MARIA CRISTINA DOMINGUES DA SILVA FINK

Distribuição genotípica do poliomavirus humano JC em pacientes com aids, com e sem leucoencefalopatia multifocal progressiva, em São Paulo, Brasil.

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de concentração:

Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Cláudio S. Pannuti

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Fink, Maria Cristina Domingues da Silva

Distribuição genotípica do poliomavirus humano JC em pacientes com aids, com e sem leucoencefalopatia multifocal progressiva, em São Paulo, Brasil / Maria Cristina Domingues da Silva Fink. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias.

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Cláudio Sergio Panutti.

Descritores: 1.Leucoencefalopatia multifocal progressiva 2.Virus JC
3.Genótipo 4.Reação em cadeia da polimerase

USP/FM/SBD-418/09

DEDICATÓRIA

Ao Nelo e à Nina, amados e saudosos.

Ao Paulo, por todos esses anos.

Aos meus filhos: Rafa, Bia, Marinho e Dudu.

Às minhas irmãs de alma: Laurinha, Ciry e Juju.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Cláudio Sergio Pannuti, meu orientador, exemplo de dignidade e profissionalismo, pelo apoio incondicional no desenvolvimento deste estudo.

Aos Drs. Augusto Cesar Penalva de Oliveira e José Ernesto Vidal Bermudez, pelo privilégio do convívio nesses últimos anos, pela parceria, pelas palavras de amizade e estímulo.

Aos meus “meninos” Paulo Roberto Urbano, Cristiane Centrone, Luiz Nali, pelo compromisso na padronização e execução das reações e o entusiasmo a cada resultado obtido.

À Adriana Fumie Tateno, Renata Moscolini Romão e Ana Carolina F. Mamana pelas reações de seqüenciamento das amostras.

Ao Dr. José Eduardo Levi, pelo apoio constante e sugestões precisas no desenvolvimento deste estudo.

Aos Profs. José Expedito Luna e Maria Regina Alves Cardoso pelas sugestões no exame de qualificação.

À Cristina Oliveira e Artur Queirós, pelas análises filogenéticas.

À Dra. Camila Romano, pela análise das mutações e pelo apoio científico.

Ao Prof.Dr. Heitor Franco de Andrade Jr. pelas sugestões, apoio e amizade.

A todos os médicos do Instituto de Infectologia Emílio Ribas, em especial ao Dr. Alexandre Almeida pela seleção dos pacientes.

À “Família” Virologia por todos esses anos.

SUMÁRIO

1)	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	1
1.1)	LEUCOENCEFALOPATIA MULTIFOCAL PROGRESSIVA	1
1.2)	CLASSIFICAÇÃO	5
1.3)	ESTRUTURA GENÔMICA	5
1.4)	EPIDEMIOLOGIA	11
1.4.1)	FORMAS DE TRANSMISSÃO DO VÍRUS	11
1.4.2)	EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR	15
1.5)	PATOGENIA	18
1.5.1)	LATÊNCIA E REATIVAÇÃO	18
1.5.2)	PATOGÊNESE DA LEUCOENCEFALOPATIA MULTIFOCAL PROGRESSIVA	22
1.5.3)	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	31
1.6)	MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DE NEUROIMAGEM	34
1.7)	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	35
2)	JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	40
3)	OBJETIVOS	41
3.1)	OBJETIVO GERAL	41
3.2)	OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	41
4)	CASUÍSTICA E MÉTODOS	42
4.1)	DESENHO DO ESTUDO	42
4.2)	DEFINIÇÃO DE CASO	42
4.3)	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	43
4.3.1)	CASOS	43
4.3.2)	CONTROLES	43
4.4)	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	43
4.5)	ASPECTOS ÉTICOS	44
4.6)	AMOSTRAS	44

4.7)	TESTES LABORATORIAIS	46
4.7.1)	AVALIAÇÃO DA CONDIÇÃO IMUNOLÓGICA.....	46
4.8)	AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO VJC	46
4.8.1)	PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	46
4.8.2)	REAÇÃO EM CADEIA POR POLIMERASE (PCR) PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE T	47
4.8.3)	REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DE VP1 PARA GENOTIPAGEM..	48
4.8.4)	SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS DE PCR	50
4.9)	CLASSIFICAÇÃO GENOTÍPICA e ANÁLISES FILOGENÉTICAS.....	51
4.10)	ANÁLISE DE SELEÇÃO E MAPEAMENTO DOS SÍTIOS VARIÁVEIS	53
4.11)	PCR EM TEMPO REAL	55
4.11.1)	Padronização da PCR em tempo real	55
5)	ANÁLISE ESTATÍSTICA	60
6)	RESULTADOS	61
6.1)	PACIENTES	61
6.2)	GRUPO CONTROLE 1	63
6.3)	ANÁLISES FILOGENÉTICAS	66
6.4)	ANÁLISE DE SELEÇÃO E MAPEAMENTO DOS SÍTIOS VARIÁVEIS	69
6.5)	DETERMINAÇÃO DA CARGA VIRAL POR PCR EM TEMPO REAL.....	70
6.6)	RESULTADOS DA PADRONIZAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL.....	74
6.6.1)	SENSIBILIDADE ANALÍTICA	74
6.7)	TESTE DE ESPECIFICIDADE.....	77
6.8)	SENSIBILIDADE DIAGNÓSTICA	77
7)	DISCUSSÃO	78
8)	CONCLUSÕES	89
9)	ANEXOS	90
	Anexo 1- Aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa.....	91
	Anexo 2 – Termo de Consentimento.....	93

	Anexo 3 - Distribuição de idade, sexo, número de células TCD ₄ ⁺ , síndrome clínica descrita e número de acesso ao <i>Genbank</i> , dos pacientes HIV+/VJC+	96
	Anexo 4 – Alinhamento de aminoácidos dos casos e controles	97
	Anexo 5 - Resultado das reações de PCR em tempo real em Cts e carga viral líquórica em número de cópias	100
10)	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama esquemático do VJC.....	8
Figura 2. Diagrama esquemático demonstrando diferenças estruturais da região regulatória entre os VJC arquetípicos e amostras clonadas de líquido de pacientes com LEMP.....	9
Figura 3. Distribuição geográfica dos oito genótipos e subtipos do VJC, tendo como base a variabilidade do gene VP1.....	17
Figura 4. Fluxograma metodológico	45
Figura 5. Reconstrução filogenética através do método Bayesiano realizada no programa BEAST com 10 milhões de cadeias. Os valores de probabilidade posterior maiores que 0,5 estão evidenciadas nos nós das árvores. Em vermelho, as sequências obtidas no GenBank foram utilizadas como referência.	68
Figura 6. Log da carga viral líquórica e a evolução para óbito	71
Figura 7. Contagem de células CD4 e evolução clínica	73
Figura 8. Construção da curva padrão obtida com diluições seriadas do plasmídeo contendo segmento do VJC.	74
Figura 9 Estabelecimento da curva padrão obtida com diluições seriadas 6×10^0 , 6×10^1 , 6×10^2 , 6×10^3 , 6×10^4 , 6×10^5 do plasmídeo contendo o fragmento do VJC. Regressão linear da curva padrão, correlacionando número de cópias na reação e o respectivo Ct.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição da PCR com respectivas sensibilidade e especificidade.	37
Tabela 2. Primers utilizados para a amplificação do DNA do VJC, com respectivas sequências, região amplificada e tamanho do fragmento.....	50
Tabela 3. Distribuição genotípica do vírus JC em amostras de líquido de pacientes com aids e LEMP e urina de pacientes com aids, sem LEMP.	64
Tabela 4. Distribuição dos subtipos do VJC em amostras de urina de pacientes com aids, sem sintomas neurológicos e amostras de líquido de pacientes com LEMP	66
Tabela 5. Associação entre medianas de CD ₄ ⁺ e evolução para óbito.	72
Tabela 6. Associação entre genótipos e evolução para óbito	73
Tabela 7. Determinação do <i>cut-off</i> da reação de PCR em tempo real através de diluições seriadas do plasmídeo, testadas em decuplicatas.....	76
Tabela 8. Avaliação da reprodutibilidade intratestes	76

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag:	Antígeno
AIDS:	síndrome da imunodeficiência humana
HÁ:	Hemaglutinação
HÁART:	highly active antiretroviral treatment (terapia antiretroviral altamente ativa)
HIV:	human immunodeficiency virus (vírus da imunodeficiência humana)
IRIS:	immune reconstitution inflammatory syndrome (síndrome inflamatória da reconstituição imune)
LCR:	líquido cefalorraquidiano
LEMP:	leucoencefalopatia multifocal progressiva
PCR:	polymerase chain reaction (reação em cadeia por polimerase)
RNM:	ressonância nuclear magnética
RPM:	rotações por minuto
TAE:	tris acetato edta
TCC:	tomografia computadorizada do crânio
TCLE:	termo de consentimento livre e esclarecido
VJC:	vírus JC

RESUMO

FINK, M.C.D.S. **Distribuição genotípica do poliomavírus humano JC em pacientes com aids, com e sem leucoencefalopatia multifocal progressiva, em São Paulo, Brasil.** São Paulo, 2009. 144 p.

A relação entre os diferentes genótipos do VJC e a patogênese da LEMP permanece ainda uma questão controversa.

O presente estudo visou a caracterização genotípica do vírus JC (VJC) e sua associação com a leucoencefalopatia multifocal progressiva (LEMP) em pacientes com aids em São Paulo, no período de 2000 a 2008. Foram avaliadas 51 amostras de líquido de pacientes com LEMP e 47 amostras de pacientes com aids sem LEMP positivas para os genes T e VP1 pela reação em cadeia por polimerase (PCR). Foram identificados, através do sequenciamento genômico os genótipos 1, 2, 3, 4 e 6, sendo que os mais prevalentes foram os genótipos 2 (33%), 1 (27%), seguidos pelo genótipo 3 (23%). O genótipo 1 mostrou associação positiva com a LEMP ($p < 0,05$), enquanto que o genótipo 3 mostrou associação inversa à LEMP. Durante a internação em que foi diagnosticada LEMP observamos evolução para óbito em 27 (59%) pacientes e alta em 19 (41%). Não houve associação entre os genótipos do VJC ou carga viral líquórica e a evolução para óbito, mas houve associação significativa entre o número de linfócitos TCD₄⁺ e o óbito. No presente estudo, uma mutação no sítio 91 do gene VP1 com substituição da leucina para isoleucina ou valina, não descrita anteriormente, foi encontrada exclusivamente em pacientes com LEMP. Substituições nos

sítios 123, 128 e 134 foram observadas mais frequentemente nos casos de LEMP. Não foram encontradas diferenças filogenéticas entre as sequências obtidas dos casos e dos controles. A PCR em tempo real padronizada mostrou sensibilidade e especificidade diagnósticas de 89% e 100%, respectivamente.

Descritores: 1. POLYOMAVIRUS HOMINIS TIPO 2; 2. LEUCOENCEFALOPATIA MULTIFOCAL PROGRESSIVA; 3. VIRUS JC GENÓTIPOS; 4. PCR EM TEMPO REAL

SUMMARY

FINK, M.C.D.S. Genotype distribution of human Polyomavirus JC in AIDS patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy, in Sao Paulo, Brazil. São Paulo, 2009. 144 p.

The relationship between the different genotypes of VJC and the pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy remains a controversial issue. This study aimed to genotypic characterization of JC virus (JCV) and its association with progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) in AIDS patients in Sao Paulo, from 2000 to 2008. We analyzed 51 CSF samples from patients with PML and 47 samples of AIDS patients without PML positives for the T and VP1 genes by polymerase chain reaction (PCR). Were identified by genomic sequencing genotypes 1, 2, 3, 4 and 6, and were the most prevalent genotypes 2 (33%), 1 (27%), followed by genotype 3 (23%). Genotype 1 showed a positive association with PML ($p < 0.05$), while genotype 3 was inversely associated with PML. Overall in-hospital mortality was 59% (27 patients). No association between the genotypes of VJC or CSF viral load and progression to death, but there was a significant association between number of CD4 + and death. In this study, a mutation in site 91 of VP1 gene with substitution of leucine for isoleucine or valine, not described previously, was found exclusively in patients with PML. Substitutions at sites 123, 128 and 134 were observed more frequently in cases of PML. No differences were found between phylogenetic sequences obtained from cases and controls. The real-time PCR showed standardized diagnostic sensitivity and specificity of 89% and 100%, respectively.

Descriptors: 1. POLYOMAVIRUS HOMINIS TIPO 2; 2. LEUCOENCEFALOPATIA MULTIFOCAL PROGRESSIVA; 3. VIRUS JC GENÓTIPOS; 4. PCR EM TEMPO REAL

1) INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1) LEUCOENCEFALOPATIA MULTIFOCAL PROGRESSIVA

Embora tenha sido descrita inicialmente em 1930 pelo neuropatologista alemão Hallervorden como “doença não classificável” (citado por BERGER, 1999), a leucoencefalopatia multifocal progressiva (LEMP) é descrita como uma entidade clínica por Astrom et al. , em 1958, no hospital geral de Massachusetts, após observação clínica e histopatológica de dois pacientes portadores de leucemia linfocítica e um paciente com doença de Hodgkin’s, apresentando múltiplas lesões desmielinizantes em sistema nervoso central, com progressão rápida e fatal da doença. (ASTROM et al., 1958)

A caracterização dessa doença é feita com base em achados histopatológicos característicos: desmielinização resultante da destruição dos oligodendrócitos, hipertrofia nuclear nessas células que apresentam densa basofilia, perda dos detalhes nucleares e, finalmente, hiperplasia dos astrócitos, que se apresentam como células gigantes de aspecto bizarro, semelhantes a células neoplásicas (ASTROM et al., 1958).

A etiologia da LEMP permaneceu incerta, embora a demonstração de corpúsculos de inclusão no núcleo dos oligodendrócitos indicasse uma possível infecção viral (CAVANAUGH et al., 1959, RICHARDSON, 1961).

Em 1967, Zu Rhein, com base nos achados da microscopia eletrônica, sugere que um poliomavirus poderia ser o responsável por essa

doença (ZU RHEIN, 1967). Em estudos subsequentes, a possível etiologia viral continua sendo apenas sugestiva, uma vez que a maioria dos casos é diagnosticada através de autópsia e sempre com base em evidências morfológicas no tecido fixado (RAUSING & AXELSON, 1970).

A confirmação inequívoca dessa hipótese ocorre em 1971, quando Padgett et al. isolam o vírus em culturas celulares permissivas, constituídas por células da glia de fetos humanos, através da inoculação de extratos do tecido cerebral de um paciente portador de linfoma de Hodgkin apresentando doença neurológica desmielinizante (PADGETT et al., 1971).

Como as iniciais desse paciente eram JC, estas passam a referenciar o vírus. Esta primeira cepa do vírus JC, identificada em Madison, Wisconsin, recebe o nome de “protótipo Mad 1”. (PADGETT et al., 1971)

A leucoencefalopatia multifocal progressiva era, inicialmente, uma doença rara, que ocorria em pacientes imunologicamente debilitados por doenças crônicas, doenças genéticas tais como a síndrome “Wiskott-Aldrich” (KATZ et al., 1994) ou uso prolongado de drogas citotóxicas ou imunossupressoras (NAGASHIMA et al., 1981, KATZ et al., 1994). Desde sua identificação inicial por Astrom e colaboradores, como uma complicação rara da doença de Hodgkin e leucemia linfocítica crônica, casos subsequentes foram descritos, em pequeno número, em associação com outras leucemias e linfomas ou em pacientes submetidos à quimioterapia para tratamento de câncer ou ainda, recebendo terapia imunossupressora pós-transplante de órgãos (GRENLEE, 1998).

Com o surgimento e a evolução da epidemia de aids, entretanto, a epidemiologia dessa doença foi drasticamente alterada.

A primeira descrição da LEMP como complicador da aids ocorre em 1982, por Miller et al., em um paciente homossexual masculino, com deficiência na imunidade de células T que, ao exame neurológico demonstra nistagmo horizontal bilateral, alteração de sensibilidade em face e braço esquerdo, além de incoordenação e sensível diminuição da força muscular no mesmo braço. Estudos sorológicos desse paciente demonstram infecções prévias por inúmeros microorganismos, inclusive o VJC, sem evidência de infecção ativa por nenhum deles. O exame do líquido cefalorraquidiano apresenta parâmetros normais, exceto pela ligeira elevação na concentração protéica. À tomografia computadorizada do cérebro observa-se uma área de densidade diminuída no hemisfério cerebral esquerdo sem captação de contraste ou efeito de massa (MILLER et al., 1982).

Casos esporádicos de leucoencefalopatia multifocal progressiva continuam a ser descritos em pacientes com aids que apresentam características semelhantes com relação ao quadro clínico e a contagem de células TCD₄⁺ (BEDRI et al 1983, KRUPP et al 1984, BLUM et al 1985).

A prevalência da LEMP, entretanto, diverge significativamente nos diferentes estudos realizados.

Holman et al. (1991) descrevem, a partir da análise dos atestados de óbito realizada pelo CDC (Center for Disease Control and Prevention, USA), entre 1981 e 1990, 971 casos de LEMP confirmados histopatologicamente

(0,72%) entre 135.644 indivíduos com aids. Esses resultados, entretanto, segundo os próprios autores, podem ter sido subestimados. (HOLMAN et al., 1991)

Pesquisa realizada por Berger et al. no período de 1982 a 1987 encontra resultados, embasados nos achados histopatológicos e diagnóstico por imagem, sugestivos de uma prevalência de cerca de 4% de LEMP em pacientes com aids (BERGER et al., 1987).

A disponibilidade da terapia anti-retroviral altamente eficaz (HAART) muda o espectro clínico da LEMP em indivíduos com aids, aumentando a expectativa de vida desses pacientes. No entanto, diferentemente de outras doenças oportunistas e tumores cerebrais, a incidência da doença não diminuiu. (ANTINORI et al., 2001).

Entre 714 pacientes com quadro neurológico, avaliados em um estudo italiano de neuroaids (2000 a 2002), são descritos 101 (14,1%) casos de LEMP, representando a terceira causa de doença neurológica, precedida pelos casos de encefalite pelo *Toxoplasma gondii* e de encefalopatia pelo HIV (ANTINORI et al., 2003).

Estudo retrospectivo realizado no Instituto de Infectologia Emílio Ribas, avalia 219 pacientes com doença neurológica, encontrando 12 casos (6%) de LEMP, o que demonstra sua ocorrência relativamente comum em nosso meio (VIDAL et al., 2008).

1.2) CLASSIFICAÇÃO

O agente etiológico responsável pela LEMP (VJC) é inicialmente classificado como membro do gênero *Polyomavirus*, pertencente à família *Papovaviridae*, segundo a primeira publicação do Comitê Internacional em Nomenclatura dos Vírus (CINV), juntamente com o segundo gênero desta família, composto pelos *Papillomavirus* (MELNICK et al., 1974).

Estudos realizados a partir de 1980 demonstram diferenças entre os poliomavirus e os papilomavirus com relação aos tamanhos do capsídeo (45 nm de diâmetro contra 55 nm) e do genoma (cerca de 5000 pares de bases contra 8000 pares de bases), bem como quanto à sua organização genômica (IMPERIALE & MAJOR, 2000).

Recentemente, o Comitê Internacional em Taxonomia dos Vírus reconhece que os *Polyomavirus* devem compor uma família independente de vírus, a família *Polyomaviridae*. Além do poliomavirus humano JC (*Polyomavirus hominis* tipo 2), dois outros poliomavirus possuem relevância em doenças humanas: o *Polyomavirus hominis* tipo 1 (vírus BK), e o vírus vacuolizante símio, o SV40.

1.3) ESTRUTURA GENÔMICA

A análise genômica dos poliomavirus demonstra uma extensa similaridade genética entre eles: o VJC possui uma similaridade de 75% ao vírus BK e 69% ao SV 40, o que sugere uma íntima relação evolucionária. (FRISQUE et al., 1984) .

O JC é um vírus não envelopado de aproximadamente 40 nm que apresenta simetria icosaédrica e um pequeno genoma (5130 bp) composto por um DNA dupla fita, ligado a histonas celulares H2A, H2B, H3 e H4, na forma de cromatina (FRISQUE et al., 1984).

O mapeamento físico inicial do VJC, realizado através do emprego de enzimas de restrição (DEININGER et al., 1980), onde o ponto “zero” da replicação é, arbitrariamente, definido como o sítio de restrição reconhecido pela enzima *EcoR1*, recebendo o nome de **ori**, a partir do qual o genoma é transcrito bi-direcionalmente (SOEDA et al., 1977). São determinadas, desta forma, regiões do genoma funcionalmente distintas, compostas por três domínios: a região precoce, por definição, a porção do genoma transcrita e expressa imediatamente após a entrada do vírus na célula, e que continua a ser expressa após o início da replicação do DNA viral (FIELDS, 2000), possui a mesma polaridade dos mRNAs precoces (DEININGER et al., 1980), cujos genes codificam as proteínas T grande e pequena (antígenos T, t); a região tardia, responsável pela codificação das proteínas do capsídeo viral VP1, VP2 e VP3, a agnoproteína e, por fim, uma região não codificadora, composta pela origem da replicação (ponto zero), associada a elementos *promoters/ enhancers* que, juntos, são referidos como “região regulatória viral” (SOEDA et al., 1977, FRISQUE et al., 1984, RAJ e KHALILI, 1995).

Os antígenos T grandes são complexos multifuncionais compostos por fosfoproteínas, responsáveis por atividades enzimáticas diversas (proteinoquinasas e ATPases) (HAND, 1981). Encontram-se ligados à região reguladora do genoma viral e dão início à replicação do DNA do vírus, além

de estimular a síntese de DNA do hospedeiro, através do aumento da expressão das enzimas celulares associadas a esta síntese (HAND, 1981, FRISQUE et al., 1984). Assim, o antígeno T age como um regulador central do ciclo lítico viral (SWEET et al 2002). Além de desempenhar esta função reguladora, um experimento realizado por Small et al. (1986), utilizando camundongos transgênicos, demonstrou que o antígeno T (precoce) do vírus JC é o responsável pela indução do processo de desmielinização, afetando a expressão dos genes de mielina pela interação com fatores de transcrição, MEF-1/ pur α , responsáveis pela regulação da síntese da proteína básica de mielina (MBP) (SMALL et al., 1986). O antígeno t pequeno parece não desempenhar qualquer papel na multiplicação do vírus ou no surgimento de tumores no homem, porém, quando expresso em células de alguns roedores e primatas não humanos, é responsável pela transformação celular maligna (LONDON et al., 1978; WALKER et al., 1973).

As proteínas do capsídeo, cujos genes codificadores encontram-se na região tardia, se acumulam no interior do núcleo da célula infectada, associando-se ao DNA viral replicado, formando os vírions que vão lizar a célula hospedeira (GORDON et al., 2000). A proteína VP1, a maior de todas, é responsável pela ligação do vírus à membrana celular, possui os epítomos responsáveis pela indução dos anticorpos, além de possibilitar a tipagem das cepas do vírus JC. (STONER, 1986; JOBES, 1998).

Estudos realizados em poliomavirus murinos demonstram que as duas outras proteínas que compõem o capsídeo (VP2 e VP3) interferem na liberação viral e que a interação da proteína VP1 com as proteínas VP2/3

pode desempenhar um papel essencial no ciclo de vida do vírus e estrutura do capsídeo (BAROUCH et al., 1994).

Figura 1. Diagrama esquemático do JCV.

A origem é flanqueada pelos genes precoces à esquerda e os genes tardios à direita. Os genes precoces consistem em T, e pelo menos três formas diferentes de emenda chamados T', designados de acordo com o número de aminoácidos como T'165, T'136 e T'135. Os genes tardios; AP: agnoproteína; proteínas do capsídeo VP1, VP2 e VP3 do vírus.

Referência: Weber T Neurol Clin 2008; 26:833–854

A região regulatória é uma sequência não codificadora, posicionada entre as regiões precoce e tardia do vírus, contendo a origem da replicação do DNA e os sinais para transcrição tardia e precoce (FRISQUE 1983; FRISQUE, 1984). Estudos utilizando mapeamento genômico do VJC por enzimas de restrição demonstram a existência de diferentes variantes genéticas, não detectadas sorologicamente, mas que apresentam diferentes propriedades biológicas ocasionadas por alterações dessa região hipervariável ou regulatória (GRINELL et al., 1983).

Com base na estrutura da sequência regulatória, também conhecida por região de controle transcricional (TCR), duas formas do vírus JC, com diferentes propriedades biológicas, são reconhecidas: a forma arquetípica e a forma rearranjada (YOGO et al 1990, CIAPPI et al 1999).

Figura 2. Diagrama esquemático demonstrando diferenças estruturais da região regulatória entre os VJC arquetípicos e amostras clonadas de líquido de pacientes com LEMP.

Referência : Tallantyre, E. C. *et al.* Arch Neurol 2009;66:1021-1024.

A forma arquetípica, encontrada basicamente na urina de indivíduos sadios e imunocomprometidos, apresenta-se altamente conservada, ou com pequenas variações de nucleotídeos, consistindo em uma seqüência de 98 pares de bases, com uma inserção de 23 pares de bases rica em GC e uma segunda inserção de 66 pares de bases (YOGO et al 1990, MAJOR et al 1992, AGOSTINI et al 1996). Segundo Yogo et al., parece ser essa a forma circulante do vírus na população (YOGO et al., 1990).

Durante a replicação viral, aparentemente, rearranjos de seqüências ocorrem dentro da região regulatória do vírus arquetípico, resultando numa nova forma, potencialmente mais ativa do vírus (ZOLTICH et al 1995, DANIEL et al., 1996).

A comparação de seqüências da região regulatória de um número de isolados do vírus JC, revelou a hipervariabilidade em sua organização estrutural. Estas variações incluem deleções e duplicações, que ocorrem em seqüências denominadas *promoters/ enhancers*, que funcionam como ativadores da transcrição de genes virais (FRISQUE, 1983).

A região regulatória da cepa Mad 1 do vírus JC, a primeira forma rearranjada do vírus isolada do tecido cerebral de um paciente com LEMP (PADGETT et al., 1971), é caracterizada pela presença de seqüências repetitivas com 98 pares de bases, os *tandem repeats*, cada uma contendo uma seqüência rica em A e T (timina e adenina), os “TATA boxes” (KENNEY et al 1984, ZOLTICH et al 1995). Postula-se que essas deleções ou duplicações que ocorrem na região regulatória do vírus arquetípico originem

um vírus com capacidade de replicação em células da glia (ZOLTICH et al 1995).

Essa hipótese é demonstrada por experimentos “in vitro”, nos quais se observa o acentuado tropismo do vírus JC “tipo LEMP” por células da glia (KENNEY et al 1984, KALILI et al., 1988; VACANTE et al., 1988), embora possa ser encontrado em linfócitos circulantes (TORNATORE et al 1992, CIAPPI et al 1999). Em um paciente com LEMP, é possível encontrar estas duas formas, sendo o arquétipo demonstrado na urina e o “tipo LEMP” ou rearranjado, no sistema nervoso central (MARTIN et al., 1985; SABATH et al., 2002). À região regulatória é atribuída, também, a capacidade de mudança entre os estados de infecção latente para lítica (JENSEN, 2001).

Em adição às proteínas estruturais existe outra denominada agnoproteína, cuja função permanece sem elucidação completa. Um estudo realizado por Safak et al. (2001) demonstra, através de ensaios de cromatografia e imunoprecipitação, além de estudos funcionais, que a agnoproteína e o antígeno T interagem fisicamente e que a replicação do DNA pode ser regulada pela agnoproteína (SAFAK et al., 2001).

1.4) EPIDEMIOLOGIA

1.4.1) FORMAS DE TRANSMISSÃO DO VÍRUS

Estudos soroepidemiológicos indicam que aproximadamente 70% da população humana é infectada com o poliomavírus humano JC, sem associação com qualquer quadro clínico. (GARDNER et al 1973, BROWN et

al 1975, FLAEGSTAD et al 1988). Inquéritos soroepidemiológicos realizados na população geral, indicam que a soroconversão ocorre precocemente, ao redor de cinco a sete anos de idade (TAGUCHI et al 1982). A técnica de hemaglutinação utilizada para detecção de anticorpos demonstra menores índices de positividade em crianças do que em adultos (CHANG et al 2002).

Esses estudos são confirmados pelo encontro freqüente do vírus JC em urina e outros tecidos, em indivíduos da população geral. A prevalência da infecção pelo poliomavírus humano JC foi recentemente investigada na população de Taiwan por Chang et al. (2002), através da detecção do DNA viral na urina, empregando-se a reação em cadeia por polimerase. Os resultados demonstram que a prevalência da virúria do JC é menor em indivíduos jovens e maior em indivíduos idosos, chegando a 79,9% em adultos maiores de setenta anos (CHANG et al 2002).

Em 1975, Taguchi et al. relatam que a infecção pelo vírus BK é freqüente em gestantes e que o vírus poderia ser transmitido de forma congênita, já que evidenciam presença de IgM no soro do cordão umbilical em 7,5 a 9,1% dos recém-nascidos estudados (TAGUCHI et al 1975). O mesmo, aparentemente, não ocorre com o vírus JC.

Estudo realizado por Daniel et al., em 1981, investigando a possível transmissão congênita do vírus JC, não encontra evidências nesse sentido.

Coletando amostras de sangue de gestantes soropositivas e soronegativas para o VJC, os pesquisadores observam que, embora algumas gestantes apresentem reativação do vírus (demonstrado através do aumento de quatro vezes o título de anticorpos e a presença de anticorpos

neutralizantes), nenhuma criança apresentou anticorpos da classe IgM no soro do cordão (DANIEL et al 1981).

Pietropaolo et al. (1998) pesquisaram a presença de duas regiões distintas do genoma dos vírus BK e JC (região regulatória e proteína VP1 do capsídeo) em materiais obtidos de necropsias realizadas em abortos (placenta, cérebro e tecido renal) e em placentas de mães com evolução gestacional normal, através da técnica de PCR. O DNA do VBK é detectado em 80% das amostras de placenta e tecido cerebral e em 60% das amostras de tecido renal, enquanto que nenhuma das amostras testadas para o DNA do VJC mostra-se positiva. Estes resultados enfraqueceram consideravelmente a hipótese da transmissão vertical do vírus JC (PIETROPAOLO et al 1998).

Ainda com o intuito de determinar a via de transmissão do vírus JC, Kitamura et al. (1994) pesquisam a presença do DNA do vírus JC e seus respectivos padrões de restrição em amostras de urina dos membros de oito famílias japonesas. Num total de vinte e uma crianças excretoras, quatorze apresentam o mesmo subtipo excretado por seus pais ou mães, enquanto que sete delas excretam subtipos diferentes. Esses achados sugerem que o VJC é transmitido horizontalmente, dentro e fora da família (KITAMURA et al. 1994). Utilizando enzimas de restrição, os autores classificaram os VJC urinários em dois subtipos (Cy e My), prevalentes na população japonesa (KITAMURA et al., 1994).

Kunitake et al. (1995), em pesquisa idêntica, utilizam como técnica o seqüenciamento do genoma viral. Selecionando famílias cujos pais e filhos

excretavam o vírus JC por via urinária, confirmam que as cepas excretadas pelos filhos eram, em 50% dos casos, idênticas às excretadas por seus pais ou mães. Já que a transmissão vertical não é confirmada em outros estudos, estes dados sugerem que a infecção ocorre longitudinalmente, através de longa co-habitação e exposição freqüente ao vírus. Além disso, o fato de que metade das cepas excretadas mostrou-se diferente da mãe corrobora a idéia de que a transmissão vertical do vírus não ocorre. Os autores ressaltam, além disso, que para algumas crianças, a infecção ocorre através do contato com o vírus JC excretado por outras pessoas tais como avós e babás (KUNITAKE et al., 1995).

A detecção do vírus JC em células estromais de amídalas e seus linfócitos associados, torna plausível que a primoinfecção pelo VJC ocorre por via respiratória (MÔNACO et al., 1998).

Estudo realizado por Ricciardiello et al. (2000), demonstra a presença de seqüências do VJC em amostras de tecido do trato gastrointestinal superior e inferior, em 75,8% dos pacientes estudados, indicando a alta prevalência do vírus no trato gastrointestinal de indivíduos imunocompetentes (RICCIARDIELLO et al 2000).

Três recentes estudos realizados por Bofill-Mas et al. em 2000 e 2001 detectam a presença de altas concentrações dos poliomavirus humanos JC e BK em esgotos urbanos de áreas geográficas distintas (Europa, Estados Unidos e África) (BOFILL-MAS et al 2000; BOFILL-MAS et al 2001a; BOFILL-MAS et al 2001b). Testes realizados a partir de amostras de esgoto infectadas experimentalmente com VJC urinário demonstram a

estabilidade das partículas virais por períodos de até noventa e dois dias, mesmo em presença de DNAses ou quando expostos a baixos níveis de pH (BOFILL-MAS et al 2001b). Segundo os autores, a detecção, especialmente do vírus JC, por sua especificidade como vírus humano, indica, além da poluição ambiental de origem antropogênica, a potencial transmissão através do trato gastrointestinal, aparentemente facilitada pela resistência do vírus a fatores ambientais (BOFILL-MAS et al 2001a).

1.4.2) EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

Diferentes genótipos do vírus JC são descritos em diferentes continentes. Esses genótipos são definidos com base no sequenciamento nucleotídico do genoma viral, tomando-se como referência a sequência de uma região de 610 pb entre o final 3' do gene VP1 e o gene codificador do antígeno T, identificada como região intergênica (AULT et al., 1992), ou uma região de 215 pb, próxima do final 5' do gene VP1 (AGOSTINI et al., 1997), ou, finalmente a sequência completa do genoma viral (JOBES et al., 1998).

O sequenciamento genômico do VJC indica a existência de oito genótipos e numerosos subtipos (JOBES et al., 1998). Os genótipos principais estão associados com populações nas grandes massas continentais e essas associações geográficas têm sido muito úteis na identificação das rotas de migração humanas (JOBES et al., 2001).

A presença de tipos distintos do poliomavírus humano JC nas diferentes populações humanas, com sequências que divergem em cerca de

1 a 3%, sugere sua origem numa população ancestral, provavelmente na África, diferenciando-se com o decorrer do tempo (JOBES et al., 2001).

O tipo 1, com três subtipos, é encontrado primariamente em indivíduos europeus, além de ampla distribuição nos Estados Unidos (FRISQUE et al., 1984; AGOSTINI et al., 1998; AGOSTINI et al., 2001). Os principais genótipos encontrados na Ásia são os tipos 2 e 7. O tipo 2 predomina à nordeste da Ásia, enquanto que o tipo 7 é o genótipo mais frequentemente encontrado ao sul da China e sudeste asiático (JOBES et al., 1998; GUO et al., 1998).

O vírus JC tipo 3 difere dos dois outros genótipos (1 e 2) em 2,2% e 1,3% respectivamente e pode ser encontrado na África oriental (AGOSTINI et al., 1997).

O tipo 4, intimamente relacionado ao tipo 1 (diferença de apenas 1%), é encontrado na região do Mediterrâneo (AGOSTINI et al., 2001). O tipo 5, do qual apenas um isolado é conhecido, aparece como uma combinação de seqüências do tipo 6 com o tipo 2B (HATWELL & SHARP, 2000). O tipo 6 é representativo das populações do oeste africano e África central (GUO et al., 1996). Finalmente, um novo genótipo do vírus JC (tipo 8), é identificado em populações da Papua Nova Guiné e Micronésia (JOBES et al., 2001).

Os habitantes do “Novo Mundo” albergam genótipos característicos de sua origem em outros continentes. Os afro-americanos, por exemplo, excretam o tipo 3 e, menos comumente o tipo 6, em adição a tipos

provavelmente introduzidos através do matrimônio com indivíduos europeus (CHIMA et al., 2000).

Figura 3. Distribuição geográfica dos oito genótipos e subtipos do VJC, tendo como base a variabilidade do gene VP1.

1.5) PATOGENIA

1.5.1) LATÊNCIA E REATIVAÇÃO

Aparentemente, a partir dos resultados dos vários estudos citados, a primoinfecção pelo vírus JC ocorre ainda na infância e essa infecção primária parece ser seguida por um período de latência (COLEMAN et al., 1980) com a reativação ocorrendo sob condições especiais de imunodepressão. Em pacientes imunocomprometidos, demonstra-se a presença do vírus em vários órgãos incluindo rins, baço e pulmões (MARKOWITZ et al., 1993; HOUFF et al., 1988; DÖRRIES et al., 1983), além da excreção urinária, demonstrada em 7% dos pacientes submetidos a transplante de medula óssea e 18% dos receptores de transplante renal (CHAISSON & GRIFFIN, 1990).

O primeiro estudo em indivíduos imunocompetentes é realizado por Coleman et al., em 1980, através da análise de amostras de urina de uma população de 1235 gestantes, dentre as quais 40 (3,2%), demonstram alterações citológicas sugestivas de poliomavirus (COLEMAN et al., 1980).

Amostras de tecido retiradas de rins e cérebro de trinta indivíduos com diversas causas de morte são analisadas por Chesters et al. (1983). A presença de DNA do vírus JC é detectada em 10% das amostras de tecido renal, sem demonstração dos poliomavirus em tecido cerebral (CHESTERS et al., 1983).

Dois outros estudos realizados por Kahan et al. (1980) e Cobb et al. (1987) em pacientes diabéticos e em portadores de doenças genitourinárias,

demonstram excreção urinária dos poliomavirus (JC ou BK) em 2% e 20%, respectivamente, sugerindo que a excreção dos poliomavirus humanos não está, necessariamente, associada a imunodeficiências (KAHAN et al., 1980;.COBB et al., 1987).

Em 1990, Kitamura et al. realizaram novo estudo reavaliando a excreção urinária do VJC em duas populações diferentes. A primeira composta por cento e vinte pacientes atendidos em clínicas urológicas, com idades variando entre zero e oitenta anos e apresentando diversas patologias associadas ao sistema urinário. A população II, sem quaisquer sintomas urológicos, ou imunodepressão, composta por pacientes com idades entre 60 e 90 anos. As porcentagens de excreção foram bastante semelhantes entre os indivíduos dos dois grupos, nas faixas etárias entre sessenta e noventa anos (52,2% e 45,5%, respectivamente). Este estudo demonstrou, também, a detecção do DNA do VJC em amostras seriadas desses pacientes, colhidas a intervalos de um a cinco meses, sugerindo que ocorram reativações do vírus por longos períodos, provavelmente por toda a vida (KITAMURA et al., 1990).

Além da detecção do vírus em tecido renal, outros estudos demonstraram a presença do VJC em vários órgãos e tecidos, sendo as células linfóides um possível sítio de latência. O vírus JC foi primeiramente demonstrado em linfócitos pela detecção do DNA e proteínas do capsídio em células mononucleares de medula óssea de dois pacientes com LEMP (HOUFF et al., 1988).

Tornatore et al. (1992), utilizando a técnica de PCR, analisam linfócitos periféricos de dezenove pacientes com LEMP (comprovada através de biópsia cerebral), vinte e seis pacientes soropositivos para HIV, sem sinais de leucoencefalopatia multifocal progressiva e de um grupo de pacientes portadores de doença de Parkinson. O DNA do vírus JC é encontrado nos linfócitos de 89% dos pacientes com LEMP e de 38% dos pacientes HIV positivos sem LEMP. Não foi detectado material genômico do VJC em nenhum dos pacientes com doença de Parkinson, sugerindo que indivíduos imunocompetentes não apresentam o vírus em seus linfócitos periféricos (TORNATORE et al., 1992).

Dubois et al., em 1997, avaliam a latência e a reativação do vírus JC em sangue periférico em três diferentes grupos de indivíduos: setenta e dois pacientes HIV positivos, sete pacientes HIV positivos com LEMP e 50 doadores de sangue. Nesse estudo, o DNA do VJC é encontrado em 40,3% dos pacientes HIV positivos sem sinais de LEMP, em cinco dos sete pacientes com LEMP e em 8% dos doadores de sangue (DUBOIS et al., 1997).

Dolei et al., em estudo recente, demonstram a presença do DNA do vírus JC em amostras de células mononucleares de sangue periférico em 0,9% de doadores de sangue e operadores dos centros de transfusão (DOLEI et al., 2000).

Além da latência estabelecida nestes diversos sítios, um estudo realizado por MORI et al., em amostras de tecido cerebral de 10 pacientes idosos, imunocompetentes, que foram a óbito por diversas causas

demonstra, através de técnicas de hibridação *in situ* e imunohistoquímica, a presença do vírus JC em quatro desses indivíduos (MORI et al., 1990).

Através da análise de material de necrópsia de 67 indivíduos que foram a óbito devido a doenças neurológicas (esclerose múltipla e doença de Huntington) ou sistêmicas, incluindo diversos tipos de tumores, Elsner e Dörries (1992) encontram seqüências específicas de VJC em amostras de 19 pacientes, distribuídas por diferentes regiões do cérebro. Segundo os autores, com base nos achados desse estudo, a infecção pelo VJC está associada com a penetração subclínica do vírus no sistema nervoso central, podendo ocorrer reativação viral mediante imunodepressão (ELSNER & DÖRRIES, 1992).

Utilizando *primers* e sondas específicos para diferentes regiões do vírus, White III et al. (1992) analisaram amostras de rins e cérebro de dois diferentes grupos de pacientes: os que possuíam diagnóstico de LEMP e aqueles não LEMP. No grupo de pacientes com LEMP é possível detectar a presença de DNA do VJC em todas as amostras de tecido renal e cerebral, enquanto que, no grupo dos não LEMP, aproximadamente 50% dos pacientes apresentam o vírus em tecido renal e 68% em fragmento cerebral (WHITE III et al., 1992).

Quinlivan et al. (1992) também detectam o VJC através de PCR em amostras de tecido cerebral necropsiadas, em quatro de treze pacientes HIV positivos e em um de doze HIV negativos (QUINLIVAN et al., 1992).

Estudo semelhante realizado por Vago et al. (1996) demonstra a presença de material genômico do vírus JC através da técnica de PCR, em

100% das amostras de tecido cerebral de pacientes HIV positivos com LEMP, em 44% dos pacientes HIV positivos sem LEMP e em 33% dos pacientes sem evidências clínicas de imunocomprometimento que foram a óbito por doença cardíaca isquêmica e mal de Alzheimer (VAGO et al., 1996).

1.5.2) PATOGÊNESE DA LEUCOENCEFALOPATIA MULTIFOCAL PROGRESSIVA

Para que ocorra o desenvolvimento da LEMP, uma série de eventos precisa ser desencadeada: a infecção pelo vírus, a latência do vírus JC em tecidos extra-neurais, reativação de cepas neurotrópicas a partir dos sítios de latência, entrada no tecido cerebral, ineficiência do sistema imune na eliminação da infecção e, finalmente, o estabelecimento de infecção produtiva em células da glia (revisado por BERGER JR, 2007).

Com relação ao vírus, aparentemente, devido à sua persistência por longos períodos em um indivíduo, variações, especialmente da região regulatória (hipervariável) podem ocorrer *in vivo*, com amplificação e seleção de variantes (GRINELL et al., 1983; BERGER et al., 2001). Estas variações ou rearranjos da região regulatória ocorreriam devido à imunossupressão, levando a viremia do VJC e consequente disseminação hematogênica para o sistema nervoso central (KORALNICK et al., 1999).

Segundo Daniel et al. (2001), a região regulatória arquetípica do vírus JC é menos suscetível à ativação da replicação do que a do VJC tipo LEMP (DANIEL et al., 2001).

Estudo comparando diversos grupos de pacientes demonstra a presença de rearranjos na região regulatória em todas as amostras de líquido cefalorraquidiano e leucócitos de sangue periférico dos pacientes com LEMP (CIAPPI et al., 1999).

No caso do vírus tipo LEMP, esses rearranjos consistem na presença dos “*tandem repeats*” e outras estruturas ativadoras, responsáveis pela mudança da infecção da fase latente para a lítica e o tropismo do vírus para células da glia (FRISQUE et al., 1983; KENNEY et al., 1984; KALILI et al., 1988; VACANTE et al., 1988).

A exemplo de outros patógenos virais humanos, a suscetibilidade de determinados tecidos para a infecção é definida, ao menos parcialmente, pela adsorção do vírus a receptores celulares específicos (SABATH & MAJOR, 2002). A interação vírus-receptor desempenha um importante papel na determinação do tropismo viral e a patologia “tecido-específica” associada à infecção (LIU et al., 1998b).

A entrada do VJC na célula ocorre através da ligação do vírus a receptores celulares específicos: as glicoproteínas ligadas ao grupo *N*, contendo ácido siálico α_{2-6} terminal, que são compartilhadas com os outros poliomavirus, exceto o SV 40 (LIU et al., 1998a; LIU et al., 1998b; WEI et al., 2000). Estudo recente demonstrou que o vírus JC utiliza, também, os receptores de serotonina, 5HT2a para sua ligação à superfície celular (ELPHIC et al., 2004).

As partículas virais ligadas a esses receptores específicos serão interiorizadas em vesículas, através das vias de endocitose clatrina e eps 15 dependentes (PHO et al., 2000).

Embora o VJC possa ligar-se a diferentes linhagens celulares e infectá-las, devido à ampla distribuição dos receptores específicos (SUZUKI et al., 2001) nem sempre ocorre replicação viral, o que sugere a necessidade de outros fatores para que ela aconteça. Khalili et al. (1988) e Amemiya et al. (1989) demonstraram a interação específica de fatores nucleares (NF-1 ou NF-1 *like*) com três sítios de ligação da região regulatória do vírus JC. Esses fatores são expressos em altos níveis nas células da glia (KHALILI et al., 1988; AMEMIYA et al., 1989).

A incidência significativamente maior de LEMP em pacientes com aids em relação a pacientes com outras doenças imunodepressoras sugere que o vírus HIV-1 pode participar, direta ou indiretamente, da patogênese dessa doença.

Existem inúmeras explicações possíveis para esse fato. Primeiramente, o grau e a duração da imunodepressão celular podem ser maiores em pacientes com aids do que em outras condições imunodepressoras (BERGER JR, 2003). Adicionalmente, o HIV pode destruir a barreira hematoencefálica, facilitando a entrada dos linfócitos B infectados pelo VJC, em tecido cerebral (BERGER et al., 2001). Essas alterações, caracterizadas pelo aumento da permeabilidade vascular, ocorrem devido à expressão aumentada de citocinas e moléculas de adesão no espaço perivascular, devido ao HIV (BERGER et al., 2001).

Finalmente, existem mecanismos moleculares específicos através dos quais o HIV pode promover a expressão gênica do VJC e participar na patogênese da LEMP.

A interação entre os dois vírus é mediada por uma proteína reguladora codificada pelo HIV, a Tat. (TADA et al., 1990)

A Tat possui a capacidade de ligar e potencializar a transcrição do *promoter* do VJC em células da glia, mediando a ativação desse vírus através de um elemento rico em sequências GGA/GGC, denominado upTAR (CHOWDHURY et al., 1993)

A ligação da Tat à upTAR é mediada pela associação da Tat com a proteína celular Pur α , aumentando consideravelmente os níveis de transcrição do HIV e do gene tardio do vírus JC, em células da glia (TADA et al., 1990; CHOWDHURY et al., 1990; REMENICK et al., 1991).

Em condições normais, a expressão aumentada da Pur α é capaz de inibir a replicação iniciada na origem do vírus JC pelo antígeno T (DANIEL et al., 2001).

Segundo o autor, em células da glia transfectadas experimentalmente com o HIV-1, a proteína Tat reverte essa inibição e potencializa a replicação do DNA do VJC. Ainda segundo o autor, a região regulatória arquetípica do vírus JC foi menos suscetível à ativação da replicação do que o VJC tipo LEMP (DANIEL et al., 2001).

Vários estudos têm descrito que a infecção de astrócitos e oligodendrócitos pelo HIV pode ocorrer *in vivo*, sugerindo o potencial de co-existência desses dois vírus em células neurais (DEL VALLE et al., 2000).

Holman et al. (1988), investigando uma possível suscetibilidade genética ao vírus, demonstraram maior prevalência de LEMP entre os indivíduos brancos (2,1%) quando comparados a indivíduos afro-americanos (1%) (HOLMAN et al., 1998).

Finalmente, evidências epidemiológicas recentes sugerem a existência de correlações positivas e negativas entre os genótipos do vírus JC e a patogênese da LEMP. O significado biológico dos genótipos do VJC em relação à LEMP não está completamente elucidado, embora alguns estudos tenham mostrado que o VJC tipo 2 é mais frequentemente encontrado no tecido cerebral de pacientes com LEMP do que em amostras de urina excretada por uma população controle (pacientes com e sem aids) (AGOSTINI et al., 1997).

Agostini et al. (1997) investigaram em 41 amostras clínicas positivas para o vírus JC (35 amostras de tecido cerebral e 6 amostras de líquido), os genótipos do vírus. A população estudada era composta por americanos de origem européia, afro-americanos e hispânicos. Os genótipos mais frequentemente encontrados em amostras de tecido cerebral e líquido foram: tipo 1 em 19 amostras (46%), tipo 2 em 20 amostras (49%) e tipo 4 em 2 amostras (4,9%). Por outro lado, a genotipagem realizada em amostras de urina da população controle (103 indivíduos), de composição étnica semelhante, demonstrou a ocorrência do genótipo 1 em aproximadamente 58% das amostras, tipo 2 em 23%, tipo 3 em 2% e o tipo 4 em 12% das amostras. Os autores demonstram nesse estudo que, nos Estados Unidos, uma proporção significativamente maior de cepas de VJC tipo 2 é

encontrada em tecido cerebral de pessoas com LEMP, embora as bases biológicas para tal achado não tenham sido identificadas (AGOSTINI et al., 1997).

Ferrante et al. (2001) investigaram o papel de diferentes genótipos do vírus JC na etiologia da LEMP. Para tanto, amostras de líquido, sangue e urina de 52 pacientes apresentando diversos quadros neurológicos (incluindo 21 casos de LEMP) e amostras de sangue e urina de indivíduos saudáveis foram avaliadas através da PCR para duas regiões distintas do vírus (T e VP1). O DNA do vírus JC foi detectado em todas as amostras de líquido de pacientes com LEMP, mas não nos pacientes que apresentavam outros quadros neurológicos, enquanto que a detecção do vírus em amostras de sangue e urina não apresentou diferença entre os grupos. A presença do VJC tipo 2 foi observada apenas em pacientes com LEMP, em particular em 52,4% das amostras. Além disso, nas amostras de líquido de 19,0% dos casos de LEMP foi observada a ocorrência de dupla infecção com os genótipos 1 e 2. Os resultados obtidos nesse estudo demonstram um inesperado envolvimento do VJC tipo 2, uma cepa incomum na Itália, além de uma alta frequência de dupla infecção nos casos de LEMP (FERRANTE et al., 2001).

Este mesmo grupo de pesquisadores investigou a distribuição genotípica do VJC em pacientes com LEMP, bem como o tempo de sobrevivência, na vigência da terapia antiretroviral altamente eficaz (HAART), comparando seus resultados com os obtidos na era pré-HAART. Em 21 amostras de pacientes com LEMP estudadas na era pré-HAART, os

genótipos 1 e 2 foram os mais frequentemente detectados, representando, respectivamente, 52% e 44% das cepas amplificadas, enquanto que nenhum dos outros genótipos foi encontrado. Entre os pacientes com LEMP tratados com HAART, 59% apresentavam o genótipo 1, enquanto que 23% e 18% foram, respectivamente, tipos 2 e 4. A análise da distribuição genotípica com relação à sobrevida não mostrou diferença significativa entre os dois grupos. O padrão de distribuição genotípica nos pacientes tratados com HAART mostrou-se semelhante ao encontrado na população saudável, entre os quais um VJC tipo 3 também foi amplificado. Por outro lado, a avaliação da região regulatória dos VJC presentes em pacientes tratados com HAART mostrou resultados muito interessantes, com amplificação de sequências arquetípicas em dois pacientes com longa sobrevida. Os resultados obtidos indicam que, após a introdução da terapia HAART, as características genômicas das cepas do VJC envolvidas na LEMP sofreram leves mudanças e, em geral, as cepas detectadas nesses pacientes assemelham-se às cepas circulantes na população geral (FERRANTE et al., 2003).

Dubois et al. (2001) investigaram quais genótipos ocorrem na França, uma vez que o tipo 1 é o mais prevalente em outras regiões da Europa. Além disso, a hipótese de neuropatogenicidade tipo-específica por determinados genótipos do VJC foi investigada em amostras de tecido cerebral de 56 pacientes com LEMP, comparando-os com os genótipos encontrados na urina de 65 pacientes sem LEMP. Dentre as amostras de urina, a maior prevalência foi do tipo 1, em 52,3% (34/65) dos pacientes. O segundo tipo mais prevalente foi o 4, encontrado em 30,8% (20/65) dos

pacientes. Tipos 2 e 3 foram encontrados em 12,3% (8/65) e 4,6% (3/65) dos pacientes respectivamente. Em amostras de tecido cerebral esses quatro genótipos também foram identificados: o tipo 1 foi o mais prevalente, identificado em 37 (66%) das 56 cepas. Os tipos 2, 3 e 4 foram identificados em 11 (19,7%), 3 (5,4%) e 5 (8,9%) dos 56 pacientes, respectivamente. Nesse estudo, os 4 genótipos foram encontrados no sistema nervoso central dos pacientes com LEMP, mas não na mesma proporção dos compartimentos periféricos. O genótipo 1 constituiu 2/3 das cepas identificadas, enquanto que o tipo 2 foi identificado em 20% das amostras, diferentemente do estudo americano onde esse genótipo foi identificado em 48% das cepas. Esse estudo francês indicou uma possível ligação entre genótipo e neuropatogenicidade, porém, não correlaciona exatamente o genótipo 2 com a ocorrência de LEMP (DUBOIS et al., 2001).

Em 2003, Lednicky et al. caracterizaram os genótipos do VJC excretados em sangue e urina de dois grupos de pacientes: setenta HIV+, em vigência de HAART e sessenta e oito indivíduos HIV negativos, pertencentes a diferentes etnias (afro-americanos, asiáticos, caucasianos e hispânicos).

O encontro do vírus JC em indivíduos HIV positivos ocorreu predominantemente entre os afro-americanos e hispânicos, enquanto que a maioria dos vírus isolados entre os voluntários negativos originou-se em indivíduos brancos. Os genótipos 1 (36%) e 4 (36%) foram os mais comuns entre os pacientes HIV positivos, enquanto que o tipo 2 (77%) foi o mais comumente encontrado nos voluntários HIV negativos. No total, a

distribuição genotípica por grupos étnicos foi a seguinte: em indivíduos afro-americanos cinco amostras foram caracterizadas como tipo 1, duas como tipo dois e seis como tipo quatro. Na população asiática dois indivíduos excretavam o VJC tipo dois. O grupo de brancos apresentou o tipo 1 em quatro indivíduos, tipo 2 em sete e o tipo 4 em três. Os hispânicos apresentaram o tipo 1 em um indivíduo, tipo dois em quatro e o tipo 3 em um isolado.

A excreção urinária do VJC nos indivíduos dos dois grupos (HIV positivos e negativos) não demonstrou diferença estatística.

Não houve detecção do vírus JC em linfócitos de pacientes recebendo HAART, sugerindo que uma reconstituição imune parcial poderia prevenir a infecção e replicação do VJC em células mononucleares. Esse é um importante achado, uma vez que a proposta mais aceita é que a infecção do sistema nervoso central e subsequente desenvolvimento da LEMP resultam do cruzamento da barreira hematoencefálica por linfócitos infectados, permitindo ao vírus a infecção lítica dos oligodendrócitos. (LEDNICKY *et al.*, 2003)

Marzocchetti *et al.* (2007) analisaram as características virológicas e imunológicas dos pacientes provenientes de uma clínica em Roma e sua associação com o prognóstico. Foram avaliados quarenta e cinco pacientes com diagnóstico virológico da doença. A medida da carga viral líquórica demonstrou mediana de $4.98 \log_{10}$ cópias/ml. A genotipagem foi possível somente em 13 das 45 amostras, fato atribuído ao baixo número de cópias do vírus nas negativas. Naquelas em que a genotipagem foi positiva, 42%

(5/13) foram 1b, 42% (5/13) 1a e 25% (3/13) genótipo 4. Os autores demonstraram, através dos resultados obtidos, forte associação entre carga viral líquórica do VJC e a sobrevida do paciente (modelo multivariado de Cox) (MARZOCCHETTI *et al.*, 2007).

Recentemente, alguns autores têm observado que os vírus JC isolados de pacientes com LEMP frequentemente apresentam polimorfismos na região tardia do genoma, ocasionando alterações em sequências de aminoácidos envolvidos na ligação da proteína do capsídeo viral a receptores celulares específicos (ácido siálico), desempenhando importante papel no tropismo viral (ZHENG *et al.*, 2005 a,b; DELBUE *et al.*, 2009).

1.5.3) MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A leucoencefalopatia multifocal progressiva produz lesões múltiplas na substância branca cerebral, ocasionando sinais e sintomas correlacionados ao sítio de envolvimento patológico (BROOKS & WALKER, 1984).

A evolução da LEMP ocorre de forma subaguda, progressiva, evoluindo, geralmente para óbito entre dez dias e dezoito meses após o diagnóstico, com média de seis meses.

Um estudo realizado por Brooks e Walker (1984), no qual foram revisados 109 casos patológica ou virologicamente testados, categorizou os sinais neurológicos e sintomas no início e durante a evolução da doença. Déficit visual foi o sinal mais comum, estando presente em 35 a 45% dos casos (BROOKS & WALKER, 1984). A hemianopsia (perda de visão de

metade do campo visual em cada olho) foi o problema visual mais encontrado, enquanto que 6 a 8% dos pacientes apresentavam-se corticalmente cegos no momento do diagnóstico, indicando patologia occipital (BROOKS & WALKER, 1984). Fraqueza motora apresentou-se como sinal inicial em 25 a 33% dos casos, embora, no momento do diagnóstico, quase todos os pacientes apresentassem hemiparesia ou hemiplegia (BROOKS & WALKER, 1984).

Alterações mentais, as quais incluem mudança de personalidade, perda de memória, instabilidade emocional e franca demência mostraram-se presentes em aproximadamente um terço dos casos (BROOKS & WALKER, 1984).

Estas manifestações clínicas foram encontradas, também, por Berger et al. (1987) numa série de 28 pacientes, além de outros sintomas que indicam envolvimento da substância branca do cerebelo e tronco cerebral tais como ataxia, dismetria e disartria (BERGER et al., 1987).

Outros sinais e sintomas associados à LEMP incluem dores de cabeça, vertigens, déficits sensoriais, parkinsonismo e afasias (BERGER et al., 1987).

Novas síndromes associadas ao vírus JC têm sido descritas, recentemente: a síndrome inflamatória pós-reconstituição imune (IRIS), a infecção ou atrofia cerebelar e, ainda, os quadros de meningite viral.

Os quadros de IRIS têm sido demonstrados com piora clínica, imediatamente após o início da HAART. Isso ocorre em decorrência da recuperação do sistema imune, demonstrada pelo aumento do número de

células TCD4+ e diminuição da carga viral plasmática do HIV (THURNHER et al., 2001). Esse paradoxal desenvolvimento da LEMP é comumente associado a uma reação inflamatória nas lesões cerebrais, observada ao exame radiológico pela captação de contraste (CINQUE et al., 2003). Nesse contexto, a apresentação clínica é mais compatível com uma encefalite e não com uma leucoencefalopatia. Apesar da piora transitória, a evolução é usualmente favorável e a resolução da fase inflamatória resulta em melhora clínica, com imagens subsequentes demonstrando somente atrofia residual clássica (DU PASQUIER et al., 2003).

Com relação à síndrome cerebelar, embora seja freqüentemente encontrada em casos de LEMP quando as lesões ocorrem na substância branca do cerebelo, observações recentes mostraram que ataxia e atrofia cerebelar podem ocorrer em pacientes HIV positivos, sem LEMP (TAGLIATI et al., 1998). Essa nova síndrome, distinta da LEMP, foi denominada “neuronopatia grânulo-celular” (KORALNICK et al., 2005). Recentes estudos sugerem que os neurônios são infectados por uma variante do vírus JC, que possui uma única deleção no gene VP1 (DANG & KORALNICK, 2006).

Finalmente, a pesquisa do VJC não é, rotineiramente, realizada nas amostras de líquido de indivíduos com quadro clínico de meningite viral. Há, entretanto, relatos bem documentados de casos em pacientes imunocompetentes e imunocomprometidos (BLAKE et al., 1992). É possível, portanto, que os casos de meningite causados pelo vírus JC sejam subdiagnosticados.

1.6) MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DE NEUROIMAGEM

A neuroimagem é o recurso diagnóstico mais utilizado na investigação de um paciente com LEMP.

Na tomografia computadorizada de crânio, as lesões desmielinizantes aparecem como hipodensidades sub-corticais com uma propensão para a área parieto-occipital, respeitando a junção das substâncias cinza e branca, sem seguir a distribuição vascular (CHAISSON & GRIFFIN, 1990; MAJOR et al., 1992). Mostram-se assimétricas, sem efeito de massa e sem captação de contraste (CHAISSON & GRIFFIN, 1990, MAJOR et al., 1992).

No início do quadro da LEMP, as imagens cerebrais obtidas através da tomografia computadorizada revelam alterações sutis, desproporcionais aos sinais e sintomas clínicos, caracterizando a dissociação clinico-radiológica (KRUPP et al., 1985). A alteração clinico-radiológica é uma característica não específica da apresentação da LEMP. Talvez isso ocorra porque pequenos focos de desmielinização produzem sintomas clínicos precoces, aparecendo na tomografia computadorizada de crânio apenas quando se tornam confluentes e mais intensos já com comprometimento axonal (KRUPP et al., 1985).

Na maioria dos casos ocorrem múltiplas lesões no sistema nervoso central, sendo que 10% dos casos apresentam uma única lesão cerebelar (KRUPP et al., 1985).

A presença de áreas de menor densidade na substância branca, sem efeito de massa, sem realce em fase contrastada, auxilia a distinção de lesões tumorais, granulomas e outras infecções (KRUPP et al., 1985).

A Ressonância Nuclear Magnética (RNM) é mais sensível que a Tomografia Computadorizada de Crânio (TCC) com relação à identificação da extensão do acometimento nervoso e o número de lesões, apresentando alterações características em comparação à substância branca ao redor, demonstrando, ocasionalmente, a patologia onde a tomografia computadorizada de crânio é normal (MAJOR et al., 1992; WHITEMAN et al., 1993). Na RNM, as lesões podem ser hiperintensas em nas seqüências T2 e *Flair* e hipointensas nas seqüências T1. As lesões podem estar adjacentes ao córtex cerebral com dano das fibras U. As lesões da LEMP usualmente não mostram edema, efeito de massa ou realce de gadonílio, características que auxiliam na diferenciação entre essas lesões e as produzidas pela esclerose múltipla.

1.7) DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico da LEMP considerado definitivo consiste na detecção do agente etiológico em tecido cerebral (reação padrão ouro) (GILLESPIE, 1991).

A presença dos vírus JC em tecido cerebral pode ser comprovada através de diversas técnicas, tais como a microscopia eletrônica (ZU RHEIN, 1965) ou através do isolamento viral em culturas celulares permissivas, que

consistem em células gliais fetais enriquecidas em espongiblastos (precursores celulares dos oligodendrócitos), as células produtoras de mielina no sistema nervoso central (CHANG et al., 1994).

Técnicas imunohistoquímicas podem também ser utilizadas, demonstrando-se a presença de antígenos específicos utilizando-se anticorpos monoclonais (BERGER, 1993) ou, ainda, demonstrando-se a presença de marcadores virais em tecido cerebral através de sondas de DNA marcadas (hibridação *in situ*) (AKSAMIT, 1986).

A alta invasividade destas técnicas, entretanto, torna difícil seu emprego para obtenção de um diagnóstico definitivo. Gildenberg et al. (2000) demonstraram em duzentas e cinquenta biópsias cerebrais, a ocorrência de complicações pós-cirúrgicas em 12% dos pacientes, principalmente sangramento cerebral, sendo que destes, 9% evoluíram para óbito (GILDENBERG et al., 2000).

Sendo assim, a utilização de outras técnicas diagnósticas menos invasivas, especialmente a reação em cadeia por polimerase para detecção do DNA do VJC em amostras de líquido aumentou muito, em substituição à biópsia cerebral.

Seguem abaixo, alguns exemplos de reação em cadeia por polimerase no líquido, com as respectivas avaliações de sensibilidade e especificidade, antes da introdução da terapia anti-retroviral altamente eficaz (HAART).

Autor	Segmento	Pacientes	Método	PCR	PCR
	Amplificado	+	Confirmatório	Sensibilidade	Especificidade
Moret, 1993	T	9/9	Histológico	100%	100%
Gibson, 1993	T/VP1	10/13	Histológico	82%	100%
Weber, 1994	T/VP1	10/13	Histológico	42% a 82%	100%
McGuire, 1994	VP1	8/8	Histológico	100%	100%
Fong, 1995	T	17/23	Histológico	73,9%	95,8%
De Lucca, 1996	T	14/19	Histológico	74%	100%
Hammarin, 1996	T	14/14	Radiológico	100%	100%
Cinque, 1997	T	6/7	Histológico	98%	98%
Matsiota-Bernard, 1997	T	10/11	Histológico	85% a 91%	87% a 100%
Koralnick, 1999	-	10/11	TCC	98%	98%
Yiannoutsos, 1999	T	11/15	Histológico	73,3%	100%

Tabela 1. Descrição da PCR com respectivas sensibilidade e especificidade.

Além da finalidade diagnóstica, a PCR também se mostrou muito útil no monitoramento dos pacientes em uso das diversas drogas, quanto à presença e o “clearance” do DNA viral no líquido (MATSIOTA-BERNARD et al., 1997; CINQUE et al., 1998, DE VIEDMA et al., 1999).

Com a introdução da HAART, a PCR convencional demonstrou um drástico declínio da sensibilidade, que pode chegar a 58,3% devido à menor quantidade de vírus no líquido (KORALNIK, 2004).

Marzocchetti et al. (2005) avaliaram as mudanças nos níveis de detecção do DNA do vírus JC em amostras de líquido de pacientes com suspeita de LEMP. Os autores observaram que, enquanto a proporção de

casos suspeitos, submetidos à punção lombar, não mostrou diferença significativa nas duas eras (18,6% na era pré-HAART e 22,1,% na era pós-HAART), o mesmo não ocorreu nos índices de detecção. Enquanto na era pré-HAART, os autores encontraram índices de positividade de 89,5%, na era HAART esses índices caíram para 57,5% (MARZOCCHETTI et al., 2005).

O advento da PCR em tempo real contribuiu para melhorar o método diagnóstico específico, graças à sua alta sensibilidade, eliminando algumas limitações da PCR convencional.

Diversos protocolos foram testados, demonstrando sensibilidade muito superior à PCR convencional, além da possibilidade de identificar e quantificar, em uma só reação, os diferentes poliomavirus presentes nas amostras clínicas (RYSCHKEWITSCH et al., 2004; McNEES et al., 2005; ELFAITOURI et al., 2006; PAL et al., 2006; SMITH et al., 2007).

A reação de PCR em tempo real padronizada por McNees et al. (2005), utilizando *primers* e sondas específicas para o Ag T do vírus JC, demonstrou especificidade de 100% e sensibilidade de 100 cópias, o que aumenta em 10 a 100 vezes a sensibilidade da PCR convencional (McNees et al., 2005).

Chapagain et al. (2006) compararam um protocolo de PCR em tempo real (sistema *Sybr green*) com o teste de hemaglutinação (HA), para quantificação do vírus JC. Os autores encontraram sensibilidade de 180 cópias do DNA do VJC na PCR e forte correlação linear entre o teste de hemaglutinação e o número de cópias do vírus (CHAPAGAIN et al., 2006).

Outros protocolos foram desenvolvidos utilizando, em sua maioria, sondas e *primers* complementares ao Ag T, obtendo limites de detecção reprodutíveis de, aproximadamente, 10 cópias do vírus (RYSCHKEWITSH et al., 2004; MCNEES et al., 2005).

2) JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

A LEMP continua sendo uma complicação freqüente e potencialmente letal em pacientes com aids, mesmo na era das terapias altamente eficazes (HAART).

Em nosso meio, é a principal causa de lesão focal sem efeito expansivo (FINK et al., 2006), e a quarta causa de doença neurológica oportunista em pacientes internados (VIDAL et al., 2008).

A caracterização genotípica dos vírus envolvidos na patogênese da doença encontra-se, ainda, bastante controversa, e, em nosso meio, nunca foi realizada.

Por outro lado, a padronização de técnicas diagnósticas sensíveis, específicas e rápidas como a reação em cadeia por polimerase (PCR) e a PCR em tempo real possibilitará o diagnóstico preciso e rápido da doença, permitindo o início mais precoce de terapia, bem como a monitorização da resposta à terapêutica.

3) OBJETIVOS

3.1) OBJETIVO GERAL

Caracterizar os diferentes genótipos do VJC presentes no líquido de pacientes com aids e LEMP e compará-los àqueles presentes em urina de pacientes com aids, sem LEMP, para determinar se há diferença na distribuição genotípica do VJC nos dois grupos.

3.2) OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

1. Análise de seleção e mapeamento de sítios variáveis na região VP1 do VJC comparando as substituições presentes no grupo de amostras virais obtidas de pacientes com LEMP com o grupo de amostras obtidas de pacientes com AIDS sem LEMP.
2. Padronizar a reação de PCR em tempo real para o VJC.
3. Avaliar a sensibilidade e especificidade da PCR em tempo real para detecção do VJC em líquido.
4. Averiguar a possível associação entre carga viral líquórica, número de células TCD4+, genótipos e letalidade em pacientes com LEMP.

4) CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1) DESENHO DO ESTUDO

Estudo caso-controle, onde se avaliou a distribuição genotípica do VJC em amostras de líquido de pacientes com quadro clínico-radiológico de LEMP. Como controles foram selecionados dois grupos com diferentes objetivos:

- **Grupo 1** - amostras de urina de pacientes com aids, sem LEMP ou outra doença neurológica, para investigação dos genótipos circulantes.

- **Grupo 2** – amostras de líquido de pacientes com aids e doenças neurológicas não LEMP, utilizadas para avaliação de especificidade, na padronização da PCR em tempo real.

4.2) DEFINIÇÃO DE CASO

A introdução da terapia anti-retroviral altamente eficaz (HAART) resultou em profundas mudanças na prevalência e curso de diversas infecções oportunistas. Na LEMP fez-se necessário o estabelecimento de uma definição consistente. De acordo com os critérios diagnósticos sugeridos por Cinque et al., (2003), os casos de LEMP podem ser referidos como “histologicamente confirmados” com evidência de infecção pelo vírus JC em tecido cerebral, “laboratorialmente confirmados” com detecção do DNA do vírus JC em líquido ou “possível LEMP”, na presença de quadro clínico-radiológico típico, sem demonstração de infecção pelo vírus JC

(CINQUE et al., 2003). Em nosso estudo, foram incluídos, como casos, os pacientes que preenchiam os critérios de definição de caso “laboratorialmente confirmado”.

4.3) CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

4.3.1) CASOS

- 1- Diagnóstico confirmado de infecção pelo HIV, segundo as recomendações do Ministério da Saúde do Brasil.
- 2- Disponibilidade de amostras de líquido colhidas no momento da investigação diagnóstica, com detecção do vírus JC.
- 3 - Assinatura do TCLE.

4.3.2) CONTROLES

- 3- Diagnóstico confirmado de infecção pelo HIV, segundo as recomendações do Ministério da Saúde do Brasil.
- 4- Ausência de doença neurológica.
- 5- Assinatura do TCLE.

4.4) CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- 1- Diagnóstico de outra doença neurológica qualquer.

4.5) ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi aprovado pelos comitês de ética das instituições envolvidas (anexo 1). Foi mantido o sigilo em relação à identidade dos pacientes.

4.6) AMOSTRAS

As amostras de líquido foram coletadas pelo médico que assiste o paciente na rotina de investigação do quadro neurológico, e processadas no Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, LIM 52 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Não foram colhidas amostras de LCR sem que houvesse indicação clínica, pelo médico assistente.

Além das novas coletas, foram utilizadas amostras de líquido que fazem parte da coleção de amostras do laboratório de Virologia, tendo sido colhidas previamente, para elucidação diagnóstica, por indicação exclusivamente clínica do médico responsável.

Foram incluídas, além das amostras de líquido, amostras de urina de pacientes com aids sem LEMP ou outra doença neurológica, para identificação dos genótipos circulantes nessa população.

Figura 4. Fluxograma metodológico

4.7) TESTES LABORATORIAIS

4.7.1) AVALIAÇÃO DA CONDIÇÃO IMUNOLÓGICA

- Contagem da subpopulação de linfócitos T CD4+

Esse exame foi realizado por citometria de fluxo, nos laboratórios das respectivas instituições de origem. O resultado é expresso em número absoluto de células por mm³.

4.8) AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO VJC

4.8.1) PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras de líquido foram inspecionadas quanto à presença de sangue. Em casos positivos, o material foi submetido à centrifugação por 5 minutos a 1500 rpm para a formação do botão de hemácias, sendo retirado o sobrenadante e transferido para novo tubo.

O DNA viral foi extraído de 200 µl de amostra através de *kit* comercial *QIAmp mini blood* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante, e eluído em volume final de 200 µl.

Para as amostras de urina, o mesmo procedimento de extração foi adotado.

4.8.2) REAÇÃO EM CADEIA POR POLIMERASE (PCR) PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE T

Todas as amostras foram inicialmente triadas através da reação em cadeia por polimerase conforme protocolo descrito por Arthur et al. (1989), padronizado por Fink et al. (2006), que utiliza um par de *primers* complementares à região precoce do genoma dos poliomavirus humanos (antígeno T), comum aos vírus JC e BK.

A seqüência alvo foi amplificada numa reação com volume final de 50 µl, contendo 10 µl da amostra, tampão 10X (50 mM de KCl, 10 mM de tris), dNTPs 200 µM, primer 0,5 µM cada, MgCl₂ 1,5 mM, *Taq* polimerase 2,5 U/ reação.

O mix de reação foi submetido a 40 ciclos de amplificação em termociclador Perkin Elmer PTC 2400, como se segue: 1,5 min a 94°C para denaturação do DNA; 1,5 min a 55°C para anelamento dos *primers* e 2 min a 72°C para extensão da seqüência. Uma etapa inicial de 10 min para denaturação foi incluída, além de uma extensão final a 72°C por sete minutos.

A sensibilidade do teste, encontrada em nosso meio, foi de 200 cópias do vírus JC (FINK et al., 2006).

De cada tubo de reação foram retirados 10 µl de amostra e misturados a 2 µl de tampão de amostra (20 g de Ficoll, 60 ml de H₂O, 20 ml de EDTA 0,5 M e 0,25 g de Xileno Cianol). Esta mistura foi aplicada em gel

de agarose 2% (A 1000, Gibco) e submetida à corrente de 100 V para eletroforese.

Após a eletroforese, os produtos de amplificação resultantes, no tamanho de 173 pares de bases, foram visualizados por trans-iluminação do gel por raios ultravioleta. O registro fotográfico foi feito através do sistema “*Ultra-Lum*” (Ultra-Lum Incorporation, Carson, Califórnia).

Por se tratar de um par de *primers* complementar a uma região altamente conservada entre os vírus JC e BK, as amostras positivas passaram por etapa posterior, onde a diferenciação entre os vírus foi realizada através da digestão do produto amplificado com a enzima de restrição *Bam* H1. O fragmento do VJC foi clivado em dois outros menores com 120 e 53 pares de bases, (ARTHUR R., 1989), sendo possível diferenciá-lo do VBK, já que este não possui sítio de clivagem para essa enzima. Essa digestão enzimática foi realizada em vinte e seis amostras. Todas as amostras positivas foram submetidas à reação de genotipagem.

4.8.3) REAÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DE VP1 PARA GENOTIPAGEM

As amostras que se apresentaram positivas para o antígeno T foram submetidas à genotipagem dos VJC detectados, através da amplificação de um fragmento de 215 pb do gene VP1, em reação de PCR *one step*, (nucleotídeos 1710-1734 e 1924–1902) (AGOSTINI et al., 1997a). Esse fragmento de DNA fornece mais de 15 sítios de tipagem para diferenciação dos oito genótipos e seus diferentes subtipos.

A amplificação foi realizada em termociclador Eppendorf, com os parâmetros de amplificação descritos por Schaffer et al. (2006): denaturação a 95°C por um minuto, anelamento a 57°C por um minuto e extensão a 72°C por um minuto, repetidos por 35 ciclos (SCHAFER et al., 2006).

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

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

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

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

Tabela 2. Primers utilizados para a amplificação do DNA do VJC, com respectivas sequências, região amplificada e tamanho do fragmento.

4.8.4) SEQUENCIAMENTO DOS PRODUTOS DE PCR

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

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

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

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

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

As amostras positivas foram submetidas a sequenciamento genômico.

4.9) CLASSIFICAÇÃO GENOTÍPICA e ANÁLISES FILOGENÉTICAS

As sequências do VJC amplificadas neste trabalho (*Genbank* FJ931054 a FJ931098, GQ856246 a GQ856252) foram alinhadas com sequências obtidas no banco de dados público *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov), totalizando 135. Para isso, foi utilizado o programa de alinhamento múltiplo ClustalX (Thompson *et al.*, 1994). O arquivo alinhado foi manualmente editado e verificado em relação à fase de leitura com o auxílio do programa SeAl (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/seal>).

Para as análises filogenéticas, o alinhamento foi exportado em formato *nexus* e utilizado como entrada para o programa de reconstrução filogenética. As inferências filogenéticas neste trabalho foram realizadas

utilizando o método de análise bayesiano. O método não procura a árvore ótima, mas sim, um conjunto de árvores que possuem probabilidade de representar os dados, dado um modelo de evolução e premissas admitidas *a priori*. Em outras palavras, conhecimentos *a priori* são utilizados para prever hipóteses *a posteriori*. O programa *BEAST* de inferência bayesiana (Drummond & Rambaut, 2007), utiliza o processo de Monte Carlo de exploração de dados, onde parâmetros como taxas de evolução, probabilidades de transição entre nucleotídeos, topologia, tamanho da população efetiva ao longo do tempo e seus priores Bayesianos (*priors*) são encapsulados em cadeias de *Markov*. Durante as sucessivas rodadas (da ordem de milhões) pelo método de Monte Carlo, estes parâmetros são modificados e novas cadeias são sucessivamente propostas e avaliadas por seu incremento de probabilidade posterior. Após a estabilização dos valores dos parâmetros, estes tendem a convergir ao mesmo tempo em que o espaço topológico é visitado e amostrado em intervalos suficientemente distantes para evitar auto-correlação entre as cadeias, desta forma fornecendo valores independentes para a estimativa apropriada da filodinâmica.

Inicialmente para a escolha do melhor modelo filogenético de substituição de DNA, foi utilizado o programa *Modeltest* v.3.7 (POSADA & CRANDALL, 1998), para que o modelo adequado fosse aplicado como *prior* para o programa *BEAST*. Um número de dez milhões de cadeias (gerações), onde eram retidas árvores a cada 1000 rodadas, foram realizadas pelo programa, resultando assim, em um total de dez mil reconstruções

filogenéticas salvas. Dessa forma, a probabilidade posterior de cada nó da árvore (podendo ser traduzido em análise de consistência) é dada pela própria sumarização das topologias geradas pelo programa, onde a frequência de cada nó aparece como um valor de 0 a 1. Essa forma de reconstrução dispensa a utilização de métodos de reamostragem (como o *bootstrap*) para avaliar a consistência dos dados. Além disso, possui a vantagem de que a árvore final é uma sumarização de dezenas de milhões de topologias.

4.10) ANÁLISE DE SELEÇÃO E MAPEAMENTO DOS SÍTIOS VARIÁVEIS

Os métodos de detecção de seleção mais utilizados e mais sensíveis utilizam a razão entre o número de substituições não-sinônimas por sítio não- sinônimo (dN) e o número de substituições sinônimas por sítio sinônimo (dS). Assim, o regime de seleção no qual uma sequência está exposta é determinado pela razão dN/dS (ω). Por exemplo, em caso de restrições funcionais ou estruturais, espera-se encontrar um menor número de variações nos sítios não sinônimos em relação aos sinônimos ($dN < dS$), ou seja, na razão dN/dS , $\omega < 1$, indicando portanto seleção negativa ou purificadora. Por outro lado, na presença de seleção positiva, ou diversificadora, espera-se encontrar um maior número de variações nos sítios não sinônimos ($dN > dS$), sendo $\omega > 1$. Em caso de regime neutro, onde sequências teoricamente não sofrem nenhum tipo de pressão seletiva, temos $\omega = 1$.

O alinhamento das sequências obtidas neste trabalho, devidamente editado e em fase de leitura, continha 65 aminoácidos. Com o objetivo de comparar diferentes pressões seletivas entre os grupos de pacientes, este alinhamento foi subdividido em dois alinhamentos menores. Um deles contendo apenas as sequências amplificadas de amostras de urina de pacientes com aids sem LEMP, e o outro contendo as sequências amplificadas a partir de pacientes com LEMP. Estas foram submetidas à análise de seleção através do servidor de domínio público *Datamonkey* (SERGEI et al., 2005) disponível no sítio <http://www.datamonkey.org/>. O método estatístico empregado utiliza verossimilhança para a detecção de seleção em um conjunto de sequências. A partir do servidor *Datamonkey*, dois métodos de análise de seleção foram realizados, *SLAC* (*single likelihood ancestor counting*) e *FEL* (*fixed effect likelihood*). O *SLAC* é um método rápido que avalia a probabilidade de um codon estar sob seleção, dado sua sequência ancestral, e o *FEL* estima diretamente as substituições sinônimas e não sinônimas por sítio.

Para a análise dos resultados e mapeamento dos sítios sob seleção na região da VP1, uma sequência de referência foi incluída nos alinhamentos. Isso permitiu que as análises de polimorfismos nesta região fossem efetuadas e comparadas aos sítios previamente caracterizados como sendo associados à LEMP. Devido ao fato da recombinação exercer um forte impacto nas análises de seleção, muitas vezes produzindo falsos resultados, análises de recombinação foram realizadas com o programa *GARD*, disponível no domínio público *Datamonkey* (SERGEI et al., 2005).

4.11) PCR EM TEMPO REAL

4.11.1) Padronização da PCR em tempo real

A tecnologia de PCR em Tempo Real possibilita a detecção do produto de amplificação à medida que vai sendo formado, ao contrário do método original.

Nessa técnica, além dos iniciadores utilizados na PCR tradicional, adiciona-se um terceiro oligonucleotídeo (sonda *TaqMan®*), com sua extremidade 5' ligada a um fluoróforo e sua extremidade 3' a uma molécula *quencher*, capaz de, por um fenômeno físico denominado FRET-*Fluorescence Resonance Energy Transfer*, absorver a fluorescência emitida pelo fluoróforo, após sua estimulação por luz de comprimento de onda específico.

Devido à propriedade 5'-3' exonuclease da enzima Taq DNA polimerase na reação de PCR, ocorre, durante a fase de extensão dos iniciadores, a separação de FAM e TAMRA da mesma molécula, o que abole o FRET, e a fluorescência de FAM é captada pelo sistema óptico do aparelho de PCR em Tempo Real.

À medida que os ciclos da reação de PCR vão se sucedendo, aumenta o número de fluoróforos FAM livres do fenômeno FRET e conseqüentemente a fluorescência gerada. Quando a fluorescência emitida pelo fluoróforo atinge determinado limiar significativamente acima da

fluorescência basal da reação e localizado na fase exponencial da mesma, o *software* do sistema correlaciona o ciclo que isto ocorre (Ct) com as informações decorrentes da curva padrão paralela à reação, o que possibilita a quantificação das amostras.

Em resumo, este sistema informa se está ocorrendo amplificação da molécula alvo (separação de *fluoróforo-quencher*) e quantifica esta amplificação, uma vez que o *software* do sistema correlaciona a intensidade do sinal com a quantidade de amplificado formado.

O protocolo escolhido para a reação de PCR em tempo real foi descrito por Pal et al. (2006), que utilizou *primers* e sondas específicos para a região codificadora precoce (Ag T), consistindo de:

5'ATGTTTGCCAGTGATGATGAAAA 3' (*forward*),

5'GGAAAGTCTTTAGGGTCTTCTACCTTT 3' (*reverse*) (PAL et al., 2006).

A sonda (AGGATCCCAACACTCTACCCACCTAAAAAGA) foi marcada com FAM (6-carboxyfluorescein) como *reporter* na porção terminal 5' e com TAMRA (6-carboxy-tetramethylrhodamine) como *quencher* na porção 3'.

4.11.1.1 ESTABELECIMENTO DA CURVA PADRÃO

A curva padrão foi estabelecida a partir da construção de um plasmídeo comercialmente adquirido (Genescript Corp, USA). Para tanto, um fragmento de 360 pb, correspondente às regiões dos genes T e VP1 foi inserido em vetor pUC 57. O plasmídeo resultante foi utilizado como um padrão para quantificar o número de cópias do genoma do VJC. A

concentração de DNA do plasmídeo foi de 4000 µg/ml avaliada por espectrofotometria (Eppendorf Bio Photometer-Hamburg- Germany) e o número de 6×10^{10} cópias/ml foi obtido utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Número de cópias} = (X_{\text{g/ul DNA}} * 6.022 \times 10^{23}) / (\text{plasmídeo bp} * 650)$$

1 mol de 1 bp = 650 Daltons (g)

Número de avogadro = $6,022 \times 10^{23}$

Foram testadas, primeiramente, diluições seriadas de 6×10^{-2} a 6×10^5 plasmídeo até a construção da curva padrão. Para a curva padrão foram escolhidas as diluições a partir de 6×10^0 até 6×10^5 .

Os valores do ciclo *threshold* (*Ct*) foram calculados para cada padrão ou amostra pela determinação do ponto no qual a fluorescência excede o limite do *threshold*.

A curva padrão foi obtida pelo cálculo da média dos valores de *Ct* obtidos para cada diluição e “plotagem” desses valores contra concentrações conhecidas do DNA do vírus JC.

4.11.1.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PRIMERS E SONDA.

Teste preliminar para determinação da concentração de sondas e *primers* foi realizado com amostra clínica já seqüenciada, em quadruplicata,

utilizando-se várias concentrações de primer (400 μ M, 600 μ M e 750 μ M) e sonda (100 μ M, 150 μ M e 200 μ M) para otimização da técnica, ou seja, identificação do menor Ct (número do ciclo saindo do *baseline*) e a maior medida de fluorescência (ΔR_n), com as menores concentrações de sonda e *primers*. A amplificação foi padronizada em um volume de reação para 25 μ l.

A mistura da reação foi preparada com 12,5 μ l de 2X TaqMan Universal PCR Master Mix (AmpliTaq Gold DNA Polymerase, AmpErase UNG, dNTPs with dUTP, Passive Reference-Applied Biosystems-Manufactured by Roche- Branchburg, New Jersey USA), 1,875 μ l de cada primer (10 μ M), 0,5 μ l da sonda (6 μ M). Os parâmetros da reação foram 2min a 50°C para ativação da UNG e 10 min a 95°C para ativação da Taq gold,seguidos de 45 ciclos (15 s a 95°C and 1 min a 65°C) realizado no equipamento ABI 7300 (Applied Systems).

4.11.1.3 DETERMINAÇÃO DA SENSIBILIDADE ANALÍTICA DO TESTE

Para se determinar a sensibilidade analítica deste ensaio submetemos as diluições seriadas do plasmídeo do VJC acima descritas à amplificação em decaplicatas (10 testes por ponto de concentração).

A reprodutibilidade intratestes foi testada através do cálculo de coeficientes de variação dos Ct obtidos de decaplicatas das diluições 10², 10¹, 10⁰ e 10⁻¹ do plasmídeo e do controle negativo. A reprodutibilidade intertestes foi avaliada através do emprego de três diluições com concentrações conhecidas do DNA padrão, testadas em duplicata, a cada reação.

4.11.1.4 AVALIAÇÃO DA ESPECIFICIDADE DO TESTE

Para a avaliação da especificidade do teste foram testadas trinta e seis amostras de líquido com outros diagnósticos, a saber: neurotoxoplasmose (11), complexo cognitivo motor do HIV (2), herpes vírus tipo 6 (2), citomegalovírus (2), esclerose múltipla *like*, vírus epstein-barr e neurocriptococose, uma amostra de cada.

Devido à alta homologia do gene T entre os poliomavírus (aproximadamente 75%), dez amostras positivas para o vírus BK (líquor) foram testadas na PCR em tempo real.

O protocolo original descrito por PAL et al. emprega 60 ciclos para amplificação dos ácidos nucleicos. Em nosso protocolo, o número de ciclos foi reduzido para quarenta e cinco, uma vez que, segundo o manual para análise de dados da Applied Biosystems, o *master mix* empregado possui concentrações de reagentes suficientes para, no máximo, 45 ciclos de amplificação. Foram, também, testadas diferentes concentrações de *primers* e sonda, conforme protocolo descrito pela Applied Biosystems. As amostras empregadas foram anteriormente testadas, por PCR, para os antígenos T e VP1, em duplicata.

5) ANÁLISE ESTATÍSTICA

A distribuição genotípica em amostras de líquido e urina foi analisada pelo método χ^2 com correção de Yates para continuidade e Teste t para diferença entre médias. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Todas as variáveis foram avaliadas através do programa *Epi-Info* (Centers for Disease Control and Prevention, versão 6).

6) RESULTADOS

6.1) PACIENTES

No período estudado (agosto de 2000 a agosto de 2008), foram avaliadas para o VJC, por PCR, amostras de LCR de 338 pacientes com aids, apresentando quadro clínico-neurológico suspeito de LEMP. Destas, cinquenta e duas amostras foram positivas para o antígeno T, preenchendo os critérios diagnósticos confirmatórios de LEMP. Quarenta desses pacientes eram provenientes do Instituto de Infectologia Emílio Ribas, sete do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, dois do Centro de Referência e Tratamento em AIDS da Secretaria de Saúde de São Paulo, um da Escola Paulista de Medicina e um do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Trinta e nove pacientes (75%) eram do sexo masculino. A idade de 49 pacientes pôde ser avaliada, variando entre 11 e 62 anos (média 38,9; mediana 38). O número de células T CD₄⁺, no momento do diagnóstico, foi determinado em 46 pacientes e variou de 1 a 653 céls/mm³, sendo a média de 74 céls/mm³ e a mediana de 45 céls/mm³. Em 67% dos pacientes (35), o número de células T CD₄⁺ foi inferior a 100 céls/mm³.

Entre os indivíduos com LEMP, 30 (58%) eram brancos, 13 (25%) pardos ou negros e um (2%) amarelo. Em oito pacientes (15%) não foi possível recuperar essa informação.

As informações detalhadas em relação à distribuição de idade, sexo, número de células TCD₄+, síndromes clínicas descritas e número de acesso ao *Genbank*, dos pacientes HIV+/VJC+ constam do anexo 2.

Quarenta e dois pacientes (80%) possuíam diagnóstico prévio de aids e, desses, 56% (26/52) referiram o uso de terapia anti-retroviral ao diagnóstico da LEMP. Em dez pacientes a LEMP foi doença definidora da aids. Em vinte e sete pacientes essa informação não se encontrava disponível.

A análise do Líquor foi realizada em quarenta e três pacientes, nos quais a citologia mostrou-se normal em trinta e oito (88%), com proteinorraquia aumentada em dezoito pacientes (42%) e hipoglicorraquia em cinco pacientes (12%).

Em doze pacientes houve descrição de infecções neurológicas prévias à LEMP, com neurotoxoplasmose relatada em 7 (13,5%) dos pacientes.

Infecções extra-neurológicas concomitantes à LEMP foram observadas em 77% (40/52) dos casos, com altas prevalências de candidíase orofaríngea e pneumonia.

Durante a internação, a evolução para óbito foi observada em vinte e sete pacientes (52%). Destes, quatro apresentavam número de linfócitos T CD₄+ maior que 100 cels/mm³ e, em vinte e três pacientes os níveis de CD₄+ foram inferiores a 100 cels/mm³.

Todas as 52 amostras anteriormente positivas na PCR da região do gene T foram também positivas para a região VP1 do vírus JC. No entanto, a

partir dos produtos da PCR para a região VP1 foi possível obter seqüências adequadas em 51/52 amostras. Com base nas seqüências obtidas através da amplificação do fragmento de 215 bp, contido na região VP1, foram encontrados, nas amostras de líquido, cinco dos oito genótipos do vírus JC descritos anteriormente.

6.2) GRUPO CONTROLE 1

Foram obtidas, mediante coleta única, amostras de urina de setenta e cinco pacientes com aids, sem doença neurológica, internados e em acompanhamento ambulatorial no Instituto de Infectologia Emílio Ribas.

Cinquenta e três pacientes (70%), com idades entre 29 e 69 anos (média 43,4; mediana 46) foram positivos para o gene T e para o gene VP1 do vírus JC. O seqüenciamento, no entanto, mostrou-se adequado em 47 amostras. Destes, trinta e cinco pacientes (65%) eram do sexo masculino; 26 (49%) brancos, 25 (47%) pardos e 2 (4%) negros. Desse grupo de amostras, 41 (77%) apresentaram co-infecção VJC/VBK.

A **tabela 3** ilustra a distribuição genotípica entre os indivíduos com e sem LEMP.

Genótipos	Pacientes com	Pacientes sem	Total de	P
VJC	LEMP (%)	LEMP (%)	amostras	
1	22 (43)	4 (9)	26 (27%)	<0,0001
2	20 (39)	12 (26)	32 (33%)	NS
3	3 (6)	20 (43)	23 (23%)	<0,0001
4	2(4)	5 (11)	7 (7%)	NS
6	4(8)	6 (13)	10 (10%)	NS
TOTAL	n=51	n=47	n=98	

NS = Não Significante

Tabela 3. Distribuição genotípica do vírus JC em amostras de líquido de pacientes com aids e LEMP e urina de pacientes com aids, sem LEMP.

A distribuição dos genótipos 1, 2 e 3 mostrou acentuada diferença entre os dois grupos. Enquanto os genótipos 1 e 2 são encontrados mais frequentemente entre os pacientes com LEMP, o genótipo 3 foi identificado com maior frequência no grupo de pacientes sem LEMP. Os genótipos 4 e 6 foram encontrados em frequências semelhantes nos dois grupos.

O genótipo 1 foi encontrado em 22/51 (43%) dos pacientes com LEMP. O segundo mais prevalente foi o genótipo 2, encontrado em 20/51 (39%). Os genótipos 6, 3 e 4 foram encontrados, respectivamente, em 8% (4/51), 6% (3/51) e 4% (2/51). Por outro lado, nas amostras de urina dos pacientes sem LEMP, o genótipo mais prevalente foi o genótipo 3 encontrado em 43% (20/47) dos casos, seguido pelos genótipos 2 em 26% (12/47), 6 em 13% (6/47), o genótipo 4 em 11% (5/47) e o genótipo 1 em 9% (4/47), cada um. Os genótipos 5, 7 e 8 não foram detectados em nenhum dos 98 pacientes selecionados no presente estudo.

Para avaliarmos se a frequência dos genótipos do VJC difere significativamente em amostras de líquido de pacientes com LEMP e amostras de urina dos controles, a proporção de casos de cada genótipo foi avaliada nos dois grupos, utilizando χ^2 . O genótipo 1 mostrou frequência significativamente maior ($p < 0,0001$) nos casos de LEMP do que nas amostras de urina dos indivíduos com aids, sem LEMP, demonstrando forte associação positiva entre esses genótipos e a LEMP. A proporção do genótipo 3, por sua vez, foi significativamente maior em amostras de urina de pacientes sem LEMP do que nas amostras de líquido dos casos de LEMP, sendo inversamente associada à LEMP ($p < 0,0001$).

As prevalências dos subtipos do VJC em amostras de urina de pacientes com aids, sem sintomas neurológicos e amostras de líquido de pacientes com LEMP podem ser observadas na tabela 4. Os subtipos 1b e 2b foram os mais prevalentes, identificados em 24,5% (24/98) e 24,5% (24/98) da casuística, respectivamente, seguidos pelo genótipo 3a em 13,3% (13/98) (Tabela 4).

Subtipos VJC	Pacientes AIDS e LEMP (%)	Pacientes AIDS sem LEMP (%)	TOTAL (%)
1a	2(4,0)	...	2 (2,0)
1b	20 (39,0)	4 (8,5)	24 (24,5)
			26/98 (26,5)
2a	4 (8,0)	2 (4,5)	6 (6,0)
2b	15 (29,0)	9 (19,0)	24 (24,5)
2c	1 (2,0)	...	1 (1,0)
2d	...	1 (2,0)	1 (1,0)
			31/98 (31,6)
3a	3 (6,0)	10 (21,0)	13 (13,3)
3b	...	10 (21,0)	10 (10,0)
			23/98 (23,5)
4	2 (4,0)	5 (11,0)	7/98 (7,2)
6	4 (8,0)	6 (15,0)	10/98 (10,2)
	N=51	N=47	N=98

Tabela 4. Distribuição dos subtipos do VJC em amostras de urina de pacientes com aids, sem sintomas neurológicos e amostras de líquido de pacientes com LEMP

6.3) ANALISES FILOGENÉTICAS

Após a escolha do melhor modelo evolucionário (K80+I+G), os arquivos foram submetidos às reconstruções filogenéticas nos programa BEAST, utilizando o modelo mais simples disponível (HKY) para aproximar ao escolhido *ModelTest*. A genotipagem das amostras foi realizada com base no agrupamento das sequências obtidas neste trabalho, com as

sequências de referência extraídas do *GenBank*, cujo genótipo era conhecido (Figura 5). No geral, a variabilidade genética apresentada foi baixa ($< 1\%$ para amostras do mesmo genótipo), tanto para amostras de pacientes com aids sem LEMP como as de pacientes com aids e LEMP. O padrão de agrupamento mostrou que as amostras que circulam no Brasil pertencem, em sua maioria, aos genótipos 1, 2, 3, 4 e 6. A reconstrução filogenética ainda mostrou que não houve agrupamento em relação à manifestação clínica, ou seja, vírus coletados de pacientes com aids sem LEMP agruparam com aqueles obtidos de pacientes com LEMP, algumas vezes apresentando distância genética zero ($k = 0$).

Figura 5. Reconstrução filogenética através do método Bayesiano realizada no programa BEAST com 10 milhões de cadeias. Os valores de probabilidade posterior maiores que 0,5 estão evidenciadas nos nós das árvores. Em vermelho, as sequências obtidas no GenBank foram utilizadas como referência.

6.4) ANÁLISE DE SELEÇÃO E MAPEAMENTO DOS SÍTIOS VARIÁVEIS

As análises de seleção foram feitas para as sequências obtidas neste trabalho de duas maneiras: primeiro, valores de dN/dS foram obtidos para as sequências como um todo e, depois, valores de dN/dS foram estimados códon a códon com o objetivo de se verificar se algum códon, especificamente, estava sob seleção nos diferentes grupos de pacientes. Os resultados mostraram que, no geral, a região VP1 encontra-se sob pressão negativa, ou seja, apresenta restrições funcionais, com pouca variação ocorrendo em sítios não sinônimos. O valor de dN/dS geral foi $\omega=0.29$ para o conjunto completo das sequências. Entretanto, ao se analisar separadamente os grupos com e sem sintomas, observou-se que o grupo de pacientes com LEMP apresentou maior restrição funcional ($\omega=0.33$) em relação ao grupo assintomático ($\omega=0.19$). Nas análises de seleção códon a códon, os resultados mostraram que no grupo dos pacientes com LEMP o códon 91 (posição determinada de acordo com a sequência de referência de acordo com o trabalho de Sunyaev et al., 2009) encontra-se sob forte seleção positiva, apresentando a substituição do aminoácido Leucina para Isoleucina ou Valina (L→I ou V). Esse é um resultado interessante, visto que esta mutação não foi encontrada em nenhum paciente com aids sem LEMP. Nesse sítio encontramos substituição de leucina para prolina em dois pacientes controle. Ademais, ocorreram tanto transições (purina-purina) como tranversões (purina-pirimidina), com a primeira posição variando entre A, C e G. Além da substituição na posição 91, outras substituições de

aminoácidos foram encontradas e mapeadas ao longo da região sequenciada. Entretanto, diferentemente da substituição acima descrita, essas substituições não foram associadas tão fortemente aos respectivos grupos de pacientes. O sítio 123, previamente descrito como possível sítio polimórfico associado à LEMP (SUNYAEV et al., 2009) foi analisado em nossas amostras, e apenas foi encontrada a ocorrência de substituições sinônimas nesse sítio. O sítio 134, já detectado como polimórfico onde, originalmente encontra-se adenosina, apresentou substituição para glicina em 90% dos pacientes com LEMP, contra 52% dos pacientes com aids sem LEMP. O sítio 128, também polimórfico, apresentou maior índice de substituição de T→A em pacientes com LEMP (70%) contra 32% de substituição de aminoácidos em pacientes com aids, sem LEMP. Finalmente, é importante ressaltar que as análises de recombinação mostraram que não há sequências apresentando indícios de recombinação no conjunto de dados analisados neste trabalho.

6.5) DETERMINAÇÃO DA CARGA VIRAL POR PCR EM TEMPO REAL.

A carga viral líquórica do vírus JC pode ser avaliada em 44 amostras de líquido dos indivíduos com LEMP. Em 8 pacientes, este procedimento não pode ser realizado por insuficiência de material.

Para avaliar uma possível associação da carga viral líquórica com a evolução do paciente durante a internação, o $\log_{10}$ do número de cópias do VJC foi determinado no grupo de pacientes que evoluir para óbito e no grupo

TCD₄⁺ foi de 45 células/mm³ no grupo com evolução para óbito e 78 células/mm³ no grupo sem evolução para óbito (p= 0,09)

CD ₄ x ÓBITO	N	Mediana	SE	SD
N	19	108,1	34,59	146,8
S	27	55,8	9,61	49,9
Diferença de medianas=52,3 (IC 95%)				
P=0,09				

Tabela 5. Associação entre medianas de CD₄⁺ e evolução para óbito.

Entretanto, o óbito foi observado menos frequentemente entre os indivíduos com número de células TCD₄⁺ superior a 100 células/mm³ (p<0,05). A distribuição de amostras segundo o número de células TCD₄⁺ é observada na Figura 7.

Figura 7. Contagem de células CD4 e evolução clínica

Investigamos a possível associação entre os diferentes genótipos encontrados e a evolução para óbito (Tabela 6). Foram avaliados 45 pacientes.

Genótipo	Óbito	Não óbito	p
Gen 1	11	08	0,98
Gen 2	11	06	0,46
Gen 3	01	02	...
Gen 4	01	03	...
Gen 6	02	...	...
Total	n=26	n=19	

Tabela 6. Associação entre genótipos e evolução para óbito

Foram avaliados os genótipos 1 e 2 e a evolução para LEMP. Não observamos associação estatisticamente significativa ($p = 0,98$ e $0,46$, respectivamente) para esses genótipos em relação aos óbitos. Os genótipos 3, 4 e 6 não foram avaliados devido ao pequeno n .

6.6) RESULTADOS DA PADRONIZAÇÃO DA PCR EM TEMPO REAL

6.6.1) SENSIBILIDADE ANALÍTICA

Foram avaliadas diluições seriadas do plasmídeo PUC 57 (GeneScript USA Inc. Piscataway, NJ, USA) com inserto de 360 pb correspondente a fragmentos do gene T e do gene VP1 para determinação da sensibilidade analítica da reação de PCR em tempo real que amplificou um segmento do gene T do genoma do VJC.

Figura 8. Construção da curva padrão obtida com diluições seriadas do plasmídeo contendo segmento do VJC.

Utilizando diluições seriadas do plasmídio (10^1 até 10^6) diluídos em tampão TE, obtivemos uma curva padrão, com um índice de correlação de 0,999, próxima do ideal. (Figura 9)

Figura 9 Estabelecimento da curva padrão obtida com diluições seriadas 6×10^0 , 6×10^1 , 6×10^2 , 6×10^3 , 6×10^4 , 6×10^5 do plasmídeo contendo o fragmento do VJC. Regressão linear da curva padrão, correlacionando número de cópias na reação e o respectivo Ct.

Estabelecemos o *cut-off* da reação através de diluições seriadas (0,6; 6; 60; 600 cópias), sendo cada diluição testada em decuplicata (Tabela 7). A partir destes resultados, determinamos um *cut-off* para nossa reação, em torno de 6 cópias/ μ L. Em todas as reações, três pontos da curva foram testados (10^2 ; 10^1 ; 10^0).

Cópias por reação	Ct curva 1	Ct curva 2	Ct curva 3	Ct curva 4	Ct curva 5	Ct curva 6	Ct curva 7	Ct curva 8	Ct curva 9	Ct curva 10	Média	DP
600	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	10	0
60	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	10	0
6	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	pos	10	0
0,6	neg	pos	neg	pos	pos	pos	pos	neg	pos	pos	7	3
negativo	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	0	10

Tabela 7. Determinação do *cut-off* da reação de PCR em tempo real através de diluições seriadas do plasmídeo, testadas em decaplicatas.

A avaliação intra-teste da reação de PCR em tempo real mostrou uma alta reprodutibilidade, com desvio padrão próximo de zero nas três diluições do plasmídeo (Tabela 8).

Nº cópias do plasmídeo	Ct										Média	DP
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
600	27,14	27,06	26,95	26,89	27,04	27,01	27,06	26,96	27,14	27,21	27,04	0,003
60	30,70	30,54	30,33	30,26	30,15	30,49	30,36	30,32	30,31	30,60	30,40	-0.0273
6	33,53	33,68	33,76	33,68	34,02	34,38	33,92	34,02	34,69	33,33	33,90	0.001

Tabela 8. Avaliação da reprodutibilidade intrateste

Com base nos valores encontrados de *Intercept*, *slope* e $\log_{10}$ das concentrações obtidas nas diluições do plasmídeo, a eficiência da PCR em tempo real obtida foi de 93,9%.

6.7) TESTE DE ESPECIFICIDADE

Todas as 36 amostras de LCR com diagnóstico etiológico definido, utilizadas para determinação da especificidade do protocolo de PCR em tempo real adotado, incluindo 10 sabidamente positivas para o vírus BK, mostraram-se negativas, com especificidade de 100%.

6.8) SENSIBILIDADE DIAGNÓSTICA

Para avaliar a sensibilidade diagnóstica do protocolo empregado nesse estudo foram testadas 44 amostras de pacientes com LEMP, com PCR convencional positivo no LCR. Trinta e nove destas foram positivas pela PCR em tempo real. As cinco amostras negativas apresentaram curvas de amplificação, mas com Cts foram muito altos, ficando acima do “*intercept*”. Com os resultados obtidos, a sensibilidade diagnóstica através da PCR em tempo real foi de 89%.

Adicionalmente, foram testadas dezesseis amostras enviadas ao laboratório com suspeita de LEMP, mas que foram para o vírus JC pela PCR convencional. Destas, seis foram positivas na RTPCR. Com a revisão dos prontuários foi possível observar que seis desses pacientes apresentavam, ao exame tomográfico, lesões hipoatenuantes em substância branca, sugestivas de LEMP.

7) DISCUSSÃO

A relação entre os diferentes genótipos do VJC e a patogênese da LEMP permanece ainda uma questão controversa.

No presente estudo, os genótipos do vírus JC foram identificados em 98 pacientes com aids, sendo 51 amostras de vírus provenientes de pacientes apresentando quadro clínico-radiológico compatível com LEMP e 47 amostras de pacientes com aids sem LEMP. Neste conjunto de amostras, os genótipos com maior prevalência foram os genótipos 2 (33%), 1 (27%), seguidos pelo genótipo 3 (23%).

Na Itália, estudo realizado com indivíduos saudáveis da população geral por Pagani et al. (2003) mostrou nítido predomínio do genótipo 1 (62%), seguido do genótipo 4 (27%). O genótipo 2 foi o menos freqüente, ocorrendo em 13% da amostragem (PAGANI, 2003). Na Polônia, em 52 indivíduos saudáveis, o genótipo 1 foi encontrado em 85% dos casos, seguido do genótipo 2 (15%), não tendo sido encontrados outros genótipos do VJC. Outro estudo, analisando os genótipos do VJC circulantes na Europa central, do este e sudeste, também mostrou predomínio do tipo 1 em todas as coortes examinadas, incluindo diferentes regiões da Espanha, Alemanha, Hungria e Polônia (AGOSTINI et al., 2001). Outro aspecto interessante é a prevalência relativamente alta de genótipos 3 e 6 em nossa casuística (23% e 10%, respectivamente). Estes genótipos foram descritos em populações africanas e raramente são encontrados nas populações

européias. Esses genótipos podem ter sido introduzidos no Brasil através do tráfico de escravos oriundos do Congo, Angola e Guiné, principalmente, durante o período de colonização.

Em nossa população encontrou-se baixa prevalência do genótipo 4 ao contrário de alguns estudos realizados na Europa e EUA onde aparece com a segunda maior prevalência na população com e sem LEMP (DUBOIS et al., 2001; MARZOCCHETTI et al., 2007).

Em relação aos subtipos, observou-se predomínio absoluto do 1b dentro o genótipo 1, 2b dentro o genótipo 2 e resultados idênticos nos genótipos 3a e 3b no genótipo 3. Na Europa, os subtipos predominantes são 1b no sudeste Europeu e 1a no norte da Europa.

Portanto, o presente estudo mostra diferenças entre a distribuição dos genótipos e subtipos do VJC que circulam na Europa e no Brasil. Não existem estudos que tenham avaliado a distribuição genotípica do VJC em outros países do hemisfério sul. Deve-se ressaltar que a distribuição de genótipos em pacientes com aids pode eventualmente não refletir de forma exata o que ocorre na população saudável em nosso meio. Contudo, teoricamente, a distribuição de genótipos em pacientes com AIDS deveria refletir a distribuição genotípica na população geral, já que existe um consenso de que a infecção pelo JCV nos indivíduos imunocomprometidos seria consequência de reativação de infecção latente prévia que ocorreu, via de regra, antes da idade adulta (DANIEL et al., 1981; TAGUCHI et al., 1982; KITAMURA et al., 1994). Tal hipótese é reforçada por vários estudos que demonstraram que o genótipo mais prevalente em amostras de urina obtida

da população geral também foi o mais prevalente no LCR de pacientes com LEMP (DUBOIS et al., 2001; FERRANTE et al., 2003). Estudo realizado na Irlanda contudo, mostrou que a prevalência dos genótipos do VJC foi diferente na população geral e em indivíduos imunocomprometidos (SCHAFFER et al., 2006). Os autores descreveram a excreção urinária do genótipo 2 em 46,2% dos indivíduos HIV positivos e em 54,2% dos indivíduos com artrite reumatóide e em apenas 12% dos indivíduos imunocompetentes. Embora os autores daquele estudo não tenham chegado a uma conclusão definitiva para esse achado, especulam que a infecção por mais de um genótipo durante a infância poderia ser frequente e subestimada e na imunossupressão o genótipo 2 apresentaria uma replicação mais eficiente. Todavia, até o momento, não existem dados consistentes demonstrando a ocorrência de infecção por mais de um genótipo em pacientes imunocomprometidos. O único estudo que sugeriu a possibilidade de infecção por dois genótipos diferentes identificou essa ocorrência no LCR de apenas quatro pacientes com LEMP e baseou-se somente na interpretação dos picos de nucleotídeos do sequenciamento, o que é considerado insuficiente para alicerçar esse tipo de conclusão (FERRANTE et al., 2001). Em nossas amostras, amplificamos a mesma região genômica utilizando os mesmos *primers* empregados por Ferrante et al.(2001), mas não encontramos indícios de infecção dupla em nenhuma das 98 amostras. Embora o genótipo 2 tenha sido o mais prevalente nos pacientes com aids incluídos no presente estudo, a falta de dados sobre a distribuição de

genótipos do VJC na população geral não permite saber se esse genótipo é também o mais prevalente em nosso meio.

Embora não tenha sido o mais prevalente na nossa casuística, o genótipo 1 apresentou-se com uma prevalência de 43% nos pacientes com LEMP comparada com a prevalência de apenas 9% nos indivíduos com aids sem LEMP, mostrando uma forte associação entre esse genótipo e a LEMP ($p < 0,0001$). Esse resultado poderia sugerir um maior neurotropismo do genótipo 1 em relação aos demais. Estudos realizados na Europa também encontraram associação entre genótipos do VJC e LEMP (AGOSTINI et al., 2000; FERRANTE et al., 2003; MARZOCCHETTI et al., 2007). Em nossa casuística, não houve associação do genótipo 2 com a LEMP já que, embora estivesse presente em 39% das amostras de LCR dos pacientes com LEMP, também foi encontrado em 26% das amostras de urina de pacientes com aids, sem LEMP ($p > 0,05$). Na maioria dos estudos, o genótipo associado aos casos de LEMP na Europa foi o genótipo 2 e não o genótipo 1. Assim, Agostini et al., em 1997, encontraram o genótipo 2 em 48% dos casos de LEMP e em 24% dos pacientes HIV- positivos sem LEMP ($p < 0,05$). (AGOSTINI et al., 1997). Em outro estudo, o genótipo 2 foi encontrado em 11/21 (52%) dos casos de LEMP, em nenhum de 14 pacientes com AIDS sem LEMP e em 8% (1/12) indivíduos controles saudáveis (FERRANTE et al., 2001).

Dubois et al., em 2001, estudando 56 amostras de LCR de pacientes com LEMP e 65 amostras de urina de pacientes com AIDS sem LEMP não

encontraram nenhum tipo de associação entre genótipos do VJC e LEMP (DUBOIS et al., 2001).

Estatísticas elaboradas em 2007 pela UNAIDS estimam que 30 a 36 milhões de indivíduos na África estão infectados com o HIV, sendo 22 milhões de casos originários da África sub-Sahariana (UNAIDS, 2007). Estudos realizados na África do Sul demonstraram que a prevalência do HIV-1 entre a população geral era de 11,4% em 2004. Apesar da alta prevalência do HIV, a LEMP entre os pacientes africanos parece ser muito baixa – 1,5% em necrópsias contra 4-10% na Europa e EUA (CHIMA et al., 1999). Esse achado foi, então, atribuído à baixa neurovirulência dos genótipos do VJC circulantes na África (3 e 6) ou devido à menor sobrevivência dos pacientes, que iriam a óbito por outras causas, anteriormente à LEMP (CHIMA et al., 1999; DUBOIS et al., 2001). Os resultados obtidos em nosso estudo não são discordantes dos estudos realizados na África já que se observou que os genótipos africanos 3 ou 6 foram encontrados em mais da metade dos indivíduos com aids sem LEMP (56%) e em apenas 14% dos casos de LEMP. Em relação ao genótipo 3, especificamente, foi possível estabelecer uma associação negativa entre esse genótipo e a LEMP ($p=0,019$), já que na população com aids sem doença neurológica sua circulação foi demonstrada em 43% dos indivíduos.

Existem, portanto, algumas evidências de associação de genótipos específicos do VJC e LEMP. Contudo, o conjunto de dados disponíveis atualmente expõe importantes discordâncias e inconsistências. Como explicar, por exemplo, sob o ponto de vista virológico, um maior

neotropismo do genótipo 2 na Europa e dos genótipo 1 na nossa casuística? Por que alguns estudos não encontraram nenhum tipo de associação de genótipos e evolução para LEMP?

Avaliando filogeneticamente os genótipos encontrados em nossa casuística, observamos que o agrupamento dos genótipos das amostras de líquido dos pacientes com LEMP com o genótipo das amostras de urina dos pacientes com aids sem LEMP não apresentaram diferenças e, também, não apresentaram diferença filogenética com os genótipos já descritos em diferentes regiões do mundo. Já que esta é a primeira vez em que essa investigação é realizada em nosso meio e apenas com pacientes com aids, não podemos afirmar se esses achados refletem fidedignamente o que ocorre na população em geral ou se o fragmento amplificado possui poucos sítios.

Adicionalmente, investigamos mutações na região VP1 das nossas amostras já que alguns estudos recentes têm descrito mutações nos vírus JC presentes em pacientes com LEMP que não estão presentes nas amostras de vírus de pacientes sem LEMP (ZHENG et al., 2005 a, 2005 b; DELBUE et al., 2009). Com esse objetivo foram realizadas análises de seleção e mapeamento de sítios variáveis. No geral, a variabilidade genética para amostras do mesmo genótipo foi baixa (<1%) nas amostras de paciente com e sem LEMP. A reconstrução filogenética não mostrou agrupamento em relação à manifestação clínica da LEMP, ou seja, os vírus isolados em pacientes com LEMP se agruparam com aqueles obtidos de pacientes sem LEMP, algumas vezes apresentando distância genética zero ($k=0$).

Recentemente, foi publicado um estudo em que foram sequenciadas amostras de vírus provenientes de pacientes com e sem LEMP com o objetivo de encontrar mutações adaptativas relacionadas à manifestação de LEMP (SUNYAEV, 2009). Neste estudo, encontraram-se fortes evidências de que há mutações pontuais, não sinônimas na região VP1 do VJC, que só foram encontradas nas amostras provenientes de pacientes com LEMP, nas posições 61, 66, 123, 129, 223 e 271. Além disso, foram encontradas outras substituições mais frequentes nas amostras provenientes de casos de LEMP. A região da VP1 nas nossas amostras foi menor que a analisada no referido estudo, compreendendo a região entre o AA85 e AA149 (215 pb). Ainda assim, pudemos observar a presença de mutações na posição 123, altamente relacionada com LEMP, em 29% amostras “LEMP” e em 12% das amostras “não LEMP”. Encontramos também três outros sítios (117, 128, 134) que, embora não tenham sido encontradas exclusivamente nos casos de LEMP no estudo anterior, foram encontradas mais frequentemente nas amostras “LEMP” do que nas amostras “não LEMP”. Assim, no sítio 117, a substituição de treonina para serina (T/S) foi encontrada em 39% das amostras “LEMP” contra 16% das “não LEMP”. O sítio 128 mostrou-se variável, com maior frequência de substituições treonina para alalina (T/A) nas amostras “LEMP” (70%) do que nas “não LEMP” (32%). O outro sítio foi o 134, com substituição da alanina para glicina (A/G) em 90% das amostras “LEMP” e 62% nas amostras “não LEMP”. Entretanto, o achado mais interessante foi o encontro de uma substituição na posição 91 de Leucina para Isoleucina ou Valina (L – I – V), não descrita anteriormente, que só

ocorreu nas amostras “LEMP”. Em dois pacientes do grupo controle encontramos substituição de Leucina para Prolina (L/P). O conjunto desses achados sugere uma evolução mais acelerada nas amostras de vírus provenientes de pacientes com LEMP, talvez ocasionada por uma pressão imune do hospedeiro. Apoiando essa hipótese, a posição 91, única exclusiva das amostras “LEMP”, foi a única que se mostrou sob seleção positiva de forma significativa ($p < 0,05$). Contudo, não houve diferença na frequência desta mutação entre o genótipo 1 (16%), que foi o mais prevalente nos casos de LEMP, e o genótipo 2 (12%), que não mostrou associação com LEMP. De qualquer modo, é conhecido que uma maior variabilidade em certas regiões do genoma viral está associada a escape do sistema imune do hospedeiro (DELBUE et al., 2009), sendo também importante ressaltar que em nosso estudo foi analisada um fragmento limitado da região VP1.

Quanto à PCR em tempo real padronizada no presente estudo, observou-se que a mesma mostrou-se sensível e específica para a detecção do VJC. A sensibilidade e a especificidade das reações de PCR convencionais em amostras de líquido de pacientes com LEMP têm sido amplamente avaliadas, em comparação com o diagnóstico histológico, com especificidade variando de 92% a 100% e sensibilidade de 73,3 a 100% (MORET et al., 1993; KORALNIK et al., 1999). A sensibilidade e especificidade diagnóstica da PCR em tempo real no presente estudo, estabelecida a partir de amostras de LCR de pacientes com AIDS com e sem LEMP, foi de 89% e 100%, respectivamente. Os testes de sensibilidade analítica do ensaio apresentaram uma alta sensibilidade, com capacidade de

detecção a partir de 6 cópias por μL . Essa sensibilidade diagnóstica um pouco abaixo do esperado, obtida com as amostras clínicas de nosso estudo, poderia estar relacionada ao fato de que algumas amostras encontravam-se estocadas no laboratório desde o ano 2.000, ano em que começamos a trabalhar com o VJC. Nesse período, foram congeladas e descongeladas várias vezes para realização de outros estudos, o que poderia ter ocasionado degradação parcial ou total do DNA viral. A PCR em tempo real permitiu a detecção do VJC em algumas amostras de LCR que haviam sido negativas na PCR convencional. Elfaitouri et al. (2006) também encontraram positividade da PCR em tempo real em amostra de LCR negativa pela PCR convencional. Esses achados sugerem que, em casos altamente suspeitos de LEMP com PCR qualitativa negativa, a utilização da PCR em tempo real poderia trazer ganhos em termos diagnósticos. Do mesmo modo, se a PCR em tempo real for utilizada inicialmente na elucidação diagnóstica de caso suspeito de LEMP, seria recomendável testar a amostra com a PCR qualitativa, já que em alguns casos uma técnica pode complementar a outra.

Um dos objetivos secundários deste estudo era verificar a eventual associação entre carga viral e prognóstico da LEMP e, com exceção de cinco amostras que apresentaram amplificação com Cts muito elevados que impossibilitaram a quantificação, a PCR em tempo real quantificou adequadamente a carga viral do VJC no LCR das 39 amostras restantes. Ainda que a mediana do $\log_{10}$ das cargas virais nos casos de LEMP que evoluíram para óbito fosse maior do que a mediana das cargas virais

observadas nos casos que tiveram alta hospitalar, esta diferença não foi estatisticamente significativa. É importante ressaltar que o presente estudo não foi planejado para avaliar fatores prognósticos da LEMP, e muitas informações clínicas como, por exemplo, tempo de tratamento com HAART, esquemas utilizados, resposta ao tratamento e mesmo dados da evolução pós-alta, não estavam disponíveis nos prontuários analisados. Também não foram colhidas amostras sequenciais de LCR durante a evolução hospitalar a exemplo do que foi feito por Bossolasco et al. (2005) em estudo que incluiu 61 pacientes com LEMP (BOSSOLASCO et al., 2005). Esses autores observaram que cargas virais líquóricas elevadas no início da LEMP apresentaram correlação com menor tempo de sobrevida nos pacientes que não estavam recebendo HAART, mas não nos pacientes em tratamento com HAART (BOSSOLASCO et al., 2005). Na nossa casuística, a maioria dos pacientes estava recebendo HAART, confirmando, desse modo, os achados de Bossolasco et al. (2005). A sensibilidade da PCR em tempo real naquele estudo foi de 76% e a especificidade de 100%, resultados análogos aos nossos, embora a sensibilidade de nosso ensaio tenha sido de 89%.

Nosso estudo não teve como objetivo avaliar a carga viral do VJC em amostras sequenciais de LCR. Entretanto, no mesmo estudo citado de Bossolasco et al. (2005) observou-se que a determinação da carga viral em amostras de LCR pode ser um marcador virológico confiável da atividade da doença em pacientes com LEMP. Naquele estudo, os pacientes que evoluíram para estabilização da LEMP apresentaram acentuada diminuição da carga viral do VJC no LCR, ao passo que os pacientes com doença

progressiva fatal não apresentaram diminuição da carga viral na evolução (BOSSOLASCO et al. 2005). Esta pode ser uma excelente ferramenta a ser utilizada em ensaios clínicos de drogas para tratamento da LEMP ou para acompanhar a evolução de pacientes com LEMP em estudos futuros.

8) CONCLUSÕES

A distribuição dos genótipos do VJC em pacientes com aids em nosso meio mostrou predomínio dos genótipos 1, 2 e 3, sendo diferente da observada em países do hemisfério norte, onde predominam os genótipos 1 e 4.

Os genótipos 1 e 2 do vírus JC mostraram associação positiva com a LEMP enquanto que o genótipo 3 mostrou associação inversa à LEMP.

A evolução para óbito foi observada mais frequentemente em pacientes com número de linfócitos TCD4+ inferior a 100 cels/mm^3 , mas não foi relacionada à carga viral líquórica por ocasião do diagnóstico da LEMP ou ao genótipo do VJC.

No presente estudo, uma mutação no sítio 91 do gene VP1 com substituição da leucina para isoleucina ou valina, não descrita anteriormente, foi encontrada exclusivamente em pacientes com LEMP.

A PCR em tempo real mostrou limite de detecção de 6 cópias/ μl .

A sensibilidade diagnóstica da PCR em tempo real foi de 89% e a especificidade de 100%.

9) ANEXOS

Anexo 1- Aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

COORDENADORIA DOS SERVIÇOS DE SAÚDE

INSTITUTO DE INFECTOLOGIA "EMILIO RIBAS"

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Av. Dr. Arnaldo, 165 - Cerqueira César - São Paulo - SP

CEP: 01246-900 - TEL: 3896-1406

E-mail: comitedeetica-ier@ig.com.br

PARECER

PROTOCOLO DE PESQUISA N.º 07/09

Data da entrada:

PARECER N.º 083/2009

Sessão: 18/3/2009

Título da Pesquisa: "Caracterização molecular do papilomavirus humano JC em pacientes com AIDS, com e sem Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva, em São Paulo, Brasil"

Investigador Principal: Dr. Augusto Cesar Penalva de Oliveira

Autora Principal: Maria Cristina Domingues Fink

CONSIDERAÇÕES: O Comitê de Ética em Pesquisas solicita:

- Qual a procedência das amostras do IMT?
- Definir quais são os critérios de inclusão e exclusão do estudo;
- Anexar Orçamento detalhado, mesmo não tendo fonte de financiamento haverá custos;
- Anexar Termo de Confidencialidade;
- Anexar Declaração sobre o manuseio e armazenamento de materiais biológicos conforme Resolução CNS 347/2005;
- Declaração que o pesquisador seguirá as diretrizes da Resolução CNS 196/96;
- TCLE do Paciente: Explicar a doença de maneira clara e simples;
- Folha de Encaminhamento para Avaliação e Folha de Rosto: corrigir o item área temática, estudo pertence ao Grupo III;

() APROVADO

() APROVADO COM RECOMENDAÇÕES

() REPROVADO

(X) COM PENDÊNCIAS- OBS.: a ausência de resposta em 60 dias, acarretará em arquivamento do processo por falta de interesse do pesquisador.

TEMÁTICA ESPECIAL

☐ SIM

☐ NÃO

CONEP

☐ SIM

☐ NÃO

SVS (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA) ☐ SIM ☐ NÃO

*Dra. Anna Christina Nunes D'Ambrosio
Comitê de Ética em Pesquisas - I.I.E.R.*

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

PROTOCOLO DE PESQUISA Nº 800/02

SESSÃO: 09/05/07

TÍTULO DA PESQUISA: Detecção do DNA do vírus JC em amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes com Aids e lesões não expansivas de substância branca do sistema nervoso central

PESQUISADOR(A) RESPONSÁVEL: Prof. Dr. Cláudio Sérgio Pannutti

DEPARTAMENTO: MOLÉSTIAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS

DOCUMENTO(S) ANALISADO(S):

- **Adendo (Carta datada de 29.01.07)** – O adendo acrescenta alguns objetivos secundários ao projeto inicial, decorrentes dos resultados obtidos. Foram acrescentados: a) padronização da PCR em tempo real para o diagnóstico de LEMP; b) determinação da carga viral líquórica do VJC; c) caracterização dos diferentes genótipos do VJC presentes no líquido e linfócitos dos pacientes com Aids e LEMP e compará-los àqueles presentes em pacientes com Aids sem LEMP; d) estabelecimento da relação entre os genótipos e a ocorrência de LEMP.

Foi também reformulado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de acordo com os novos objetivos.

As alterações no protocolo e no Termo de Consentimento Livre e Esclarecidos não alteram a natureza da pesquisa.

CONCLUSÃO:

XX APROVADO

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente
CAPPesq-HCFMUSP

Anexo 2 – Termo de Consentimento

TERMO DE CONSENTIMENTO

Nome do estudo: Caracterização molecular do poliomavírus humano JC em pacientes com AIDS, com e sem Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva, em São Paulo, Brasil.

Estamos realizando uma pesquisa com o objetivo de conhecer melhor um tipo específico de vírus, denominado “vírus JC”. Esse vírus, que pode ser classificado em oito tipos diferentes, existe na maioria de pessoas adultas e é excretado pela urina, geralmente sem causar doença. No entanto, em pacientes com as defesas muito reduzidas, como nos indivíduos com aids, esse vírus pode causar uma doença que acomete o cérebro.

O objetivo deste termo é convidá-lo a participar de um estudo que avalia a presença e classificação do vírus JC em pacientes com o sistema imune comprometido. Caso você aceite participar, uma amostra de sua urina será utilizada para o processamento do exame que estamos estudando. Esse exame, chamado de “PCR”, pode identificar a presença desse vírus na sua urina, a qual se for positiva, não significa que você apresentará, necessariamente, alguma doença no futuro; indica, apenas, que você teve contato com esse vírus.

O seu acompanhamento e tratamento prosseguirão normalmente a cargo dos médicos que lhe acompanham e não será modificado de maneira alguma caso você participe ou não da pesquisa.

Todas as informações coletadas serão mantidas confidencialmente. Os dados serão armazenados em um computador e seu nome não aparecerá em nenhuma publicação, apresentação ou documento. Você poderá ter acesso aos resultados dos seus exames colhidos durante o estudo, bem como terá acesso, se assim desejar, às publicações pertinentes.

A sua participação neste estudo é voluntária, não implicando em qualquer custo para você. Caso você decida não participar, os cuidados médicos que você recebe não serão afetados de qualquer forma. Caso aceite participar, você poderá retirar-se do estudo em qualquer momento, sem afetar os cuidados médicos.

Nenhum exame adicional será coletado sem que seja solicitado pelo seu médico.

Para qualquer esclarecimento você poderá entrar em contato com Maria Cristina Fink, do laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, através dos telefones: 3061-7020/7012, ou através do e-mail crisfink@usp.br.

Consentimento

Eu, abaixo assinado, afirmo que li na íntegra e entendi completamente as informações. Concordo que as informações a respeito de minha condição médica e os resultados obtidos através de minha urina podem ser utilizados neste estudo. Minha participação é voluntária e livre de qualquer tipo de pressão ou coação.

Eu entendo que estas informações serão confidenciais e que meu nome não será mencionado em qualquer publicação deste estudo.

Nome _____

Data de nascimento _____ Raça _____

Assinatura _____

Data __/__/__

Anexo 3 - Distribuição de idade, sexo, número de células TCD₄+, síndrome clínica descrita e número de acesso ao *Genbank*, dos pacientes HIV+/VJC+

Identificação.	Genbank	Sexo/idade	CD ₄	Síndrome clínica
AA	FJ 931054	M/37	159	LEMP CLÁSSICA
JVL	FJ 931055	F/46	26	LEMP CLÁSSICA
MDA	FJ 931056	M/43	60	LEMP CLÁSSICA
DSJ	FJ 931057	M/11	70	LEMP CLÁSSICA
SM	FJ 931058	M/41	43	LEMP CLÁSSICA
JAS	FJ 931059	M/29	19	SÍNDROME CEREBELAR
JAO	FJ 931060	M/31	1	LEMP CLÁSSICA
MM	FJ 931061	F/38	5	LEMP CLÁSSICA
PLPB	FJ 931062	M/42	21	LEMP CLÁSSICA
MFJ	FJ 931063	F/33	15	LEMP CLÁSSICA
SGO	FJ 931064	F/32	83	LEMP CLÁSSICA
OSQ	FJ 931065	M/30	5	LEMP CLÁSSICA
NAC	FJ 931066	F/62	228	IRIS
JCFR	FJ 931067	M/?	52	LEMP CLÁSSICA
JCG	FJ 931068	M/36	35	LEMP CLÁSSICA
RB	FJ 931069	F/31	53	LEMP CLÁSSICA
JTC	FJ 931070	M/36	115	LEMP CLÁSSICA
BA	FJ 931071	F/?	31	LEMP CLÁSSICA
MSA	FJ 931072	F/32	133	LEMP CLÁSSICA
JBB	FJ 931073	M/37	4	LEMP CLÁSSICA
CVM	FJ 931074	M/59	41	LEMP CLÁSSICA
GVB	FJ 931075	M/46	29	LEMP CLÁSSICA
FRR	FJ 931076	M/39	45	LEMP CLÁSSICA
PES	FJ 931077	M/31	166	LEMP CLÁSSICA
VRS	FJ 931078	M/28	19	LEMP CLÁSSICA
MJMF	FJ 931079	F/51	...	LEMP CLÁSSICA
JCM	FJ 931080	M/35	68	LEMP CLÁSSICA
CRS	FJ 931081	M/41	9	LEMP CLÁSSICA
WM	FJ 931082	M/54	66	LEMP CLÁSSICA
EAS	FJ 931083	F/40	118	LEMP CLÁSSICA
RRS	FJ 931084	M/44	104	LEMP CLÁSSICA
MLAC	FJ 931085	F/57	58	LEMP CLÁSSICA
MSS	FJ 931086	M/33	33	SÍNDROME CEREBELAR
JAPF	FJ 931088	M/41	158	SÍNDROME CEREBELAR
LHS	FJ 931089	M/32	30	LEMP CLÁSSICA
MG	FJ 931090	F	...	...
VAA	FJ 931091	M/48	...	LEMP CLÁSSICA
TA	FJ 931092	F/43	88	LEMP CLÁSSICA
VM	FJ 931093	M/34	140	SÍNDROME CEREBELAR
WS	FJ 931095	M/42	100	SÍNDROME CEREBELAR
ASS	FJ 931096	M/35	61	LEMP CLÁSSICA
KEO	FJ 931097	M/30	24	LEMP CLÁSSICA
MAO	FJ 931098	M	...	...
PCA	GQ856246	M/36	12	LEMP CLÁSSICA
JCG	...	M/39	35	LEMP CLÁSSICA
JDO	...	M/38	17	LEMP CLÁSSICA
AKC	GQ856247	M/32	34	SÍNDROME CEREBELAR
RSS	GQ856248	M/27	18	LEMP CLÁSSICA
DS	GQ856249	M/42	140	SÍNDROME CEREBELAR
VV	GQ856250	M/41	653	IRIS
WES	GQ856251	M	...	...
CC	GQ856252	M/54	63	LEMP CLASSICA

Anexo 4 – Alinhamento de aminoácidos dos casos e controles

[illegible]

C61		T	T	
C28		T	T	A
C48		T	T	A
C1		T	T	A
C2	P	T	T	
C4		T	T	
C5		T	T	A
C7		T	T	A
C8	P	T	T	
C10		T	T	
C11		T	T	A
C12		T	T	A
C14		T	T	A
C17		T	T	
C19		T	T	A
C20		T	T	A
C21				
C23		T	T	A
C24		T		A
C29		T	T	
C31		T	T	A
c32		T	S	A
c33		T	T	A
c34		T	T	A
c36		T	T	A
c37		T	T	A
c39		T	T	

ROT940	-----P.
RO1420	.T.T.
SNC86	.T.T.
ROT1059	-
RO2658	G.
RO2296	.T.
RO21486	-----T.
ROT3036	.T.T.
RO1226	.T.
ROT1451	.T.
ROT2944	.T.T.
ROT495	.T.T.A.
ROT382	.T.
RO2381	.I.T.A.
C76	.T.T.A.
C65	.T.T.A.
C57	.T.
C74	-
C26	.T.T.
C22	.T.
C62	.T.T.A.
C47	.T.
C58	.T.
C27	.T.
C50	.T.T.-----
C68	.T.T.A.
C93	---ST.X.
C75	-L.T.T.A.
C71	.T.T.A.
C67	-T.T.A.
C49	-----T.T.
C64	.T.T.
C66	.T.T.
C56	.T.T.A.
C51	.T.
C38	.T.T.

Anexo 5 - Resultado das reações de PCR em tempo real em Cts e carga viral líquórica em número de cópias

Paciente	Ct	Cópias
1	31,2	76
2	27,3	1006
3	31,09	84
4	29,8	193
5	24,5	6385
6	23,9	9500
7	26,3	1938
8	16,3	1447654
9	28,9	360
10	20,3	105136
11	35,5	4
12	33,4	13
13	31,6	58
14	34,3	10
15	31,05	86
16	24,03	9070
17	17,11	886824
18	28,0	654
19	28,7	411
20	23,6	11821
21	31,17	80
22	33,9	13
23	27,26	1068
24	30,8	150
25	29,1	315
26	22,14	31709
27	31,14	81
28	29,5	228
29	31,4	67
30	33,08	22
31	29,8	198
32	27,7	803
33	27,2	1096
34	30,1	160
35	28,7	411
36	31,7	70
37	36,3	3
38	32,6	50
39	27,44	948
40	31,5	63
41	30,32	140
42	31,3	58
43	20,2	100000
44	34,9	5

10) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINI, H.T.; RYSCHKEWITSCH, C.F.; STONER, G.L.. Genotype profile of human polyomavirus JC excreted in urine of immunocompetent individuals. *J. Clin. Microbiol.*, v. 34, p.159- 164, 1996.

AGOSTINI, H.T.; YANAGIHARA, R.; DAVIS, V.; RYSCHKEWITSCH, C.F.; STONER, GL. Asian genotypes of JC virus in native 101aulo101e101101 and in a pacific island population: markers of viral evolution and human migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 94, p. 14542- 14546, 1997a.

AGOSTINI H.T., RYSCHKEWITSCH C.F., BRUBAKER G.R., SHAO J., STONER G.L. Five complete genomes of JC virus type 3 from Africans and African Americans.. *Arch Virol* v.142 p. 637- 655, 1997b.

AGOSTINI H.T., RYSCHKEWITSCH C.F., STONER G.L. JC virus type 1 has multiple subtypes: three new complete genomes. *J. Gen. Virol.*, v.79 p. 801- 805, 1998.

AGOSTINI H.T., SHISHIDO-HARA Y., BAUMHEFNER R.W., SINGER E.J., RYSCHKEWITSCH C.F., STONER G.L. JC virus type 2: definition of subtypes based on DNA sequence analysis of ten complete genomes. *J. Gen. Virol.*, v.79, p. 1143- 1151, 1998.

AGOSTINI H.T., DUCKHUT A., JOBES D.V., GIRONES R., SCHLUNCK G., PROST M.G., FRIAS C., TRALLER E.P., RYSCHKEWITSCH C.F., STONER G.L. Genotypes of JC virus in East, Central and Southwest Europe. *J. Gen. Virol.*, v. 82, p. 1221- 1331, 2001.

AKSAMIT A.J., SERVER J.L., MAJOR E.O. Progressive multifocal leukoencephalopathy: JC virus detection by in situ hybridization compared with immunohistochemistry. *Neurology*, v. 36, p. 499-504, 1986.

AMEMIYA K., TRAUB R., DURHAM L., MAJOR E.. Interaction of a nuclear factor-1-like protein with the regulatory region of the human polyomavirus JC virus. *J. Biol. Chem.*, v. 264, p. 7025- 7032, 1989.

ANTINORI A., AMMASSARI A., DE LUCA A.. Diagnosis of AIDS-related focal brain lesions: A decision-making analysis based on clinical and neuradiologic characteristics combined with polymerase chain reaction assays in CSF. *Neurology*, v. 48, p. 687-694, 1997.

ANTINORI A., AMASSARI A., GIANCOLA M.L., CINGOLANI A., GRISETTI S., MURRI R., ALBA L., CIANCIO B., SOLDANI F., LARUSSA D., IPPOLITO G., DE LUCA A. Epidemiology and prognosis of AIDS-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in the HAART era. *J. Neurovirol.* v. 7, p. 323-8, 2001.

ANTINORI A., AMASSARI A., LUZZATI R., CASTAGNA A., MASERATI R. Role of brain biopsy in the management of focal brain lesions in HIV-infected patients. *Neurology*, v. 54, p. 993- 997, 2000.

ANTINORI A., CINGOLANI A., LOREZINI P. Clinical epidemiology and survival of progressive multifocal leukoencephalopathy in patients treated with highly active antiretroviral therapy data from the Italian Registry Investigate Neuro AIDS (IRINA). *J. Neurovirol.* v. 9 (Suppl. 1), p. 47-53, 2003.

ARTHUR R.R., SHAH K.V., BAUST S.J. Association of BK viruria with hemorrhagic cystitis in recipients of bone marrow transplants. *N. Engl. J. Med.*, v. 315, p. 230- 234, 1989.

ARTHUR R.R. BK and JC virus infection in recipients of bone marrow transplants. *J. Infect. Dis.*, v. 158, p. 563-569, 1988.

ARTHUR R.R., DAGOSTIN S., SHAH K.V. Detection of BK virus and JC virus in urine and brain tissue by the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, v. 27, p. 1174-1179, 1989.

ASTROM K.E., MANCALL E.L., RICHARDSON E.P. Jr. Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *Brain*, v. 81, p. 93-127, 1958.

AULT G.S., STONER G.L. Two major types of JC virus defined in progressive multifocal leukoencephalopathy brain by early and late coding region DNA sequences. *J Gen Virol* 73 (Pt 10):2669-2678, 1992

BAROUCH D H, HARRISON S. C. Interactions among the major and minor coat proteins of polyomavirus. *J. Virol.*, v. 68, p. 3982- 3989, 1994.

BEDRI J., WEINSTEIN W., De GREGORIO, VERITY M. A. Progressive multifocal leukoencephalopathy in acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.*, v. 309, p. 492- 493, 1983.

BERGER J.R., KASZOVITZ B., DONOVAN POST J., DICKINSON G. Progressive Multifocal Leukoencephalopathy associated with human immunodeficiency virus infection. *Ann. Int. Med.*, v. 107, p. 78-87, 1987.

BERGER J.R.; CONCHA M. Progressive Multifocal Leukoencephalopathy: the evolution of a disease once considered rare. *J. Neurovirol.*, v. 1, p. 5-18, 1995.

BERGER J.R., LEVY R.M., FLOMENHOFT D., DOBBS M. Predictive factors for prolonged survival in acquired immunodeficiency syndrome associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann. Neurol.*, v. 44, p. 341-349, 1998.

BERGER J.R. & MAJOR E.O. Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *Semin. Neurol.*, v. 19, p. 193-200, 1999.

BERGER J.R., CHAUHAN A., GALEY D., NATH A. Epidemiological evidence and molecular basis of interactions between HIV and JC virus. *J. Neurovirol.*, v. 7, p. 329-338, 2001.

BERGER J.R. Progressive multifocal leukoencephalopathy in acquired immunodeficiency syndrome explaining the high incidence and disproportionate frequency of the illness relative to others immunosuppressive conditions. *J. Neurovirol.*, v 9, suppl 1, p. 38-41, 2003.

BERGER J.R. Progressive multifocal leukoencephalopathy. *Handbook of Clinical Neurology* v. 85, p. 169- 183, 2007.

BLAKE K., PILLAY D., KNOWLES W., BROWN DW., GRIFFITHS P.D., TAYLOR B. JC virus associated meningoencephalitis in an immunocompetent girl. *Arch Dis Child* v. 67, p. 956 –957, 1992.

BLUM L.W., CHAMBERS R.A., SCHWARTZMAN R.J., STRELATZ L.J. Progressive multifocal leukoencephalopathy in acquired immune deficiency syndrome. *Arch. Neurol* v. 42, p. 137- 139, 1985.

BOFILL-MAS S., PINA S., GIRONES R. Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Appl. Environm. Microbiol.*, v. 66, p. 238- 245, 2000.

BOFILL-MAS S., FORMIGA-CRUZ M., CLEMENTE-CESARES., CALAFEL F., GIRONES R. Potential transmission of human polyomavirus through the gastrointestinal tract after exposure to virions or viral DNA. *J. Virol* v. 75, p.10290- 10299, 2001a.

BOFILL-MAS S. & GIRONES R. Excretion and transmission of JCV in human populations. *J. Neurovirol.*, v. 7, p. 345- 349, 2001b.

BOSSOLASCO S. et al. Prognostic significance of JC virus DNA levels in cerebrospinal fluid of patients with HIV-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Clin Infect Dis* 40(5):738-744, 2005

BROOKS B.R. & WALKER D.L. Progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurol. Clin.*, v. 2, p. 299- 313, 1984.

BROWN P., TSAI T., GAJDUSEK G.D. Seroepidemiology of human papovaviruses: discovery of virgin populations and some unusual patterns of antibody prevalence among remote people of the world. *Am. J. Epidemiol* v. 102, p. 331- 340, 1975.

CAVANAUGH J.B., GREENBAUM D., MARSHALL A. Cerebral demyelination associated with disorders of reticuloendothelial system. *The Lancet* v. 2, p. 524-529, 1959.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION 1993. Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance of definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, v. 41, p. 1- 4, 1992.

CHAISSON R.E. & GRIFFIN D.E. Progressive multifocal leukoencephalopathy in aids. *JAMA*, v. 264, p. 79- 82, 1990.

CHANG C.F., TADA H., KHALILI K.. The role of a pentanucleotide repeat sequence, AGGGAAGGGA, in the regulation of JC virus DNA replication. *Gene* v. 148, p. 309- 314, 1994.

CHANG H., WANG M., TSAI R.T., LIN H.S., HUAN J.S., WAN W.C., CHANG D. High incidence of JC viruria in JC seropositive older individuals. *J. Neurovirol* v. 8, p. 447- 51, 2002.

CHAPAGAIN M.L., NGUYEN T., BUI T., VERMA S., NERURKAR V.R. Comparison of real-time PCR and hemagglutination assay for quantitation of human polyomavirus JC. *Virology* 3:3, 2006.

CHESTERS P.M., HERITAGE J., McCANCE J. Persistence of DNA sequences of BK virus and JC virus in normal human tissues and in diseased tissues. *J. Infect. Dis* v. 147, p. 676- 683, 1983.

CHIMA S.C., AGOSTINI H.T., RYSCHKEWITSCH C.F., LUCAS S.B., STONER G.L. Progressive multifocal leukoencephalopathy and JC virus genotypes in West African patients with acquired immunodeficiency syndrome: a pathologic and DNA sequence analysis of 4 cases. *Arch Pathol Lab Med* 123(5):395-403, 1999.

CHIMA S.C., RYSCHKEWITSCH C.F., FAN K.J., STONER G.L. POLYOMAVIRUS JC genotypes in an urban United States population reflect the history of African origin and genetic admixture in modern African Americans. *Hum Biol* 72(5):837-850, 2000.

CHOU Q., RUSSELL M., BIRCH D.E., RAYMOND J., BLOCH W. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Ac. Res.*, v. 20, p. 1717- 1723, 1992.

CHOWDHURY M, KUNDU M, KHALILI K. GA/GC-rich sequence confers Tat responsiveness to human neurotropic virus promoter, JCVL, in cells derived from central nervous system. *Oncogene*, v. 8, p. 887- 892, 1993.

CIAPPI S., AZZI A., DE SANTIS R., LEONCINI F., STERRANTINO G., MAZZOTA F., MECOCCHI L. Archetypal and rearranged sequences of human polyomavirus JC transcription control region in peripheral blood leukocytes and in cerebrospinal fluid. *J. Gen. Virol.*, v. 80, p. 1017- 1023, 1999.

CINQUE P., GIUDICI B., BOSSOLASCO S. The application of the polymerase chain reaction of cerebrospinal fluid in the clinical management of aids- related CNS disorders. *AIDS Patient Care and STDs* v. 12, p. 287-294, 1998.

CINQUE P., CASARI S., BERTELLI D. Progressive multifocal leukoencephalopathy, HIV and highly active antiretroviral therapy. *N. Engl. J. Med* v. 339, p. 848-9, 1998.

CINQUE P., KORALNIK I. J. & CLIFFORD D.B. The evolving face of human immunodeficiency virus-related progressive multifocal leukoencephalopathy: defining a consensus terminology. *J. Neurovirol* v. 9 (suppl. 1), p. 88-92, 2003.

CINQUE P., BOSSOLASCO S., BRAMBILLA A.M., BOSCHINI A., MUSSINI C., PIEROTTI C., CAMPI A., CASARI S., BERTELLI D., MENA M., LAZZARIN A. The effect of highly active antiretroviral therapy-induced immune reconstitution on development and outcome of progressive multifocal leukoencephalopathy: study of 43 cases with review of the literature. *J. Neurovirol* v.9 (suppl. 1), p. 73– 80, 2003 .

COBB J.J., WICKENDEN C., SNELL M.E., HULME B., MALCOM A.D.B., COLEMAN D.V. Use of hybridot assay to screen for BK and JC polyomavirus in non- immunosupressed patients. *J. Clin. Pathol* v. 40, p. 777- 781, 1987.

COLEMAN D.V., WOLFENDALE M.R., DANIEL R.A., DHANJAL N.K., GARDNER S.D., GIBSON P.E., FIELD A.M. A prospective study of human polyomavirus in pregnancy. *J. Infect. Dis.*, v. 142, p. 1- 8, 1980.

DANG X. & KORALNIK I.J. A granule cell neuron-associated JC virus variant has a unique deletion in the VP1 gene. *J. Gen. Virol* v. 87, P. 2533–2537, 2006.

DANIEL D.C., WORTMAN M.J., SCHILLER R.J., LIU H., GAN L., MELLEN J. S., CHANG C.H. Coordinate effects of human immunodeficiency virus type 1 protein Tat and cellular protein Pur α on DNA replication initiated at the JC virus origin. *J. Gen. Virol.*, v. 82, p. 1543- 1553, 2001.

DANIEL R., SHAH K., MADDEN D., STAGNO S. Serological investigation of the possibility of congenital transmission of papovavirus JC. *Infec. Immun* v. 33, p. 319- 321, 1981.

Del VALLE L, CROUL S, MORGELLO S, ZMINI S, RAPPAPORT J, KHALILI K. Detection of HIV-1Tat and JCV capsid protein, VP1, in AIDS brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurovirol.*, v. 6, p. 221-228, 2000.

De VIEDMA D.G., ALONSO R., MIRALLES P. Dual qualitative-quantitative nested PCR for detection of JC virus in cerebrospinal fluid: high potential for evaluation and monitoring of progressive multifocal leukoencephalopathy in aids patients receiving highly active antiretroviral therapy. *J. Clin. Microbiol.*, v. 37, p.724- 728, 1999.

DENINGER P.L., ESTY A., LAPORTE P., HSU H., FRIEDMANN T. The nucleotide sequence and restriction enzyme sites of the polyoma genome. *Nucleic Acids Res* 8(4):855-860, 1980.

DELBUE S., BRANCHETTI E., BERTOLACCI S., TAVAZZI E., MARCHIONI E., MASERATI R. et al. JC virus VP1 loop-specific polymorphisms are associated with favorable prognosis for progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurovirol* 15(1):51, 2009.

DORRIES K. & ter MEULEN. Progressive multifocal leucoencephalopathy: detection of papovavirus JC in kidney tissue. *J. Med. Virol.*, v. 11, p. 307-317, 1983.

DOLEI A., PIETROPAOLO V., GOMES E., DI TARANTO C., ZICCHEDDU M., SPANU M.A., LAVORINO C., MANCA M., DENEGER A.M.. Polyomavirus persistence in lymphocytes: prevalence in lymphocytes from blood donors and healthy personnel of a blood transfusion center. *J. Gen. Virol.*, v. 81, p.1967- 1973, 2000.

DRUMMOND A.J., RAMBAUT A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* v 7, p. 214, 2007.

DUBOIS V., DUTRONC H., LAFON M.E., POINSOT V., PELLEGRIN J.L., RAGNAUD J.M., FERRER A.M., FLEURY H.J.A. Latency and reactivation of JC virus in peripheral blood of human immunodeficiency virus type 1-infected patients. *J. Clin. Microbiol.*, v. 35, p. 2288- 2292, 1997.

DUBOIS V., MORET H., LAFON M.E., BRODARD V., ICART J., RUFFAULT A et al. JC virus genotypes in France: molecular epidemiology and potential significance for progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Infect Dis* 183(2):213-217, 2001.

DU PASQUIER RA & KORALNIK IJ. Inflammatory reaction in progressive multifocal leukoencephalopathy: harmful or beneficial? *J. Neurovirol.*, v. 9(suppl 1), p. 25–31, 2003.

ELFAITOURI A., HAMMARIN A.L., BLOMBERG J. Quantitative real-time PCR assay for detection of human polyomavirus infection. *J Virol Methods* 135(2):207-213, 2006.

ELPHICK G.F., QUERBES W., JORDAN J. A., GEE G.V., EASH S., MANLEY K., DUGAN A., STANIFER M., BHATNAGAR A., KROEZE W. K., ROYH B. L., ATWOOD W. J. The human polyomavirus, JCV, uses serotonin receptors to infect cells. *Science* v. 306, p. 1380-1383, 2004.

ELSNER C. & DÖRRIES K. Evidence of human polyomavirus BK and JC infection in normal brain tissue. *Virology*, v.191, p. 72- 80, 1992.

FIELDS VIROLOGY POLYOMAVIRUS Editors: Knipe, David M.; Howley, Peter M. *Fields Virology*, 5th Edition, 2007 Lippincott Williams & Wilkins

FERRANTE P., MEDIATI M., CALDARELLI-STEFANO R., LOSCIALE L., MANCUSO R., CAGNI A.E. et al. Increased frequency of JC virus type 2 and of dual infection with JC virus type 1 and 2 in Italian progressive multifocal leukoencephalopathy patients. *J Neurovirol* 7(1):35-42, 2001.

FERRANTE P., DELBUE S., PAGANI E., MANCUSO R., MARZOCCHETTI A., BORGHI E. et al. Analysis of JC virus genotype distribution and transcriptional control region rearrangements in human immunodeficiency virus-positive progressive multifocal leukoencephalopathy patients with and without highly active antiretroviral treatment. *J Neurovirol* 9 Suppl 1:42-46, 2003.

FINK M.C.D., PENALVA DE OLIVEIRA A.C., MILAGRES F.A., VIDAL J.E., PICERNO-POUZA A.F., DUARTE NETO A., PANNUTI C.S. JC virus DNA in cerebrospinal fluid samples from Brazilian AIDS patients with focal brain lesions without mass effect. *J Infect* v. 52, p. 30-36, 2006.

FRISQUE R.J. Nucleotide sequence of the region encompassing the JC virus origin of DNA replication. *J Virol* 46(1):170-176, 1983.

FRISQUE R.J., BREM G.L., CANNELLA M.T. Human polyomavirus JC virus genome. *J. Virol* v. 51, p. 458- 469, 1984.

GARDNER S. D. Prevalence in England of antibody to human polyomavirus (BK). *Br. Med. J* v. 1, p. 77- 78, 1973.

GIBSON P.E., KNOWLES W.A., HAND J.F. Detection of JC virus DNA in the cerebrospinal fluid of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Med. Virol.*, v. 39, p. 278- 281, 1993.

GILDENBERG P.L., GATHE J.C., Jr., KIM J.H. Stereotactic biopsy of cerebral lesions in AIDS. *Clin Infect Dis* 30(3):491-499, 2000.

GILLESPIE S.M., CHANG Y., LEMP G. Progressive multifocal leukoencephalopathy in persons infected with human immunodeficiency virus, San Francisco, 1981-1989. *Ann. Neurol.*, v. 30, p. 597-604, 1991.

GORDON J., GALLIA G. L., DEL VALLE L., AMINI S., KHALILI K. Human polyomavirus JCV and expression of myelin genes. *J. Neurovirol.* Suppl 2, p. S92- S97, 2000.

GREENLE J.E. Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. Progress made and lessons relearned. *N. Engl. J. Med* v. 338, p. 1378-1380, 1998.

GRINNELL B.W., PADGETT B.L., WALKER D.L. Comparison of infectious JC virus DNAs cloned from human brain. *J. Virol* v. 45, p. 299- 308, 1983.

GUO J., KITAMURA T., EBIHARA H., SUGIMOTO C., KUNITAKE T., TAKEHISA J., NA Y. Geographical distribution of the human polyomavirus JC types A and B and isolation of a new type of Ghana. *J. Gen. Virol* v. 77, p. 919- 927, 1996.

GUO J., SUGIMOTO C., KITAMURA T., EBIHARA H., KATO A., GUO Z., LIU J. Four geographically distinct genotypes of JC virus are prevalent in China and Mongolia: implications for the racial composition of modern China. *J. Gen. Virol* v. 79, p. 2499- 2505, 1998.

HAMMARIN A.L., BOGDANOVIC G., SVEDHEM V. Analysis of PCR as a tool for detection of JC virus DNA in cerebrospinal fluid for diagnosis of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Clin. Microbiol* v. 34, p. 2929- 2932, 1996.

HAND R. Functions of T antigens of SV 40 and polyomavirus. *Bioch. Bioph. Acta* v. 651, p. 1- 24, 1981.

HATWELL J.N. & SHARP P.M. Evolution of human polyomavirus JC. *J. Gen. Virol* v. 81, p. 1191- 1200, 2000.

HOLMAN R.C., TÖRÖK T.J., BELAY E.D., JANSSEN R.S., SCHOENBERGER L.B. Progressive multifocal leukoencephalopathy in the United States, 1979-1994: increased mortality associated with HIV infection. *Neuroepidemiol* v. 6, p 303-309, 1988.

HOPPE B. L., CONTI-TRONCONI B. M. AND HORTON R.M. Gel-loading dyes compatible with PCR. *Biotech.*, v. 12, p. 679-680, 1992

HOUFF J. & MAJOR E.O. The efficacy of nucleoside analogs against JC virus multiplication in a persistently infected human fetal brain cell line. *J. Neurol* v. 4, p. 451-456, 1998.

HOUFF S.A., MAJOR E.O., KATZ D.A., KUFTA C.V., SEVER J.L. Involvement of JC virus infected mononuclear cells from the bone marrow and spleen in the pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy. *N. Eng. J. Med* v. 318, p. 301- 305, 1988.

JENSEN P.N. & MAJOR E.O. A classification scheme for human polyomavirus JCV variants based on the nucleotide sequence of the noncoding regulatory region. *J. Neurovirol.*, v. 7, p. 280- 287, 2001.

JOBES D.V., CHIMA S.C., RYSCHKEWITSCH G.F., STONER G.L.
Phylogenetic analysis of 22 complete genomes of the human polyomavirus JC virus. *J. Gen. Virol* v. 79, p. 2491- 2498, 1998.

JOBES D.V., FRIEDAENDER J.S., MGONE C.S., AGOSTINI H.T., KOKI G.,
YANAGIHARA R. New JC virus (JCV) genotypes from Papua New Guinea
and Micronesia (Type 8 and Type 2E) and evolutionary analysis of 32
complete JCV genomes. *Arch. Virol* v. 146, p. 2097- 2113, 2001.

KALILI K., RAPAPPORT J., KHOURY G. Nuclear factors in human brain
cells bind specifically to the JCV regulatory region. *EMBO J.*, v. 7, p. 1205-
1210, 1988.

KATZ D.A., BERGER J.R., HAMILTON B., MAJOR E.O., POST J.D.
Progressive Multifocal Leukoencephalopathy complicating Wiskott-Aldrich
syndrome. *Arch. Virol* v. 51, p. 422-426, 1994.

KAHAN A.V., COLEMAN D.V., KOSS L.G. Activation of human polyomavirus
infection – detection by cytologic technics. *Am. J. Pathol* v. 74, p. 326- 332,
1980.

KENNEY S., NATARAJAN V., STRIKE D., KHOURY G., SALTZMAN N. P. JC virus enhancer- promoter active in human brain cells. *Science*, v. 226, p.1337- 1339, 1984.

KITAMURA T., ASO Y., KUNIYOSHI N., HARA K., YOGO Y. High incidence of urinary JC virus excretion in nonimmunosuppressed older patients. *J. Infect. Dis* v. 161, p. 1128- 1133, 1990.

KITAMURA T., KUNITAKE T., GUO J., TOMINAGA T., KAWABE K., YOGO Y. Transmission of the human polyomavirus JC virus occurs both within the family and outside the family. *J. Clin. Microbiol* v. 32, p. 2359- 2363, 1994.

KORALNICK I.J., BORDEN D., MAI V.X., LORD C.I., LETVIN N.L. JC virus DNA load in patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurology* v. 52, p. 253-264, 1999.

KORALNIK I.J. New insights into progressive multifocal leukoencephalopathy *Curr Opin Neurol.*, v. 17, p 365-370, 2004.

KORALNIK I.J., WUTHRICH C., DANG X., ROTTNEK M., GURTMAN A., SIMPSON D., MORGELLO S. JC virus granule cell neuronopathy: a novel clinical syndrome distinct from progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann. Neurol.*, v. 57, p. 576 –580, 2005.

KRUPP L.B., LIPTON R.B., SWERDLOW M.L., LEEDS N.E., LLENA J. Progressive multifocal leukoencephalopathy: clinical and radiographic features. *Ann. Neurol.*, v. 17, p. 344- 349, 1985.

KUNITAKE T., KITAMURA T., GUO J., TAGUCHI F., KAWABE K., YOGO Y. Parent to child transmission is relatively common in the spread of the human polyomavirus JC virus. *J. Clin. Microbiol.*, v. 33, p.1448- 1451, 1995.

LEDNICK J.A., GARCEA R.L., BERGSAGEL D.J. Natural Simian virus 40 strains are present in human choroids plexus and ependymoma tumors. *Virology*, v. 212, p. 710-717, 1995.

LEDNICKY J.A., VILCHEZ R.A., KEITEL W.A., VISNEGARWALA F., WHITE Z.S., KOZINETZ C.A. et al. Polyomavirus JCV excretion and genotype analysis in HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 17(6):801-807, 2003.

LIU C.K., HOPE A.P., ATWOOD W.J. The human polyomavirus, JCV, does not share receptor specificity with SV 40 on human glial cells. *J. Neurol.*, v. 4, p. 49- 58, 1998a.

LIU C.K., WEI G., ATWOOD W.J. Infection of glial cells by the human polyomavirus JC is mediated by an N-linked glycoprotein containing terminal α (2-6)-linked sialic acids. *J. Virol.*, v. 72, p. 4643- 4649, 1998b.

LONDON W.T., HOUFF S.A., MADDEN D.L., FUCCILLO D.A., GRAVELL M., WALLEN W.C. et al. Brain tumors in owl monkeys inoculated with a human polyomavirus (JC virus). *Science* 201(4362):1246-1249, 1978.

MAJOR E.O., AMEMIYA K., TORNATORE C.S., HOUFF S.A., BERGER J.R. Pathogenesis and molecular biology of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain. *Clin. Microbiol. Reviews* v. 5, p. 49- 73, 1992.

MATSIOTA-BERNARD P., de TRUCHIS P., GRAY F., FLAMENT-SAILLOUR M., VOYATZAKIS E., NAUCIEL C. JC virus detection in the cerebrospinal fluid of aids 121aulo121e121 with progressive multifocal leukoencephalopathy and monitoring of the antiviral treatment by a PCR method. *J. Med. Microbiol.*, v. 46, p. 256- 259, 1997.

MARKOWITZ R.B., THOMPSON H.C., MUELLER J.F., COHEN J.A., DYNAN W.S. Incidence of BK virus and JC virus viruria in human immunodeficiency virus – infected and – uninfected subjects. *J Infect Dis* v. 167, p. 13-20, 1993.

MARTIN J.D., KING D.M., SLAUCH J.M., FRISQUE R.J. Differences in regulatory sequences of naturally occurring JC virus variants. *J Virol* 53(1):306-311, 1985.

MARZOCCHETTI A., Di GIAMBENEDETTO S., CINGOLANI A., AMMASSARI A., CAUDA R., DE LUCA A. Reduced rate of diagnostic positive detection of JC virus DNA in cerebrospinal fluid in cases of suspected progressive multifocal leukoencephalopathy in the era of potent antiretroviral therapy. *J Clin Microbiol* 43(8):4175-4177, 2005.

McGUIRE D., BARHITE S., HOLLANDER H. JC virus DNA in cerebrospinal fluid of human immunodeficiency virus infected patients: predictive value for progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann Neurol* v 37 p. 395- 399, 1995.

MELNICK J.L., ALLISON A.C., BUTEL J.S. *Papovaviridae. Intervirology* v 3 p.106-120, 1974.

McNEES A.L., WHITE Z. S., ZANWAR P., VILCHEZ R.A., BUTEL J.S. Specific and quantitative detection of human polyomaviruses BKV, JCV, and SV40 by real time PCR. *J Clin Virol* v 34, p. 52–62, 2005.

MILLER J., BARRET R., BRITTON C. Progressive Multifocal Leukoencephalopathy in a male homosexual with T-cell immune deficiency. *N Eng J Med* v 307 p. 1436-1438, 1982.

MONACO M.C.G., JENSEN P.N., HOU J., DURHAM L.C., MAJOR E.O.

Detection of JC virus DNA in human tonsil tissue: evidence for site of initial viral infection. *J. Virol* v 72, p. 9918- 9923, 1998.

MORET H., GUICHARD M., MATHERON S. Virological diagnosis of progressive multifocal leukoencephalopathy: detection of JC virus DNA in cerebrospinal fluid and brain tissue of aids patients. *J Clin Microbiol* v. 31, p. 3310- 3313, 1993.

MORI M., KURATA H., TAJIMA M., SHIMADA H. .JC virus detection by in situ hybridization in brain tissue from elderly patients. *Ann Neurol* v. 29, p. 428- 434, 1991.

NAGASHIMA K., YAMAGUCHI K., YASUI K., OGIWARA H. Progressive Multifocal Leukoencephalopathy – Neuropathology and Virus Isolation. *Acta Pathol Japan* v. 31, p. 953-961, 1981.

PADGETT B.L., ZURHEIN G., WALKER D.J. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. *The Lancet* v 1 p.1257-1260, 1971.

PADGETT B.L., WALKER D.J. Prevalence of antibodies in human sera against JC virus, an 123aulo123e from a case of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J. Infect. Dis.*, v.127, p. 467- 470, 1973.

PAGANI E., DELBUE S., MANCUSO R., BORGHI E., TARANTINI L., FERRANTE P. Molecular analysis of JC virus genotypes circulating among the Italian healthy population. *J Neurovirol* 9(5):559-566, 2003.

PAL A., SIROTA L., MAUDRUA T., PEDEN K., LEWIS A. M. Jr. Real-time, quantitative PCR assays for the detection of virus-specific DNA in samples with mixed populations of polyomaviruses. *J. Virol. Meth.* v135, p. 32–42, 2006.

PHO M.T., ASHOK A., ATWOOD W.J. JC virus enters in human glial cells by clathrin dependent receptor mediated endocytosis. *J. Virol* v. 74, p. 2288-2292, 2000.

PIETROPAOLO V, Di TARANTO C, DEGENER AM, JIN L, SINIBALDI L, BAIOCCHINI A et al. Transplacental transmission of human polyomavirus BK. *J Med Virol* 56(4):372-376, 1998.

POWER C., KONG P.A., CRAWFORD T.O., WESSELINGH S., GLASS J.D., McARTHUR J.C., TRAPP B.D. Cerebral white matter changes in acquired immunodeficiency syndrome dementia: alterations of the blood-brain barrier. *Ann Neurol* v 33, p. 339- 350, 1993.

POSADA D. & CRANDALL K.A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* v. 9, p. 817-8, 1998.

QUINLIVAN E.B., NORRIS M., BOULDIN T.W., SUZUKI K., MEEKER R., SMITH M.S., HALL C., KENNEY S. Subclinical central nervous system with JC virus in patients with aids. *J. Infect. Dis.*, v. 166, p. 80- 85, 1992.

RAJ G. & KHALILI K. Transcriptional regulation: lessons from the human neurotropic polyomavirus JCV. *Virology*, v. 213, p. 283- 291, 1995.

RAUSING A. & AXELSON U. Progressive Multifocal Leukoencephalopathy in Chronic Lymphatic Leukaemia – Caused by Polyoma Virus? *Scand J Haematol* v. 7, p. 184-194, 1970.

REMENICK J., RADONOVICH M.F., BRADY J.N. Human immunodeficiency virus Tat transactivation: induction of a tissue-specific enhancer in a nonpermissive cell line. *J Virol* v. 65, p. 5641- 5646, 1991.

RICCIARDIELLO L., LAGHI L., RAMAMIRTHAM P., CHANG C.L., CHANG D.K., RANDOLPH A.E., BOLAND R. JC virus DNA sequences are frequently present in the human upper and lower gastrointestinal tract. *Gastroenterol* v 119, p. 1228- 1235, 2000.

RICHARDSON E.P. Jr. Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *N Engl J Med* v. 265, p. 815-823, 1961.

RYSCHKEWITSCH C., JENSEN P., HOU J., FAHLE G., FISCHER S., MAJOR E.O. Comparison of PCR-southern hybridization and quantitative real-time PCR for the detection of JC and BK viral nucleotide sequences in urine and cerebrospinal fluid. *J. Virol. Meth.*, v. 121, p. 217–221, 2004.

SABATH B.F., MAJOR EO. Traffic of JC virus from sites of initial infection to the brain: the path to progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Infect Dis* 186 Suppl 2:S180-S186, 2002.

SAFAK M., BARRUCO R., DARBINYAN A., OKADA Y., NAGASHIMA K., KHALILI K. Interaction of JC 126aulo agnoprotein with T antigen modulates transcription and replication of the viral genome in glial cells. *J Virol* v. 75, p. 1476- 1486, 2001.

SCHAFFER K., SHEEHY N., COUGHLAN S., BERGIN C., HALL W.W. JC virus in the Irish population: significant increase of genotype 2 in immunocompromised individuals. *J Neurovirol* 12(1):39-46, 2006.

SERGEI L., KOSAKOVSKY P. & SIMON D. W. F. Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. *Bioinformatics* 2005 v. 10, p. 2531-2533, 2005.

SMALL J.A., SCANGOS G.A., CORK L., JAY G., KHOURY G. The early region of human papovavirus JC induces dysmyelination in transgenic mice. *Cell* v. 46, p.13-18, 1986.

SMITH T.F., ESPY M.J., MANDREKAR J., JONES M. F., COCKERILLF. R., PATEL R. Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction for Evaluating DNAemia due to Cytomegalovirus, Epstein-BarrVirus, and BK Virus in Solid-Organ Transplant Recipients. *C I D*, v. 45 p.1056–61, 2007

SOEDA E., MIURA K., NAKASO A., KIMURA G. Nucleotide sequence around the replication origin of polyoma virus DNA. *Febs Letters* v. 79, p. 383- 389, 1977.

STONER G.L., RYSCHKEWITSCH G.F., WALKER D.L. JC papovavirus large tumor (T) antigen expression in brain tissues of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and non-aids patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Proc. Nat Acad Sci USA* v 23, p. 2271-2275, 1986.

SUNYAEV S.R., LUGOVSKOY A., SIMON K., GORELIK L. Adaptive mutations in the JC virus protein capsid are associated with progressive multifocal leukoencephalopathy (PML). *PLoS Genet* 5(2):e1000368, 2009.

SUZUKI S., SAWA H., KOMAGOME R., ORBA Y., YAMADA M., OKADA Y., ISHIDA Y., NISHIHARA H., TANAKA S., NAGASHIMA K. Broad distribution of the JC virus receptor contrasts with a markers cellular restriction of virus replication. *Virology* v. 286, p.100- 112, 2001.

SWEET T.M., DEL VALLE L., KHALILI K. Molecular biology and immunoregulation of human neurotropic JC virus in CNS. *J Cel Physiol* v. 191, p. 249- 256, 2002.

TADA H., RAPPAPORT J., LASHGARI M.S., AMINI S., WONG-STAAAL, KHALILI K. Trans-activation of the later promoter by the tat protein of type 1 human immunodeficiency virus in glial cells. *Proc Nat Acad Sci USA* v. 87, p. 3479-3483, 1990.

TADA H., LASHGARI M.S., AMINI S. & KHALILI K. Regulation of JCV_L promoter function: evidence that a pentanucleotide “silencer” repeat sequence AGGGAAGGGA down regulates transcription of the JC virus late promoter. *Virology* v. 180, p. 327-338, 1991.

TAGUCHI F., NAGAKI D., SAITO M., HARUYAMA C., IWASAKI K., SUZUKI T. Transplacental transmission of BK virus in human. *J. Microbiol* v. 19, p. 395- 398, 1975.

TAGUCHI F., KAJIOKA J., MIYAMURA T. Prevalence rate and age of acquisition of antibodies against JC virus and BK virus in human sera. *Microbiol Immunol* v. 26, p.1057-1064, 1982.

TAGLIATI M., SIMPSON D., MORGELLO S., CLIFFORD D., SCHWARTZ R.L., BERGER J.R. Cerebellar degeneration associated with human immunodeficiency virus infection. *Neurology* v. 50, p. 244 –251, 1998.

TORNATORE C., BERGER J.R., HOUFF S.A., CURFMAN B., MEYERS K., WINFIELD D., MAJOR E.O. Detection of JC virus DNA in peripheral lymphocytes from patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann Neurol* v. 31, p. 455- 462, 1992.

THURNHER M.M., POST M.J., RIEGER A., KLEIBL-POPOV C., LOEWE C., Schindler E. Initial and follow-up MR imaging findings in AIDS-related progressive multifocal leukoencephalopathy treated with highly active antiretroviral therapy. *Am J Neuroradiol* v. 22, p. 977–984, 2001.

UNIAIDS. AIDS epidemic update: December 2007. Geneva, pp 1-15, 2007

VACANTE D.A., TRAUB R., MAJOR E.O. Extension of JC virus host range to monkey cells by insertion of a simian virus 40 enhancer into the JC virus regulatory region. *Virology* 170(2):353-361, 1989.

VAGO L., CINQUE P., SALA E., NEBULONI M., CALDARELLI R., RACCA S., FERRANTE P., TRABATTONI G., COSTANZI G. JCV-DNA and BKV-DNA in the CNS tissue and CSF of aids patients and normal subjects. Study of 41 cases and review of the literature. *J Acq Imm Defic Syndrome* v. 12, p. 139- 146, 1996.

VIDAL JE., PENALVA DE OLIVEIRA AC., FINK MCDS., PANNUTI CS., TRUJILLO JR Aids-related progressive multifocal leukoencephalopathy: a retrospective study in a referral center in são Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop* v 50, p. 209-212, 2008.

WALKER D.L., PADGETT B.L., ZU RHEIN G.M. Human papovavirus (JC): induction of brain tumor in hamsters. *Science* v. 181, p. 674- 676, 1973.

WEBER F., GOLDMAN C., KRÄMER M., KAUP F.J., PICKHARDT M., YOUNG P., PETRY H., WEBER T., LÜKE W. Cellular and humoral immune response in progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann Neurol* v. 5, p. 636-642, 2001.

WEI G., LIU C.K., ATWOOD W.J. JC virus binds to primary human glial cells, tonsillar stromal cells and B- lymphocytes, but not to T lymphocytes. *J. Neurovirol.* v. 6, p. 127- 136, 2000.

WHITE III F.A., ISHAQ M., STONER G.L., FRISQUE R.J. JC virus DNA is present in many human brain samples from patients without progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Virol* v. 66, p. 5726- 5734, 1992.

WHITEMAN M.L.H., POST M.J.D., BERGER J.R., TATE L.G., BELL M.D., LIMONTE L.P. Progressive multifocal leukoencephalopathy in 47 HIV seropositive patients: neuroimaging with clinical and pathologic correlation. *Radiology* v. 187, p. 233- 240, 1993.

YOGO Y., KITAMURA C., SUGIMOTO T., UEKI Y., ASO K., TAGUCHI F. Isolation of a possible archetypal JC virus DNA sequence from nonimmunocompromised individuals. *J Virol* v. 29, p. 2130-2138, 1990.

ZOLTICK P.W., MAYREDDY R.P.R., CHANG C.F., NORTHRUP B., KHALILI K., SCHWARTZMAN. Isolation and characterization of a type II JC virus from a brain biopsy of a patient with PML. *J Neurovirol* v. 1, p. 307- 315, 1995.

ZURHEIN G.M. Polyoma-like virions in a human demyelinating disease. *Acta Neuropathol* v. 8, p. 57-68, 1967.

ZHENG H.Y., TAKASAKA T., NODA K., KANAZAWA A., MORI H., KABUKI T. et al. New sequence polymorphisms in the outer loops of the JC polyomavirus major capsid protein (VP1) possibly associated with

progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Gen Virol* 86(Pt 7):2035-2045, 2005.

ZHENG H.Y., IKEGAYA H., TAKASAKA T., MATSUSHIMA-OHNO T., SAKURAI M., KANAZAWA I. et al. Characterization of the VP1 loop mutations widespread among JC polyomavirus isolates associated with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 333(3):996-1002, 2005.