/sinal positivo para JCPyV e com banda inespecífica. 19) Paciente 4 com banda/sinal positivo para JCPyV. D) Resultados da PCR do JCPyV de DNA extraído de plasma, fragmento de 190pb. 20) Padrão de tamanho molecular 50pb. 21) Controle positivo de JCPyV. 22) Paciente 102 com banda/sinal positivo para JCPyV. 23) Branco.

Para avaliar a especificidade das bandas geradas, o fragmento de tamanho esperado para cada vírus foi purificado e enviado para sequenciamento na empresa Myleus Biotecnologia (<http://myleus.com/>).

Após análise do programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) de identificação de regiões de similaridade entre as sequências de BKPyV foram obtidas, a amostra 1 apresentou valores de identidade de 98,41% a 98,81% com amostras de BKPyV depositadas no GenBank (acesso LR216254.1 e LR216252.1, respectivamente). A amostra 2 apresentou valores de identidade de 94,19% a 98,79% com amostras de BKPyV depositadas no GenBank (acesso LR216148.1 e LR216160.1, respectivamente). A amostra 3 apresentou valores de identidade de 98,41% a 98,80% com amostras de BKPyV depositadas no GenBank (acesso LR216148.1 e LR216160.1, respectivamente).

Para as nossas sequências de JCPyV obtidas, a amostra 1 apresentou valores de identidade de 98,71% a 99,35% de identidade com amostras de JCPyV depositadas no GenBank (acesso AB048555.1 e AB372037.1, respectivamente). A amostra 2 apresentou valores de identidade de 98,06% a 98,71% de identidade com amostras de JCPyV depositadas no GenBank (acesso MF662205.1 e MF662184.1, respectivamente). A amostra 3 apresentou valores de identidade de 96,99% a 99,35% de identidade com amostras de JCPyV depositadas no GenBank (acesso AB362362.1 e AF281614.1, respectivamente).

Pelo nosso método de detecção, 18 (20,2%) dos pacientes apresentaram os dois vírus em conjunto na urina e 5 (5,4%) apresentaram os dois vírus no plasma. Quando relacionada a co-infecção com os dois vírus em relação ao diagnóstico positivo de BKPyV na urina, foi observado que de 18 pacientes co-infectados, 46,2% eram positivos para BKPyV. E quando relacionados ao diagnóstico positivo de BKPyV no plasma, foi observado que de 5 pacientes co-infectados, 18,5% eram positivos para BKPyV no plasma. Estes resultados de frequência, apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$).

5.2.3 Marcadores clínicos e laboratoriais

5.2.3.1 Evolução da creatinina e ureia plasmáticas

O presente estudo incluiu 92 pacientes submetidos ao transplante renal. Os dados laboratoriais dos participantes avaliados relativos à evolução dos níveis de creatinina e ureia estão apresentados nas figuras a seguir.

A **Figura 7** mostra a evolução da creatinina plasmática dos pacientes transplantados analisadas em quatro períodos distintos, no pré-transplante, no pós-transplante (até um mês pós-cirúrgico), após seis meses do transplante e no dia da coleta (fevereiro a março de 2019), sendo esta evolução avaliada separadamente nos pacientes diagnosticados como BKPyV positivo (BKPyV +) ou negativo (BKPyV -) nas amostras de urina e plasma, respectivamente.

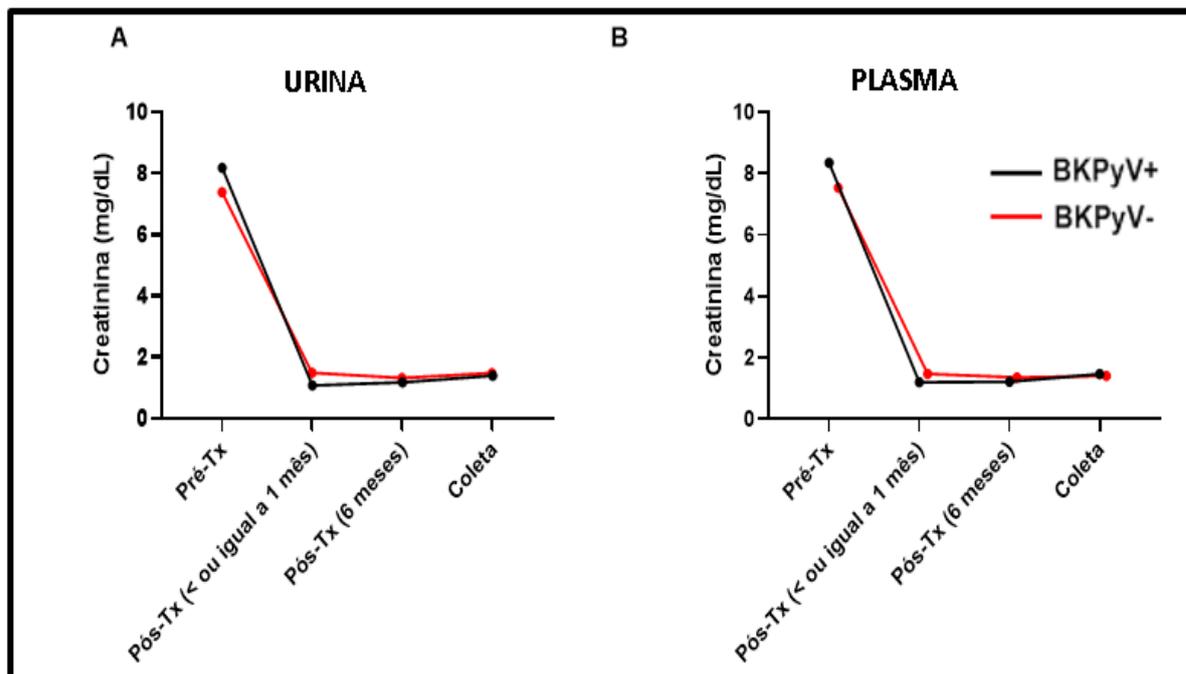


Figura 7: Evolução da creatinina em pacientes com diagnóstico positivo e negativo para BKPyV. A) Evolução da creatinina plasmática (mg/dL) dos pacientes diagnosticados como BKPyV positivo ou negativo na urina. B) Evolução da creatinina plasmática (mg/dL) dos pacientes diagnosticados como BKPyV positivo ou negativo no plasma. A evolução foi considerada no pré-transplante, pós-transplante até um mês após a cirurgia, após seis meses do transplante e no dia da coleta. Teste Kruskal-Wallis seguido pela correção de Bonferroni para os quatro grupos. *O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

A mediana dos níveis de creatinina no pós-transplante foi significativamente menor nos pacientes que tiveram o diagnóstico positivo ou negativo para BKPyV na urina e no plasma em relação à mediana do grupo no pré-transplante ($p < 0,0001$), como mostra a **Figura 7 (A)** e **Figura 7 (B)**. Esta redução já era esperada, sendo um indicativo de sucesso do transplante.

Na **Figura 8**, foi demonstrada a evolução da ureia plasmática dos pacientes transplantados. Para avaliar essa evolução em pacientes diagnosticados como

BKPyV positivo ou negativo na urina e no plasma, foi realizada a avaliação dos níveis destes marcadores de filtração renal em relação aos mesmos grupos pré e pós-transplante descritos anteriormente.

Esta evolução foi avaliada separadamente nos pacientes diagnosticados como BKPyV positivo ou negativo nas amostras de urina e plasma, respectivamente.

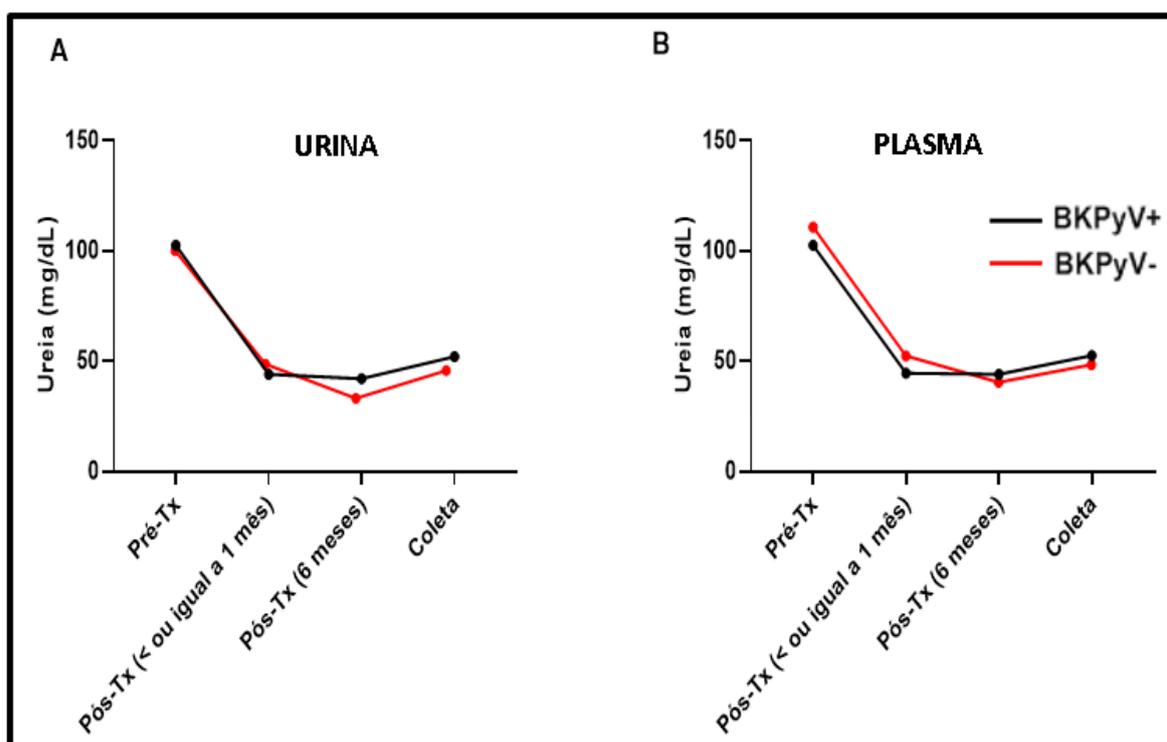


Figura 8: Evolução da ureia em pacientes com diagnóstico positivo e negativo para BKPyV.

A) Evolução da ureia plasmática (mg/dL) dos pacientes diagnosticados como BKPyV positivo ou negativo na urina. B) Evolução da ureia plasmática (mg/dL) dos pacientes diagnosticados como BKPyV positivo ou negativo no plasma. A evolução foi considerada no pré-transplante, pós-transplante até um mês após a cirurgia, após seis meses do transplante e no dia da coleta. Teste Kruskal-Wallis seguido pela correção de Bonferroni para os quatro grupos. *O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

A mediana dos níveis de ureia no pós-transplante foi significativamente menor nos pacientes que tiveram o diagnóstico positivo ou negativo para BKPyV na urina e no plasma em relação à mediana do grupo no pré-transplante ($p < 0,0001$), como mostra a **Figura 8 (A)** e **Figura 8 (B)**. Esta redução já era esperada, sendo um indicativo de sucesso do transplante.

A **Figura 9** demonstra a evolução da creatinina plasmática dos pacientes transplantados analisadas em quatro períodos distintos, no pré-transplante, no pós-

transplante (até um mês pós-cirúrgico), após seis meses do transplante e no dia da coleta (fevereiro a março de 2019).

Esta evolução foi avaliada separadamente nos pacientes diagnosticados como JCPyV positivo (JCPyV+) ou negativo (JCPyV-) nas amostras de urina e plasma, respectivamente.

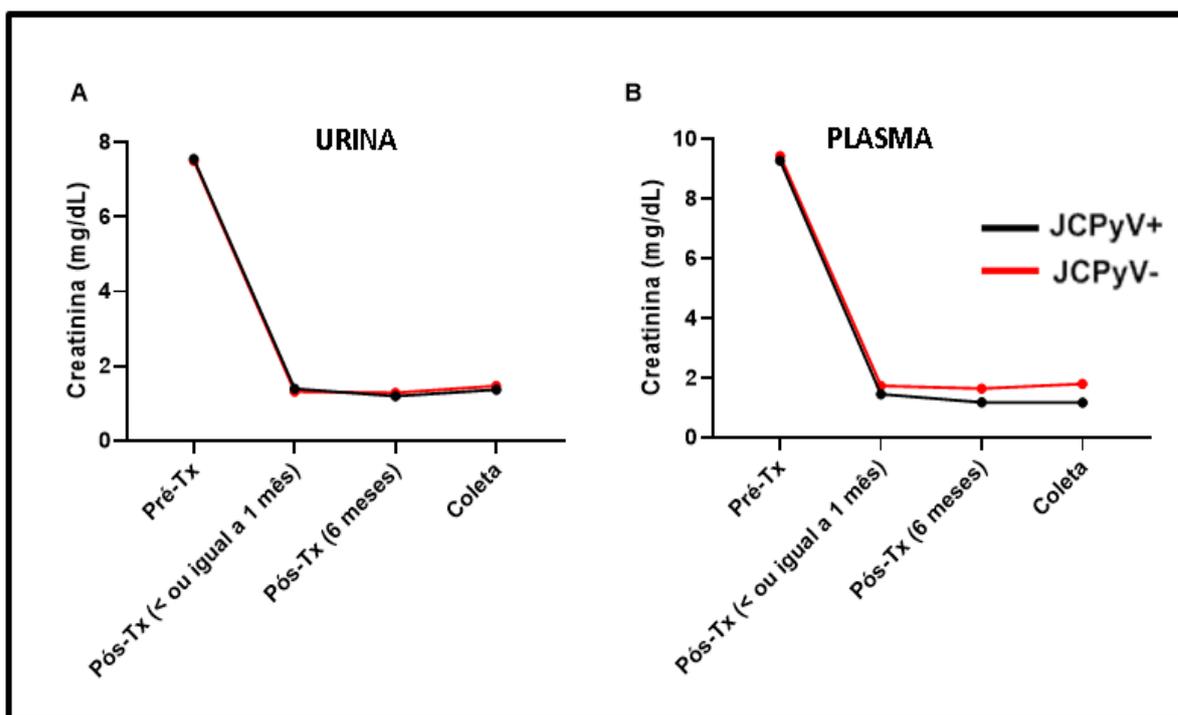


Figura 9: Evolução da creatinina em pacientes com diagnóstico positivo e negativo para JCPyV. A) Evolução da creatinina plasmática (mg/dL) dos pacientes diagnosticados como JCPyV positivo ou negativo na urina. B) Evolução da creatinina plasmática (mg/dL) dos pacientes diagnosticados como JCPyV positivo ou negativo no plasma. A evolução foi considerada no pré-transplante, pós-transplante até um mês após a cirurgia, após seis meses do transplante e no dia da coleta. Teste Kruskal-Wallis seguido pela correção de Bonferroni para os quatro grupos. *O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

A mediana dos níveis de creatinina no pós-transplante foi significativamente menor nos pacientes que tiveram o diagnóstico positivo ou negativo para JCPyV na urina e no plasma em relação à mediana do grupo no pré-transplante ($p < 0,0001$), como mostra a **Figura 9 (A)** e **Figura 9 (B)**. Esta redução já era esperada, sendo um indicativo de sucesso do transplante.

Na **Figura 10**, foi demonstrada a evolução da ureia plasmática dos pacientes transplantados. Para avaliar essa evolução em pacientes diagnosticados como JCPyV positivo ou negativo na urina e no plasma, foi realizada a avaliação dos níveis

destes marcadores de filtração renal em relação aos mesmos grupos pré e pós-transplante descritos anteriormente.

Esta evolução foi avaliada separadamente nos pacientes diagnosticados como JCPyV positivo ou negativo nas amostras de urina e plasma, respectivamente.

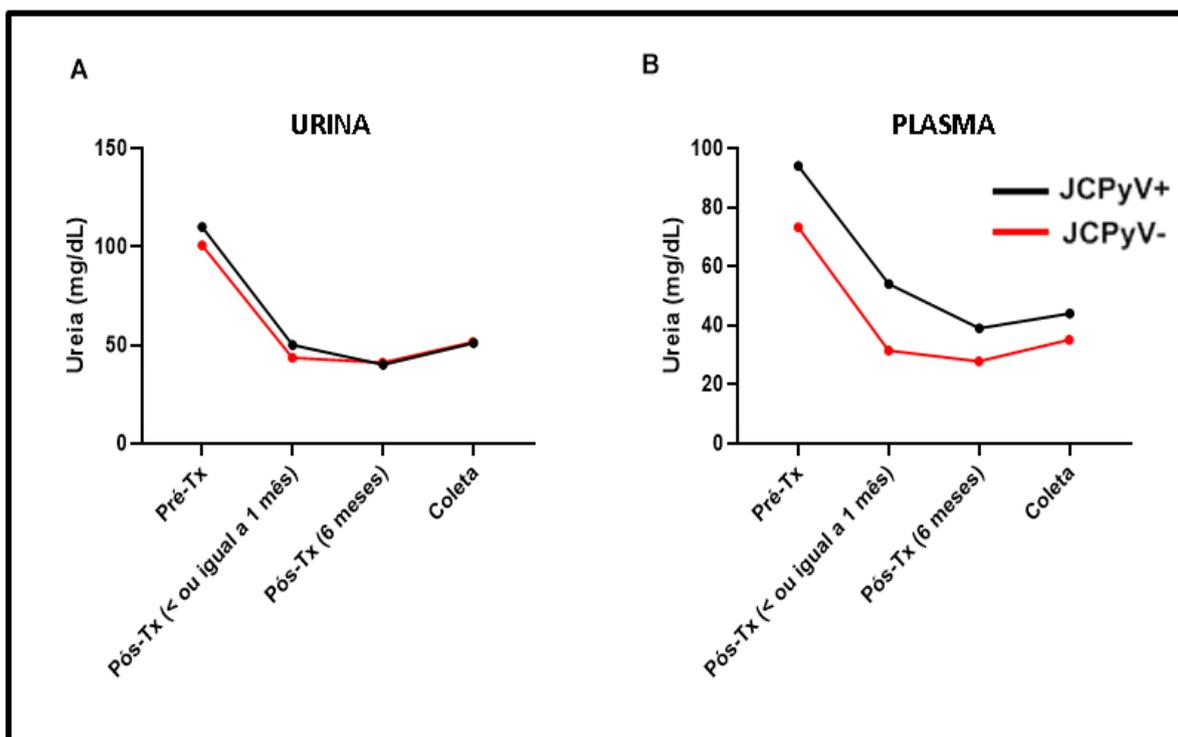


Figura 10: Evolução da ureia em pacientes com diagnóstico positivo e negativo para JCPyV.

A) Evolução da ureia plasmática (mg/dL) dos pacientes diagnosticados como JCPyV positivo ou negativo na urina. B) Evolução da ureia plasmática (mg/dL) dos pacientes diagnosticados como JCPyV positivo ou negativo no plasma. A evolução foi considerada no pré-transplante, pós-transplante até um mês após a cirurgia, após seis meses do transplante e no dia da coleta. Teste Kruskal-Wallis seguido pela correção de Bonferroni para os quatro grupos. *O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

A mediana dos níveis de ureia no pós-transplante foi significativamente menor nos pacientes que tiveram o diagnóstico positivo ou negativo para JCPyV na urina e no plasma em relação à mediana do grupo no pré-transplante ($p < 0,0001$), como mostra a **Figura 10 (A)** e **Figura 10 (B)**. Esta redução já era esperada, sendo um indicativo de sucesso do transplante.

5.2.3.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos em função do diagnóstico dos poliomavírus

Foi realizada a avaliação dos níveis de creatinina e ureia, assim como do ritmo de filtração glomerular estimado em função do diagnóstico de BKPyV na urina (representado pelas letras A, B e C) e no plasma (representado pelas letras D, E e F), como mostra a **Figura 11**.

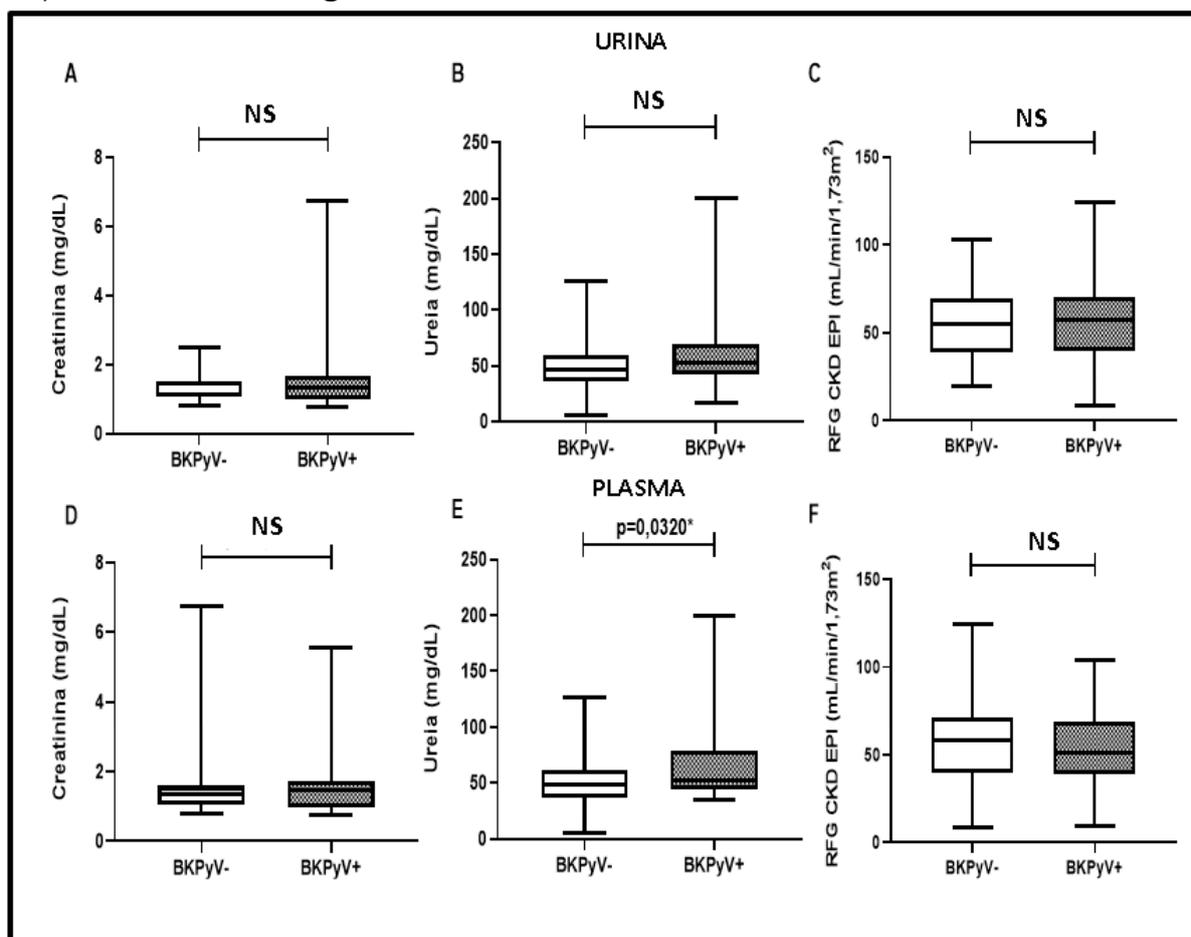


Figura 11: Avaliação dos níveis de creatinina e ureia e eRFG em função dos pacientes diagnosticados como BKPyV- e BKPyV+. Sigla NS: não significativo. A) Níveis de creatinina plasmática (mg/dL) em função dos pacientes diagnosticados como BKPyV- e BKPyV+ na urina. B) Níveis de ureia plasmática (mg/dL) em função dos pacientes diagnosticados como BKPyV- e BKPyV+ na urina. C) Ritmo de filtração glomerular estimado (mL/min/1,73m²) em função dos pacientes diagnosticados como BKPyV- e BKPyV+ na urina. D) Níveis de creatinina plasmática (mg/dL) em função dos pacientes diagnosticados como BKPyV- e BKPyV+ no plasma. E) Níveis de ureia plasmática (mg/dL) em função dos pacientes diagnosticados como BKPyV- e BKPyV+ no plasma. F) Ritmo de filtração glomerular estimado (mL/min/1,73m²) em função dos pacientes diagnosticados como BKPyV- e BKPyV+ no plasma. Teste de Mann-Whitney para dois grupos. *O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Os níveis de ureia foram significativamente maiores em pacientes diagnosticados como BKPyV+ em amostras de plasma em relação aos pacientes diagnosticados como BKPyV- ($p=0,0320$). Não foram encontradas diferenças significativas nas demais análises, como mostra a **Figura 11**.

Foi realizada a avaliação dos níveis de creatinina e ureia plasmáticas e do eRFG em função dos pacientes diagnosticados como JCPyV- e JCPyV+ na urina (representado pelas letras A, B e C) e no plasma (representado pelas letras D, E e F), como mostra a **Figura 12**.

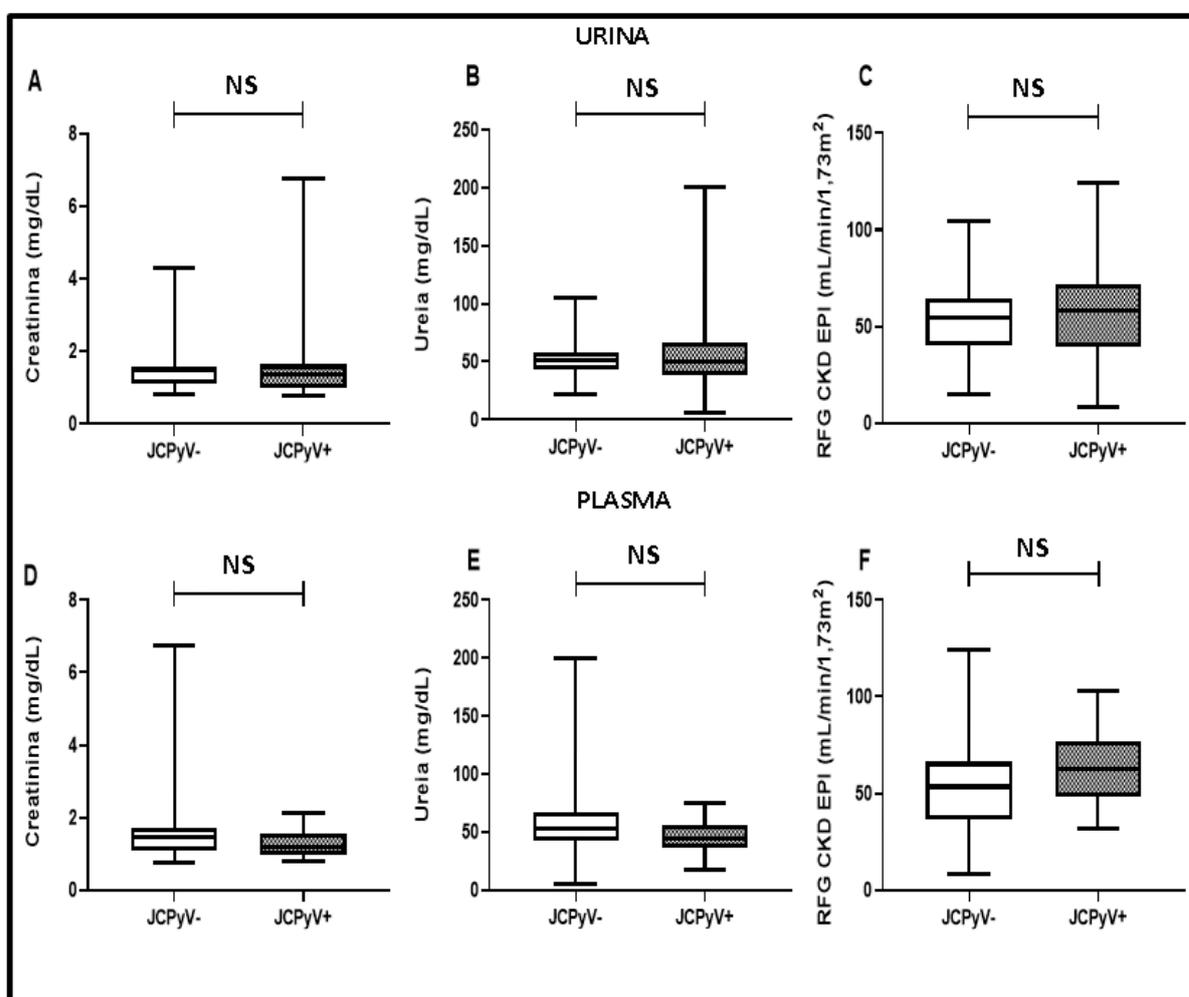


Figura 12: Avaliação dos níveis de creatinina e ureia plasmáticas e eRFG em função dos pacientes diagnosticados como JCPyV- e JCPyV+. Sigla NS: não significativo. A) Níveis de creatinina plasmática (mg/dL) em função dos pacientes diagnosticados como JCPyV- e JCPyV+ na urina. B) Níveis de ureia plasmática (mg/dL) em função dos pacientes diagnosticados como JCPyV- e JCPyV+ na urina. C) Ritmo de filtração glomerular estimado (mL/min/1,73m²) em função dos pacientes diagnosticados como JCPyV- e JCPyV+ na urina. D) Níveis de creatinina plasmática (mg/dL) em função dos pacientes diagnosticados como JCPyV- e JCPyV+ no plasma. E) Níveis de

ureia plasmática (mg/dL) em função dos pacientes diagnosticados como JCPyV- e JCPyV+ no plasma. F) Ritmo de filtração glomerular estimado (mL/min/1,73m²) em função dos pacientes diagnosticados como JCPyV- e JCPyV+ no plasma. Teste de Mann-Whitney para dois grupos. *O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Não foram encontradas diferenças significativas nas análises dos níveis de creatinina e ureia, assim como do eRFG, em função do diagnóstico de JCPyV no plasma e na urina, como pode ser observado na **Figura 12**.

Foi realizada a avaliação dos níveis de creatinina e ureia plasmáticas e eRFG em função dos pacientes diagnosticados como BKPyV+ e JCPyV+ na urina (representado pelas letras A, B e C) e no plasma (representado pelas letras D, E e F), como mostra a **Figura 13**.

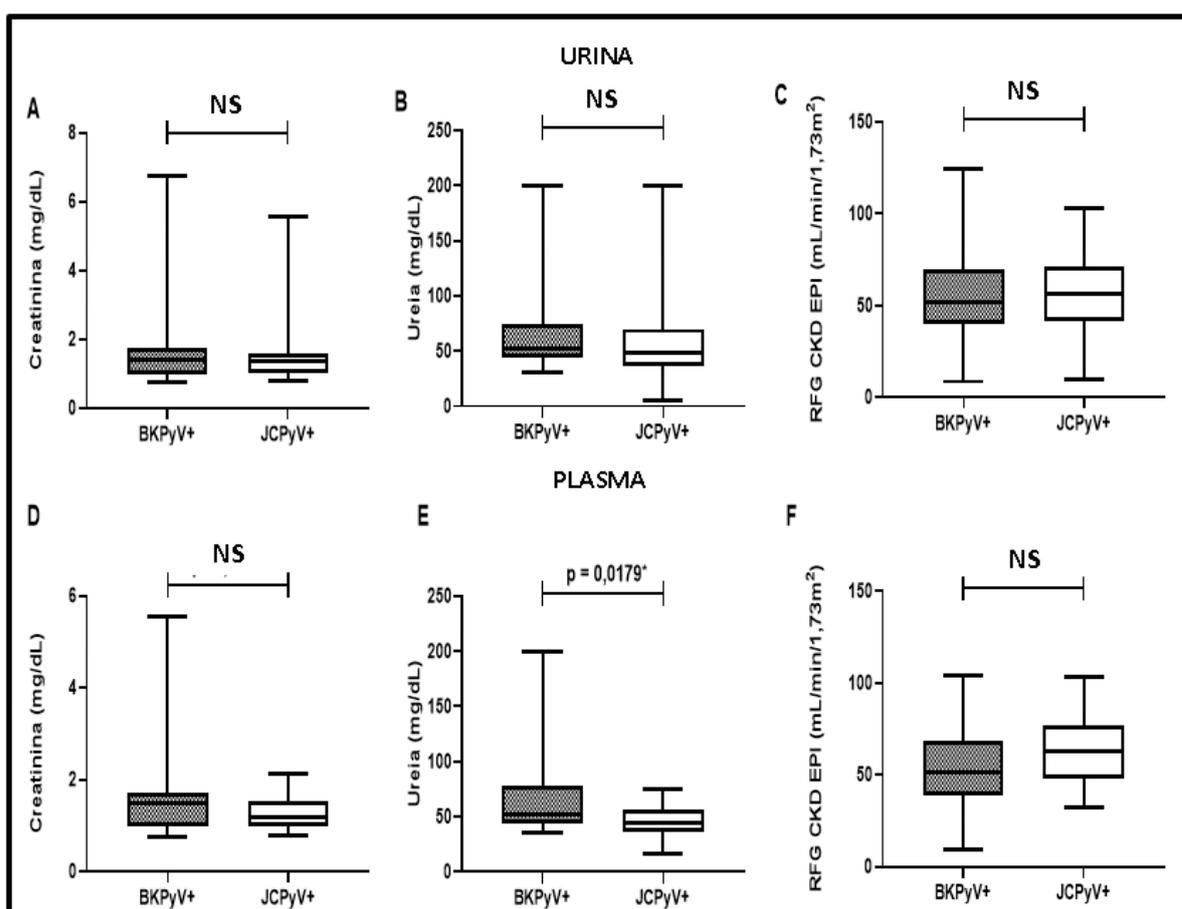


Figura 13: Avaliação dos níveis de creatinina e ureia plasmáticas e eRFG em função dos pacientes diagnosticados como BKPyV+ e JCPyV+. Sigla NS: não significativo. A) Níveis de creatinina plasmática (mg/dL) em função dos pacientes diagnosticados como BKPyV+ e JCPyV+ na urina. B) Níveis de ureia plasmática (mg/dL) em função dos pacientes diagnosticados como BKPyV+ e JCPyV+ na urina. C) Ritmo de filtração glomerular estimado (mL/min/1,73m²) em função dos

pacientes diagnosticados como BKPyV+ e JCPyV+ na urina. D) Níveis de creatinina plasmática (mg/dL) em função dos pacientes diagnosticados como BKPyV+ e JCPyV+ no plasma. E) Níveis de ureia plasmática (mg/dL) em função dos pacientes diagnosticados como BKPyV+ e JCPyV+ no plasma. F) Ritmo de filtração glomerular estimado (mL/min/1,73m²) em função dos pacientes diagnosticados como BKPyV+ e JCPyV+ no plasma. Teste de Mann-Whitney para dois grupos. *O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Os níveis de ureia plasmática em função dos pacientes diagnosticados como BKPyV+ no plasma foi maior do que dos pacientes JCPyV+, sendo observado diferenças estatísticas ($p = 0,0179$). Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas nas demais análises, conforme mostra a **Figura 13**.

Foi realizada a avaliação entre a contagem global de leucócitos, hemoglobina e plaquetas em função dos pacientes diagnosticados como BKPyV- e BKPyV+ (representado pelas letras A, B e C) e no plasma (representado pelas letras D, E e F), como mostra a **Figura 14**.

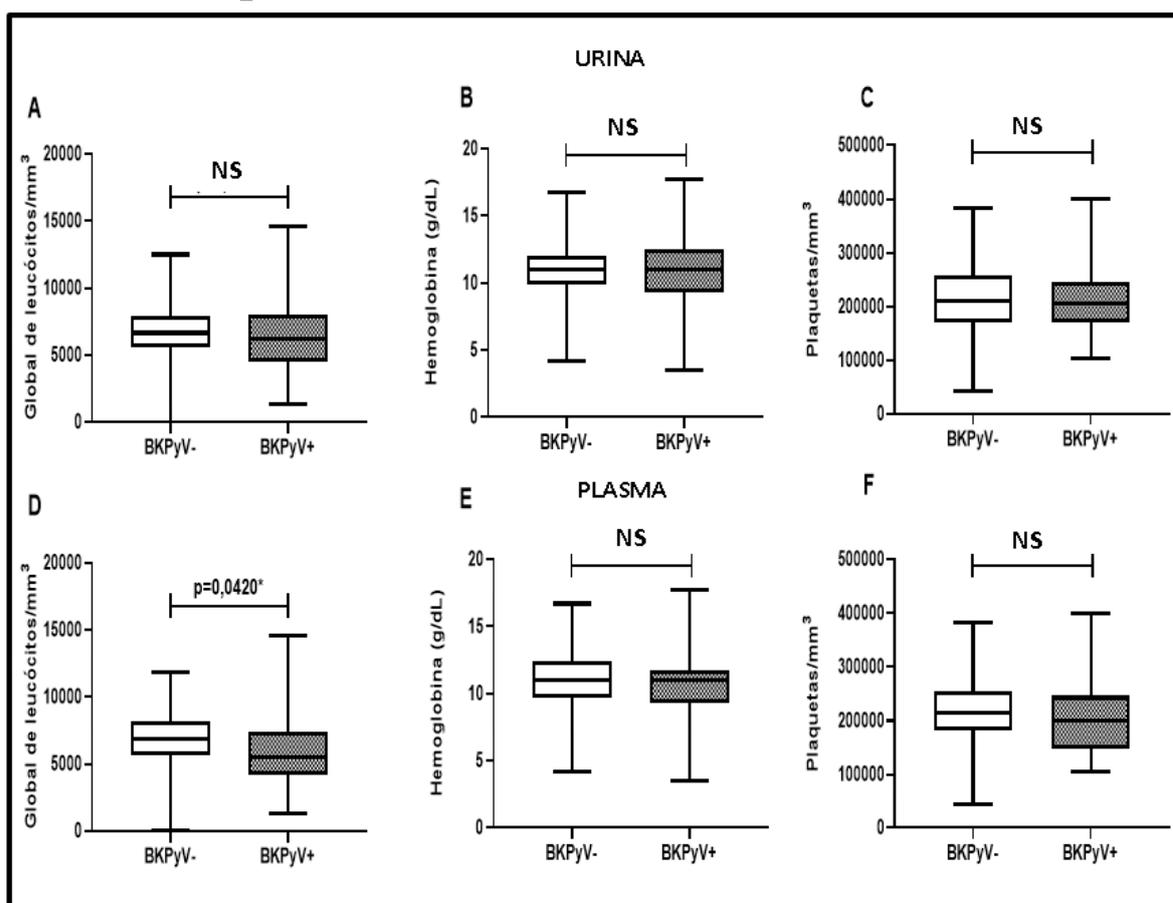


Figura 14: Avaliação da contagem global de leucócitos, hemoglobina e plaquetas em função dos pacientes diagnosticados como BKPyV- e BKPyV+. Sigla NS: não significativo. A) Contagem global de leucócitos/mm³ em função dos pacientes diagnosticados como BKPyV- e BKPyV+ na urina. B) Dosagem de hemoglobina (g/dL) em função dos pacientes diagnosticados como BKPyV-

e BKPyV+ na urina. C) Contagem de plaquetas/mm³ em função dos pacientes diagnosticados como BKPyV- e BKPyV+ na urina. D) Contagem global de leucócitos/mm³ em função dos pacientes diagnosticados como BKPyV- e BKPyV+ no plasma. E) Dosagem de hemoglobina (g/dL) em função dos pacientes diagnosticados como BKPyV- e BKPyV+ no plasma. F) Contagem de plaquetas/mm³ em função dos pacientes diagnosticados como BKPyV- e BKPyV+ no plasma. Teste de Mann-Whitney para dois grupos. *O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

A contagem global de leucócitos em função dos pacientes diagnosticados como BKPyV- no plasma foi maior do que dos pacientes BKPyV+, sendo observado diferenças estatísticas ($p = 0,0420$). Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas nas demais análises realizadas, conforme mostra a **Figura 14**. Foi realizada a avaliação entre a contagem global de leucócitos, hemoglobina e plaquetas em função dos pacientes diagnosticados como JCPyV- e JCPyV+ na urina (representado pelas letras A, B e C) e no plasma (representado pelas letras D, E e F), como mostra a **Figura 15**.

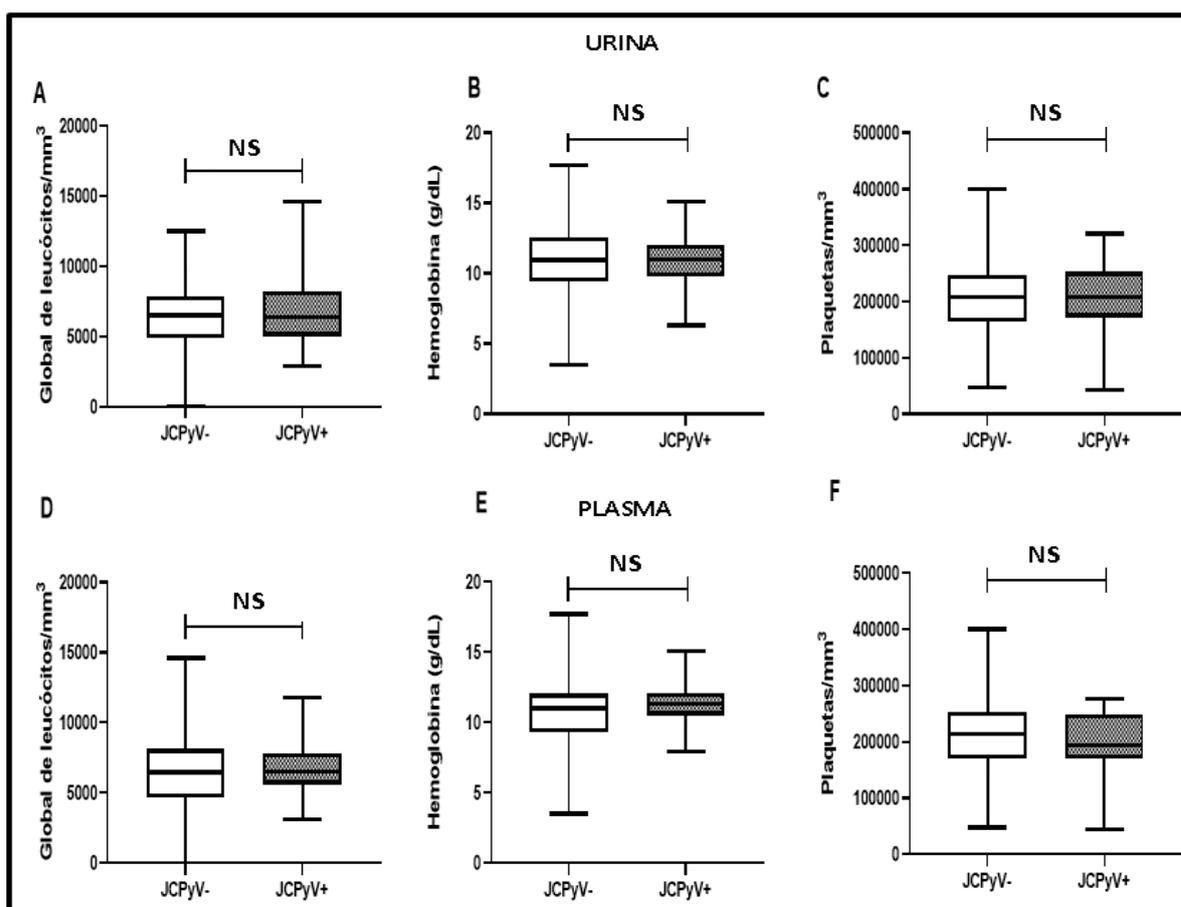


Figura 15: Avaliação da contagem global de leucócitos, hemoglobina e plaquetas em função dos pacientes diagnosticados como JCPyV- e JCPyV+. Sigla NS: não significativo. A) Contagem global de leucócitos/mm³ em função dos pacientes diagnosticados como JCPyV- e JCPyV+ na urina. B) Dosagem de hemoglobina (g/dL) em função dos pacientes diagnosticados como JCPyV- e JCPyV+ no plasma.

na urina. C) Contagem de plaquetas/mm³ em função dos pacientes diagnosticados como JCPyV- e JCPyV+ na urina. D) Contagem global de leucócitos/mm³ em função dos pacientes diagnosticados como BKPyV- e JCPyV+ no plasma. E) Dosagem de hemoglobina (g/dL) em função dos pacientes diagnosticados como JCPyV- e JCPyV+ no plasma. F) Contagem de plaquetas/mm³ em função dos pacientes diagnosticados como JCPyV- e JCPyV+ no plasma. Teste de Mann-Whitney para dois grupos. *O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

A avaliação da contagem global de leucócitos, dosagem de hemoglobina e contagem de plaquetas mostrou que todos os parâmetros foram maiores nos pacientes JCPyV+ (detectado tanto na urina quanto plasma) do que dos pacientes JCPyV-, porém estas diferenças não foram estatisticamente significantes, como mostra a **Figura 15**.

Foi realizada a avaliação entre a contagem global de leucócitos, hemoglobina e plaquetas em função dos pacientes diagnosticados como BKPyV+ e JCPyV+ na urina (representado pelas letras A, B e C) e no plasma (representado pelas letras D, E e F), como mostra a **Figura 16**.

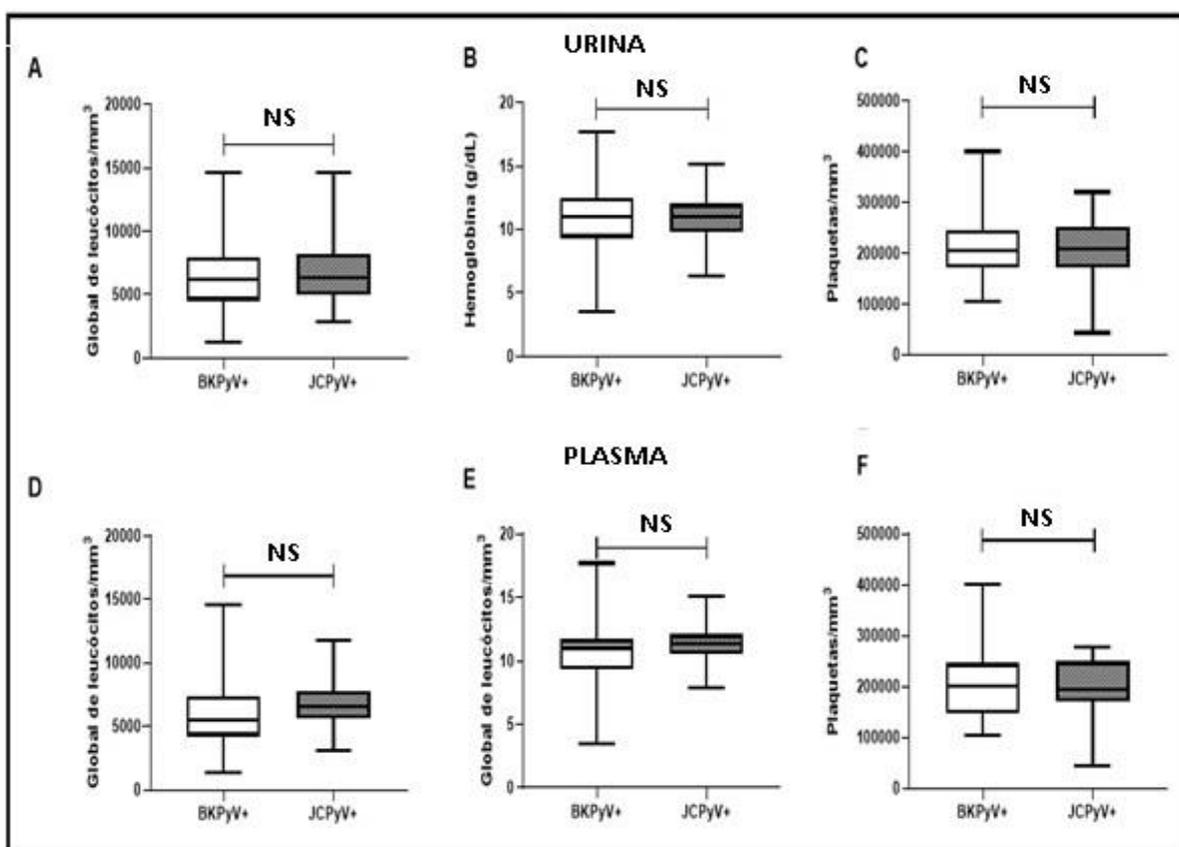


Figura 16: Avaliação da contagem global de leucócitos, hemoglobina e plaquetas em função dos pacientes diagnosticados como BKPyV+ e JCPyV+. Sigla NS: não significativo. A) Contagem global de leucócitos/mm³ em função dos pacientes diagnosticados como BKPyV+ e JCPyV+ na urina.

B) Dosagem de hemoglobina (g/dL) em função dos pacientes diagnosticados como BKPyV+ e JCPyV+ na urina. C) Contagem de plaquetas/mm³ em função dos pacientes diagnosticados como BKPyV+ e JCPyV+ na urina. D) Contagem global de leucócitos/mm³ em função dos pacientes diagnosticados como BKPyV+ e JCPyV+ no plasma. E) Dosagem de hemoglobina (g/dL) em função dos pacientes diagnosticados como BKPyV+ e JCPyV+ no plasma. F) Contagem de plaquetas/mm³ em função dos pacientes diagnosticados como BKPyV+ e JCPyV+ no plasma. Teste de Mann-Whitney para dois grupos. *O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

A avaliação da contagem global de leucócitos, dosagem de hemoglobina e contagem de plaquetas mostrou que apresentaram diferenças estatísticas significativas, como mostra a **Figura 16**.

5.2.3.3 Análises citológicas

Dos 92 pacientes avaliados, três não realizaram a coleta de urina, portanto a análise citológica foi realizada em 89 pacientes, dos quais 7 (7,9%) apresentaram células *decoy* na urina (resultado positivo). Abaixo está ilustrada uma imagem de uma célula *decoy* para um paciente positivo para BKPyV (**Figura 17**).

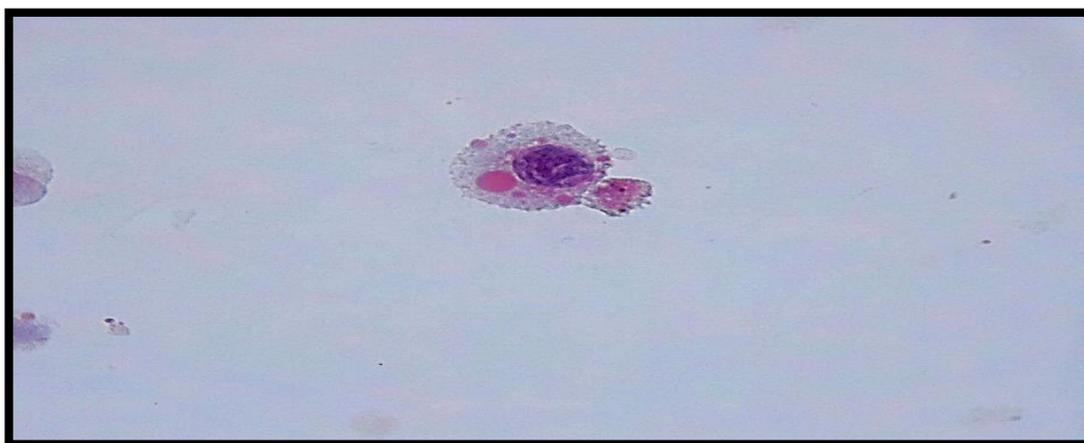


Figura 17: Célula *decoy* observada no estudo transversal-observacional. Imagem da lâmina corada em Papanicolau 400x, apresentando célula *decoy* na urina do paciente 33 com alteração da relação núcleo-citoplasma, núcleo hiper Cromático, cromatina irregular e múltiplas inclusões hialinas virais.

Os pacientes foram distribuídos de acordo com o diagnóstico citológico realizado, sendo avaliados os pacientes com células *decoy* (+) e sem células *decoy* (-) na urina, em função do diagnóstico molecular encontrado para BKPyV na urina e no plasma. As análises de frequência foram realizadas, dadas em número absoluto

e porcentagem. A frequência de células *decoy* após diagnóstico de BKPyV na urina está demonstrada na **Tabela 12**.

Tabela 12 – Frequência de células *decoy* após diagnóstico de BKPyV na urina

Diagnóstico molecular (urina)	<i>Decoy -</i>	<i>Decoy +</i>	p
BKPyV-	29 (100%)	0 (0%)	0,0175*
BKPyV+	32 (82,1%)	7 (17,9%)	

Teste Qui-Quadrado de Pearson Assintótico; os dados foram apresentados como valores absolutos (frequência em %). *Valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Foi observada uma maior frequência de pacientes sem células *decoy* com diagnóstico de BKPyV- na urina, em relação aos pacientes com células *decoy* e com o mesmo diagnóstico molecular. O mesmo foi observado quando analisado os pacientes diagnosticados com BKPyV+ na urina que apresentaram menor frequência de células *decoy* (+) na urina. Nesta análise houve diferenças estatísticas significativas com $p = 0,0175$, sensibilidade de 52,5% e valor preditivo positivo de 82,1%, como mostra a **Tabela 12**.

A frequência de células *decoy* após diagnóstico de BKPyV no plasma está demonstrada na **Tabela 13**.

Tabela 13 – Frequência de células *decoy* após diagnóstico de BKPyV no plasma

Diagnóstico molecular (plasma)	<i>Decoy -</i>	<i>Decoy +</i>	p
BKPyV-	60 (96,8%)	2 (3,2%)	0,0249*
BKPyV+	22 (81,5%)	5 (18,5%)	

Teste Qui-Quadrado de Pearson Assintótico; os dados foram apresentados como valores absolutos (frequência em %). *Valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Foi observada uma maior frequência de pacientes sem células *decoy* com diagnóstico de BKPyV- no plasma em relação aos pacientes com células *decoy* com o mesmo diagnóstico molecular. O mesmo foi observado quando analisado os pacientes diagnosticados com BKPyV+ na urina que apresentaram menor frequência

de células *decoy* (+) no plasma. Nesta análise houve diferenças estatísticas significativas com $p= 0,0249$, sensibilidade de 26,8%, especificidade de 28,6%, valor preditivo positivo de 81,5% e valor preditivo negativo de 3,2%, como mostra a **Tabela 13**.

5.2.3.4 Análises das biópsias renais

Foi possível constatar que a nefrite crônica túbulo intersticial foi encontrada em todos os pacientes com o diagnóstico de infecção por poliomavírus diagnosticados por biópsia renal. Estes dados foram coletados dos prontuários médicos do hospital.

Ao todo foram sete pacientes com diagnóstico de nefrite crônica túbulo intersticial em atividade secundária à infecção por poliomavírus, sendo cinco pacientes do estudo epidemiológico de 2013-2014 e dois do estudo transversal observacional.

Os presentes achados morfológicos estão de acordo com os padrões descritos pela Classificação histopatológica das rejeições (critério Banff) (1997-2017) que configuram a Nefrite Crônica Túbulo-intersticial como secundária à infecção por poliomavírus (Classe B2).

Dos sete pacientes diagnosticados, cinco pacientes (71,4%) perderam o enxerto, com necessidade de terapia renal dialítica ou re-transplante. Desta forma, fica clara a importância do diagnóstico precoce de BKPyV em pacientes transplantados renais.

5.2.3.5 Análise de regressão

Foi realizado um levantamento das frequências das variáveis BKPyV, JCPyV, citomegalovírus (CMV), células *decoy*, rejeição pós-transplante, creatinina plasmática, ureia plasmática, eRFG, hemoglobina, global de leucócitos e plaquetas dos pacientes do estudo transversal-observacional diagnosticados por biópsia renal com NCE ($n=24$). Os dados das biópsias renais foram obtidos nos prontuários médicos. Os dados qualitativos foram descritos em número absoluto e frequência (%). Os parâmetros bioquímicos e hematológicos foram descritos como mediana e intervalo interquartilico (**Tabela 14**).

Tabela 14 – Levantamento de dados das variáveis clínicas e laboratoriais de pacientes com NCE

Parâmetros	Valores
BKPyV no plasma	9 (37,5%)
BKPyV na urina	10 (42%)
JCPyV no plasma	8 (33,3%)
JCPyV na urina	11 (45,8%)
CMV	11 (45,8%)
Células <i>decoy</i>	3 (12,5%)
Rejeição pós-Tx	13 (54,2%)
Creatinina (mg/dL)	1,51 (1,2-2,9)
Ureia (mg/dL)	53,5 (42-100)
eRFG (mL/min/1,73m ²)	51 (20-70,6)
Hemoglobina (g/dL)	10,4 (8,8-12)
Global de leucócitos/mm ³	5.900 (3.100-8.000)
Plaquetas/mm ³	208.000 (148.500-240.500)

Os dados obtidos na **Tabela 14** foram utilizados para direcionar as variáveis de interesse na análise de regressão.

Em seguida, foi realizada a análise de regressão conforme **Tabela 15**. Foram mostrados os resultados obtidos após análise de regressão univariada, com os valores da exponencial β , intervalo de confiança (95%) e valor de p, relacionando a nefropatia crônica do enxerto (variável dependente) com as variáveis independentes (BKPyV, JCPyV, citomegalovírus, células *decoy*, rejeição pós-transplante, creatinina plasmática, ureia plasmática, eRFG, hemoglobina, global de leucócitos e plaquetas).

Tabela 15 – Resultados da análise de regressão univariada

	Exponencial (β)	Intervalo de confiança (95%)	p
BKPyV no plasma	0,612	0,228-1,643	0,330
BKPyV na urina	1,655	0,497-5,507	0,411
JCPyV no plasma	1,263	0,464-3,438	0,647
JCPyV na urina	1,833	0,511-6,571	0,352
CMV	7,253	2,363-22,26	0,001*
Células <i>decoy</i>	2,287	0,471-11,104	0,305
Rejeição pós-Tx	10,13	3,301-31,090	0,000*
Creatinina	2,820	1,346-5,906	0,006*
Ureia	1,025	1,006-1,045	0,009*
eRFG	0,978	0,956-1,0	0,048*
Hemoglobina	1,412	0,693-2,877	0,342
Global de leucócitos	1,0	1,0-1,0	0,123*
Plaquetas	1,0	1,0-1,0	0,452

CMV: citomegalovírus; eRFG: ritmo filtração glomerular estimado; Rejeição pós-Tx: rejeição pós-transplante. Análise de regressão binária univariada, validada pelo teste de Hosmer Lemeshow ($p > 0,05$) e teste Omnibus ($p < 0,05$). *O valor de $p \leq 0,20$ foi considerado significativo.

Houve associação entre a NCE e a infecção por citomegalovírus, rejeição pós-transplante, creatinina, ureia e contagem global de leucócitos com $p \leq 0,20$. Este valor de $p \leq 0,20$ foi um ponto de corte para incluir as variáveis na análise multivariada.

Desta forma, na **Tabela 16** foram mostrados os resultados obtidos após análise de regressão multivariada, com os valores da exponencial β , intervalo de confiança (95%) e valor de p, relacionando a NCE (variável dependente) com as variáveis independentes (CMV, rejeição pós-transplante, creatinina plasmática, ureia plasmática, eRFG e global de leucócitos).

Tabela 16 – Resultados da análise de regressão multivariada

	Exponencial (β)	Intervalo de confiança (95%)	p
CMV	12,429	3,133-49,314	0,000*
Rejeição pós-Tx	7,215	1,880-27,686	0,004*
Creatinina	3,327	1,344-8,233	0,009*
Ureia	0,974	0,940-1,011	0,163
eRFG	1,027	0,977-1,080	0,294
Global de leucócitos	1,000	0,999-1,000	0,120

CMV: citomegalovírus; eRFG: ritmo filtração glomerular estimado; Rejeição pós-Tx: rejeição pós-transplante. Análise de regressão binária univariada, validada pelo teste de Hosmer Lemeshow ($p > 0,05$) e teste Omnibus ($p < 0,05$). *O valor de $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

Após o ajuste, permaneceu a associação entre a nefropatia crônica do enxerto e a infecção por CMV, rejeição pós-transplante e creatinina plasmática com $p \leq 0,05$.

5.2.3.6 Fluxograma do estudo transversal-observacional

No fluxograma foi ilustrado o diagnóstico molecular da infecção por BKPyV no plasma e urina e a sua relação com o desenvolvimento da nefropatia crônica do enxerto e rejeição ao enxerto (**APÊNDICE C**).

Dos 92 pacientes do estudo transversal-observacional, foram avaliados os pacientes com relação ao desenvolvimento da NCE pós-transplante, dos quais 24 pacientes apresentaram alterações morfológicas renais sendo considerados pacientes nefropatas e dos quais 68 pacientes foram considerados não nefropatas.

Dos 24 pacientes com diagnóstico de NCE, 10 pacientes apresentaram diagnóstico molecular positivo para BKPyV na urina, nove pacientes apresentaram diagnóstico inconclusivo e cinco pacientes apresentaram diagnóstico molecular negativo para BKPyV na urina.

Dos 10 pacientes nefropatas crônicos e positivos para BKPyV na urina, três pacientes apresentaram células *decoy* na urina e sete pacientes não apresentaram. Dentre os três pacientes com presença de células *decoy* na urina, dois pacientes apresentaram diagnóstico molecular positivo para BKPyV no plasma e um paciente

foi negativo. Os dois pacientes positivos para BKPyV no plasma e positivos para células *decoy* não apresentaram rejeição ao enxerto renal.

Em relação aos 10 pacientes considerados nefropatas crônicos e que tiveram diagnóstico molecular positivo para BKPyV na urina, sete pacientes apresentaram diagnóstico positivo para BKPyV no plasma e três pacientes tiveram diagnóstico negativo no plasma. Dentre os três pacientes nefropatas crônicos e positivos para BKPyV na urina, mas negativos no plasma, apenas um teve rejeição e dois pacientes não tiveram rejeição ao enxerto. Dos sete pacientes nefropatas crônicos, positivos para BKPyV no plasma e na urina, quatro pacientes não tiveram rejeição e três pacientes tiveram rejeição.

Nove pacientes foram considerados duplo positivos, 2 pacientes cujo os resultados das células *decoy* foram positivas no diagnóstico de BKPyV na urina e no plasma juntamente com 7 pacientes cujo diagnóstico molecular de BKPyV na urina e no plasma foi positivo.

Dos 24 pacientes com diagnóstico de NCE, cinco pacientes apresentaram diagnóstico negativo para BKPyV na urina e no plasma. Sendo que destes cinco pacientes, quatro pacientes apresentaram rejeição ao enxerto e um paciente não teve rejeição.

Em relação ao 68 pacientes que não desenvolveram a NCE, 29 pacientes apresentaram diagnóstico molecular positivo para BKPyV na urina, 15 pacientes apresentaram diagnóstico inconclusivo e 24 pacientes apresentaram diagnóstico molecular negativo para BKPyV na urina.

Dos 29 pacientes não nefropatas crônicos e positivos para BKPyV na urina, quatro pacientes apresentaram células *decoy* na urina e 25 pacientes não apresentaram. Dentre os quatro pacientes com presença de células *decoy* na urina, três pacientes apresentaram diagnóstico molecular positivo para BKPyV no plasma e 1 paciente foi negativo. Os 3 pacientes positivos para BKPyV no plasma e positivos para células *decoy*, não apresentaram rejeição ao enxerto renal.

Dos 29 pacientes considerados não nefropatas crônicos e que tiveram diagnóstico molecular positivo para BKPyV na urina, 16 pacientes apresentaram diagnóstico positivo para BKPyV no plasma e 13 pacientes tiveram diagnóstico negativo no plasma. Dentre os 16 pacientes não nefropatas crônicos e positivos para BKPyV na urina e no plasma, apenas 1 teve rejeição e 15 pacientes não tiveram rejeição ao enxerto. Dentre os 13 pacientes que tiveram diagnóstico positivo

para BKPyV na urina, mas negativo no plasma, 12 pacientes tiveram rejeição ao enxerto e apenas 1 paciente não teve rejeição.

Em relação aos 24 pacientes não nefropatas crônicos, negativos para BKPyV na urina, 0 pacientes tiveram diagnóstico de BKPyV positivo no plasma e 24 pacientes tiveram diagnóstico negativo para BKPyV no plasma e na urina. Dentre estes 24 pacientes, 2 pacientes tiveram rejeição ao enxerto e 22 pacientes não apresentaram rejeição, sendo estes considerados duplo negativos.

Em resumo, foram avaliados 92 transplantados renais, dos quais 24 desenvolveram NCE e 68 não desenvolveram. Dentre os 24 nefropatas crônicos, dez foram positivos para BKPyV na urina e apenas sete confirmados no plasma, havendo rejeição em apenas três pacientes.

Pode-se inferir que apenas três pacientes com virúria e viremia associada ao BKPyV desenvolveram rejeição ao enxerto com o desenvolvimento da NCE.

O presente estudo mostrou baixo índice de casos de desenvolvimento da NCE associada a infecção pelo BKPyV na população estudada.

5.2.3.7 Desenvolvimento da NCE após análise do fluxograma

Os pacientes foram distribuídos de acordo com o resultado das biópsias renais obtidas, sendo avaliados os pacientes com ou sem nefropatia crônica do enxerto em relação ao diagnóstico molecular encontrado para BKPyV na urina e no plasma.

Os pacientes foram agrupados em dois grupos, os que desenvolveram nefropatia crônica e os pacientes sem nefropatia crônica, sendo que a frequência de pacientes diagnosticados com presença de nefropatia crônica nesta análise deveriam ser positivo para BKPyV na urina e no plasma conjuntamente, sendo considerados duplos positivos. E os pacientes não nefropatas crônicos deveriam ser negativo para BKPyV na urina e no plasma conjuntamente, sendo considerados duplos negativos.

A **Tabela 17** foi criada a partir dos dados coletados no fluxograma. As análises de frequência foram realizadas, dadas em número absoluto e a frequência (%).

Tabela 17 – Frequência de nefropatas crônicos ou não relacionando a infecção por BKPyV na urina e no plasma

	BKPyV- (duplos negativos)	BKPyV+ (duplos positivos)
Sem nefropatia crônica	24 (60%)	16 (40%)
Com nefropatia crônica	5 (41,7%)	7 (58,3%)

Teste Qui-Quadrado de Pearson Assintótico; os dados foram apresentados como valores absolutos (frequência em %).

Foi realizado o Teste Qui-Quadrado de Pearson sendo que a maior frequência de pacientes do estudo foram duplos negativos para BKPyV e sem o desenvolvimento da NCE e esta relação apresentou uma especificidade de 30,4% e sensibilidade de 82,8%, com valor preditivo positivo de 60,0% e valor preditivo negativo de 58,3%. As análises realizadas não apresentaram diferenças estatísticas significativas.

6 DISCUSSÃO

6.1 Caracterização clínica, demográfica e laboratorial do estudo retrospectivo de 2013-2014

As características demográficas mostradas na **Tabela 5** corroboram com dados da literatura, segundo Batista e colaboradores (2017) e Alves (2018), a maior parte dos indivíduos em lista de espera pelo transplante são do sexo masculino com idade compreendida entre 51 a 60 anos. Condizentes com a pesquisa de De Oliveira e colaboradores (2014) realizada nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste, nas quais verificou-se que a maioria dos pacientes inscritos em programas de hemodiálise e que aguardam o transplante renal tem idade acima de 50 anos e sexo masculino predominante (DE OLIVEIRA; FORMIGA; ALEXANDRE, 2014). De acordo com o Ministério da Saúde, os homens são mais vulneráveis às doenças crônicas, em especial hipertensão arterial sistêmica e diabetes mellitus, principais fatores de risco para doença renal crônica. Observa-se, no cotidiano dos serviços de saúde, que os homens em idade ativa de trabalho procuram menos atendimento do que as mulheres, uma vez que estas buscam mais os serviços de saúde devido a cuidados ginecológicos. Este fato pode estar relacionado à vulnerabilidade masculina com propensão a sugerir superioridade nas filas de espera pelo transplante renal (BATISTA *et al.*, 2017). Os efeitos prejudiciais da testosterona, como suas propriedades pró-apoptóticas e pró-fibróticas também estão relacionadas ao maior número de casos de insuficiência renal nos homens. Além disso, os efeitos renoprotetores dos estrogênios na idade reprodutiva podem favorecer o menor número de casos de transplante renal em mulheres (ALVES, 2018). Apesar da maior prevalência do sexo masculino, em nosso estudo não houve grande diferença com relação ao sexo feminino, apesar do predomínio ainda ser masculino.

No presente trabalho, a cor parda foi a mais prevalente, porém, em um estudo com 3.614 transplantados renais no Hospital do Rim em São Paulo foi observada a prevalência da cor branca em 1.906 pacientes (52,7%) desta população de estudo, o que foi similar em outras pesquisas (PESTANA, 2017; BATISTA *et al.*, 2017). A diferença do nosso estudo quando comparado aos demais pode ser explicado pela

miscigenação da população brasileira que talvez no hospital Felício Rocho foi mais prevalente e também pela cor ser autodeclarada.

As causas primárias de doença renal crônica mais prevalentes neste estudo foram as glomerulopatias, seguido das doenças primárias de causas indeterminadas (**Tabela 6**). Em um estudo com 3.614 pacientes transplantados renais as doenças indeterminadas foram as mais prevalentes (33,6%) e as glomerulopatias estavam presentes em 18,2% (PESTANA, 2017). Outro estudo sobre o perfil epidemiológico constatou que as doenças de base como hipertensão arterial sistêmica e diabetes mellitus são comumente identificadas como as principais responsáveis por cerca de metade das doenças em pacientes em tratamento dialítico no Brasil e as causas de etiologia desconhecida para doença renal crônica também aparecem constantemente nos registros (BATISTA *et al.*, 2017). Portanto, as causas primárias foram distintas entre os centros médicos hospitalares.

O tempo pós-transplante menor ou igual a 5 anos indica que o estudo retrospectivo de 2013-2014 apresentou um tempo de sobrevida do enxerto satisfatória.

O tipo de doador falecido foi o mais prevalente nesta população, presente em 106 pacientes, o que corrobora com os achados da literatura. Segundo o Registro Brasileiro de Transplantes, em 2018 foram realizados no Brasil 4.905 transplantes com doadores falecidos e 1.018 transplantes com doadores vivos (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE TRANSPLANTES DE ÓRGÃOS - ABTO, 2019). O número elevado de transplantes com doadores falecidos se deve a uma política nacional e local que visa aprimorar a aquisição de órgãos e promover a doação de órgãos entre as famílias, frutos de um sistema de transplante nacional público competente, sistemático e financiado pelo governo (PESTANA, 2017).

Com base nos resultados encontrados para as comorbidades adquiridas pós-transplante, as mais prevalentes em nosso estudo foram as múltiplas. O que corrobora com um achado na literatura em que a maioria dos transplantados sofre de hipertensão arterial sistêmica; seguido de glomerulonefrite crônica, diabetes mellitus e de doenças não especificadas nos prontuários médicos. Apesar do aparecimento de tais comorbidades, a mortalidade por doenças cardiovasculares é

menos comum após o transplante quando comparada aos pacientes dialíticos (SANTOS *et al.*, 2017).

Com relação à terapia renal substitutiva pré-transplante, a hemodiálise foi a mais prevalente. A taxa de prevalência global de pacientes em tratamento dialítico é de 552 pacientes por milhão da população, sendo a hemodiálise a terapia renal substitutiva mais prevalente no mundo (SESSO *et al.*, 2016). No Brasil, segundo o censo de diálise de 2014, há um total estimado de 112.004 pacientes em tratamento dialítico, sendo que, desses, 91% têm como modalidade de diálise a hemodiálise (LESSA *et al.*, 2018).

A imunossupressão pós-transplante mais prevalente foi o regime imunossupressor triplo com Micofenolato Mofetil de Sódio (antiproliferativo), Tacrolimus (inibidor de calcineurina) e Prednisona (corticóide) (**Tabela 10**). O que corrobora com dados da literatura, segundo o “Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas”, portaria SAS/MS nº 712, de 13 de agosto de 2014, para receptores de doador vivo (HLA idêntico ou distinto) ou falecido, recomenda-se o esquema de imunossupressão tríplice com Prednisona, Azatioprina e Ciclosporina ou Tacrolimus. Alternativamente o esquema com Prednisona, Micofenolato de Mofetila ou de sódio e Ciclosporina ou Tacrolimus pode ser adotado, sendo que o uso dos precursores do ácido micofenólico (MMFNa) fica reservado para situações como intolerância clínica comprovada à Azatioprina, evidenciada clinicamente por leucopenia intensa e precoce ou, laboratorialmente, pela deficiência da enzima tiopurina metiltransferase, outra situação seria nefropatia crônica do enxerto comprovada com dados clínicos e histológicos; ou após rejeições celulares agudas recorrentes, histologicamente comprovadas, ou diante de comprovada rejeição mediada por anticorpos. Em ambas as situações recomenda-se também a reformulação de outros imunossupressores, com reajuste na dose dos imunossupressores ou troca de Ciclosporina por Tacrolimus. No Hospital Felício Rocho, foi observado que desde o início da terapia imunossupressora de manutenção os pacientes eram tratados com a imunossupressão tríplice mais prevalente em nosso estudo.

O tratamento de indução pós-transplante mais prevalente em nosso estudo foi com o medicamento Simulect (anticorpos monoclonais anti-receptores de IL-2), se administrado em 2 doses de 20 miligramas, a primeira no dia zero e a segunda no quarto dia pós-operatório, podem reduzir a frequência de rejeições agudas sem

ocasionar maior incidência de infecções ou de doença linfoproliferativa. Embora na literatura tenha sido encontrado que a terapia de indução com anticorpos anti-células T propicia melhores resultados, com menores taxas de rejeição. A terapia de indução com imunoglobulina anti-timócito é o tratamento que se associa a melhores respostas e, posteriormente, a esquema de manutenção sem corticosteróides (PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS, 2014).

Com relação às infecções virais adquiridas, a infecção por citomegalovírus foi a mais prevalente, o que corrobora com dados da literatura, onde o citomegalovírus é uma das principais manifestações que ocorrem após o transplante, com alto índice de morbidade e mortalidade entre o primeiro e o quinto mês pós-transplante renal. Em casos mais graves, os pacientes podem apresentar disfagia, odionofagia, náuseas, vômitos, dor abdominal, sangramento gastrointestinal, perfuração e diarreia (TIZO & MACEDO, 2015).

Com relação à compatibilidade HLA, a maioria apresentou entre 0 a 3 alelos HLA correspondentes entre doador e receptor. Na atual rotina laboratorial dos exames de histocompatibilidade pré-transplante são avaliados os locos HLA-A, HLA-B, HLA-C e HLA-DRB1. No presente estudo foram avaliados os locos HLA-A, B e C do doador e receptor, totalizando o máximo de 6 matches/compatibilidades alélicas. Em nosso estudo e segundo dados da literatura, os receptores de transplante incompatíveis ou com baixa compatibilidade HLA têm maior chance de desenvolver anticorpos específicos do doador (DSA), associados à baixa sobrevida do aloenxerto (KRAMER *et al.*, 2017). O polimorfismo HLA é importante do ponto de vista biológico, pois dota os indivíduos de uma maior abrangência de moléculas apresentadoras de antígenos ao sistema imune. E no que se refere aos antígenos principais de histocompatibilidade, tal diversidade reduz e/ou dificulta as chances de se encontrar doadores não relacionados com os mesmos haplótipos HLA (RUIZ, 2004).

Com relação ao diagnóstico de rejeição, a maioria não desenvolveu rejeição pós-transplante. Segundo dados da literatura, a rejeição celular aguda é a mais acometida, entre 20% a 80% dos receptores podem adquirir esta rejeição (TIZO & MACEDO, 2015). O desenvolvimento da rejeição pode estar relacionado ao perfil dos receptores, às condições ambientais, às práticas assistenciais, às técnicas cirúrgicas, entre outros fatores. Na prática clínica, observa-se que os principais sinais e sintomas que caracterizam a rejeição são febre, hipertensão arterial sistêmica,

aumento do volume e dor sobre o enxerto, diminuição do volume urinário e o aumento do valor da creatinina sérica sem outra explicação para a ascensão. O diagnóstico precoce da rejeição aguda é crucial para função e sobrevivência do enxerto (CORREA *et al.*, 2013).

Com relação ao desenvolvimento da NCE, a maioria não desenvolveu, o que indica que o monitoramento pós-transplante tem sido satisfatório, com o uso de tratamento imunossupressor adequado bem como de outros medicamentos associados, atrelado aos hábitos de vida saudáveis. Como demonstrado anteriormente sobre a imunossupressão, a terapia imunossupressora tripla utilizada no Hospital Felício Rocho previne o possível desenvolvimento de nefropatia crônica do enxerto, por isso, a baixa prevalência de casos de nefropatia na população estudada, além dos pacientes serem bem monitorados (PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS, 2014).

Os rins são os órgãos primários para a eliminação de produtos indesejáveis do metabolismo. Dentre estes produtos estão incluídos a ureia (principal metabólito nitrogenado derivado da degradação protéica) e a creatinina (metabólito derivado de aminoácidos oriundo do metabolismo muscular da creatina e da ingestão de carne) (BIAVA *et al.*, 2014). A creatinina é filtrada livremente no glomérulo, ativamente secretada em pequena parcela, mas o suficiente para estimar o RFG, sendo muito utilizada como marcador de avaliação para a função renal. Este exame é rotineiramente solicitado no pós-transplante renal para monitorar os pacientes e detectar precocemente a existência de rejeição ao órgão transplantado (MOTA, 2012).

A ureia apesar de ser filtrada livremente pelo glomérulo, não pode ser reabsorvida nem secretada ativamente, representando um fraco preditor do RFG, mas sua determinação em conjunto com a creatinina pode indicar estados patológicos distintos. E o RFG é definido como o volume plasmático de uma substância que pode ser completamente filtrada pelos rins em uma determinada unidade de tempo (SODRÉ; COSTA; LIMA, 2007).

Os níveis plasmáticos de ureia e creatinina são indicadores tardios do funcionamento normal do rim e quando aumentados são indicadores de disfunção renal (MITTAL *et al.*, 2012; PANDYA *et al.*, 2016).

Segundo Santos e colaboradores (2018), a doença renal crônica consiste no comprometimento lento, insidioso e irreversível da função renal que ocorre em decorrência do excesso de produtos hidrogenados (ureia e creatinina) no sangue, os quais impossibilitam os rins de manterem o equilíbrio corporal. Diante deste contexto, os níveis plasmáticos de ureia e creatinina foram mensurados. Os pacientes deste estudo apresentaram bom monitoramento pós-transplante em relação aos parâmetros bioquímicos analisados, vale ressaltar que apesar de serem transplantados renais, eles não deixaram de ser doentes renais crônicos (**Tabela 7**). Em relação ao RFG, ele é comumente calculado usando equações de estimativa baseadas nos valores da creatinina plasmática sendo que o desempenho destas equações em receptores do transplante renal não está claro, apresentando resultados conflitantes entre os estudos. Após o transplante renal, a composição corporal pode sofrer algumas alterações, com alta prevalência de obesidade e perda de massa muscular devido ao uso de esteróides, o que poderia alterar os resultados destas equações. Assim, para estes receptores, a validação específica de equações da função renal se faz necessária. Mas o que se pode afirmar com os valores do ritmo de filtração glomerular é de que eles tendem a declinar a partir dos 40 anos, independentemente se o indivíduo é transplantado ou não, o que corrobora com o achado do estudo (POTTEL *et al.*, 2017). Além disso, a média do RFG encontrada é semelhante ao achado em transplantados renais.

6.2 Caracterização clínica, demográfica e laboratorial do estudo transversal-observacional

As características demográficas e clínicas desta população foram semelhante ao estudo retrospectivo discutido acima, com exceção da cor autodeclarada dos pacientes (**Tabela 8**). A imunossupressão pós-transplante mais prevalente também foi semelhante ao estudo anterior. Já o tratamento de indução pós-transplante mais prevalente neste estudo foi com o medicamento Timoglobulina, usado em 34 pacientes, e como discutido anteriormente ele é considerado o tratamento de escolha, apesar das vantagens do uso do Simulect já discutidas. Com relação às infecções virais adquiridas, a infecção por citomegalovírus foi a mais prevalente, semelhante ao achado do estudo anterior. Com relação ao diagnóstico de rejeição e

NCE, a maior parte não as desenvolveram, o que indica que o monitoramento pós-transplante tem sido satisfatório, semelhante ao descrito anteriormente no **item 6.1**.

A evolução dos níveis plasmáticos de creatinina e ureia após o transplante demonstram bom monitoramento e boa recuperação da função renal pós-transplante tanto dos pacientes diagnosticados com BKPyV ou JCPyV positivo quanto negativo, sendo os níveis encontrados dentro da normalidade. E como descrito por Varella e colaboradores (2014), o vírus estabelece uma fase latente, persistindo indefinidamente em diferentes tecidos, em especial no trato urinário, o que poderia explicar a ausência de alterações aparentes nos parâmetros bioquímicos. Diretrizes internacionais recomendam a triagem da replicação viral, avaliando-se a urina ou plasma, pelo menos a cada três meses durante os primeiros dois anos após o transplante, em seguida, anualmente durante cinco anos, e se houver um aumento inexplicável da creatinina sérica pós-tratamento é indicativo de rejeição aguda (NIHEI; PIERROTTI; DAVID-NETO, 2016).

Os níveis elevados de ureia (**Figura 11 e 13**), segundo Bastos & Kirsztain (2011), podem ocorrer devido a dieta com alto consumo de proteínas, destruição tédica, hemorragia gastrointestinal ou terapia com corticosteróides. O estudo de Giacomelli & Pedrazzi (2001), também demonstrou que várias alterações que modificam as taxas de filtração glomerular, de ureia e creatinina plasmáticas, são alteradas devido ao uso de fármacos. Estes achados corroboram com os nossos resultados, além da questão farmacológica. O uso de imunossupressores representa um fator importante de reativação do BKPyV. A imunossupressão necessária para sustentar o aloenxerto predispõe os receptores de transplantes a infecções oportunistas, que atualmente representam uma causa significativa de morbidade e mortalidade (MYSOREKAR *et al.*, 2012). O local inicial da reativação do BKPyV é o trato urinário e a sua primeira manifestação é a excreção assintomática do vírus na urina. Dependendo do grau de reatividade, o vírus pode ser eliminado na urina sem entrar na corrente sanguínea, pode persistir na urina ou progredir para viremia e desenvolver a nefropatia (MONTAGNER *et al.*, 2007). As taxas aumentadas de infecções virais em receptores de transplantes são recorrentes. O CMV e o BKPyV são as causas mais comuns de infecção após o transplante renal e são comumente adquiridas durante a diálise ou através de transfusão sanguínea. No entanto, em nosso estudo não foram observadas diferenças estatísticas nos níveis de creatinina.

Apesar da dosagem sérica de creatinina ser um marcador da função renal, a sua análise isolada não é capaz de definir a causa da disfunção dos pacientes transplantados renais (SANTOS *et al.*, 2004). O que corrobora com o estudo de Maia (2008) avaliando 50 transplantados renais, os níveis séricos elevados de uréia e creatinina, utilizados isoladamente, não diferenciaram pacientes que apresentaram disfunção do enxerto devido à rejeição celular aguda ou em decorrência de replicação viral pelo BKPyV ($p > 0,05$). Já a correlação dos níveis alterados de uréia e creatinina, com a presença ou ausência das células *decoy*, foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). No entanto, segundo Kayler e colaboradores (2008), quando há progressão para nefropatia esta é marcada pelo aumento dos níveis séricos de creatinina, podendo ser detectada a presença de BKPyV na urina e no plasma. Embora em nosso estudo não tenha sido encontrada diferenças estatísticas nos níveis de creatinina plasmática.

Com relação a avaliação dos níveis de ureia plasmática em função dos pacientes diagnosticados com virúria e viremia por BKPyV e JCPyV, foi observado maiores níveis de ureia nos pacientes com viremia por BKPyV em relação aos pacientes com viremia por JCPyV, com diferenças estatísticas ($p = 0,0179$), conforme mostra a **Figura 13**. O que corrobora com dados da literatura, uma vez que o BKPyV está mais associado a complicações renais quando comparado ao JCPyV (VARELLA *et al.*, 2014; DIVERS *et al.*, 2019).

Segundo Divers e colaboradores (2019), o JCPyV e BKPyV são notáveis por seu tropismo pelo rim, onde eles permanecem em estado latente, mas sofrem reativação periódica levando à sua excreção na urina. Cerca de 60-80% dos adultos são soropositivos para esses vírus, e 20 a 40% excretam o vírus na urina a qualquer momento. Porém, altos níveis de replicação viral podem levar à morte celular e ao desenvolvimento de outras doenças. Aproximadamente 10% dos receptores do transplante sofrem de nefropatia crônica associada ao BKPyV podendo resultar em perda do enxerto. Da mesma forma, a replicação de BKPyV está associada ao declínio da função renal em receptores de transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas. Em contraste com o BKPyV, a doença causada pelo JCPyV é mais associada ao sistema nervoso central (DIVERS *et al.*, 2019). Além disso, segundo Divers e colaboradores (2019), há evidências de uma associação protetora entre a presença de JCPyV na urina e a nefropatia não-diabética. Apesar do resultado

paradoxal da associação protetora, foi demonstrado no estudo de Pires e colaboradores (2011) a presença de taxas mais baixas de doença renal avançada em pacientes com JCPyV presente na urina (PIRES *et al.*, 2011). A virúria de JCPyV também está associada a taxas mais baixas de rejeição aguda e falha do aloenxerto em receptores do transplante de rins e possui menor probabilidade de causar inflamação no parênquima renal (gerador de glomerulosclerose e/ou doença renal crônica) (DIVERS *et al.*, 2019). A virúria de JCPyV é postulada como sendo um marcador do sistema imunológico do hospedeiro mas que falha ao erradicar vírus não-nefropáticos. Diante deste achado, pode-se dizer que a associação do JCPyV com complicações renais pós-transplante é baixa quando comparada ao BKPyV, o que explicaria a maior elevação da ureia plasmática nos indivíduos BKPyV+. Segundo Divers e colaboradores (2019) o cenário clínico sugere que o JCPyV exibe uma relação comensal com o urotélio e as células renais, o que também explicaria os resultados não significativos encontrados na **Figura 12**.

O hemograma completo é um dos exames mais solicitados no laboratório clínico, pois apresenta grande importância na avaliação geral do paciente, no auxílio ao diagnóstico, assim como no acompanhamento do tratamento de diversas doenças, além de ser essencial na investigação das doenças adquiridas após o transplante. Dentre as principais alterações avaliadas, podemos citar as anemias carenciais, anemias associadas a doenças crônicas, poliglobulias, leucocitoses infecciosas e as leucemias. Sendo que o organismo possui um sistema imune específico de combate aos diferentes agentes tóxicos e infecciosos, seja por destruição de agentes invasores ou pela formação de anticorpos e linfócitos capazes de destruir patógenos (RENA *et al.*, 2001; GROTTTO, 2009; HLAVAC, 2012). Diante deste contexto foi realizada a análise hematológica dos pacientes no pré e pós-transplante renal. A contagem global de leucócitos avaliada em função do diagnóstico de BKPyV no plasma, mostrou que os pacientes positivos para BKPyV tiveram a global de leucócitos significativamente menor do que em pacientes negativos para BKPyV, mas com valores leucocitários ainda dentro da normalidade, pode-se dizer que há uma predisposição dos pacientes com viremia pelo BKPyV de desenvolver quadros de leucopenia, porém ainda sem alterações aparentes no hemograma, como mostra a **Figura 14**. O que corrobora com dados da literatura. O BKPyV pode atuar como agente imunomodulador, tornando os pacientes mais

suscetíveis à infecções por outros organismos. No entanto, no estudo de Pérez-Torres e colaboradores (2010), foi descrito que nenhum episódio de leucopenia foi relatado em pacientes do grupo controle quando comparado aos pacientes com BKPyV ($p=0,001$). Também foi observado que nove de 17 transplantados renais desenvolveram a nefropatia crônica e apresentaram leucopenia grave em algum período próximo ou no momento da biópsia. Sendo levantado o seguinte questionamento, se a leucopenia representa um fator de risco para o desenvolvimento da infecção por BKPyV ou se ela é o resultado da infecção por BKPyV, esta resposta não foi esclarecida no estudo de Pérez-Torres e colaboradores (2010) e permanece em aberto após a nossa análise e busca na literatura. Além disso, medicamentos profiláticos, incluindo Inibidores da calcineurina, Sulfametoxazol mais Trimetoprima, Valganciclovir e Micofenolato Mofetil são bem conhecidos por causarem leucopenia/neutropenia (SMITH *et al.*, 2014), sendo estes medicamentos bastante utilizados pelos transplantados renais. Outro estudo em pacientes oncológicos mostraram que a presença de infecção por BKPyV foi significativamente associada a uma diminuição na contagem global de leucócitos entre os pacientes com tumores sólidos ($p= 0,025$) (LOUTFY *et al.*, 2017).

6.3 Diagnóstico Molecular

As técnicas moleculares para obtenção do fragmento de β -actina (220pb), bem como de BKPyV (284pb) e JCPyV (190pb) mostraram-se satisfatórios. Sendo este experimento realizado com base nos primers construídos anteriormente pelo estudo de De Souza e colaboradores (2018). Apesar da utilização dos iniciadores já desenhados, foi realizada alterações nas condições ótimas da PCR, como descrito em materiais e métodos, sendo possível a adaptação da técnica em nosso laboratório, seguindo as nossas próprias condições. Em nosso experimento o limite de detecção encontrado para BKPyV foi de 10^1 cópias/ μ L, semelhante ao estudo de De Souza e colaboradores (2018). E o limite encontrado para JCPyV foi de 10^2 cópias/ μ L. No estudo de De Souza e colaboradores (2018) a PCR *Semi-Nested* pode detectar 10 cópias do modelo de DNA plasmidial de cada vírus por microlitro. Portanto, nosso estudo mostrou-se reprodutível em relação ao BKPyV em comparação com o outro estudo. E o JCPyV apresentou maior número de cópias com limite mínimo de detecção em relação ao BKPyV.

Em relação ao sequenciamento realizado, todas as três sequências de BKPyV produzidas no nosso estudo apresentaram similaridade acima de 90% com sequências específicas de BKPyV depositadas no GenBank. No caso do JCPyV, as três sequências apresentaram identidade acima de 95% com sequências específicas do GenBank, mostrando que os produtos produzidos na PCR são específicas dos vírus estudados.

Avaliando-se os dados de amplificação nos dois tipos de amostras, observa-se que na urina 48,9% das amostras tiveram amplificação do controle endógeno β -actina, comparado a 98,9% nas amostras de sangue como observado na **Tabela 10**. Esses dados sugerem que possa ter existido degradação de DNA ou presença de inibidores entre os dois tipos de amostras analisadas. Em especial nas amostras de urina, trabalhos da literatura descrevem que essas amostras podem possuir menor conteúdo de DNA endógeno (molécula alvo da amplificação da β -actina), ou maior degradação do DNA endógeno livre na urina. Essa observação pode ser devido às diferenças de filtração renal ou diferenças no grau de degradação de DNA na urina, intrínsecas de cada paciente, ou mesmo do período de coleta desse tipo de amostra, além disso a coleta sendo feita em qualquer horário e com qualquer jato pode não ter DNA suficiente para a PCR, a ureia também é considerada inibidor da PCR e problemas no kit de extração também devem ser considerados, estes seriam os principais motivos para a amplificação do controle endógeno ter apresentado limitações (BALI *et al.*, 2014; HOORFAR *et al.*, 2004; KHAN *et al.*, 1991). Uma limitação encontrada em amostras extraídas de urina seria a inibição do processo de amplificação por substâncias que permanecem no extrato de DNA. É sabido que a ureia é um forte inibidor da amplificação da PCR. Na urina, por exemplo, a ureia em uma concentração de 50mM ou acima pode gerar inibição da PCR devido a desnaturação de polimerases, e portanto a baixa porcentagem de amostras de urina negativas para o alvo e para o controle endógeno podem indicar a presença de inibidores, e a necessidade de otimização no processo de extração de DNA (Hedman & Rådström, 2013; BALI *et al.*, 2014; KHAN *et al.*, 1991). No entanto, segundo Hedman & Rådström (2013) para inibidores com solubilidades semelhantes ao DNA, como é o caso da ureia, uma estratégia de purificação seria necessária para remover inibidores solúveis em água na etapa de extração do DNA. A exemplo da lavagem com água, exclusão por tamanho ou ligação de proteínas a uma fase sólida (como a

membrana de sílica). Sendo que em nosso estudo foi utilizado kit de extração com sílica, mas não se pode afirmar que esta purificação removeu todos os inibidores. O kit de extração utilizado em nosso estudo apresentou um rendimento de DNA inferior a 10ng/ μ L nas amostras urinárias, mesmo tendo sido realizado a re-extração das mesmas. Segundo Bali e colaboradores (2014), a ausência de sequência alvo presente na reação pode significar também que a reação foi inibida, devido ao mau funcionamento do termociclador, mistura incorreta da PCR e baixa atividade da polimerase. Vale ressaltar o tempo da coleta e processamento da amostra. A primeira urina da manhã deve ser a amostra de escolha a ser coletada, por apresentar maior concentração celular neste período. Mas na prática, nem sempre esta coleta é facilmente obtida. Até mesmo o armazenamento da urina deve ser cuidadosamente realizado prevenindo o crescimento bacteriano e a degradação do DNA. É importante armazenar as amostras de urina em condições específicas e a extração não deve ser realizada imediatamente após a coleta (BALI *et al.*, 2014). A presença do controle endógeno é apenas um indicador de falha na PCR, e por si só não tem nenhum efeito contra fatores inibitórios (HOORFAR *et al.*, 2004). É bem conhecido também que o DNA proveniente de urina é fragmentado como resultado da atividade de nucleases endógenas presentes na urina (BALI *et al.*, 2014; HOORFAR *et al.*, 2004). Diante deste contexto, a padronização para o diagnóstico molecular de amostras de urina é de difícil realização, apesar de serem amostras não invasivas e de fácil coleta.

Avaliando-se os dados de amplificação para os dois vírus, observa-se que na urina 43,8% das amostras tiveram amplificação para o BKPyV e 46% para JCPyV. Comparado a 29,4% de amplificação do BKPyV nas amostras de plasma e 29% de amplificação do JCPyV, como observado na **Tabela 11**. Segundo a literatura, a excreção de JCPyV e de BKPyV na urina de pacientes transplantados é bastante variável, sendo relatado valores que variam de 20% a 90% (PIRES, 2009). A virúria por JCPyV varia de 3–27% (HIRSCH & STEIGER, 2003; KNOWLES, 2006; DRACHENBERG *et al.*, 2007; HELANTERA *et al.*, 2009; PIRES *et al.*, 2011; BOUKOUM *et al.*, 2015). E a viremia por JCPyV nos receptores de transplante renal parece ser muito rara, transitória e de índice baixo (DELBUE *et al.*, 2013; BOUKOUM *et al.*, 2015). A baixa viremia associada ao JCPyV não é surpreendente, sendo considerada incomum e mais frequentemente assintomática (RANDHAWA; VATS;

SHAPIRO, 2005; DRACHENBERG *et al.*, 2007; HELANTERA *et al.*, 2009; CHENG *et al.*, 2011).

Segundo Varella e colaboradores (2014), a virúria por BKPyV acomete entre 30 a 40% da população transplantada e a viremia acomete entre 11 a 20% desta mesma população, sendo esta presuntiva do desenvolvimento de nefropatia. Esta nefropatia só é considerada definitiva quando é comprovada a lesão do enxerto. No entanto, no estudo de Montagner e colaboradores (2010) foram encontrados 61,7% de urinas positivas para BKPyV coletadas de pacientes transplantados renais na região sul do Brasil. E Pires e colaboradores (2011) também encontraram significativa diferença na detecção de BKPyV; enquanto 27,1% dos transplantados foram positivos, apenas em 2,2% do grupo controle foram detectados BKPyV.

As variações nos resultados de detecção viral encontradas podem ocorrer devido a diferenças na sensibilidade das técnicas de detecção, diferenças de aspectos clínicos e estado imunológico dos indivíduos testados, ou mesmo diferenças demográficas dos pacientes (COMERLATO, 2012). Apesar da variedade de métodos de triagem disponíveis para diagnosticar os vírus, a metodologia ideal não foi definida, existindo variações intralaboratoriais e interlaboratoriais que influenciam na sensibilidade analítica e na padronização da técnica. É recomendado o monitoramento mais intenso dos pacientes no primeiro ano após o transplante e quando é identificada a disfunção renal de causa inexplicada (TROFE-CLARK & SAWINSKI, 2016). Embora a prevalência dos vírus em nosso estudo tenha sido maior na urina e no plasma em relação aos demais trabalhos da literatura, houve semelhança em relação ao predomínio dos vírus na urina em relação ao plasma.

6.4 Análises citológicas

A detecção de células *decoy* na urina é um importante marcador de replicação do BKPyV, mas pobre preditor de nefropatia crônica associada ao BKPyV (PINTO *et al.*, 2016). No entanto, no estudo de Drachenberg e colaboradores (2001) avaliando as células *decoy* na urina, o valor preditivo positivo da citologia urinária para o diagnóstico de nefropatia viral foi de 90%, comprovada por biópsia renal realizada no mesmo dia. Os nossos resultados demonstram que dentre os 89 pacientes analisados por citologia urinária, a maioria não apresentou células *decoy* na urina,

as quais foram encontradas em apenas sete (7,9%) pacientes, como mostra as **Tabela 12** e **Tabela 13**. Este resultado foi inferior aos achados encontrados na literatura, apesar de termos obtido valores preditivos positivos elevados mas com sensibilidade analítica inferior a 50%.

Segundo Drachenberg e colaboradores (2004) e Geramizadeh e colaboradores (2006), a prevalência de células *decoy* encontradas na urina de transplantados renais varia entre 20-60%. Segundo o estudo de Nickeleit *et al.* (2003), de 212 receptores do transplante renal, apenas 51(24%) foram positivos para células *decoy*. Em outro estudo, com 221 transplantados analisados após um mês do transplante, a prevalência de células *decoy* foi de 16% (16,9% em receptores de rim, 5,9% em receptores simultâneo de rim-pâncreas e 20% em receptores de pâncreas isolado) e não houve diferenças entre os pacientes com citologia urinária positiva ou negativa para as células *decoy* em relação aos dados demográficos (sexo, idade e cor) ou clínicos (tempo pós-transplante, tipo de doador [falecido *versus* doador vivo], presença de função tardia do enxerto ou rejeição, outras infecções virais associadas e tipo de drogas imunossupressoras) (KROTH *et al.*, 2012). Já no estudo de Geramizadeh e colaboradores (2006) foi observada uma relação significativa entre o aumento da idade e uma maior incidência de células *decoy* presentes na urina, assim como uma maior incidência de células *decoy* entre pacientes maiores de 20 anos.

6.5 Avaliação das biópsias renais

A confirmação da NCE associada ao BKPyV requer biópsia do enxerto renal que é o método padrão-ouro de detecção, sendo esta realizada sempre que a função do enxerto estiver comprometida (ALMEIDA *et al.*, 2006; DA SILVA; ROTTA; POLONI, 2013). Foi possível constatar que a nefrite crônica túbulo intersticial foi observada em todos os pacientes com o diagnóstico de infecção por poliomavírus diagnosticados na biópsia renal, dos quais, 71,4% tiveram perda do enxerto com necessidade de terapia dialítica ou re-transplante,

Segundo Krejci e colaboradores (2018), o achado histológico pode ser falsamente negativo, pois as lesões são naturalmente focais, em particular no início da nefropatia crônica. O BKPyV afeta principalmente a medula renal em relação aos

túbulos corticais. As características imunohistoquímicas revelaram que as lesões das células tubulares proximais aparecem nos estágios avançados da NCE, após ter afetado os canais coletores renais. Além de alterações glomerulares significativas terem sido relatadas.

Foram avaliados 92 transplantados renais, dos quais 24 desenvolveram NCE e 68 não desenvolveram, como mostra o **APÊNDICE C**. Pode-se inferir que apenas três pacientes com virúria e viremia associada ao BKPyV desenvolveram rejeição com desenvolvimento da NCE. Segundo dados da literatura, a virúria é geralmente considerada insignificante, a viremia e o desenvolvimento da nefropatia crônica representam o gatilho para iniciar a terapia de redução da imunossupressão, já que ainda não existe tratamento comprovado. Em transplantados renais, a virúria de BKPyV assintomática se desenvolve em 30% dos pacientes, no entanto, apenas 1-2% dos pacientes desenvolvem a nefropatia viral no primeiro ano pós-transplante (CHEHADEH & NAMPOORY, 2013). Os achados corroboram com a literatura, segundo Varella e colaboradores (2014), cerca de 25-40% dos pacientes com altos níveis de virúria e positividade para células *decoy*, desenvolvem a viremia, sendo a prevalência da NCE entre 1% a 10% dos receptores do transplante. E em até 80% dos casos de nefropatia crônica associada ao BKPyV o desfecho clínico é a perda do enxerto. Vários estudos demonstram que a viremia no plasma de transplantados renais está associada ao maior risco de desenvolvimento da NCE (VARELLA *et al.*, 2014; AMBALATHINGAL *et al.*, 2017; PINTO & DOBSON, 2014).

Segundo Ambalathingal e colaboradores (2017), a PCR qualitativa é altamente sensível para detectar a replicação viral ativa e tem um valor preditivo positivo (VPP) entre 30 a 50% para diagnóstico de NCE, o que corrobora com os nossos achados. De fato, no presente estudo, o método analítico de diagnóstico para o BKPyV, relacionado à NCE, apresentou-se mais sensível que específico.

6.6 Análises de regressão

A regressão multivariada revelou que existe uma associação significativa entre o desenvolvimento da NCE e infecção por citomegalovírus, rejeição pós-transplante e creatinina plasmática, como mostra as **Tabela 16**. Esta relação não foi significativa para o JCPyV e BKPyV quando relacionados à NCE, embora tenhamos

encontrado uma sensibilidade alta (82,8%) em nossos pacientes diagnosticados com BKPyV.

Segundo o estudo de Mengel e colaboradores (2003), os pacientes transplantados renais diagnosticados com poliomavírus apresentaram um aumento significativo da creatinina sérica e episódios de rejeição aguda no primeiro mês após o transplante e um aumento significativo no número total de episódios de rejeição em relação aos pacientes do grupo controle, apresentando diferenças significativas na terapia imunossupressora utilizada entre os dois grupos. No estudo de Barton e colaboradores (2006), a viremia por BKPyV e JCPyV foi encontrada em 26% dos transplantados renais, sendo a viremia por BKPyV associada a casos de rejeição ao enxerto.

Embora infecções por CMV em receptores de transplante sejam bem conhecidas, pouco se conhece sobre a sua ocorrência em pacientes com glomerulonefrites. A nefrite lúpica e as vasculites associadas ao anticorpo citoplasmático anti-neutrófilo (ANCA), podem levar o paciente à doença renal em estágio terminal e à morte. O uso de terapia imunossupressora melhora a sobrevivência do paciente e do enxerto, porém é um fator de risco para o desenvolvimento de infecção por CMV (LIM *et al.*, 2019).

Segundo Morgantetti e colaboradores (2019), a infecção por CMV é uma causa importante de morbidade e mortalidade em receptores do transplante renal. Apesar de bem documentado como uma doença sistêmica em pacientes transplantados renais, acometendo tecidos não renais, como o trato gastrointestinal e respiratório, poucos casos foram relatados envolvendo lesões do aloenxerto renal secundárias ao CMV (SUNEJA & NAIR, 2008). Embora em nosso estudo revelou-se bastante significativa. Portanto, a possibilidade de infecção direta do rim pelo CMV precisa ser reconhecida para a realização de tratamento eficaz.

Uma média de 60% dos receptores de transplante renal tem infecção ativa pelo CMV e 20% desenvolvem doença sintomática. O CMV pode causar pneumonite, colite, esofagite, gastrite, hepatite, nefrite, entre outras manifestações. E pode estabelecer estado de latência semelhante aos poliomavírus. Outro estudo corroborou com o anterior citado, demonstrando que a doença invasiva provocada por CMV no aloenxerto renal são incomuns, mas quando ocorrem tem o padrão típico

de envolvimento túbulo-intersticial (SUNEJA & NAIR, 2008). No estudo de Shaver e colaboradores (1999) foi demonstrado que a infecção por CMV está associada com um risco aumentado de infecções bacterianas e oportunistas, rejeição aguda e crônica, perda de aloenxerto e morte. No estudo citado, o paciente infectado por CMV foi associado a disfunção do aloenxerto agudo apresentando inclusões virais sem rejeição aguda ou anormalidade glomerular na biópsia renal realizada. Apesar da ausência de lesão morfológica, o tratamento com ganciclovir foi acompanhado por uma melhora da função renal. Porém mais estudos são necessários para estabelecer o mecanismo de disfunção do aloenxerto na ausência de alterações inflamatórias em pacientes com infecção por CMV.

Diante dos resultados e discussões apresentados, uma continuidade nos estudos dos poliomavírus se faz necessária, uma vez que são patógenos emergentes e negligenciados na saúde pública. Estes vírus juntamente com o CMV são importantes para o sucesso do transplante renal bem como do combate da PML associada ao JCPyV. Até o momento não existem técnicas moleculares padronizadas e nem terapia antiviral específica para os poliomavírus, o que torna a infecção adquirida preocupante principalmente no contexto dos transplantes. Pretende-se nos futuros estudos padronizar uma técnica de avaliação da carga viral destes vírus, auxiliando no diagnóstico precoce, sendo utilizada como uma promissora ferramenta no monitoramento clínico e no prognóstico de pacientes transplantados renais.

7 CONCLUSÕES

- Após caracterização clínica, demográfica e laboratorial dos pacientes, a prevalência de poliomavírus foi de 3,2% no estudo retrospectivo de 2013-2014 e de 2,2% no estudo transversal-observacional, mostrando uma baixa prevalência desta infecção associada à nefropatia crônica do enxerto diagnosticada por biópsia renal.
- A prevalência de virúria associada ao diagnóstico molecular realizado para BKPyV foi de 43,8% e para JCPyV de 46%. E a prevalência de viremia associada ao BKPyV foi de 29,4% e para JCPyV de 29% na população do estudo transversal-observacional.
- Foi observada uma baixa associação entre a positividade de células *decoy* na urina e a infecção por BKPyV ou ao desenvolvimento da NCE.
- Os pacientes com viremia associada ao BKPyV apresentaram níveis elevados de ureia plasmática e valores diminuídos da global de leucócitos, mostrando uma potencial interferência desses vírus na função renal e nos parâmetros hematológicos.
- Os testes de diagnóstico molecular empregados no estudo mostraram-se mais sensíveis que específicos.
- A presença de virúria e/ou viremia mostrou baixa associação com a rejeição ao enxerto e com o desenvolvimento da NCE.
- A infecção viral por CMV e os níveis de creatinina plasmática foram independentemente associados ao desenvolvimento da NCE na população selecionada neste estudo.

8 PERSPECTIVAS DO ESTUDO

- Reavaliar a padronização do controle endógeno de β -actina em amostras de urina por meio da avaliação de novos kits de extração, realizar a troca do controle endógeno se julgar necessário ou utilizar um controle exógeno na forma de plasmídeo com primer específico a ser desenhado.
- Padronização da PCR quantitativa (*RealTime*) para avaliação da carga viral de BKPyV e JCPyV em amostras de urina e plasma.
- Pesquisar a associação entre o citomegalovírus com o desenvolvimento da nefropatia crônica do enxerto em pacientes transplantados renais bem como a sua associação com a co-infecção com o BKPyV.
- Realizar a técnica de imuno-histoquímica para identificação de células *decoy*.
- Retornar os resultados obtidos para a equipe médica da Unidade de Transplantes do Hospital Felício Rocho.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINI, H.T., BRUBAKER, G.R., SHAO, J., LEVIN, A., RYSCHKEWITSCH, C.F., BLATTNER, W.A., STONER, G.L. **BK virus and a new type of JC virus excreted by HIV-1 positive patients in rural Tanzania.** *Archives of Virology*, v.140, p.1919–1934, 1995.

AGOSTINI, H.T., RYSCHKEWITSCH, C.F., STONER, G.L. **Genotype profile of human polyomavirus JC excreted in urine of immunocompetent individuals.** *Journal of Clinical Microbiology*, v. 34, p.159–164, 1996.

AGOSTINI, H.T., YANAGIHARA, R., DAVIS, V., RYSCHKEWITSCH, C.F., STONER, G.L. **Asian genotypes of JC vírus in Native Americans and in a Pacific Island population: markers of viral evolution and human migration.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 94, p.14542- 14546, 1997.

AGOSTINI, H.T., RYSCHKEWITSCH, C.F., MORY, R., SINGER, E.J., STONER, G.L. **JC virus (JCV) genotypes in brain tissue from patients with progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) and in urine from controls without PML: increased frequency of JCV type 2 in PML.** *American Journal of Infectious Diseases*, v. 176, p.1–8, 1997.

AHLENSTIEL-GRUNOW, T.; PAPE, L.. **Diagnostics, treatment, and immune response in BK polyomavirus infection after pediatric kidney transplantation.** *Pediatric Nephrology*, p. 1-8, 2018.

ALMEIDA, M.; MARTINS, L.S.; DIAS, L.; SILVESTRE, F.; PEDROSO, S.; PEREIRA, P.; OLIVEIRA, V.; HENRIQUES, A.C.; SARMENTO, A.M.; CABRITA, A. **Infecção por Poliomavírus: tratamento com Cidofovir e Imunoglobulina Inespecífica, um**

esquema promissor? *Revista Portuguesa de Nefrologia e Hipertensão*, v. 20, n. 1, p.51-60, 2006.

ALVES, Lorraine Vieira. **Associação de níveis plasmáticos e polimorfismos em genes de citocinas com a função renal de pacientes transplantados.** 2018. 131 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas e Toxicológicas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018.

ALVES, Talita de Castro. **Detecção dos poliomavírus humanos BK e JC em fluidos orais de indivíduos com insuficiência renal crônica e transplantados renais.** 2015. 60 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/23/23141/tde-19012016-163456/pt-br.php>>. Acesso em 14 dez. 2017.

AMBALATHINGAL, G.R.; FRANCIS, R.S.; SMYTH, M.J.; SMITH, C.; KHANNA, R. **BK Polyomavirus: Clinical Aspects, Immune Regulation, and Emerging Therapies.** *Clinical Microbiology Reviews*, v.30, n. 2, p. 503-528, 2017.

ANTINORI, A.; CINGOLANI, A.; LORENZINI, P.; GIANCOLA, M.L.; UCCELLA, I.; BOSSOLASCO, S.; GRISSETTI, S.; MORETTI, F.; VIGO, B.; BONGIOVANNI, M.; DEL GROSSO, B.; ARCIDIACONO, M.I.; FIBBIA, G.C.; MENA, M.; FINAZZI, M.G.; GUARALDI, G.; AMMASSARI, A.; D'ARMINIO MONFORTE, A.; CINQUE, P.; DE LUCA, A.; Italian Registry Investigative Neuro AIDS Study Group. **Clinical epidemiology and survival of progressive multifocal leukoencephalopathy in the era of highly active antiretroviral therapy: data from the Italian Registry Investigative Neuro AIDS (IRINA).** *Journal for Neurovirology*, v.9, n.1, p. 47-53, 2003.

ANTUNES, Paulo Ramos Botelho. **Estudo comparativo entre biopsias renais guiadas por ultrassom realizadas com agulhas de calibres 16G e 18G.** 2013. 63 f. Dissertação (Mestrado em Medicina e Biomedicina) – Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia, Belo Horizonte, 2013. Disponível em: <<http://santacasabh.org.br/app/webroot/files/uploads/MA%20-%20PAULO%20RAMOS%20BOTELHO.pdf>>. Acesso em 28 ago. 2019.

ASSETTA, B.; ATWOOD, W.J. **The biology of JC polyomavirus.** *Biological Chemistry*, v. 398, n. 8, p. 839-855, 2017.

Associação Brasileira de transplante de órgãos (ABTO). Disponível em: <<http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/RBT/2019/RBT-2019-1%20trim%20-%20Pop.pdf>>. Acesso em 31 mai. 2019.

AWADALLA, Y.; RANDHAWA, P.; RUPPERT, K.; ZEEVI, A.; DUQUESNOY, R.J. **HLA mismatching increases the risk of BK virus nephropathy in renal transplant recipients.** *American Journal of Transplantation*, v. 4, n.10, p.1691-6, 2004.

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

BALI, L.E.; DIMAN, A.; BERNARD, A.; ROOSENS, N.H.C.; KEERSMAECKER, S.C.J.De. **Comparative Study of Seven Commercial Kits for Human DNA Extraction from Urine Samples Suitable for DNA Biomarker-Based Public Health Studies.** *Journal of Biomolecular Techniques*, v.25, p.96–110, 2014.

BARTON, T.D.; BLUMBERG, E.A.; DOYLE, A.; AHYA, V.N.; FERRENBURG, J.M.; BROZENA, S.C.; LIMAYE, A.P. **A prospective cross-sectional study of BK virus**

infection in non-renal solid organ transplant recipients with chronic renal dysfunction. *Transplant Infectious Disease*, v. 8, p. 102-107, 2006.

BASTOS, M.G.; KIRSZTAJN, G.M. **Doença renal crônica: importância do diagnóstico precoce, encaminhamento imediato e abordagem interdisciplinar estruturada para melhorar o desfecho em pacientes ainda não submetidos à diálise.** *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v. 33, n.1, p. 93-108, 2011.

BATISTA, C. M. M.; MOREIRA, R.S.L.; PESSOA, J.L.E.; FERRAZ, A.S.; ROZA, B. de A. **Perfil epidemiológico dos pacientes em lista de espera para o transplante renal.** *Acta Paulista de Enfermagem*, v. 30, n.3, p. 280-286, 2017.

BIAVA, A.; DE SOUZA, C.B.; DE LIMA, D.D.; RAMOS, S.A. **Avaliação de biomarcadores séricos em pacientes submetidos ao transplante renal na Fundação Pró-Rim – Joinville (SC).** *NewsLab*, 2014. Disponível em: <<https://newsLab.com.br/avaliacao-de-biomarcadores-sericos-em-pacientes-submetidos-ao-transplante-renal-na-fundacao-pro-rim-joinville-sc/>>. Acesso em 08 ago. 2019.

BICALHO, Camila da Silva. **Vigilância da replicação do poliomavírus humano BK (BKPyV) e evolução para nefropatia associada ao BKPyV (NABKPyV) em pacientes submetidos ao transplante renal.** 2017. 152 f. Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5134/tde-09112017-134215/en.php>>. Acesso em 27 de ago. 2019.

BOFIL-MAS, S.; PINA, S.; GIRONES, R. **Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage.** *Applied and Environmental Microbiology*, v.66, n.1, p. 238-45, 2000.

BOHL, D.L.; BRENNAN, D.C. **BK virus nephropathy and kidney transplantation.** *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, v. 2, p. 36-46, 2007.

BOHL, D.L.; STORCH, G.A.; RYSCHKEWITSCH, C.; GAUDREAU-KEENER, M.; SCHNITZLER, M.A.; MAJOR, E.O.; BRENNAN, D.C. **Donor origin of BK virus in renal transplantation and role of HLA C7 in susceptibility to sustained BK viremia.** *American Journal of Transplantation*, v. 5, n.9, p. 2213-21, 2005.

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

BOUKOUM, H.; NAHDI, I.; SAHTOUT, W.; SKIRI, H.; ALOUI, S.; ACHOUR, A.; SEGONDY, M.; AOUNI, M. **BK and JC polyomavirus infections in Tunisian renal transplant recipients.** *Journal of Medical Virology*, v.87, n.10, p.1788-1795, 2015.

CENTRONE, Cristiane de Campos. **Prevalência da excreção e caracterização molecular do poliomavírus humano JC em amostras de urina de pacientes com AIDS sem leucoencefalopatia multifocal progressiva.** 2009. 17 f. Monografia (Trabalho de conclusão de curso em Ciências Biológicas Modalidade Médica) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/118631/centrone_cc_tcc_botib.pdf?sequence=1>. Acesso em: 03 set. 2009.

CHANTZANTONIOU, N.; JOUDEH, A.A.; AL-ABBADI, M.A. **Significance, cytomorphology of decoy cells in polyomavirus-associated nephropathy: Review of clinical, histopathological and virological correlates with commentary.** *Journal of the American Society of Cytopathology*, v.5, p. 71-85, 2016.

CHEHADEH, W.; NAMPOORY, M. R. **Genotypic diversity of polyomaviruses circulating among kidney transplant recipients in Kuwait.** *Journal of Medical Virology*, v.85, n.9, p.1624-1631, 2013.

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

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

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

COMERLATO, Juliana. **Detecção e caracterização molecular de poliomavírus JC e BK em urinas de pacientes transplantados renais e de indivíduos saudáveis e em águas superficiais de Porto Alegre, Brasil.** 2012. 88 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/77739>>. Acesso em 31 mai. 2019.

CORREA, A. P.A.; BRAHM, M.M. T.; TEIXEIRA, C. de C.; FERREIRA, A.L.; MANFRO, R. C.; LUCENA, A de F.; ECHER, I.C. **Complicações durante a internação de receptores de transplante renal.** *Revista Gaúcha de Enfermagem*, v.34, n.3, p.46-54, 2013.

DA SILVA, I.C.G.; ROTTA, L.N.; POLONI, J.A.T. **Células Decoy: um auxílio no diagnóstico da infecção por poliomavírus.** *NewsLab*, 2013.

DE CASTRO, Maria Cristina Ribeiro. **Manual de Transplante Renal –período pós transplante.** São Paulo: Grupo Lopso de Comunicação, 2006. Disponível em: <http://www.abto.org.br/abtov03/Upload/file/manual_transplante_pos.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2019.

DE OLIVEIRA, H.M.J.; FORMIGA, F.F.; ALEXANDRE, C.S. **Clinical and epidemiological profile of chronic hemodialysis patients in João Pessoa.** *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v.36, n.3, p.367-74, 2014.

DE SOUZA, L. M.; SAVASSI-RIBAS, F.; DE ALMEIDA, S.G.S.; DA SILVA, R.N.N.; BAEZ, C.F.; ZALIS, M.G.; GUIMARÃES, M.A.A.M.; VARELLA, R.F. **A globally applicable PCR-based detection and discrimination of BK and JC polyomaviruses.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 60, n.47, 2018.

DeCAPRIO, J.A.; GARCEA, R.L. **A cornucopia of human polyomaviruses.** *Nature Reviews Microbiology*, v.11, n.4, p.264-276, 2013.

DELBUE, S.; FERRARESSO, M.; GHIO, L.; CARLONI, C.; CARLUCCIO, S.; BELINGHERI, M.; EDEFONTI, A.; FERRANTE, P. **A review on JC virus infection in kidney transplant recipients.** *Clinical and Developmental Immunology*, v.2013, p.1-15, 2013.

DHARNIDHARKA, V.R.; ABDULNOUR, H.A.; ARAYA, C.E. **The BK virus in renal transplant recipients-review of pathogenesis, diagnosis, and treatment.** *Pediatric Nephrology*, v. 26, n.10, p. 1763-1764, 2011.

Diretrizes em Transplante Renal (Sociedade Brasileira de Nefrologia – 2001).

Disponível em: <<http://bjn.org.br/img/tx.htm>>. Acesso em: 19 ago. 2019.

DIVERS, J.; LANGEFELD, C.D.; LYLES, D.S.; MA, L.; FREEDMAN, B.I. **Protective association between JC polyoma viruria.** *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, v. 28, n.1, p. 65-69, 2019.

DRACHENBERG, C.; HIRSCH, H.H.; PAPADIMITRIOU, J.C.; MOZAFARI, P.; WALI, R.; McKINNEY, J.D.; NOGUEIRA, J.; CANGRO, C.B.; MENDLEY, S.; KLASSEN, D.K.; RAMOS, E. **Cost efficiency in the prospective diagnosis and follow-up of polyomavirus allograft nephropathy.** *Transplantation Proceedings*, v. 36, n. 10, p. 3028-3031, 2004.

DRACHENBERG, C.B.; HIRSCH, H.H.; PAPADIMITRIOU, J.C.; GOSERT, R.; WALI, R.K.; MUNIVENKATAPPA, R.; NOGUEIRA, J.; CANGRO, C.B.; HARIRIAN, A.; MENDLEY, S.; RAMOS, E.; **Polyomavirus BK versus JC replication and nephropathy in renal transplant recipients: A prospective evaluation.** *Transplantation*, v. 84, p. 323–330, 2007.

EGLI, A.; INFANTI, L.; DUMOULIN, A.; BUSER, A.; SAMARIDIS, J.; STEBLER, C.; GOSERT, R.; HIRSCH, H.H. **Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors.** *The Journal of Infectious Diseases*, v. 199, n.6, p.837-46, 2009.

GARDNER, S.D.; FIELD, A.M.; COLEMAN, D.V.; HULME, B. **New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation.** *Lancet*, v. 7712, n.1, p. 1253-57, 1971.

GAZIEV, J.; PABA, P.; MIANO, R.; GERMANI, S.; SODANI, P.; BOVE, P.; PERNO, C.F.; MARZIALI, M.; GALLUCCI, C.; ISGRÒ, A.; PACIARONI, K.; ROVEDA, A.;

SIMONE, M.D.; DE ANGELIS, G.; ALFIERI, C.; LUCARELLI, G. **Late-onset hemorrhagic cystitis in children after hematopoietic stem cell transplantation for thalassemia and sickle cell anemia: a prospective evaluation of polyoma (BK) virus infection and treatment with cidofovir.** *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, v.16, n. 5, p. 662-671, 2010.

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

GEETHA, V.; MONAPPA, V.; PRABHU, R.; RAO, L.; SUSMITHA, M.S. **Decoy cells in urine cytology: A useful clue to post-transplant polyoma virus infection.** *Journal of Cytology*, v. 29, n. 2, p. 133-134, 2012.

GERAMIZADEH, B.; ROOZBEH, J.; MALEK-HOSSEINI, S-A.; AZARPINA, N.; AYATOLLAHI, M.; SALAHI, H.; YAGHOUBI, R. **Urine Cytology as a useful screening method for polyoma Virus nephropathy in renal transplant patients: a single-center experience.** *Transplantation Proceedings*, v. 38, n. 9, 2923–2925, 2006.

GIACOMELLI, L.R.G.; PEDRAZZI, A. H. P. **Interferência dos medicamentos nas provas laboratoriais de função renal.** *Arquivos de Ciências da Saúde*, v. 5, n. 1, p. 79-85, 2001.

GROTTO, H.Z.W. **O hemograma: importância para a interpretação da biópsia.** *Revista Brasileira de Hematologia*, v.31, n.3, p.178-182, 2009.

GUO, J., KITAMURA, T., EBIHARA, H., SUGIMOTO, C., KUNITAKE, T., TAKEHISA, J., NA, Y. Q., AI-AHDAL, M. N., HALLIN, A., KAWABE, K., TAGUCHI, F., YOGO, Y. **Geographical distribution of the human polyomavirus JC virus types A and B and isolation of a new type from Ghana.** *Journal of General Virology*, v. 77, p. 919 - 927, 1996.

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

HASAN, M.R.; TAN, R.; AL-RAWAHI, G.; THOMAS, E. **Comparative evaluation of laboratory developed real-time PCR assays and RealStar® BKV PCR Kit for quantitative detection of BK polyomavirus.** *Journal of Virological Methods*, v.234, p. 80-86, 2016.

HATWELL, J.N., SHARP, P.M. **Evolution of human polyomavirus.** *Journal of General Virology*, v. 81, p.1191-1200, 2000.

HEDMAN, J.; RADSTROM, P. **Overcoming Inhibition in Real-Time diagnostic PCR.** *Methods in Molecular Biology*, v. 943, p.17-48, 2013.

HELANTERA, I.; ORTIZ, F.; AUVINEN, E.; RAISANEN-SOKOLOWSKI, A.; LAPPALAI-NEN, M.; LAUTENSCHLAGER, I.; KOSKINEN, P. **Polyomavirus BK and JC infections in well matched Finnish kidney transplant recipients.** *Transplant International*, v.22, n.7, p. 688–693, 2009.

HELLE, F.; BROCHOT, E.; HANDALA, L.; MARTIN, E.; CASTELAIN, S.; FRANCOIS, C.; DUVERLIE, G. **Biology of the BKPyV: An Update.** *Viruses*, v.9, n.327, p.1-18, 2017.

HIRSCH, H.H.; BABEL, N.; COMOLI, P.; FRIMAN, V.; GINEVRI, F.; JARDINE, A.; LAUTENSCHLAGER, I.; LEGENDRE, C.; MIDTVEDT, K.; MUÑOZ, P.; RANDHAWA, P.; RINALDO, C.H.; WIESZEK, A.; ESCMID Study Group of Infection in Compromised Hosts. **European perspective on human polyomavirus infection, replication and disease in solid organ transplantation.** *Clinical Microbiology and Infection*, v. 20, p. 74-88, 2014.

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

HIRSCH, H.H.; STEIGER, J. **Polyomavirus BK.** *The Lancet Infectious Diseases*, v. 3, n.10, p. 611–623, 2003.

HLAVAC, Nicole Regina Capacchi. **Avaliação dos parâmetros plaquetários em cães saudáveis: efeito da temperature, tempo e tipo de anticoagulante.** 2012. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/lacvet/site/wp-content/uploads/2013/05/disserta%C3%A7ao_Nico.pdf>. Acesso em: 16 ago. 2019.

HOORFAR, J.; MALOMY, B.; ABDULMAWJOOD, N.; COOK, N., WAGNER, M.; FACH, P. **Practical Considerations in Design of Internal Amplification Controls for Diagnostic PCR Assays.** *Journal of clinical microbiology*, v.42, p. 1863–1868, 2004.

HOWELL, D.N.; SMITH, S.R.; BUTTERLY, D.W.; KLASSEN, P.S.; KRIGMAN, H.R.; BURCHETTE, J.L.J.; MILLER, S.L. **Diagnosis and management of BK polyomavirus interstitial nephritis in renal transplant recipients.** *Transplantation*, v. 68, n.9, p. 1279 –1288, 1999.

HUANG, G.; CHEN, L.Z.; QIU, J.; WANG, C.X.; FEI, J.G.; DENG, S.X.; LI, J.; CHEN, G.D.; ZHANG, L.; ZENG, W.T.; ZHAO, D.Q. **Prospective study of polyomavirus BK replication and nephropathy in renal transplant recipients in China: a single-center analysis of incidence, reduction in immunosuppression and clinical course.** *Clinical Transplantation*, v. 24, n.5, p. 599-609, 2010.

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

IMPERIALE, M.J.; MAJOR, E.O. **Polyomavirus.** In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology.** 5. Ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2007, p. 2263-2289.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) - Polyomaviridae. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/dsdna-viruses/w/polyomaviridae>. Acesso em: 28 mai. 2019.

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

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

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

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

KAYLER, L.K.; BATAL, I.; MOHANKA, R.; MORGAN, C.; BASU, A.; SHAPIRO, R.; RANDHAWA, P.S. **Anti-rejection treatment in kidney transplant patients with BK viruria.** *Transplantation*, v. 86, n. 6, p. 797–803, 2008.

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

KHALILI, K.; STONER, G.L. **Human polyomaviruses: molecular and clinical perspectives.** 1.ed., New York (NY), Wiley-Liss, 2001.

KHAN, G.; KANGRO, H.O.; COATES, P.J.; HEATH, R.B. **Inhibitory effects of urine on the polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA.** *Journal of Clinical Pathology*, v. 44, p. 360-365, 1991.

Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group. **KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients.** *American Journal of Transplantation*, v.9, p.1-155, 2009.

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

KNOWLES, W.A.; PIPKIN, P.; ANDREWS, N.; VYSE, A.; MINOR, P.; BROWN, D.W.; MILLER, E. **Population based study of antibody to the human polyomaviruses BKV and JCV and the simian polyomavirus SV40.** *Journal Medical Virology*, v. 71, p. 115–123, 2003.

KRAMER, C.S.M.; ROELEN, D.L.; HEIDT, S.; CLAAS, F.H.J. **Defining the immunogenicity and antigenicity of HLA epitopes is crucial for optimal epitope matching in clinical renal transplantation.** *HLA*, v. 90, n. 1, p. 5–16, 2017.

KREJCI, K.; TICHY, T.; BEDNARIKOVA, J.; ZAMBOCH, K.; ZADRAZIL, J. **BK virus-induced renal allograft nephropathy.** *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia (Biomed Paper)*, v. 162, n. 3, p. 165-177, 2018.

KROTH, L.V.; PERES, L.D.; PAGANELLA, M.C.; MAZZALI, M.; DUVAL, M.D.; TRAESEL, M.A.; SAITOVITCH, D. **Prevalence of urinary decoy cells and associated risk factors in a brazilian kidney, pancreas, and kidney–pancreas Transplant Population.** *Transplantation Proceedings*, v.44, n. 8, p. 2394–2396, 2012.

KROTH, Leonardo Viliano. **Avaliação da prevalência de infecção pelo poliomavírus em transplantados renais e pancreáticos através da excreção urinária de células decoy.** 2007. 58 f. Dissertação (Mestrado Medicina e Ciências da Saúde), Pontifícia Universidade Católica, Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007. Disponível em: <<http://tede2.pucrs.br/tede2/bitstream/tede/6066/2/469455%20-%20Texto%20Completo.pdf>>. Acesso em: 14 dez. 2017.

LEE, B.T.; GABARDI, S.; GRAFALS, M.; HOFMANN, M.; AKALIN, E.; ALJANABI, A.; MANDELBROT, D.A.; ADEY, D.B.; HEHER, E.; FAN, P-Y.; CONTE, S.; DYER-WARD, C.; CHANDRAKER, A. **Efficacy of levofloxacin in the treatment of BK Viremia: a multicenter, double-blinded, randomized, placebo-controlled trial.** *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, v. 9, n.3, p. 583-589, 2014.

LESSA, S. R. de O.; BEZERRA, J. N. de M.; BARBOSA, M.C.; LUZ, G. O. de A.; BORBA, A. K. de O.T. **Prevalência e fatores associados para a ocorrência de eventos adversos no serviço de hemodiálise.** *Texto & Contexto Enfermagem*, v. 27, n.3, 2018.

LIM, C.C.; TAN, B.H.; TUNG, Y.T.; HUANG, H.; HAO, Y.; MOK, I.Y.J.; LEE, P.H.; CHOO, J.C.J. **Risk-stratified approach to anti-viral prophylaxis against cytomegalovirus disease in glomerulonephritis and renal vasculitis treated with potent immunosuppressants.** *Infectious Diseases*, v.51, n.10, p.745-752, 2019.

LOUTFY, S.A.; MONEER, M.M.; SALEM, S.E.; EL-MONIEM ABADAM, E.A.; EL-MONIEM AHMED, E.A.; IBRAHIM, L.H.; MOHAMED, E.B. **Polyomavirus infections and its clinical relevance in cancer patients: A Prospective Study.** *Journal of Infection and Public Health*, v. 10, p. 22-30, 2017.

MAIA, Tânia Maria Cavalcante. **Estudo citológico em urina de pacientes transplantados renais para pesquisa do poliomavírus humano tipo BKV.** 2008. 91 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/1852/1/2008_dis_tmcaia.pdf>. Acesso em 16 ago. 2019.

MENGEL, M.; MARWEDEL, M.; RADERMACHER, J.; EDEN, G.; SCHWARZ, A.; HALLER, H.; KREIPE, H. **Incidence of polyomavirus-nephropathy in renal allografts: influence of modern immunosuppressive drugs.** *Nephrology Dialysis Transplantation*, v. 18, p. 1190–1196, 2003.

MITTAL, A.; SATHIAN, B.; KUMAR, A.; CHANDRASSEKHARAN, N.; SUNKKA, A. **Diabetes mellitus as a potential risk factor for renal disease among napalese:**

A hospital based case control study. *Nepal Journal of Epidemiology*, v.1, n.1, p.:22-25, 2010.

MONTAGNER, J. de M.; MICHELON, T. F.; SCHROEDER, R.B.; FONTANELLE, B.T.; OLIVEIRA, A.T.D.de; **SILVEIRA, J.G. da; GRAUDENZ, M.S.; ALEXANDRE, C.O.P.; NEUMANN, J. Poliomavírus – um patógeno emergente para receptores de transplantes.** *Einstein*, v. 5, n. 2, p. 184-189, 2007.

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

MORGANTETTI, G.F.; BALANCIN, M.L.; DE MEDEIROS, G.A.; DANTAS, D.; SILVA, G.E.B. **Cytomegalovirus infection in kidney allografts: a review of literature.** *Translational Andrology and Urology*, v. 8, n. 2, p.192-197, 2019.

MOTA, Ana Paula Lucas. **Pacientes transplantados renais com função renal estável: estudo de biomarcadores inflamatórios/hemostáticos e relação com a função renal e o tempo pós-transplante.** 2012. 153 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/EMCO-9BENP2>>. Acesso em: 12 ago. 2019.

MYSOREKAR, V.V.; ESHWARAPPA, M.; LINGARAJ, U. **Opportunistic infections in a renal transplant recipient.** *Infectious Disease Reports*, v. 4, n. 8, p. 19-21, 2012.

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

NICKELEIT, V.; KLIMKAIT, T.; BINET, I.F.; DALQUEN, P.; DEL ZENERO, V.; THIEL, G.; MIHATSCH, M.J.; HIRSCH, H.H. **Testing for polyomavirus type BK DNA in plasma to identify renal-allograft recipients with viral nephropathy.** *The New England Journal of Medicine*, v. 342, n. 18, p. 1309-15, 2000.

NICKELEIT, V.; MIHATSCH, M.J. **Polyomavirus nephropathy in native kidneys and renal allografts: an update on an escalating threat.** *Transplant International*, v.19, n.12, p.960-973, 2006.

NICKELEIT, V.; SINGH, H.K.; MIHATSCH, M.J. **Polyomavirus nephropathy: morphology, pathophysiology, and clinical management.** *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, v. 12, n. 6, p. 599-605, 2003.

NIHEI, C. H.; PIERROTTI, L.C.; DAVID-NETO, E. **Análise de métodos diagnósticos de vigilância para detecção de nefropatia pelo vírus BK em pacientes transplantados renais.** *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v. 38, n.3, p. 277-279, 2016.

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

OLIVEIRA, Renato dos Reis. **Determinação da incidência e caracterização molecular do poliomavírus BK em pacientes submetidos a transplante renal.** 2012. 145 f. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012. Disponível em: <<http://bv.fapesp.br/pt/publicacao/79914/determinacao-da-incidencia-e-caracterizacao-molecular-do-pol/>>. Acesso em: 29 set. 2017.

PANDYA, D.; NAGRAJAPPA, K.; RAVI, K.S. **Assessment and correlation of urea and creatinine levels in saliva and serum of patients with chronic**

kidneydisease, diabetes and hypertension—A research study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, v.10, n.10, p.58-62, 2016.

PÉREZ-TORRES, D.; BERTRÁN-PASARELL, J.; SANTIAGO-DELPÍN, E.; GONZÁLEZ-RAMOS, M.; MEDINA-MANGUAL, S.; MORALES-OTERO, L.; GONZÁLEZ-CARABALLO, Z. **Factors and outcome in BK virus nephropathy in a Hispanic kidney transplant population.** *Transplant Infectious Disease*, v.12, p.16-22, 2010.

PESTANA, J. M. **Desfechos clínicos de 11.436 transplantes renais realizados em centro único - Hospital do Rim.** *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v.39, n.3, p. 287-295, 2017.

PINTO, G.G.; POLONI, J.A.T.; ROTTA, L.N.; RAZONABLE, R.R.; PASQUALOTTO, A.C. **Desempenho de métodos diagnósticos no rastreamento de nefropatia pelo vírus BK em pacientes transplantados renais.** *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v. 38, n.3, p.356-362, 2016.

PINTO, M.; DOBSON, S. **BK and JC virus: A review.** *Journal of Infection*, v. 68, p. 2-8, 2014.

PIRES, E.P.; BERNARDINO-VALLINOTO, C.V.; ALVES, D.M.; MIGONE, S.R.; MACHADO, L.F.; ISHAK, M.O.; ISHAK, R.; CAYRES-VALLINOTO, I.M.; VALLINOTO, A.C. **Prevalence of infection by JC and BK polyomaviruses in kidney transplant recipients and patients with chronic renal disease.** *Transplant Infectious Disease*, v. 13, p. 633–637, 2011.

PIRES, Elizabete Pereira. **Prevalência da infecção pelos polyomavirus JC e BK em pacientes com doença renal crônica e transplantados.** 2009. 89 f.

Dissertação (Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários), Universidade Federal do Pará, Belém, 2009. Disponível em: <http://repositorio.ufpa.br/jspui/bitstream/2011/4857/1/Dissertacao_PrevalencialnfeccaoPolyomavirus.pdf>. Acesso em: 06 ago. 2019.

POTTEL, H.; HOSTE, L.; YAYO, E.; DELANAYE, P. **Glomerular filtration rate in healthy living potential kidney donors: a meta-analysis supporting the construction of the full age spectrum equation.** *Nephron Clinical Practice*, v.135, p.105–119, 2017.

Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas. **Imunossupressão no transplante renal.** Portaria SAS/MS nº 712, de 13 de agosto de 2014, republicada em 14 de agosto de 2014. Disponível em: <http://conitec.gov.br/images/Protocolos/Imunossupressao_TransplanteRenal.pdf>. Acesso em: 07 ago. 2019.

RAMOS, E.; DRACHENBERG, C.B.; PAPADIMITRIOU, J.C.; HAMZE, O.; FINK, J.C.; KLASSEN, D.K.; DRACHENBERG, R.C.; WILAND, A.; WALI, R.; CANGRO, C.B.; SCHWEITZER, E.; BARTLETT, S.T.; WEIR, M.R. **Clinical course of polyoma virus nephropathy in 67 renal transplant patients.** *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 13, n. 8, p. 2145-51, 2002.

RANDHAWA, P.; UHRMACHER, J.; PASCULLE, W.; VATS, A.; SHAPIRO, R.; EIGHTSEAD, B.; WECK, K. **A comparative study of BK and JC virus infections in organ transplant recipients.** *Journal of Medical Virology*, v. 77, p. 238–243, 2005.

RANDHAWA, P.; VATS, A.; SHAPIRO, R. **Monitoring for polyomavirus BK and JC in urine: comparison of quantitative polymerase chain reaction with urine cytology.** *Transplantation*, v.79, n.8, pg. 984-6, 2005.

Registro Brasileiro de Transplantes. Disponível em: <<http://www.abto.org.br/abtov03/default.aspx?mn=457&c=900&s=0>>. Acesso em: 29 set. 2017.

RENA, C. de L.; VIDIGAL, F.M.; BARRA, A.A.; SCHEIB, E.J.S.; DE TOLEDO, L.O.; DORNELAS, M. de C.; RENA, R.L. **Estudo revisional sobre a morfologia e as funções dos leucócitos.** *Revista Médica Oficial do Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora*, v. 27, n. 1-3, 2011.

RUIZ, T.M. **A estrutura organizacional do registro brasileiro de doadores voluntários de medula óssea (REDOME) e o perfil HLA de doadores voluntários de Curitiba.** 2004. 142 f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas), Universidade do Paraná, Curitiba, 2004. Disponível em: <<https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/36247/Monografia%20Teo%20Massignan%20Ruiz.pdf?sequence=1>>. Acesso em 14 out. 2019.

SANTOS, L.F.; PRADO, B.C.; CASTRO, F.P. dos S.; MACIEL, S.C.; AVELAR, T. C. **Qualidade de Vida em Transplantados Renais.** *Psico-USF*, v. 23, n. 1, p. 163-172, 2018.

SANTOS, M.C. dos.; RIBEIRO, R de C. H. M.; BEROLIN, D.C.; CESARINO, C. B.; FERNANDES, C.H.I.; MAZER, L. E. **Fatores sociodemográficos e clínicos dos pacientes que tiveram perdado enxerto renal.** *Arquivos de Ciências da Saúde*, v. 24, n.4, p.3-7, 2017.

SANTOS, R.L.; MANFRINATTO, J.A.; CIA, E.M.; CARVALHO, R.B.; QUADROS, K.R.; ALVES-FILHO, G.; MAZZALI, M. **Urine cytology as a screening method for polyoma virus active infection.** *Transplantation Proceedings*, v.36, n.4, p. 889-901, 2004.

SAUNDH, B.K.; BAKER, R.; HARRIS, M.; WELBERRY, S.M.P.; CHERUKURI, A.; HALE, A. **Early BKV reactivation in donor kidney is a risk factor for development of BK polyomavirus associated nephropathy.** *Journal of Infection Disease*, 2012.

SCHAUB, S.; HIRSCH, H.H.; DICKENMANN, M.; STEIGER, J.; MIHATSCH, M.J.; HOPFER, H.; MAYR, M. **Reducing immunosuppression preserves allograft function in presumptive and definitive polyomavirus-associated nephropathy.** *American Journal of Transplantation*, v.10, n.12, p. 2615-2623, 2010.

SESSO, R.C.; LOPES, A.A.; THOMÉ, F.S.; LUGON, J.R.; MARTINS, C.T.; BRAZILIAN CHRONIC DIALYSIS CENSUS. **Brazilian Chronic Dialysis Census 2014.** *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v. 38, n.1, p. 54-61, 2016.

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

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

SHARMA, R.; TZETZO, S.; PATEL, S.; ZACHARIAH, M.; SHARMA, S.; MELENDY, T. **BK Virus in Kidney Transplant: Current Concepts, Recent Advances, and Future Directions.** *Experimental and Clinical Transplantation*, v.4, n. 377-384, 2016.

SHAVER, M.J.; BONSI, S.M.; ABUL-EZZ, S.; BARRI, Y.M. **Renal allograft dysfunction associated with Cytomegalovirus infection.** *American Journal of Kidney Diseases*, v. 34, n. 5, p. 942-946, 1999.

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

SMITH, A.; COUVILLION, R.; ZHANG, R.; KILLACKEY, M.; BUELL, J.; LEE, B.; SAGGI, B.H.; PARAMESH, A.S. **Incidence and Management of Leukopenia/Neutropenia in 233 Kidney Transplant Patients Following Single Dose Alemtuzumab Induction.** *Transplantation Proceedings*, v.46, n.10, p. 3400-3404, 2014.

Sociedade Brasileira de Nefrologia. Disponível em: <<https://sbn.org.br/publico/tratamentos/transplante-renal/>>. Acesso em: 31 ago. 2017.

SODRÉ, F. L.; COSTA, J. C. B.; LIMA, J. C. C. **Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial.** *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v.43, n.5, p. 329-337, 2007.

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

SUNEJA, M.; NAIR, R. **Cytomegalovirus glomerulopathy in a kidney allograft with response to oral valganciclovir.** *American Journal of Kidney Diseases*, v. 52, n.1, p.1-4, 2008.

SUWELACK, B.; MALYAR, V.; KOCH, M.; SESTER, M.; SOMMERER, C. **The influence of immunosuppressive agents on BK virus risk following kidney transplantation, and implications for choice of regimen.** *Transplantation Reviews*, v. 26, n.3, p. 201–211, 2012.

TAKASAKA, T. N.; GOYA, T.; TOKUMOTO, K.; TANABE, H.; TOMA, Y.; OGAWA,

S.; HOKAMA, A.; MOMOSE, T.; FUNYU, T.; FUJIOKA, S.; OMORI, H.; AKIYAMA, Q.; CHEN, H.Y.; ZHENG, N.; OHTA, T.; KITAMURA, T.; YOGO, Y. **Subtypes of BK virus prevalent in Japan and variation in their transcriptional control region.**

The Journal of General Virology, v. 85, p. 2821-2827, 2004.

TIZO, J.M.; MACEDO, L.C. **Principais complicações e efeitos colaterais pós-transplante renal.** *Revista UNINGÁ Review*, v.24, n.1, p.62-70, 2015.

TOYODA, M.; PULIYANDA, D.P.; AMET, N.; BADEN, L.; CAM, V.; RADHA, R.; PAO, A.; BUNNAPRADIST, S.; MOUDGIL, A.; JORDAN, S.C. **Co-infection of polyomavirus - BK and cytomegalovirus in renal transplant recipients.**

Transplantation, v. 80, n.2, p.198-205, 2005.

TROFE-CLARK, J.; SAWINSKI, D. **BK and other polyomaviruses in kidney transplantation.** *Seminars in Nephrology*, v. 36, n. 5, p. 372-385, 2016.

UDA, K.; KOYA, A.; WAKAI, C.; SHOJI, K.; IWASE, N.; MOTOOKA, D.; NAKAMURA, S.; MIYAIRI, I. **WU Polyomavirus detected in children with severe respiratory failure.** *Journal of Clinical Virology*, v.107, p. 25-28, 2018.

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

VARELLA, R. B. ALMEIDA, J.R.; LOPES, P. de F.; DE MATOS, J.P.S.; MENEZES, P.; LUGON, J.R. **BK poliomavírus em receptores do transplante renal: rastreamento, monitoramento viral e manuseio clínico.** *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v. 36, n. 4, p. 529-534, 2014.

VILAR, E.; VARAGUNAM, M.; YAGOOB, M.M.; RAFTERY, M.; THURAISINGHAM, R. **Creatinine Reduction Ratio: A useful marker to identify medium and high-risk renal transplants.** *Transplantation*, v.89, n.1, p. 97-103, 2010.

Viral Zone. **Partícula viral do Poliomavírus BK.** Disponível em: <http://viralzone.expasy.org/58?outline=all_by_species>. Acesso em: 18 out. 2017.

WESTERVELT, J.D.; ALEXANDER, B.D.; COSTA, S.F.; MILLER, S.E.; HOWELL, D.N.; SMITH, S.R. **Detection of BK polyomavirus after kidney transplantation: a comparison of urine electron microscopy with plasma polymerase chain reaction.** *Clinical Transplantation*, v.2, p.42-8, 2013.

WILLIAMSON, E.M.L.; BERGER, J.R. **Diagnosis and Treatment of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy Associated with Multiple Sclerosis Therapies.** *Neurotherapeutics*, v. 14, p. 961–973, 2017.

ZALONA, A.C.; LOPES, G.S.; SCHRAGO, C.G.; GONÇALVES, R.T.; ZALIS, M.G; VARELLA, R.B. **Molecular characterization of BK polyomavirus subtypes in renal transplant recipients in Brazil.** *Journal of Medical Virology*, v. 83, n. 8, p. 1401-5, 2011.

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

ZHENG, H.Y.; NISHIMOTO, Y.; CHEN, Q.; HASEGAWA, M.; ZHONG, S.; IKEGAYA, H.; OHNO, N.; SUGIMOTO, C.; TAKASAKA, T.; KITAMURA, T.; ZUR HAUSEN, H. **Novel human polyomaviruses re-emergence of a well known virus family as**

possible human carcinogens. *International Journal of Cancer*, v. 123, p. 247-250, 2008.

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

ANEXO A – APROVAÇÃO COEP-UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de receptores do transplante renal associando o Poliomavírus BK com complicações pós-transplante e rejeição ao enxerto.

Pesquisador: Ana Paula Lucas Mota

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 91755918.9.0000.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.832.853

Apresentação do Projeto:

Conforme parecer 2.756.081 de 5 de Julho de 2018.

Objetivo da Pesquisa:

Conforme parecer 2.756.081 de 5 de Julho de 2018.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme parecer 2.756.081 de 5 de Julho de 2018.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A investigadora principal providenciou o termo de funcionamento do biorrepositório conforme solicita a legislação (iremos aceitar o login com senha na plataforma como substitutivo da sua assinatura no documento que não está assinado). Ajustes adicionais foram feitos no TCLE clarificando a intenção de algumas informações.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha rosto – Adequada

Projeto completo – Adequado

Brochura do Investigado – Adequado

TCLE – adequado

Termo de funcionamento do biorrepositório - Adequado

Parecer consubstanciado do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 2.832.853

Farmácia

CV do investigador

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sou favorável pela aprovação do projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o COEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1114008.pdf	27/07/2018 16:41:31		Aceito
Outros	biorrepositorio.docx	27/07/2018 16:40:43	Ana Paula Lucas Mota	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	27/07/2018 16:36:23	Ana Paula Lucas Mota	Aceito
Parecer Anterior	CartaRespostaaoCoep.docx	27/07/2018 16:36:08	Ana Paula Lucas Mota	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoPoliomaVirus.doc	27/07/2018 16:35:49	Ana Paula Lucas Mota	Aceito
Outros	curriculolattes.pdf	12/07/2018 10:52:01	Ana Paula Lucas Mota	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRostoAssinada.docx	15/05/2018 14:29:36	Ana Paula Lucas Mota	Aceito
Outros	91755918aprovacaoassinada.pdf	21/08/2018 09:54:05	Vivian Resende	Aceito
Outros	91755918parecerassinado.pdf	21/08/2018 09:54:15	Vivian Resende	Aceito

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE**Telefone:** (31)3409-4592**E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 2.832.853

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 21 de Agosto de 2018

Assinado por:
Vivian Resende
(Coordenador)

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

ANEXO B – APROVAÇÃO DO COEP DO HOSPITAL FELÍCIO ROCHO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de receptores do transplante renal associando o Poliomavírus BK com complicações pós-transplante e rejeição ao enxerto.

Pesquisador: Ana Paula Lucas Mota

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 91755918.9.3001.5125

Instituição Proponente: Hospital Felício Rocho/MG

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.010.946

Apresentação do Projeto:

O Poliomavírus BK (BKPyV) é um agente causal da nefropatia, estenose ureteral e cistite hemorrágica em receptores do transplante renal sendo considerado uma infecção emergente nos transplantes (VARELLA, et al, 2014), com potencial risco de rejeição ao enxerto renal.

Como o BKPyV permanece latente no tecido renal e está relacionado à imunossupressão, pacientes com insuficiência renal crônica e transplantados renais, são grupos nos quais o diagnóstico precoce desses vírus é interessante, a fim de prevenir a evolução da infecção viral e as subseqüentes doenças relacionadas a eles (ALVES, 2015).

A redução da imunossupressão é a pedra angular no manejo de pacientes infectados pelo BKPyV. O diagnóstico tardio está geralmente associado ao declínio irreversível da função do enxerto em pacientes nefropatas.

Dados recentes sugerem que o risco de patologia relacionada com BKPyV resulta de fatores pré e pós-transplante. Múltiplos estudos identificaram o tacrolimus como um fator de risco para desenvolvimento de viremia por BKPyV ou nefropatia. Em contraste, a ciclosporina A parece suprimir a replicação BKPyV in vitro, mas não está claro se este efeito antiviral está presente nos receptores de transplante. Isso sugere que a escolha da imunossupressão desempenha um papel

Endereço: Avenida do Contorno, 9.530

Bairro: Barro Preto

CEP: 30.110-934

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3514-7626

Fax: (31)3514-7626

E-mail: cep@feliciorocho.org.br



Continuação do Parecer: 3.010.946

importante nos crescentes casos de BKVN nas últimas décadas, uma vez que a maioria dos receptores de transplante renal recebe terapia imunossupressora com Tacrolimus.

Em transplante renal, a ocorrência de infecção relacionada ao poliomavírus representa uma das maiores complicações no período pós-transplante. Sua prevalência nesta população é elevada, com alta morbidade e com sobrevida reduzida de enxerto. Atualmente, pouco se sabe sobre os mecanismos de ativação do poliomavírus. Nickeleit e colaboradores propuseram a hipótese de reativação em 2 etapas ("reactivation in two-hits"), a primeira é relacionada ao estímulo de multiplicação secundário à imunossupressão por drogas, como tacrolimus ou micofenolato. Como a minoria dos pacientes que recebem estas duas medicações simultaneamente desenvolve BKVN, a segunda etapa, ou seja, uma lesão tubular (episódio de rejeição aguda, por exemplo) parece necessária à replicação viral (NICKELEIT, et al, 2003). Os estudos são pouco esclarecedores.

O trabalho pretende avaliar receptores do transplante renal de maneira retrospectiva e prospectiva, verificando a ocorrência de Poliomavírus BK (BKPyV) e sua associação com complicações pós-transplante e com a rejeição ao enxerto. Serão selecionados cerca de 350 voluntários para a pesquisa, sendo uma porcentagem sem diagnóstico de infecção por BKPyV e o restante portadores deste diagnóstico. Serão coletadas amostras biológicas para determinação dos seguintes parâmetros: genotipagem por PCR convencional (PCR Semi-nested), análise da carga viral por PCR Real Time (PCR quantitativo), exame citológico da urina (Células Decoy) e avaliação de parâmetros bioquímicos.

Dessa forma, acredita-se que o presente estudo poderá contribuir para:

1. Um melhor entendimento sobre o mecanismo de ação do BKPyV;
2. Um maior entendimento da relação entre a infecção pelo BKPyV e as complicações associadas;
3. Um maior entendimento da relação entre o vírus e a rejeição ao enxerto;
4. Um melhor entendimento da relação entre o uso de imunossupressores com a incidência do vírus.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO GERAL

Avaliar pacientes transplantados renais no período de 2008 e 2009 e avaliar os receptores no pré e pós-transplante no período de 2018 e 2019, verificando a ocorrência do BKPyV e sua associação

Endereço: Avenida do Contorno, 9.530
Bairro: Barro Preto **CEP:** 30.110-934
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3514-7626 **Fax:** (31)3514-7626 **E-mail:** cep@felicio-rocho.org.br



Continuação do Parecer: 3.010.946

com complicações pós-transplante e com a rejeição ao enxerto.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar, por meio de um estudo comparativo entre um grupo de pacientes submetidos ao transplante renal e um grupo controle, as seguintes variáveis:

Estudo retrospectivo

1. Análise da ocorrência do BKPyV nos pacientes que realizaram o transplante renal em 2008 e 2009 e verificar os que fizeram o re-transplante.
2. Identificação viral por métodos de genotipagem e citologia urinária (células decoy).
3. Avaliação da carga viral através de PCR quantitativo (qPCR).
4. Correlacionar todos os parâmetros entre si e com outros fatores de risco, como o uso de imunossupressores, infecções adquiridas e dados bioquímicos.

Estudo prospectivo

1. Análise da ocorrência do BKPyV nos pacientes que serão submetidos ao transplante nos anos de 2018 e 2019, bem como o monitoramento pós-transplante desses pacientes.
2. Identificação viral por métodos de genotipagem e citologia urinária.
3. Avaliação da carga viral através de PCR quantitativo (qPCR).
4. Acompanhar os pacientes verificando se há o desenvolvimento de complicações pós-transplante ou perda do enxerto.
5. Correlacionar todos os parâmetros entre si e com outros fatores de risco, como o uso de imunossupressores, infecções adquiridas e dados bioquímicos como da creatinina e o ritmo de filtração glomerular.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O projeto inclui riscos mínimos, uma vez que todos os procedimentos de biossegurança serão tomados. Em relação aos pacientes, existe um risco mínimo de possíveis incômodos durante a punção venosa, como dor local, tonteira ou sensação de desmaio e, após a coleta, o possível surgimento de uma mancha roxa, devido ao extravasamento de sangue de um vaso sanguíneo. Geralmente não há complicações e essa mancha roxa desaparece em poucos dias.

Benefícios:

Endereço: Avenida do Contorno, 9.530	CEP: 30.110-934
Bairro: Barro Preto	
UF: MG	Município: BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3514-7626	Fax: (31)3514-7626
	E-mail: cep@feliciorocho.org.br



Continuação do Parecer: 3.010.946

Os voluntários participantes estarão contribuindo para a confirmação ou a exclusão das hipóteses geradas em torno das alterações em exames laboratoriais e clínicos encontrados em pacientes transplantados renais e possivelmente infectados com o poliomavírus BK, auxiliarão na prevenção da perda do enxerto e desenvolvimento de complicações pós-transplante. Bem como irão contribuir para a geração de materiais didáticos, que possuem o objetivo de instruir e esclarecer os participantes sobre o tratamento e a prevenção de diversas complicações associadas ao transplante.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A investigadora principal providenciou a folha de rosto assinada pelo Hospital Felício Rocho e anexou na Plataforma Brasil.

Foi realizado os TERMOS DE COMPROMISSOS tanto da UFMG quanto do Hospital Felício Rocho que também foram anexados na Plataforma Brasil. Esses termos devidamente assinados constam que:

- serão anexados os resultados da pesquisa na Plataforma Brasil;
- será garantido o sigilo relativo às propriedades intelectuais e patentes industriais;
- será garantido que os benefícios resultantes do projeto retornem aos participantes da pesquisa, seja em termos de retorno social, acesso aos procedimentos, produtos ou agentes da pesquisa;
- há infraestrutura necessária e apta ao desenvolvimento da pesquisa para atender eventuais problemas que dela resultem;
- há concordância da instituição e/ou organização por meio de seu responsável maior com competência/coordenador da clínica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha rosto – Adequada

Projeto completo – Adequado

Brochura do Investigado – Adequado

TCLE – adequado

Termo de funcionamento do biorrepositório - Adequado

Parecer consubstanciado do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia CV do investigador

Recomendações:

Atualizar as tarefas desenhadas com início posterior à data de aprovação da pesquisa pelo CEP-

Endereço: Avenida do Contorno, 9.530
Bairro: Barro Preto **CEP:** 30.110-934
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3514-7626 **Fax:** (31)3514-7626 **E-mail:** cep@feliciorocho.org.br



Continuação do Parecer: 3.010.946

HFR.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica.

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme Resolução CNS 466/12: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1205102.pdf	10/10/2018 10:59:34		Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRostoAssinadaHFR.pdf	10/10/2018 10:58:58	Ana Paula Lucas Mota	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DeclaracaoProfessoraAnaPaulaMota.pdf	08/10/2018 17:21:00	Ana Paula Lucas Mota	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoDraSandraVilacaHFR.pdf	08/10/2018 17:20:47	Ana Paula Lucas Mota	Aceito
Outros	91755918parecerassinado.pdf	21/08/2018 09:54:15	Vivian Resende	Aceito
Outros	91755918aprovacaoassinada.pdf	21/08/2018 09:54:05	Vivian Resende	Aceito
Outros	biorepositorio.docx	27/07/2018 16:40:43	Ana Paula Lucas Mota	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	27/07/2018 16:36:23	Ana Paula Lucas Mota	Aceito
Parecer Anterior	CartaRespostaaoCoep.docx	27/07/2018 16:36:08	Ana Paula Lucas Mota	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoPoliomaVirus.doc	27/07/2018 16:35:49	Ana Paula Lucas Mota	Aceito
Outros	curriculolattes.pdf	12/07/2018 10:52:01	Ana Paula Lucas Mota	Aceito

Endereço: Avenida do Contorno, 9.530

Bairro: Barro Preto

CEP: 30.110-934

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3514-7626

Fax: (31)3514-7626

E-mail: cep@feliciorocho.org.br



Continuação do Parecer: 3.010.946

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 09 de Novembro de 2018

Assinado por:
Selme Silqueira de Matos
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida do Contorno, 9.530

Bairro: Barro Preto

CEP: 30.110-934

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3514-7626

Fax: (31)3514-7626

E-mail: cep@feliciorocho.org.br

ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**Submissão e aprovação do COEP CAAE: 91755918.9.0000.5149**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido(Grupo de Pacientes Crônicos)**Título do Projeto:**

Avaliação de receptores do transplante renal associando o Poliomavírus BK com complicações pós-transplante e rejeição ao enxerto.

Professor orientador e pesquisador responsável:**Ana Paula Lucas Mota**

Você está sendo convidado para participar como voluntário de uma pesquisa, proposta intitulada “ESTUDO RETROSPECTIVO E PROSPECTIVO DE RECEPTORES DO TRANSPLANTE RENAL ASSOCIANDO O POLIOMAVÍRUS BK COM COMPLICAÇÕES PÓS-TRANSPLANTE E REJEIÇÃO AO ENXERTO” que está descrita a seguir:

Pesquisas em humanos têm demonstrado efeitos benéficos do diagnóstico precoce de infecção por Poliomavírus BK bem como o tratamento e a tomada de medidas profiláticas precoces em pacientes submetidos ao transplante renal. O diagnóstico precoce é uma boa maneira de evitar complicações pós-transplante, a exemplo das seguintes patologias: nefropatia, cistite hemorrágica, estenose ureteral e o fator de maior impacto a rejeição ao enxerto. Nesta pesquisa pretendemos avaliar pacientes submetidos ao transplante renal, antes e após a sua realização, verificando se há presença do Poliomavírus BK no organismo do paciente. E há diversas maneiras de realizar a identificação do vírus, através de amostras biológicas de urina, sangue e em casos mais especiais por biópsia renal. Este vírus infecta mais

de 80% da população, mas a maioria dos indivíduos não manifesta nenhuma sintomatologia. O problema ocorre em indivíduos imunocomprometidos, estando bastante relacionado com complicações pós-transplante, sendo o desenvolvimento de nefropatia o principal fator que leva à perda do enxerto. Pesquisas têm demonstrado que o vírus se torna reativo principalmente nestes pacientes imunocomprometidos. Sendo assim, é de suma importância conhecer melhor sobre a infecção causada por esse vírus e desta forma, evitar a perda do enxerto ou demais complicações pós-transplante. Fazer a pesquisa do vírus representa um aliado importantíssimo no sucesso do transplante.

Com o aumento da expectativa de vida, aumenta a preocupação, por parte da população e dos órgãos públicos de saúde, em relação à prevenção de doenças infecciosas e demais comorbidades. E no caso do transplante, o público alvo já merece uma atenção especial, uma vez que o tratamento com imunossupressores é contínuo e pra vida toda.

Esta pesquisa visa avaliar as alterações clínicas e laboratoriais de pacientes transplantados renais. A avaliação de exames laboratoriais poderia fornecer ferramentas úteis para o diagnóstico e monitoramento dessas doenças. Você está sendo convidado para participar desta pesquisa de forma voluntária e gratuita.

Para decidir se você deve concordar ou não em participar desta pesquisa, leia atentamente todos os itens a seguir que irão informá-lo (a) e esclarecê-lo(a) de todos os procedimentos, riscos e benefícios pelos quais você passará segundo as exigências da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde.

1. Objetivo da pesquisa:

Avaliar os receptores do transplante renal antes e após a realização do transplante verificando a incidência do Poliomavírus BK e sua associação com complicações pós-transplante e com a rejeição ao enxerto. Os prontuários médicos serão avaliados para coletas de dados.

2. Descrição detalhada e explicação dos procedimentos realizados:

Sua participação é voluntária. E sua identidade será mantida em sigilo, a coleta é anonimizada, portanto sua identificação antes e após a coleta se dará por códigos numéricos e/ou letras, assegurando o sigilo e confidencialidade. A coleta sanguínea ocorrerá através da punção venosa utilizando agulhas estéreis e descartáveis e tubos a vácuo, também estéreis. Serão coletadas amostras de urina aleatória, não sendo necessária neste procedimento a obtenção de amostra de urina de 24 horas, apenas seguindo o protocolo laboratorial de desprezar o primeiro jato de urina. Suas amostras de sangue e urina serão coletadas no Hospital Felício Rocho no dia da consulta médica já agendada pelo médico responsável da Unidade de Transplante. Sendo que as amostras coletadas não serão utilizadas apenas para este estudo, mas também para a rotina médica já estabelecida. Serão coletadas as amostras dos indivíduos que assinarem o TCLE.

Pedimos a sua autorização para a coleta, o depósito, o armazenamento, a utilização e descarte das amostras de sangue e urina. A utilização do seu material biológico está vinculada somente a este projeto de pesquisa, ou se você concordar, em outras pesquisas futuras. Você pode retirar, a qualquer momento, o seu consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado. O biorrepositório da Faculdade de Farmácia representa o local de armazenamento das amostras de sangue e urina coletadas, as quais serão utilizadas na pesquisa. Sendo que as amostras de sangue serão armazenadas em freezer do laboratório de Bioquímica, na temperatura de -80°C até o momento da utilização. E as amostras de urina serão refrigeradas na geladeira, na temperatura de -20°C deste mesmo laboratório e logo serão utilizadas. O prazo máximo de utilização das amostras será de um mês, o DNA das amostras deverá ser extraído neste intervalo de tempo para fins da pesquisa. O DNA extraído poderá ser utilizado para outras pesquisas, se você concordar, sendo armazenado em freezer à -80°C . As amostras serão descartadas em sacos brancos leitosos após o fim da pesquisa, passarão por tratamento para desinfecção e descontaminação e serão desprezadas em um aterro sanitário, conforme condições já estabelecidas pela Faculdade de Farmácia da UFMG, atendendo as Resoluções nº 441/11 e nº 466/12, ambas do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

Os riscos decorrentes de sua participação na pesquisa envolvem possíveis incômodos durante a punção venosa, como dor local, tonteira ou sensação de

desmaio e, após a coleta, o possível surgimento de uma mancha roxa, devido ao extravasamento de sangue de um vaso sanguíneo. Essa mancha roxa desaparece em poucos dias. Os cuidados básicos após a coleta de sangue foram descritos abaixo: não carregar peso imediatamente após a coleta; observar se não está usando relógio, pulseira ou mesmo vestimenta que possa estar garroteando o braço punccionado; não massagear o local da punção enquanto pressiona o local; participantes da pesquisa acima de 60 anos ou em uso de anticoagulantes, devem manter pressão sobre o local de punção por cerca de 3 minutos ou até parar o sangramento.

Com relação à urina, esta será coletada em frasco estéril ou saco coletor de urina estéril (em casos de voluntários acamados, crianças ou em indivíduos com dificuldades de micção), mas não acarretará em nenhum risco. Se você estiver em uso de sonda, os profissionais da enfermagem e da coleta são bem treinados e eles retirarão a urina com seringa e a transferirão para um frasco estéril de urina para que os exames de rotina sejam feitos. Se o pedido para exame de urina já tiver sido realizado pela equipe médica de rotina, esta amostra será aproveitada pela nossa pesquisa, não sendo necessária a coleta de uma nova amostra.

Tanto a coleta de sangue quanto de urina para análise ocorrerá no Hospital Felício Rocho em Belo Horizonte, Minas Gerais. E serão encaminhadas para o Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG, no laboratório de Bioquímica Clínica.

3. Descrição dos benefícios da pesquisa:

Se você aceitar participar, estará contribuindo para a confirmação ou a exclusão das hipóteses geradas em torno das alterações em exames laboratoriais e clínicos encontrados em pacientes transplantados renais e possivelmente infectados com o poliomavírus BK, auxiliará na prevenção da perda do enxerto e desenvolvimento de complicações pós-transplante. Bem como irá contribuir para a geração de materiais didáticos, que possuem o objetivo de instruir e esclarecer os participantes sobre o tratamento e a prevenção de diversas complicações associadas ao transplante.

4. Despesas, compensações e indenizações:

Você não terá despesa pessoal nessa pesquisa incluindo transporte, exames e consultas. As coletas serão realizadas sempre que você comparecer às consultas de rotina e/ou ao laboratório para exames. Você não terá compensação financeira relacionada à sua participação nessa pesquisa.

5. Direito de confidencialidade:

Você tem assegurado que todas as suas informações pessoais obtidas durante a pesquisa serão consideradas estritamente confidenciais e os registros estarão disponíveis apenas para os pesquisadores envolvidos no estudo. Os resultados obtidos nessa pesquisa poderão ser publicados com fins científicos, mas sua identidade será mantida em sigilo.

6. Acesso aos resultados da pesquisa:

Você tem direito de acesso atualizado aos resultados da pesquisa, ainda que os mesmos possam afetar sua vontade em continuar participando da mesma.

7. Liberdade de retirada do consentimento:

Você tem direito de retirar seu consentimento, a qualquer momento, deixando de participar da pesquisa, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu cuidado e/ou tratamento na instituição.

8. Acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa:

Você tem garantido o acesso, em qualquer etapa da pesquisa, aos profissionais responsáveis pela mesma, para esclarecimento de eventuais dúvidas acerca de procedimentos, riscos, benefícios, etc., através dos contatos abaixo:

Professora orientadora: Ana Paula Lucas Mota (responsável pela pesquisa)

Telefone: 3409 6896 e-mail: aplmeta@yahoo.com.br

9. Acesso à instituição responsável pela pesquisa:

Você tem garantido o acesso, em qualquer etapa da pesquisa, à instituição responsável pela mesma, para esclarecimento de eventuais dúvidas acerca dos procedimentos éticos, através do contato abaixo:

*Comitê de ética do campus da UFMG: Avenida Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2º andar, sala 2005, Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG.
CEP: 31270-901.*

Telefone (31) 3409 4592. Email: coep@prpq.ufmg.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Fui informado verbalmente e por escrito sobre os dados dessa pesquisa e minhas dúvidas com relação a minha participação foram satisfatoriamente respondidas.

Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, os desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso aos pesquisadores e à instituição de ensino. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar, se assim o desejar, tendo recebido uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Declaro que:

() Concordo que o meu material biológico seja utilizado somente para esta pesquisa.

() Concordo que o meu material biológico possa ser utilizado em outras pesquisas, mas serei comunicado pelo pesquisador novamente e assinarei outro termo de consentimento livre e esclarecido que explique para que será utilizado o material.

() Concordo que o meu material biológico possa ser utilizado nesta e em outras pesquisas.

O termo seguirá em duas vias com espaço destinado para rubricas e o COEP poderá ser contatado em caso de dúvidas éticas: telefone (31) 3409-4592 e e-mail: coep@prpq.ufmg.br.

Assinatura do Pesquisador responsável (por extenso)

Assinatura do Participante (por extenso)

Data de assinatura do TCLE: __ / __ / __

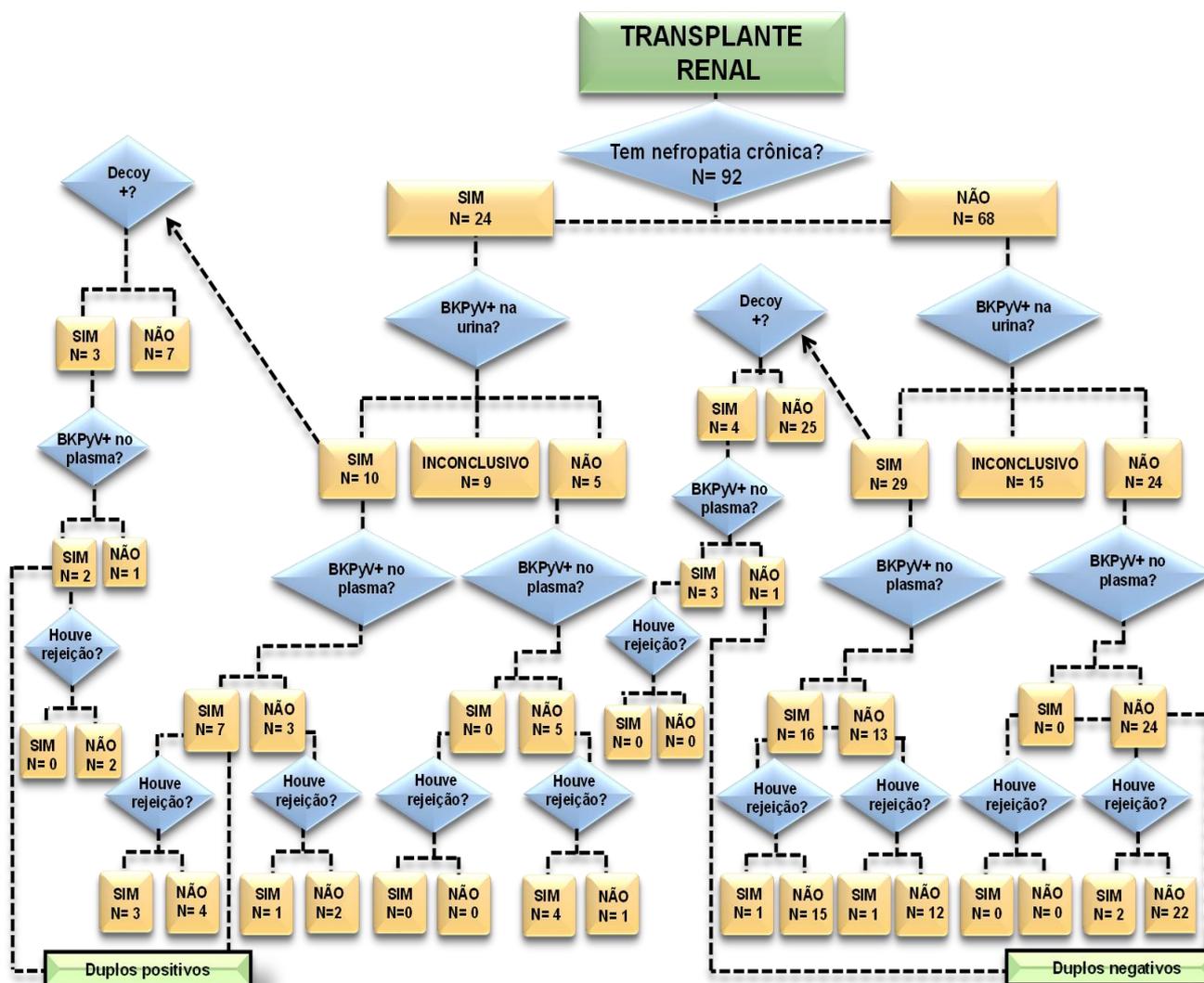
APÊNDICE A – CONDIÇÕES DA PCR *SEMI-NESTED*

Condições da PCR <i>Semi-Nested</i> da Primeira Reação de BKPyV					
	Etapa 1	Etapa 2 (40 ciclos)			Etapa 3
Temperatura (°C)	95	95	55	72	72
Tempo (minutos)	5	0,5	0,5	1	10
Condições da PCR <i>Semi-Nested</i> da Primeira Reação de JCPyV					
	Etapa 1	Etapa 2 (35 ciclos)			Etapa 3
Temperatura (°C)	95	95	45	72	72
Tempo (minutos)	5	0,5	0,5	1	10
Condições da PCR <i>Semi-Nested</i> da Segunda Reação de BKPV e JCPyV					
	Etapa 1	Etapa 2 (35 ciclos)			Etapa 3
Temperatura (°C)	95	95	45	72	72
Tempo (minutos)	5	0,5	0,5	1	10

APÊNDICE B – CONDIÇÕES DA PCR CONVENCIONAL DE B-ACTINA

Condições da PCR Convencional de β -actina					
	Etapa 1	Etapa 2 (35 ciclos)			Etapa 3
Temperatura (°C)	95	95	50	72	72
Tempo (minutos)	5	0,5	0,5	1	10

APÊNDICE C – FLUXOGRAMA DO ESTUDO TRANSVERSAL-OBSERVACIONAL



Fluxograma do estudo transversal-observacional. Fluxograma relacionando nefropatia crônica do enxerto (NCE) com infecção por BKPyV e rejeição ao enxerto, onde foram avaliados 92 transplantados renais, dos quais 24 pacientes desenvolveram NCE e 68 pacientes não desenvolveram. Dentre os 24 nefropatas crônicos, dez foram positivos para BKPyV na urina e apenas sete confirmados no plasma, havendo rejeição em apenas três pacientes.

APÊNDICE D – PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

III Simpósio Nacional em Ciências Farmacêuticas

Data: 7, 8 e 9 de novembro de 2018.

Local: Belo Horizonte (MG).

Apresentação de pôster: Caracterização clínica, demográfica e laboratorial de pacientes transplantados renais em função da presença ou ausência de infecções virais pós transplante.

Recebeu menção honrosa pela apresentação do pôster.



Seminários em Análises Clínicas e Toxicológicas

Data: 5 de novembro de 2018.

Local: Belo Horizonte (MG).

Apresentação oral: Avaliação de receptores do Transplante Renal associando o Poliomavírus BK com complicações pós-transplante e rejeição ao enxerto.



I Simpósio do Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas

Data: 29 de agosto de 2019.

Local: Belo Horizonte (MG).

Participou como membro da comissão organizadora do I Simpósio do Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG.

