

DETERMINAÇÃO DO LIMITE MÍNIMO DE DETECÇÃO DA TÉCNICA DE *NESTED-PCR* PARA OS POLIOMAVÍRUS JC E BK

ASSESSMENT OF MINIMUM DETECTION LIMIT OF NESTED-PCR FOR JC AND BK POLYOMAVIRUSES

Aline dos Santos Vieira^{1,2}, Alice Beatriz Mombach Pinheiro Machado¹, Adriana Simon Coitinho², Fernanda de-Paris¹

RESUMO

Clin Biomed Res. 2014;34(3):260-265

1 Serviço de Patologia Clínica,
Hospital de Clínicas de Porto Alegre,
Universidade Federal do Rio Grande
do Sul. Porto Alegre, RS, Brasil.

2 Centro Universitário Metodista – IPA,
Porto Alegre, RS, Brasil.

Autor correspondente:

Fernanda de-Paris
E-mail: fparis@hcpa.ufrgs.br
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Serviço de Patologia Clínica
Rua Ramiro Barcelos, 2350.
90035-903, Porto Alegre, RS, Brasil.

Introdução: Os poliomavírus (JCV e BKV) causam infecções principalmente em adultos imunocomprometidos. Um diagnóstico sensível e específico é de fundamental importância para os pacientes portadores de JCV e BKV. Atualmente alguns laboratórios têm utilizado a técnica de PCR para a detecção do material genético destes vírus em amostras clínicas. Assim, o objetivo deste estudo é determinar o limite mínimo de detecção da técnica de *nested-PCR* para os poliomavírus JC e BK.

Métodos: Diluições seriadas (100 cópias/mL; 50 cópias/mL; 25 cópias/mL; 10 cópias/mL; 5 cópias/mL e 1 cópia/mL) de controles positivos comerciais de JCV e BKV com concentrações conhecidas foram submetidas à técnica de *nested-PCR* semi-duplex. Todas as diluições foram testadas 11 vezes para determinação do limite mínimo de detecção.

Resultados: O limite mínimo de detecção da reação de *nested-PCR* para os vírus JC e BK foi de 25 cópias/mL para ambos, com 100% de positividade das diluições testadas na reação de PCR. Ainda, podemos observar que resultados positivos fracos foram obtidos nas diluições de 1, 5 e 10 cópias/mL em algumas das repetições realizadas. As diluições de 25, 50 e 100 cópias/mL sempre obtiveram resultado francamente positivo.

Conclusões: Estes valores são semelhantes aos relatados em outros estudos, contribuindo para a indicação desta reação de PCR para potenciais fins diagnósticos.

Palavras-chave: JCV; BKV; *nested-PCR*; limite mínimo de detecção

ABSTRACT

Introduction: Polyomaviruses (BKV and JCV) cause infection mainly in immunocompromised adults. A sensitive and specific diagnosis tool is fundamental to demonstrate the BKV and JCV infections. Nowadays many laboratories are using a PCR technique for detecting polyomaviruses genome in clinical samples. In this context, the purpose of this study is to determine the threshold of detection of the *nested-PCR* for polyomaviruses JC and BK.

Methods: Serial dilutions of the samples of BKV and JCV of known concentration (100 copies/mL, 50 copies/mL, 25 copies/mL, 10 copies/mL, 5 copies/mL, and 1 copy/mL) were subjected to the technique of *nested-PCR*. All dilutions were tested 11 times to determine the minimum detection limit.

Results: The minimum detection limit of the *nested-PCR* for JC and BK viruses was 25 copies/mL. This dilution (25 copies/mL) showed 100% PCR positive reaction.

Furthermore, we found that weak positive results were obtained at dilutions of 1,5 and 10 copies/mL in some repetitions. Dilutions of 25, 50, and 100 copies/mL always had very positive results.

Conclusions: These values are similar to those reported in other studies, contributing to the indication of this PCR for potential diagnostic purposes.

Keywords: JCV; BKV; nested-PCR; minimum detection limit

Os vírus BK (BKV) e JC (JCV) foram descritos primeiramente em 1971. Eles foram isolados a partir de culturas de células inoculadas da urina de um paciente e do líquor de outro, respectivamente. A denominação dos vírus foi atribuída a partir das iniciais dos pacientes nos quais foram identificados^{1,2}. Esses vírus foram classificados na família Polyomaviridae^{3,4}.

Ospoliomavírus têm alta especificidade, tanto em relação ao hospedeiro, quanto aos tipos celulares que infectam. Em seres humanos, penetram pelas vias respiratórias, disseminando-se pela corrente sanguínea (viremia)^{5,6}. Ambos os vírus são excretados na urina de pacientes infectados, o que sugere que o rim possa ser infectado em estágios precoces do contato com estes patógenos. No caso do JCV, tecidos linfóides e a medula óssea também parecem estar envolvidos como sítios iniciais ou de infecção latente⁴. Nos pacientes imunocomprometidos, a reativação do vírus BK nos rins leva à infecção no trato urinário, causando cistite hemorrágica^{5,7}, enquanto a reativação do vírus JC pode causar infecção no sistema nervoso central, desenvolvendo leucoencefalopatia multifocal progressiva (LMP)^{4,5,8-10}.

Aproximadamente 60 a 80% dos adultos têm anticorpos contra os poliomavírus^{4,11,12}. A primeira infecção acomete os indivíduos na infância. A prevalência entre os adultos saudáveis é de 83% em relação ao DNA do JCV, e 94% apresentavam DNA do BKV. Em 50% dos pacientes com doença de Huntington e em 100% dos pacientes com LMP foi encontrado o DNA de ambos os vírus¹³. As manifestações clínicas de infecção ocorrem principalmente em adultos imunocomprometidos, incluindo HIV positivos, indicando a reativação de uma infecção latente^{5,14}. Pacientes transplantados, e, portanto, imunossuprimidos, também têm alta incidência de infecção por poliomavírus. Quanto mais tempo o paciente permanece imunossuprimido, maior é a frequência de reativação do vírus polioma latente^{3,6}.

O vírus BK tem sido relacionado como causador de problemas no trato genito-urinário,

principalmente em pacientes transplantados renais. A doença do BKV é bastante variável, sendo determinada principalmente pelos fatores imunes do hospedeiro¹. Apesar de ter sido descrita há muitos anos, a nefropatia associada ao poliomavírus não era clinicamente observada até a metade da última década; nos últimos anos, porém, houve um aumento da incidência dos casos atribuído à melhora de técnicas para o diagnóstico, e, principalmente, à potencialidade cada vez maior da imunossupressão. A LMP é a síndrome clínica causada pelo vírus JC^{2,10}. O diagnóstico da LMP, assim como o da nefropatia associada ao poliomavírus, pode ser realizado analisando-se tecidos e células, através de técnicas de imunofluorescência, imunoperoxidase e reação em cadeia da polimerase (PCR). A análise do líquido cefalorraquidiano por PCR está substituindo a biópsia cerebral no diagnóstico da infecção pelo vírus JC no sistema nervoso central, pois se trata de um método menos invasivo. Entre as técnicas utilizadas para o diagnóstico do BKV, estão as histopatológicas. A detecção de *decoy cells* em amostras de urina pode ser indicativa da replicação do vírus BK no trato urogenital. Porém, este marcador possui um valor preditivo positivo de 27%, necessitando de confirmação com técnicas mais específicas como a de amplificação do DNA^{5,7,15,16}. Para este diagnóstico molecular existem, tanto kits comerciais para a detecção viral qualitativa e/ou quantitativa, como métodos *in-house*.

Muitos laboratórios utilizam PCR *in-house*, termo que se refere a uma técnica criada e/ou otimizada dentro do próprio laboratório. Variações interlaboratoriais podem ocorrer, principalmente devido à existência de diferentes condições de execução em cada laboratório. Assim, alguns parâmetros devem ser estabelecidos para que as técnicas *in-house* possam ser utilizadas como métodos de diagnóstico. Entre estes parâmetros podemos citar o limite mínimo de detecção que deve ser estabelecido para cada laboratório. Este limite é definido como a quantidade mínima de DNA

alvo que pode ser identificado em uma amostra com um determinado intervalo de confiança¹⁷. Desta forma, o objetivo deste estudo foi determinar o limite mínimo de detecção da técnica de *nested-PCR* descrita por Merlino et al. (2004) para os poliomavírus JC e BK.

MÉTODOS

O DNA viral foi adquirido comercialmente puro e quantificado. Segundo o fornecedor, ABI – *Advanced Biotechnologies*, este material foi preparado a partir de vírus purificado e o número de cópias do DNA quantificado foi determinado por *real-time* PCR utilizando o termociclador LightCycler da Roche. Cada tubo apresentava um volume total de 250 µL com 1,6 x 10⁵ cópias/mL (JCV) e 1,4 x 10⁵ cópias/mL (BKV). Todas essas informações foram fornecidas pelo distribuidor do produto.

Foram realizadas seis diluições (100 cópias/mL; 50 cópias/mL; 25 cópias/mL; 10 cópias/mL; 5 cópias/mL e 1 cópia/mL) das amostras de JCV e BKV a partir da concentração conhecida. As diluições foram realizadas em água ultrapura (Sigma, Sant Louis, USA), em volume suficiente para todos os testes a serem realizados. Todas as diluições foram testadas 11 vezes, para determinação do limite mínimo de detecção. Cada um dos 11 testes foi realizado em reações independentes.

As diluições foram submetidas à técnica de *nested-PCR*, que utiliza duas reações de amplificação com dois pares de *primers* diferentes. Na primeira reação, os *primers*: JCV1/BKV1 (*sense*: 5'-CTGGGTAAAGTCATGCT-3') e JCV1/BKV1 (*anti-sense*: 5'-GGTAGAAGACCCTAAAGACT-3'), produziram um produto de amplificação de 385 pares de base (pb), enquanto na segunda reação, os *primers* internos, JCV2/BKV2 (*sense*: 5'-AAGTATTCCTTATTCACACC-3') e JCV2 (*anti-sense*: 5'-AACTTTTATAAGTAGACATGGT-3') e BKV2 (*anti-sense*: CCCTCTGATCTACACCAG-3') resultaram em uma amplificação de 150 pb e 278 pb respectivamente¹⁸.

Cada tubo de reação de PCR na primeira etapa continha tampão 1X com 1,5 mM MgCl₂ (JMR Holdings), 250 µM de mistura de dNTP (EasyPath), 0,1 µM de *primers* externos (Invitrogen), 1U de enzima *Super-Therm* DNA polimerase (JMR Holdings) e 5 µL de cada diluição de DNA viral. O volume final da reação foi de 50 µL e a amplificação foi executada em termociclador PTC – 100 (MJ

ResearchTM, Waltham, USA), utilizando-se um período de desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de anelamento a 48°C, e 30 segundos de extensão a 72°C.

Na segunda reação de amplificação empregaram-se os *primers* internos. Esta reação utilizou uma mistura idêntica à anterior excetuando-se que o volume total foi de 49 µL e que foi utilizado 1µL do amplificado obtido na primeira reação de PCR como DNA alvo. O programa de amplificação constou de 30 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de anelamento a 45°C, e 30 segundos de extensão a 72°C.

Os produtos da amplificação foram detectados por eletroforese utilizando-se 10 µL da segunda reação em gel de agarose a 2%, contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio. A visualização foi realizada em transiluminador com luz ultravioleta, acoplado a um fotodocumentador que registrou a imagem e a enviou ao computador. Um marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Invitrogen®, Carlsbad, USA) foi empregado para auxiliar na avaliação dos resultados da reação.

As amostras foram sempre testadas em duplicata. Foram considerados resultados positivos quando se visualizaram bandas nas duas reações da mesma diluição. O resultado negativo foi interpretado como ausência de banda e como positivo fraco a partir da presença de banda em uma única reação da mesma diluição. Foi considerado o limite mínimo de detecção para cada reação a maior diluição que ainda resultava em uma banda de DNA visível no gel de agarose correspondente ao peso molecular do fragmento amplificado.

Os procedimentos de preparação dos reagentes, processamento da amostra, amplificação, transferência do produto da primeira para a segunda etapa de PCR e detecção do produto amplificado, foram realizados em três ambientes distintos para eliminar a possibilidade de contaminação. Além disso, foram utilizadas ponteiras com filtros de barreira e controles negativos constituídos de água ultrapura em cada reação.

Para avaliar o limite de detecção para a técnica de *nested-PCR* para os vírus JC e BK estimou-se, por meio do programa de análise estatística WinPepi® (versão 3.0) um número de 11 repetições para cada diluição da amostra, aceitando-se um erro de 10%.

Os resultados das 11 repetições da reação de PCR para cada diluição da amostra foram analisados de forma descritiva, verificando-se

o percentual de positividade. Foi considerado o limite mínimo de detecção a maior diluição onde se obteve 100% de positividade nas duas reações da mesma diluição nas 11 repetições.

RESULTADOS

Durante a realização das repetições observamos resultados positivos (positivos nas duas reações da duplicata) e positivos fracos (positivos em uma das reações da duplicata). Para o cálculo do limite mínimo de detecção consideramos apenas os resultados positivos (tabela 1).

O limite mínimo de detecção da reação de *nested-PCR* para os vírus JC e BK foi de 25 cópias/mL para ambos com 100% de positividade (tabela 1) a partir de 5 µL de DNA das diluições testadas na reação de PCR. Ainda, pudemos observar que resultados positivos fracos foram obtidos nas diluições de 1, 5 e 10 cópias/mL em algumas das repetições realizadas. As diluições de 25, 50 e 100 cópias/mL sempre obtiveram resultado francamente positivo.

Tabela 1: Porcentagem de positividade do limite mínimo de detecção

Diluições	Amostras positivas JCV ^a	Amostras positivas BKV ^a
1 cópia/mL	0 (0%)	0 (0%)
5 cópias/mL	2 (18%)	3 (27%)
10 cópias/mL	1 (9%)	9 (81%)
25 cópias/mL	11 (100%)	11 (100%)
50 cópias/mL	11 (100%)	11 (100%)
100 cópias/mL	11 (100%)	11 (100%)

^a número de repetições = 11

Para analisar a eletroforese dos fragmentos obtidos, contou-se com o auxílio de um marcador de peso molecular de 100 pb. A visualização dos fragmentos para JCV (150 pb) e BKV (278 pb) é demonstrada na Figura.

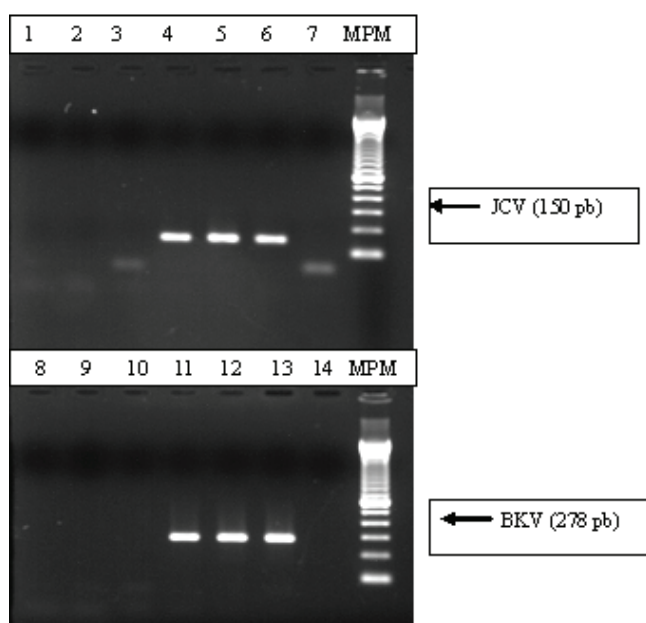


Figura: Eletroforese em gel de agarose 2% mostrando os fragmentos da amplificação das diluições.

1 – Diluição 1 cópia/mL JCV; 2 – Diluição 5 cópias/mL JCV; 3 – Diluição 10 cópias/mL JCV; 4 – Diluição 25 cópias/mL JCV; 5 – Diluição 50 cópias/mL JCV; 6 – Diluição 100 cópias/mL JCV; 7 – Controle Negativo; 8 – Diluição 1 cópia/mL BKV; 9 – Diluição 5 cópias/mL BKV; 10 – Diluição 10 cópias/mL BKV; 11 – Diluição 25 cópias/mL BKV; 12 – Diluição 50 cópias/mL BKV; 13 – Diluição 100 cópias/mL BKV; 14 – Controle Negativo; MPM – Marcador de peso molecular (100 pb);

DISCUSSÃO

O desenvolvimento e aprimoramento dos métodos moleculares têm facilitado o diagnóstico das doenças infecciosas por meio da detecção do DNA do agente etiológico. Um diagnóstico sensível, específico e reprodutível é de importância fundamental para pacientes portadores dos poliomavírus JCV e BKV. Muitos dos testes usados atualmente, especialmente os testes moleculares, são considerados *in-house*. O termo *in-house* se refere a uma técnica padronizada pelo próprio laboratório executor, especialmente no que se refere à escolha das marcas, procedência e concentrações de cada reativo utilizado nas várias etapas da execução da reação. Assim, o uso de técnicas *in-house* inspira um cuidado redobrado do laboratório executor devido a variações interlaboratoriais que podem ocorrer, principalmente devido à existência de diferentes condições de execução da técnica em cada laboratório. Portanto, para que as técnicas *in-house* possam ser utilizadas para fins diagnósticos, alguns parâmetros devem ser estabelecidos pelo laboratório executor. Procedimentos analíticos são caracterizados por uma variedade dos parâmetros técnicos de funcionamento que devem ser analisados, tais como a precisão, sensibilidade e especificidade. Outro parâmetro essencial é a mais baixa concentração do analito detectável com segurança no teste. Este parâmetro pode ser classificado como "sensibilidade analítica" ou "limite de detecção"¹⁹. Este limite é definido como a mínima quantidade de DNA alvo que pode ser detectado em uma amostra¹⁷.

Neste trabalho, nosso objetivo foi determinar o limite mínimo de detecção da técnica de *nested-PCR* descrita por Merlino et al. (2004) para os poliomavírus JC e BK. Para isso foram utilizadas 6 diluições (100 cópias/mL; 50 cópias/mL; 25 cópias/mL; 10 cópias/mL; 5 cópias/mL e 1 cópia/mL) de controles positivos quantificados comerciais de JCV e BKV. Durante a realização dos testes observamos resultados positivos e positivos fracos. As diluições 1, 5 e 10 cópias/mL apresentaram alguma porcentagem de positivos fracos e, a partir da diluição 25 cópias/mL, observamos 100% de reações positivas. Assim, consideramos o valor de 25 cópias/mL como o limite mínimo de detecção. Tendo esse limite mínimo como padrão, garante-se que pacientes que apresentem uma carga viral igual ou superior a 25 cópias/mL tenham o resultado positivo para suas amostras clínicas.

Outros autores também testaram suas reações moleculares de detecção de JC e BK vírus.

Merlino et al. (2003) utilizando um ensaio para a quantificação de carga viral de DNA do vírus BK determinou a sensibilidade do teste > 102 cópias/mL de BKV²⁰. Ainda, o mesmo grupo de trabalho (Merlino et al.) em 2005 reportou uma sensibilidade de 10 cópias/mL, porém utilizando outra técnica de detecção, diferente da utilizada neste trabalho²¹. Moret et al. (2006) utilizando o método de hibridização encontraram os valores de limite de detecção de 10 cópias/mL e 1 cópia/mL para JCV e BKV, respectivamente¹⁴. Pode-se observar que o limite de detecção das reações varia e depende de vários fatores, como a sequência de *primers* escolhida, a atividade da enzima e o método de detecção utilizado. Porém podemos afirmar que os valores descritos neste estudo são semelhantes aos relatados por outros autores. Assim, acreditamos que a reação *nested-PCR* descrita por Merlino et al. (2004) para os poliomavírus JC e BK tem potencial para fins de diagnósticos em laboratórios clínicos que mantenham controle rígido da contaminação e métodos eficientes de extração da amostra. Especialmente por se tratar de um protocolo de *nested-PCR*, podemos afirmar que este tipo de "PCR duplo", utilizando *primers* internos e externos confere maior sensibilidade e especificidade à reação. Igualmente, este tipo de protocolo traz alguma desvantagem por trazer uma maior chance de contaminação cruzada. Porém, a contaminação cruzada pode ser facilmente controlada, por exemplo, pelo uso de controles negativos. Assim, protocolos otimizados e a implantação de controles de qualidade internos e externos têm tornado a PCR *in-house* um teste laboratorial confiável. A reprodutibilidade, o uso de controles internos e externos, e a participação em programas de acreditação e qualidade laboratorial contribuem para a credibilidade da utilização da técnica de PCR na rotina diagnóstica, possibilitando um aumento considerável do número de casos de identificações etiológicas¹⁷.

Em conclusão, com valores de limite de detecção de 25 cópias virais/mL para JCV e BKV, que se mostram concordantes com os relatados em outros estudos, acredita-se que esta reação de *nested-PCR* tem uso potencial para fins diagnósticos.

Agradecimentos

Agradecemos ao Prof. Afonso Luis Barth pelo seu apoio e ao FIPE-HCPA (Fundo de incentivo à pesquisa e eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre) pelo incentivo financeiro a este trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Hirsch HH, Steiger J. Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis.* 2003;3:611-23.
2. Kwak EJ, Vilchez RA, Randhawa P, Shapiro R, Butel JS, Kusne S. Pathogenesis and management of polyomavirus infection in transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 2002;35:1081-7.
3. Hammarin AL, Bogdanovic G, Svedhem V, Pirskanen R, Morfeldt L, Grandien M. Analysis of PCR as a tool for detection of JC virus DNA in cerebrospinal fluid for diagnosis of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Clin Microbiol.* 1996;34:2929-32.
4. Murray PR, Baron JE, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, editors. *Manual of clinical microbiology.* 7th ed. Washington, D.C.: ASM Press; 1999.
5. Behzad-Behbahani A, Klapper PE, Valley PJ, Cleator GM, Khoo SH. Detection of BK virus and JC virus DNA in urine samples from immunocompromised (HIV-infected) and immunocompetent (HIV-non-infected) patients using polymerase chain reaction and microplate hybridisation. *J Clin Virol.* 2004;29:224-9.
6. De Gascun CF, Carr MJ. Human polyomavirus reactivation: disease pathogenesis and treatment approaches. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:373579.
7. Bennett SM, Broekema NM, Imperiale MJ. BK polyomavirus: emerging pathogen. *Microbes Infect.* 2012;14:672-83.
8. Arthur RR, Dagostin S, Shah KV. Detection of BK virus and JC virus in urine and brain tissue by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1989;27:1174-9.
9. Wilson WR, Sande MA. Doenças Infecciosas Diagnóstico e Tratamento. Porto Alegre: Artmed; 2004.
10. Tavazzi E, White MK, Khalili K. Progressive multifocal leukoencephalopathy: clinical and molecular aspects. *Rev Med Virol.* 2012;22:18-32.
11. Drews K, Bashir T, Dorries K. Quantification of human polyomavirus JC in brain tissue and cerebrospinal fluid of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy by competitive PCR. *J Virol Methods.* 2000;84:23-36.
12. Nickenleit V, Hirsch HH, Binet IF, Gudat F, Prince O, Dalquen P, et al. Polyomavirus infection of renal allograft recipients: from latent infection to manifest disease. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10:1080-9.
13. Dorries K, Vogel E, Gunther S, Czub S. Infection of human polyomaviruses JC and BK in peripheral blood leukocytes from immunocompetent individuals. *Virology.* 1994;198:59-70.
14. Moret H, Brodard V, Barranger C, Jovenin N, Joannes M, Androletti L. New commercially available PCR and microplate hybridization assay for detection and differentiation of human polyomaviruses JC and BK in cerebrospinal fluid, serum, and urine samples. *J Clin Microbiol.* 2006;44:1305-9.
15. Di Padova C. Stopping a medical research project for financial reasons. *Nephrol Dial Transplant.* 2004;19:1015.
16. Fogazzi GB, Cantu M, Saglimbeni L. 'Decoy cells' in the urine due to polyomavirus BK infection: easily seen by phase-contrast microscopy. *Nephrol Dial Transplant.* 2001;16:1496-8.
17. Teló EP, Machado ABMP, Schmitt VM, Chesky M. Determinação do limite mínimo de detecção da técnica de pcr "semi-nested" para *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e *Streptococcus pneumoniae*. *Rev bras anal clin.* 2007;39:197-200.
18. Merlino C, Bergallo M, Daniele R, Scutera S, Giacchino F, Comune L, et al. Co-detection and discrimination of JCV and BKV DNA by duplex nested-PCR in renal transplant recipients. *Panminerva Med.* 2004;46:153-9.
19. Armbruster DA, Tillman MD, Hubbs LM. Limit of detection (LQD)/limit of quantitation (LOQ): comparison of the empirical and the statistical methods exemplified with GC-MS assays of abused drugs. *Clin Chem.* 1994;40:1233-8.
20. Merlino C, Bergallo M, Gribaudo G, Gregori G, Paolo Segoloni G, Giacchino F, et al. Polyomavirus BK DNA quantification assay to evaluate viral load in renal transplant recipients. *J Clin Virol.* 2003;28:265-74.
21. Merlino C, Bergallo M, Daniele R, Ponzi AN, Cavallo R. BKV-DNA and JCV-DNA co-quantification assay to evaluate viral load in urine and serum. *Mol Biotechnol.* 2005;30:1-8.

Recebido: 05/06/2014

Aceito: 07/07/2014