LUIZ HENRIQUE DA SILVA NALI

**Investigação da reativação dos poliomavírus humanos JC e BK
em pacientes com Esclerose Múltipla (EM) sob tratamento com
Natalizumab e pacientes com EM sob outros tratamentos.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Dra. Camila Malta Romano

São Paulo

2013

Dedico essa dissertação aos meus pais **Luiz Nali** e **Magali Moreira**, à minha irmã **Bianca Nali**, às minhas tias **Monica Moreira** e **Valquíria Moreira**, à minha avó **Diva** e às minhas primas **Karina Ferreira** e **Thalita Ferreira**. Minha família que sempre me apoiou em todos os aspectos possíveis e imagináveis e que com toda certeza tiveram contribuição fundamental para o desenvolvimento dessa dissertação.

Dedico essa dissertação também à **Samia Iwai Cabral** (*in memoriam*), por ter me oferecido a oportunidade de conviver com uma das pessoas mais incríveis que pude r, pelo amor, pelo companheirismo, e principalmente por ter me mostrado que nenhum problema que possa aparecer na nossa vida deve servir de motivo para o desânimo. Um exemplo de vida saudades.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Claudio Sérgio Pannuti por abrir as portas do Laboratório de Virologia e depositar as fichas de confiança em minha pessoa, acreditando que eu seria capaz de iniciar e concluir esse trabalho.

À Dra. Camila Malta Romano pela paciência em lecionar praticamente todo conhecimento laboratorial e científico que possuo hoje, pela confiança, pelo incentivo, apoio e a motivação para atuar no mundo científico, pelo companheirismo e compreensão em momentos de dificuldade e principalmente pela excelência em minha orientação.

À Dra. Maria Cristina Domingues da Silva Fink, a minha segunda mãe, por me apresentar ao mundo Poliomavírus, por me pegar pela mão e ensinar os primeiros passos dentro da biologia molecular, por confiar no meu trabalho, e sem dúvida, por estar ao meu lado em momentos difíceis.

Aos meus pais Luiz Antonio Nali e Magali Moreira da Silva pelo extremo apoio, carinho e amor incondicional que sempre me forneceram, vocês são minha vida.

À minha irmã Bianca da Silva Nali pela grande amizade fraternal que temos construído e pela revisão do texto, eu te amo.

À minha madrinha e tia Monica, tia Valquíria, tia Rita, primas Thalita, Karina, Aline, Fernanda e minha avó Diva, minha família que sempre me incentivou.

Ao grupo de Neurociências do Instituto de Infectologia Emilio Ribas, em especial ao Dr. Augusto César Penalva de Oliveira pela oportunidade de participar das reuniões científicas que tanto geraram ideias interessantes para esse e outros trabalhos.

Ao Guilherme Sciascia Olival e à Dra Lenira Moraes pelo apoio nas coletas das amostras que fizeram parte desse estudo.

À mãe japa Laura Massami e à mãe loira Cynthia Canto pelo grande carinho e momentos de descontração.

Ao Dr. José Eduardo Levi e à Dra. Ligia Camara Pierrotti pelos valiosos comentários e sugestões no exame de qualificação.

À Dra. Clarisse Machado e Dr. Sabri Sanabani pelas valiosas sugestões durante as reuniões do laboratório.

Aos meus irmãos do laboratório Paulo Roberto Palma Urbano, Felipe Scassi Salvador, Cristiane de Campos Centrone, Cristina Mendes de Oliveira, Renato Reis de Oliveira e Michele Galhardoni Padovan, pelos momentos de descontração, discussões científicas e todo apoio que prestaram, obrigado por tudo.

Aos mais novos amigos e membros do *Camilas' team*, Cristina Nunes, Débora Gerhardt, Paulo Nasser e Giovana Caleiro, pelo carinho, amizade, risadas, discussões científicas e apoio na etapa final.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Virologia: Luciano, Renata, Toni, Carol Soares, Clara, Marli, Wilton, Silvia, Sonia, Aline, Luciana, Jaila, Sideny, Rodrigo, Carol Mamana, Lucy, Maria, Débora e Georgina pelo convívio no dia-a-dia do laboratório.

À Dra. Carla Torres Braconi pela enorme paciência e pelo enorme favor em me ensinar e auxiliar na etapa da clonagem e sequenciamento das amostras, muito obrigado.

Aos meus queridos amigos da APCD: Karla, Luiz Fernando, Rosana, Alessandra, Sandra, Juliana, Renato e Lourdes.

Aos meus amigos da minha cidade querida Guarulhos: Thiago, Fernando, Marcos, Ronaldo, Mauricio e Débora, sempre servindo como válvula de escape nos dias livres.

Ao Programa de Pós do IMT e à CAPES pela bolsa de estudos.

À todos os pacientes que cordialmente concordaram em participar desse estudo.

“Existe apenas um bem, o saber, e apenas um mal, a ignorância.”
Sócrates

RESUMO

Nali, LHS. Investigação da reativação dos poliomavírus humanos JC e BK em pacientes com Esclerose Múltipla (EM) sob tratamento com Natalizumab e pacientes com EM sob outros tratamentos. (dissertação). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2013.

A Esclerose Múltipla (EM) é uma doença autoimune caracterizada por um processo neuroinflamatório com degeneração axonal progressiva. O medicamento Natalizumab (Biogen Idec, NC, USA) representa hoje um dos tratamentos mais promissores para EM. Entretanto, pacientes sob esse tratamento possuem maiores chances de desenvolver Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva (LEMP), em decorrência de uma possível reativação do poliomavírus JC (VJC). Além do VJC, o poliomavírus BK (VBK) pode representar uma preocupação adicional para tais pacientes, uma vez que também apresenta capacidade de causar encefalopatias. Apesar do Natalizumab ser uma ótima ferramenta contra a EM, o fato de interagir de alguma maneira com os poliomavírus, em especial o VJC, impede que seja utilizado em larga escala. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi investigar os padrões de excreção e reativação dos VJC e VBK em pacientes com EM durante o tratamento com Natalizumab e comparar aos padrões observados em pacientes que se encontram sob outros tratamentos.

Amostras seriadas de sangue e urina foram coletadas e submetidas a testes de biologia molecular para detecção do vírus e caracterização molecular. Foram analisados 97 pacientes em diferentes tempos de acompanhamento. Não foi observada presença de poliomavírus no sangue de nenhum dos indivíduos analisados. Entretanto, 36% excretavam poliomavírus na urina em pelo menos uma das coletas, sendo que 21,7% excretavam VJC, 9,3% excretavam VBK e 5,1% excretavam ambos os poliomavírus. Não foi observada diferença entre as taxas de excreção urinária de poliomavírus entre pacientes que tratavam com Natalizumab (38,9%) e pacientes que sob outros tratamentos (34,5%), sendo que para o Grupo Controle (GC); 21,3%, 8,2% e 4,9% excretavam VJC, VBK e ambos os vírus, respectivamente e para o grupo Grupo Natalizumab (GN) 22,2%, 11,1% e 5,6% excretavam VJC, VBK e ambos os vírus, respectivamente. As análises moleculares da Região Regulatória do VJC revelaram sequências de característica arquetípica. A reconstrução filogenética de sequências do gene VP1 do VJC revelou predominância do genótipo 3 e do genótipo 1 para o VBK. Não foi observada diferença estatística da carga viral do VJC e do VBK entre os dois grupos. Foi detectada uma

mutação (E29G) na VP1 de uma paciente que apresentou alta carga viral do VJC. Do grupo GN, 14 apresentaram anticorpos para VJC, sendo que desses 58% apresentou excreção de VJC, 42% não apresentou excreção urinária, interessante uma paciente não apresentou anticorpos contra o VJC, mas apresentou excreção de VJC. Pode-se concluir principalmente que a detecção de anticorpos, concomitantemente com a investigação molecular do VJC poderá contribuir para uma melhor determinação da estratificação do risco de desenvolvimento de LEMP em indivíduos com EM sob tratamento com Natalizumab.

Descritores: JC vírus, BK vírus, Esclerose Múltipla, Natalizumab e reativação viral

ABSTRACT

Nali, LHS. Investigation of the reactivation of the human polyomavirus JC and BK in patients with Multiple Sclerosis (MS) under treatment with Natalizumab and in patients with MS under other treatments. (dissertation). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2012.

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease characterized by neuronal inflammatory process with progressive axonal degeneration. The drug Natalizumab (Biogen Idec, NC, USA) is today one of the most promising treatments for MS. However, patients undergoing this treatment have higher chances of developing progressive multifocal leukoencephalopathy (PML), due to a possible reactivation of the polyomavirus JC (VJC). Besides VJC, the BK polyomavirus (VBK) may represent an additional concern for such patients, since it also has ability to cause encephalopathies. Despite Natalizumab be a great tool against MS, the fact that drug some way may interact with polyomavirus, especially VJC, prevents it from being used on a large scale. Thus, aim of this study was to investigate the patterns of excretion and reactivation of VJC and VBK in MS patients during treatment with Natalizumab and compare the patterns observed in patients who are under other treatments.

Serial blood samples and urine were collected and submitted to molecular biology tests for virus detection and molecular characterization. Ninety seven patients were analyzed at different follow-up times. There was no polyomavirus DNA in the blood of none subjects analyzed. However, 36% of patients excreted polyomavirus in the urine in at least one of the samples, of those 21.7%, 9.3% and 5.1% excreted VJC, VBK and both polyomavirus, respectively. No difference was observed between the rates of urinary excretion of polyomavirus patients treated with Natalizumab (38.9%) and patients treated with other drugs (34.5%), for the Control Group (GC); 21.3%, 8.2% and 4.9 shed VJC, VBK and both viruses, respectively and for the Natalizumab Group (GN) 22.2%, 11.1% and 5.6% shed VJC, VBK and both viruses, respectively. Molecular analysis of the Regulatory Region of VJC revealed sequences similar to the archetype form of VJC. A phylogenetic reconstruction of the VP1 gene sequences revealed VJC predominance of genotype 3 and genotype 1 for VBK. There was no statistical difference in the viral load VJC and VBK between the two groups. It was detected a mutation (E29G) in VP1 of a patient who had a high viral load VJC, however the mutation disappeared after a few months of monitoring. Fourteen patients of GN had antibodies to VJC, and of these 58% had excretion VJC,

42% showed no urinary excretion, interestingly one patient had no antibodies against VJC but showed excretion of VJC. It can be concluded that mostly anti-VJC antibodies detection, concurrently with the VJC molecular research may contribute to a better determination of risk stratification for development of PML in patients with MS undergoing treatment with Natalizumab.

Descriptors: JC virus, BK virus, Multiple Sclerosis, Natalizumab, viral reactivation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EM	Esclerose Múltipla
SNC	Sistema Nervoso Central
OMS	Organização Mundial da Saúde
BHE	Barreira Hemato Encefálica
DMT	<i>Disease Modifying Therapy</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
VCAM1	Molécula de Adesão Vascular 1
LEMP	Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva
AgT	Antígeno tumoral grande
Agt	Antígeno tumoral pequeno
RR	Região regulatória
LCR	Líquido cefalorraquidiano
EMRR	Esclerose Múltipla remitente recorrente
VJC	Vírus JC
VBK	Vírus BK
SUS	Sistema Único de Saúde
GN	Grupo Natalizumab
GC	Grupo Controle
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
IMTUSP	Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo
PCR	Reação em cadeia da polimerase
UNG	Uracil-n-glicosilase
pb	Pares de bases
LB	Luria Bertani
PEG	Polietilenoglicol
SCI	Síndrome Clínica Isolada
EMSP	Esclerose Múltipla Secundariamente Progressiva
EMPP	Esclerose Múltipla Primariamente Progressiva
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
CMSP	Células mononucleares de sangue periférico

Lista de Figuras

Figura 1 - Imagem representativa da medula espinhal com lesões sem causa aparente. As áreas amareladas representam as placas descritas por Robert Carswell como lesões não identificadas.....	20
Figura 2 - Prevalência mundial da Esclerose Múltipla, determinada pelo número de casos/100.000 habitantes.....	23
Figura 3 - Representação do mecanismo de atuação do Natalizumab. O Natalizumab se liga a molécula de adesão VCAM-1, evitando assim a transmigração de linfócitos T através da BHE, e posterior inflamação.....	28
Figura 4 - Representação esquemática do poliomavírus BK e JC.....	30
Figura 5 - Representação esquemática da Região regulatória do VJC. 1) Representação da forma rearranjada do VJC, demonstrando as repetições de 98 pares de bases. 2) RR da primeira cepa isolada de VJC de paciente com LEMP. 3) Forma arquetípica do VJC, caracterizada por não conter repetições de 98 pares de bases, indicada pela linha pontilhada.....	32
Figura 6 - Fluxograma metodológico das amostras submetidas ao estudo.....	43
Figura 7 - Reação de PCR em Tempo Real para a determinação da curva padrão do VBK. (A) Diluições seriadas dos plasmídeos (B) Regressão linear da curva padrão das diluições seriadas.....	47
Figura 8 - Reação de PCR em Tempo Real para a determinação da curva padrão do VJC. (A) Diluições seriadas dos plasmídeos (B) Regressão linear da curva padrão das diluições seriadas.....	48
Figura 9 - Representação esquemática da localização dos <i>primers</i> utilizados na	

amplificação do gene VP1 do VJC.....51

Figura 10 - Carga viral média do poliomavírus JC nos indivíduos com EM. Em azul, os pacientes do GC e em vermelho, os pacientes do GN. Não foi observada diferença estatística entre os grupos ($p=0.576$).....66

Figura 11 - Carga viral média do poliomavírus VBK nos indivíduos com EM. Em azul, os pacientes do GC e em vermelho, os pacientes do GN. Não foi observada diferença estatística entre os grupos ($p=0.278$).....67

Figura 12 - Cromatogramas resultantes do sequenciamento da VP1 do VJC encontrado na urina de paciente com EM sob tratamento com Natalizumab. A linha em azul demonstra o sítio de aparecimento da mutação no nível nucleotídico.....69

Figura 13 - Cópias virais/ml nas amostras seriadas de urina. O gráfico demonstra cópias virais de JC/ml estimadas por meses de coleta. Tempo 0 corresponde a coleta antes do tratamento. Asteriscos indicam os meses onde a variante da VP1 foi encontrada.....70

Figura 14 - Reconstrução filogenética por máxima verossimilhança do vírus VJC dos pacientes com EM do GC (em azul), do GN (em vermelho) e sequências de referência (em preto) de diferentes genótipos. A reconstrução foi feita baseada no fragmento de aproximadamente 900 do gene VP1. Apenas valores de suporte de *bootstrap* maiores que 50 foram demonstrados na árvore.....72

Figura 15 - Reconstrução filogenética por máxima verossimilhança do vírus VBK dos pacientes com EM do GC (em azul), do GN (em vermelho) e sequências de referência (em preto) de diferentes genótipos. A reconstrução foi feita baseada no fragmento parcial do gene VP1 de 353 pb. Apenas valores de suporte de *bootstrap* maiores que 50 foram demonstrados na árvore.....75

Figura 16 - Representação esquemática do fluxograma proposto para o monitoramento dos pacientes com EM sob tratamento com Natalizumab para a melhor definição da estratificação de risco.....88

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Os diferentes poliomavírus e suas principais manifestações clínicas.....	29
Tabela 2 - Volumes e concentrações dos reagentes utilizados para amplificação dos seguintes genes virais: AgT, VP1 de ambos os vírus e da RR do VJC.....	44
Tabela 3 - <i>Primers</i> e Sondas utilizadas nas reações de PCR em Tempo Real.....	45
Tabela 4 - Volume e concentração dos reagentes utilizados para diferenciação do JC e BK das amostras positivas para AgT.....	46
Tabela 5 - Volume e concentração dos reagentes utilizados para amplificação do fragmento maior do gene VP1 do VJC.....	51
Tabela 6 - <i>Primers</i> utilizados nas reações de PCR convencional.....	52
Tabela 7 - Dados clínicos e demográficos dos pacientes com EM analisados no estudo.....	60
Tabela 8 - Excreção de poliomavírus na urina de pacientes com EM de ambos os grupos do estudo.....	61
Tabela 9 - Excreção de Poliomavírus JC e BK, ambos de acordo com o gênero dos indivíduos estudados.....	62
Tabela 10 - Excreção de poliomavírus VJC, eVBK de ambos os grupos nos pacientes com EM de acordo com diferentes grupos de faixa etária.....	62
Tabela 11 - Excreção de VBK e VJC na urina dos pacientes do grupo GN e GC em amostras submetidas ao acompanhamento (três ou mais coletas) com pelo menos uma coleta positiva. Legendas: C: Controle, Na: Natalizumab, J: amostra JC positiva, B:	

amostra BK positiva, N: amostra negativa, X: amostra não coletada, -: coletas onde o acompanhamento não foi realizado, *: pacientes com mais de 1 ano de tratamento.....64

Tabela 12 - Descrição da frequência genotípica do VJC dos grupos de estudo.....73

LISTA DE SÍMBOLOS OU FÓRMULAS

g:	Gravidade
°C:	Graus Celsius
µl:	Microlitros
ml:	Mililitros
%	Porcentagem
mm:	Milímetros
mg:	Miligramas
E:	Glutamato
G:	Glicina
ng:	Nanogramas
mM:	Mili molar
H ₂ O:	Fórmula da Água

Anexos

Anexo 1 - Comprovante de submissão do artigo submetido ao <i>Journal of NeuroVirology</i>	108
Anexo 2 - Carta de Aprovação do CEP do IMT do projeto de pesquisa.....	109
Anexo 3 - Carta de aprovação da CAPESQ do projeto de pesquisa.....	110
Anexo 4 - Exemplo do TCLE apresentado aos voluntários participantes do estudo.....	111
Anexo 5 - Ficha fornecida aos pacientes para coleta de dados demográficos.....	119

Sumário

1. Introdução	19
1.1 História da Esclerose Múltipla	19
1.2 Manifestações clínicas.....	21
1.3 Epidemiologia.....	22
1.4 Patogenia da Esclerose Múltipla	24
1.5 Tratamento	25
1.5.1 O Natalizumab.....	27
1.6 Classificação e estrutura genômica dos Poliomavírus.....	28
1.7 O Natalizumab e a LEMP	33
1.7.1 Estratificação de risco para desenvolvimento de LEMP em indivíduos sob tratamento com Natalizumab.	34
1.7.2 Natalizumab e o Poliomavírus BK.....	35
 2. Justificativa	 37
 3. Objetivos.....	 39
3.1 Objetivo principal	39
3.2 Objetivos específicos	39
 4. Metodologia.....	 40
4.1 Desenho do estudo.....	40
4.1.1 Pacientes.....	40
4.1.2 Critérios de Exclusão	41
4.1.3 Casuística	41
4.1.4 Aspectos Éticos	41
4.2 Logística laboratorial e Extração de DNA	42
4.3. Detecção do DNA viral	43
4.4 PCR em Tempo Real – Diferenciação entre VJC e VBK.....	45
4.4.1 Determinação das curvas padrão para análise de carga viral.	46

4.5 Caracterização molecular da VP1, do VJC e VBK.	49
4.6 Clonagem e caracterização da Região Regulatória do VJC	53
4.6.1 Produção de bactérias eletrocompetentes para transformação em plasmídeo...53	
4.6.2 Transformação das bactérias eletrocompetentes e extração do plasmídeo	54
4.7 Sequenciamento da região Regulatória e da VP1	55
4.8 Análises das sequências e reconstruções filogenéticas.....	56
4.9 Análises estatísticas.....	57
5. Resultados	58
5.1 Pacientes e dados demográficos.....	58
5.2 Excreção de BK e JC nas amostras de sangue e urina	60
5.6 Excreção e determinação da carga viral do JC e BK em amostras seriadas de urina	63
5.7 Determinação da Carga Viral (CV) do VJC e VBK.....	65
5.8 Excreção urinária de VJC e detecção de Anticorpos contra VJC	67
5.9 Caracterização molecular da VP1 e da RR de pacientes positivos para VJC..	68
5.10 Genotipagem do poliomavírus JC	71
5.11 Genotipagem do poliomavírus BK	74
6. Discussão	76
6.1 Dados demográficos dos pacientes com EM.....	76
6.2 Detecção do DNA dos poliomavírus nos pacientes com EM	77
6.3 Investigações moleculares dos poliomavírus encontrados nos pacientes com EM.	81
6.4 Anticorpos contra o VJC e correlação à excreção urinária.....	86
6.5 Perspectivas para o futuro dos pacientes com EM no Brasil.....	87
7. Conclusões	89
8. Referências	90

9. Anexos.....108**1. Introdução****1.1 História da Esclerose Múltipla**

Acredita-se que uma das primeiras descrições da Esclerose Múltipla (EM) tenha sido o caso Santa Ludwina, que viveu na Holanda no final do século XIV. Aos dezesseis anos, sofreu uma queda enquanto praticava esporte, a qual foi associada a sinais de fraqueza nos membros inferiores. A paciente apresentou vários episódios recorrentes de perda de equilíbrio, fraqueza, distúrbios visuais, sendo que esses eventos foram separados por períodos de remissão (Murray *et al.*, 2009a).

Outros relatos da EM no mundo foram descritos em meados do século XIX onde dois médicos europeus observaram manifestações clínicas incompatíveis com qualquer doença descrita anteriormente. A primeira demonstração foi apresentada por Robert Carswell, que em algumas de suas necropsias observou a presença de placas esbranquiçadas sem causa aparente nas regiões da medula e do cerebelo (Figura 1) revisado por (Murray *et al.*, 2009a; Murray *et al.*, 2009b).

Figura 1. Imagem representativa da medula espinhal com lesões sem causa aparente. As áreas amareladas representam as placas descritas por Robert Carswell como lesões não identificadas. (Fonte <http://special.lib.gla.ac.uk/exhibns/month/oct2003.html>, último acesso em 04/12/12).

Assim como Robert Carswell, Jean Cruveilhier também observou a ocorrência de placas no Sistema Nervoso Central (SNC) em necropsias de rotina, relatos estes datados na mesma época dos de Carswell. Porém, Jean Cruveilhier forneceu descrições clínicas de um dos casos, onde o paciente manifestou distúrbios visuais e fraqueza progressiva nos membros (Murray *et al.*, 2009a). Embora Cruveilhier descrevesse as condições clínicas do paciente, nenhuma correlação foi estabelecida entre os dados clínicos e as lesões encontradas.

A primeira correlação entre as lesões patológicas com os achados clínicos foi realizada por Von Freirichs em 1849, onde ele divulgou um relato de caso com

características muito similares aos da Esclerose Múltipla atuais. Posteriormente, um aluno de Von Freirichs descreveu dois casos com evolução em surtos e remissões e presença de sintomas cognitivos. Entretanto, a teoria de que as lesões cerebrais e medulares tivessem alguma relação com os achados clínicos não foi bem aceita (Murray *et al.*, 2009a). Posteriormente, em 1896, Jean-Martin Charcot compilou todos os dados clínicos, anatomopatológicos e histológicos disponíveis e forneceu o que veio a ser a descrição definitiva da EM, então chamada de *Sclérose en plaques* (revisado por (Compston *et al.*, 1999; Moreira *et al.*, 2002)).

A primeira descrição da doença no Brasil foi feita em 1923, no estado de Pernambuco, por Aluizio Marques. A paciente apresentava sintomas de formas clássicas da EM, como nistagmo, fala escandida, tremor intencional e paralisia espástica (revisado por (Tilbery *et al.*, 2004)).

1.2 Manifestações clínicas

A Esclerose Múltipla (EM) é caracterizada por lesões desmielinizantes em uma determinada variedade de tempo e espaço. Manifesta-se por sinais neurológicos e tem caráter evolutivo com manifestações clínicas sucessivas causadas por danos periódicos à mielina e aos axônios (Compston *et al.*, 2008; Noseworthy *et al.*, 2000).

A desmielinização do SNC pode ocorrer em qualquer região, entretanto, na maioria dos pacientes, os primeiros sintomas estão restritos geralmente às áreas periventriculares ou nervo óptico (Tilbery *et al.*, 2004). A doença pode se iniciar com sintomas neurológicos isolados (início monossintomático) ou por associação desses (início polissintomático). Na maioria dos casos, a doença inicia-se com um surto, geralmente de forma polissintomática. Os principais sintomas observados são:

paraparesias, distúrbios sensitivos, cerebelares, alterações oculomotoras e visuais, sintomas paroxísticos, sinal de Lhermitte, espasmos tônicos, nevralgia do trigêmeo, dores, disfunções esfincterianas e sexuais, síndromes neurocomportamentais, fadiga e fraqueza difusas (Tilbery *et al.*, 2004).

1.3 Epidemiologia

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima-se que cerca de 1,3 milhões de pessoas vivem com EM no mundo (disponível em: http://www.who.int/entity/mental_health/neurology/Atlas_MS_WEB.pdf, último acesso em 20/12/12) Com distribuição heterogênea, a prevalência pode variar de cinco casos/100.000 habitantes em áreas tropicais, até 200 casos/100.000 habitantes em áreas temperadas, em especial nos países do norte da Europa e da América do Norte (Milo *et al.*, 2010) (Rosati *et al.*, 2001).

Os dados epidemiológicos no Brasil são escassos, entretanto, é notório que o país apresenta uma baixa prevalência quando comparado com os países da Europa e América do Norte (Figura 2) (Callegaro *et al.*, 2001; Milo *et al.*, 2010). Um estudo realizado na cidade de São Paulo descreveu a prevalência da EM como sendo 15,1 casos/100.000 habitantes (Callegaro *et al.*, 2001). Outro estudo epidemiológico realizado em Belo Horizonte no estado de Minas Gerais relatou dados semelhantes aos do estado de São Paulo, onde a prevalência estimada por Lana-Peixoto e colaboradores foi de 18,1 casos/100.000 habitantes (Lana-Peixoto *et al.*, 2012). Também em Minas Gerais, na cidade de Uberaba, um estudo realizado por Ribeiro e colaboradores descreveu prevalência de 12,5 casos/100.000 habitantes (Ribeiro *et al.*, 2011). Contrastando com os

trabalhos anteriores, um estudo realizado na cidade de Recife, Pernambuco, descreveu prevalência de 1,36 casos/100.000 habitantes (Ferreira *et al.*, 2004).

Figura 2. Prevalência mundial da Esclerose Múltipla, determinada pelo número de casos/100.000 habitantes. Fonte: atlas MS.

A EM manifesta-se com maior prevalência em mulheres (Noseworthy *et al.*, 2000) e entre as etnias, afeta em sua maioria os caucasianos (Sumelahti *et al.*, 2002). Infelizmente, não há informações suficientes que expliquem a diferença de prevalência relacionada à etnia e gênero em indivíduos portadores de EM.

1.4 Patogenia da Esclerose Múltipla

O dano associado à mielina e aos axônios é produto de um processo complexo causado pela inflamação no Sistema Nervoso Central (SNC), resultando em graves características patológicas como a desmielinização e neurodegeneração (Lassmann *et al.*, 2007). Acredita-se que o desenvolvimento da doença inicia-se pela permissividade da barreira hemato-encefálica (BHE) migração de linfócitos T CD4+ e CD+8 através da mesma, o que em condições normais tais características não são frequentes (Owens *et al.*, 1995).

Durante o processo de dano inflamatório é possível observar que essas lesões possuem como característica principal o infiltrado de linfócitos T CD8+ e macrófagos, sendo que o dano contínuo à mielina está associado ao infiltrado de macrófagos e ativação das microglias. A invasão dessas células inflamatórias ocorre geralmente após os primeiros danos à mielina. Acredita-se que exista um tipo de reposta inflamatória completa, onde a resposta inicial seria composta por linfócitos T CD8+, ativação microglial e recrutamento de células T e B e macrófagos como consequência da destruição da mielina (revisado por (Lassmann *et al.*, 2012)) .

A autoimunidade é o fator determinante na patogenia da doença, entretanto os fatores que levam ao desenvolvimento dessa autoimunidade não estão elucidados. Nesse sentido, pesquisadores tentam estabelecer fatores de risco que possam contribuir para o melhor entendimento da patogênese da doença.

Um dos fatores de risco é a hereditariedade, uma vez que as chances de uma pessoa com parente próximo portador de EM desenvolver a doença é maior do que na população em geral (Compston *et al.*, 2008). Entretanto, somente a hereditariedade não

determina o desenvolvimento da doença. Assim, postula-se que fatores ambientais também contribuam para o desenvolvimento da EM.

Dentre os fatores ambientais mais estudados estão: agentes infecciosos (Cook *et al.*, 1995; Kurtzke *et al.*, 2001; Murray *et al.*, 2009a), exposição a certas substâncias químicas, tais como os componentes do amálgama (Casetta *et al.*, 2001) , compostos presentes no cigarro (Hedstrom *et al.*, 2009; Wingerchuk *et al.*, 2012) e níveis baixos de vitamina D (Holmoy *et al.*, 2012; Runia *et al.*, 2012).

Tomados em conjunto, esses dados levam à conclusão de que a EM trata-se de uma doença multifatorial, que resulta na interação de um conjunto de determinantes, envolvendo susceptibilidade genética e fatores ambientais (Milo *et al.*, 2010).

1.5 Tratamento

A forma aguda da EM é normalmente tratada com altas doses de corticosteróides intravenosos, como metilprednisona. Embora esse tipo de tratamento seja capaz de diminuir a duração da recidiva, ele não é eficaz a longo prazo. Já a utilização de interferons implica em outro tipo de terapia, conhecida como modificadoras do curso da doença (DMTs, do inglês *disease –modifying therapies*). Estas são eficazes em aumentar o tempo entre os relapsos e diminuir o acúmulo de novas lesões. Dentre os mais utilizados estão o IFN β -1a Avonex© (Biogen Idec, North Carolina, USA) e Rebif© (EMD Serono, Geneva, Switzerland). Entretanto, a eficácia terapêutica desses medicamentos é apenas parcial e, além dos efeitos colaterais e questões práticas da administração da droga, a redução da progressão da doença e de novos surtos é inferior a de certas terapias a base de anticorpos monoclonais existentes (Lanzillo *et al.*, 2011).

O Fingolimod (Novartis, Basel, Suíça) é um dos mais novos medicamentos do grupo das DMTs. Este foi o primeiro medicamento de via oral aprovado pelo *Food and*

Drug Administration (FDA) em 2010 para o tratamento da Esclerose Múltipla. Seu mecanismo consiste em interferir na transmigração de linfócitos T e B entre órgãos linfóides e o sangue. Por diminuir a cinética de egresso de linfócitos pró-inflamatórios para o sangue, previne a entrada dos mesmos no SNC, reduzindo então a inflamação (Brinkmann *et al.*, 2009). Um estudo que avaliou a eficácia terapêutica do Fingolimod descreveu redução de surtos superior do que o grupo placebo (Kappos *et al.*, 2010). Entretanto, entre os efeitos adversos desse medicamento incluem: edema macular, dor de cabeça, hipertensão, náuseas e bradicardia sintomática (Faber *et al.*, 2012; Ontaneda *et al.*, 2012).

Os Imunossupressores, por sua vez, também são muito utilizados para o tratamento da EM, sendo a Azatioprina (GlaxoSmithKline, Middlesex, United Kingdom) um dos mais utilizados. Entretanto, terapias à base de imunossupressores podem levar os pacientes a uma maior vulnerabilidade a infecções por diferentes agentes. É importante considerar que o efeito terapêutico da Azatioprina na redução de novos surtos e na progressão da doença é semelhante ao tratamento à base de IFN β (Etemadifar *et al.*, 2007).

Um dos mais novos métodos terapêuticos para o tratamento da progressão e da ocorrência de novos surtos em pacientes com EM são baseados em anticorpos monoclonais. Dentre eles, os principais são: (i) Rituximab (Biogen Idec, North Carolina, USA), que é antagonista à molécula α -CD20 dos linfócitos B e também utilizado para tratamento de artrite reumatoide (Agarwal *et al.*, 2011) e doença linfo-proliferativa causada pelo EBV (Ganne *et al.*, 2003; Worth *et al.*, 2011); (ii) Alemtuzumab (Bayer HealthCare, Leverkusen, German), anticorpo antagonista a molécula CD52 expressos na superfície dos linfócitos B e T. Este, porém está associado a uma série de efeitos colaterais graves como trombocitopenia idiopática púrpura, com registro de dois casos

fatais, e um caso de glomeronefrite, que resultou na necessidade de transplante. Em virtude disso, o Alemtuzumab foi descontinuado para tratamento com EM (revisado por (Kieseier *et al.*, 2010); e (iii) o Natalizumab (Biogen Idec, North Carolina, USA).

1.5.1 O Natalizumab

Natalizumab é uma das mais novas e promissoras terapias desenvolvidas para conter novos surtos e a progressão da EM, sendo a primeira terapia baseada em anticorpo monoclonal aprovada para o tratamento da doença. Consiste em um anticorpo monoclonal humanizado contra a integrina $\alpha4\beta1$, uma subunidade de moléculas de adesão expressa na superfície de linfócitos T. O medicamento é capaz de interagir com a molécula de adesão vascular-1 (VCAM1), outra molécula de adesão celular presente na membrana das células endoteliais, evitando assim a transmigração dos linfócitos T através da BHE. Os anticorpos dirigidos para essa integrina agem bloqueando a interação entre os leucócitos e as células endoteliais, atenuando assim os efeitos inflamatórios (Yednock *et al.*, 1992) (Figura 3). Um estudo incluindo 942 pacientes com EM, mostrou que o Natalizumab foi capaz de reduzir em 68% os relapsos e em 42% o risco de progressão da doença (Polman *et al.*, 2006). O Natalizumab foi aprovado em 2004 pelo FDA (Kachuck *et al.*, 2005), mas retirado em 2005 quando alguns pacientes sob tratamento desenvolveram Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva (LEMP), causada pela reativação do poliomavírus JC após alguns meses de tratamento.

Nature Reviews | Drug Discovery

Figura 3. Representação do mecanismo de atuação do Natalizumab. O Natalizumab se liga a molécula de adesão VCAM-1, evitando assim a transmigração de linfócitos T através da BHE, e posterior inflamação. Fonte: (Noseworthy *et al.*, 2005)

1.6 Classificação e estrutura genômica dos Poliomavírus

Inicialmente, os poliomavírus foram classificados como membros da família *Papovaviridae* junto com os papilomavírus. Entretanto, em 2000, o Comitê Internacional de Taxonomia Viral, oficialmente dividiu esses dois vírus em duas famílias, sendo elas *Papillomaviridae* e *Polyomaviridae* (Van Regenmortel M *et al.*, 2000). Existem até hoje sete poliomavírus humanos descritos na literatura com manifestações clínicas diferentes, associado a diferentes sistemas do organismo (Tabela 1).

Tabela 1. Os diferentes poliomavírus e suas principais manifestações clínicas.

Poliomavírus	Principais Manifestações	Referência
	Clínicas	
JC	Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva	(Padgett <i>et al.</i> , 1971)
BK	Cistite Hemorrágica, estenose de ureter, nefropatia associada ao BK	(Fishman <i>et al.</i> , 2002; Gardner <i>et al.</i> , 1973; Hilton <i>et al.</i> , 2008; Rajpoot <i>et al.</i> , 2007)
SV40	Atividades oncogênicas em camundongos*	(Girardi <i>et al.</i> , 1962)
WU	Quadros Respiratórios	(Gaynor <i>et al.</i> , 2007)
KI	Quadros Respiratórios	(Allander <i>et al.</i> , 2007)
<i>Merkel cell</i>	Câncer de células Merkel	(Feng <i>et al.</i> , 2008)
TSV	Tricodisplasia Espinulosa	(van der Meijden <i>et al.</i> , 2010)

*Não há relatos de cânceres causados pelo SV40 em humanos.

Os poliomavírus humanos JC e BK, dois dos principais vírus da família *Polyomaviridae* de importância médica, são endêmicos na população, com soro prevalência em adultos saudáveis e com EM que com mais de 50% para pelo menos um desses vírus (Antonsson *et al.*, 2010; Bozic *et al.*, 2011; Brown *et al.*, 1975; Egli *et al.*, 2009; Gardner *et al.*, 1973; Kean *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2010; Trampe *et al.*, 2012). Após a primo-infecção, os poliomavírus migram para os rins, onde adquirem característica de latência. No decorrer da vida de um indivíduo imunocompetente, esses vírus podem ser excretados na urina, sem quaisquer complicações para a saúde dos indivíduos, sendo que a viremia é um evento raro (Egli *et al.*, 2009).

Os poliomavírus são não envelopados com capsídeo icosaédricos de 40 a 45 nm de diâmetro. Seu genoma possui aproximadamente 5.130 pares de bases (pb), composto por uma dupla fita de DNA circular ligado a histonas celulares H2A, H2B, H3, H4 (Frisque *et al.*, 1984). Os genomas do VBK e do VJC, podem ser dividido em três regiões, sendo elas: a região precoce codificadora, que codifica os antígenos tumorais grande (AgT) e pequeno (Agt); a região codificadora tardia, que codifica as três principais proteínas do capsídeo VP1, VP2, VP3 e a agnoproteína não estrutural; e a região regulatória (RR), não codificadora, que contém os promotores virais e a origem da replicação (Imperiale MJ *et al.*, 2007). O capsídeo viral é composto de 72 pentâmeros, cada um contendo cinco moléculas de VP1 e uma molécula de VP2 ou VP3 (Figura 4) (Imperiale MJ *et al.*, 2007; Liddington *et al.*, 1991).

Figura 4. Representação esquemática do poliomavírus BK e JC. Fonte: (Imperiale MJ *et al.*, 2007)

Segundo (Frisque *et al.*, 1984), os genomas do VJC e VBK possuem uma similaridade no nível nucleotídico de aproximadamente 75% entre si. O gene do AgT é o mais conservado em ambos os poliomavírus, e por essa razão, essa região é bastante utilizada como alvo para fins de diagnóstico (Arthur *et al.*, 1989; Delbue *et al.*, 2008; Fink *et al.*, 2006; Tan *et al.*, 2009).

A VP1 é a maior das três moléculas do capsídeo. Essa também é responsável pela ligação do vírus à membrana do hospedeiro, e seus epítomos são os únicos expostos entre as moléculas que compõem o capsídeo. A VP1 é responsável pela indução da resposta imunológica, e em laboratório, é muito útil para a genotipagem das cepas do VJC (Fink *et al.*, 2010; Stoner *et al.*, 1986). Adicionalmente, a VP1 do VJC encontrado em casos com LEMP apresenta mutações não sinônimas, diferentemente do que é encontrado na urina de pacientes sem LEMP, essas mutações aparentemente não exercem um papel direto na ligação na região de ligação de siálico, um dos principais sítios de ligação do VJC (Liu *et al.*, 1998), entretanto são frequentemente encontradas em casos de LEMP, demonstrando uma forte relação entre o aparecimento dessas mutações com a LEMP (Gorelik *et al.*, 2011; Sunyaev *et al.*, 2009).

A RR do VJC possui duas formas conhecidas com características biológicas distintas: a forma arquetípica, que é altamente conservada e encontrada em vírus excretados na urina de indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos (Yogo *et al.*, 1990); e a forma rearranjada, que leva esse nome pelo fato de que durante a replicação viral, pode sofrer rearranjos e duplicações de determinadas sequências que a compõe, os chamados *tandem repeats* (Figura 5). Acredita-se que os vírus que possuem sua RR na forma rearranjada possuem maior neurovirulência em relação àqueles com a forma arquetípica, estando diretamente ligada a reativação nos casos de LEMP, e em menor frequência, em reativações assintomáticas do VJC (Chen *et al.*, 2009; Daniel *et al.*, 2001). Acredita-se ainda que, por ser uma região muito variável, a caracterização de determinados tipos de mutações presentes na RR do vírus de pacientes com LEMP pode ser útil como prognóstico da doença (Pfister *et al.*, 2001). Em pacientes imunodeprimidos e com LEMP, a viremia é comum, e a região regulatória dos vírus no sangue, no líquido e principalmente nos oligodendrócitos é a mesma (Chen *et al.*, 2009; Pfister *et al.*, 2001),

muito embora a relação entre viremia e LEMP não estejam totalmente elucidada. O VBK também apresenta as duas formas de RR, sendo que a forma rearranjada também pode ser associada ao desenvolvimento de nefropatias (Gosert *et al.*, 2008).

Figura 5. Representação esquemática da Região regulatória do VJC. 1) Representação da forma rearranjada do VJC, demonstrando as repetições de 98 pares de bases. 2) RR da primeira cepa isolada de VJC de paciente com LEMP. 3) Forma arquetípica do VJC, caracterizada por não conter repetições de 98 pares de bases, indicada pela linha pontilhada. Fonte: (Marzocchetti *et al.*, 2008)

Em virtude das características moleculares peculiares de ambos os vírus, em que algum momento durante a replicação viral adquirem novas características consideradas mais patogênicas, optou-se pela utilização do termo 'reativação', no decorrer da dissertação como sendo quaisquer mudanças encontradas na RR que se assemelham com as características rearranjadas frequentemente encontradas nos casos de LEMP. Além disso, uma vez que a literatura utiliza o termo 'reativação' no caso de o DNA viral estar presente em fluídos como sangue ou líquido cefalorraquidiano (LCR), essas características também foram consideradas como casos de reativação. Isso é devido ao fato de que o vírus comumente encontrado na urina não é associado a doença, e dificilmente possui a RR rearranjada. Já a viremia e a presença do vírus no LCR é frequentemente acompanhada de rearranjos na RR, e a presença do vírus nesses fluídos

pode decorrer tanto de migração como de 'reativação viral de formas presentes em linfócitos ou mesmo no SNC (Tan *et al.*, 2010). Portanto, tanto a primeira quanto a segunda abordagem foram utilizadas mesmo na ausência de qualquer sintoma clínico, sendo interpretada então como reativação assintomática, abordagem semelhante à adotada por (Chen *et al.*, 2009).

1.7 O Natalizumab e a LEMP

A LEMP trata-se de doença desmielinizante do sistema nervoso central (SNC), geralmente fatal. A confirmação do VJC como agente etiológico da LEMP foi determinada através de microscopia eletrônica e posterior isolamento a partir do tecido cerebral de um indivíduo com linfoma de Hodgkin que veio a desenvolver LEMP (Padgett *et al.*, 1971). As principais características da LEMP é a desmielinização, astrócitos gigantes com aspecto bizarro e hipertrofia nuclear nos oligodendrócitos (Astrom *et al.*, 1958).

Os dois primeiros casos de LEMP associados ao Natalizumab foram descritos em 2005 (Kleinschmidt-DeMasters *et al.*, 2005; Langer-Gould *et al.*, 2005). O Natalizumab foi então retirado do mercado, porém em virtude do grande benefício que proporcionava aos pacientes com EM, foi reintroduzido em 2006 sob um rígido programa de controle, o qual estabelecia exigências para sua utilização. Exigências estas incluíram sua aplicação apenas como monoterapia, e somente em pacientes que apresentam as formas relapso-remitentes (EMRR) da doença (Biogen *et al.*, 2006). No entanto, mesmo com as restrições de uso, nos últimos três anos o número de casos de LEMP cresceu rapidamente. Em junho de 2010 haviam sido descritos 27 casos (Sadiq *et al.*, 2010), em novembro do mesmo ano esse número subiu para 75, e quase um ano depois, em

setembro de 2011, o número de casos de LEMP associados ao Natalizumab chegou a 133 (Kappos *et al.*, 2011). A última atualização disponível em maio de 2012 relatou 242 casos de LEMP associados ao Natalizumab (Kleinschmidt-DeMasters *et al.*, 2012). Frente a isso, a prevalência de LEMP em indivíduos que recebem o Natalizumab está em torno de 1:1000 revisado por (Kappos *et al.*, 2011).

Além da problemática da LEMP nesses indivíduos, o VJC aparentemente pode ser reativado de forma assintomática em pacientes com EM sob tratamento com Natalizumab. Chen e colaboradores observaram que após 18 meses de tratamento, a frequência do DNA do VJC no plasma subiu de 0 para 20% em amostras de plasma e de 0 para 60% das amostras de sangue periférico de pacientes com EM ($p= 0.02$). Principalmente, foi possível observar nas amostras de urina a presença de VJC com características rearranjadas semelhantes às encontradas nos indivíduos com LEMP (Chen *et al.*, 2009).

1.7.1 Estratificação de risco para desenvolvimento de LEMP em indivíduos sob tratamento com Natalizumab.

Apesar da grande restrição para a utilização do Natalizumab, o número de casos de LEMP em pacientes com EM sob esse tratamento é preocupante. Em vista disso, tornou-se necessário estabelecer parâmetros de estratificação dos pacientes para o risco de desenvolvimento de LEMP (Bloomgren *et al.*, 2012; Laroni *et al.*, 2012; Sorensen *et al.*, 2012; Tur *et al.*, 2012).

A primeira ferramenta disponível para classificar os pacientes em maior ou menor risco de desenvolvimento de LEMP foi o teste sorológico para JCV (Gorelik *et al.*, 2010). Considerando que o VJC é o principal fator limitante para o uso do Natalizumab, essa ferramenta é muito útil para indivíduos não infectados pelo VJC. Desde então, alguns

grupos adotaram a sorologia de VJC para determinar o risco para desenvolvimento de LEMP em suas respectivas coortes de pacientes (Bozic *et al.*, 2011; Trampe *et al.*, 2012; Warnke *et al.*, 2012). Entretanto, como o VJC é altamente prevalente na população e possui um processo peculiar de reativação, somente a avaliação qualitativa não parecia ser suficiente. Assim, a dosagem de anticorpos por titulação também foi utilizada para a busca de uma possível relação entre quantidade de anticorpos circulantes e o prognóstico para o desenvolvimento da LEMP (Trampe *et al.*, 2012).

Outros fatores ainda, aliados ou não a sorologia, também foram considerados para estratificação de risco em pacientes sob tratamento com Natalizumab. Um estudo que correlacionou a excreção urinária de VJC com a presença de anticorpos contra o VJC encontrou 5,4% pacientes que não possuíam anticorpos anti-VJC mas apresentavam DNA de VJC na urina. Embora essa discrepância seja provavelmente relacionada à sensibilidade do teste sorológico, enfatiza a importância de uma segunda ferramenta para a identificação de indivíduos infectados pelo VJC e, conseqüentemente, para a análise da estratificação de risco dos mesmos (Laroni *et al.*, 2012).

1.7.2 Natalizumab e o Poliomavírus BK

O VBK tem grande importância médica, especialmente para pacientes receptores de medula e rins, que por estarem em condição de considerável imunossupressão, podem reativar o VBK e manifestar uma série de doenças do sistema excretor, incluindo cistite hemorrágica (Fishman *et al.*, 2002) estenose de ureter (Rajpoot *et al.*, 2007), e nefropatia associada ao VBK (Hilton *et al.*, 2008). Além das doenças do sistema urinário, foi descrito um caso de um paciente HIV+ que veio a desenvolver encefalopatia associada ao VBK (Vidal *et al.*, 2007). Entretanto, as causas pelas quais esse vírus que está

intimamente relacionado a doenças do sistema excretor venha a causar doenças neurológicas, são desconhecidas.

Devido ao grande impacto provocado pela reativação do VJC em pacientes recebendo Natalizumab, alguns estudos foram realizados no sentido de investigar a reativação do VBK sob as mesmas condições. Um desses estudos investigou a presença do VJC e do VBK no líquido e plasma de 200 pacientes com EM sob o tratamento com Natalizumab e observaram a presença do DNA do VBK no líquido de cinco pacientes (Sadiq *et al.*, 2010). Outro grupo pesquisou a presença do DNA do VBK no plasma de 54 pacientes com EM sob tratamento com a droga, e o encontraram em 12 pacientes (Lonergan *et al.*, 2009).

2. Justificativa

Os tratamentos tradicionais para a EM são apenas moderadamente efetivos, oferecendo uma redução da frequência de novos surtos e na progressão da doença de apenas 20% a 30%, para os pacientes em estágios iniciais. O Natalizumab é uma ferramenta nova e eficaz disponível para o tratamento da EM, sendo capaz de reduzir os relapsos em até 68%. Entretanto, em virtude da sua aparente capacidade de reativar o vírus JC, o uso do Natalizumab intriga as comunidades médica e científica. Assim, após sua reintrodução no mercado em 2006, o Natalizumab é apenas indicado para utilização como monoterapia e em pacientes com a forma remitente recorrente da doença. Dados mais recentes descreveram uma prevalência de LEMP em indivíduos sob tratamento com Natalizumab próxima de 1:1000. Devido a esse fator, muitos médicos solicitam avaliação sorológica para a confirmação da infecção pelo VJC como uma forma de estratificar os pacientes com EM que estariam sob maior risco de desenvolverem LEMP. Entretanto, a presença de IgG para VJC no sangue não tem sido considerado um fator preditivo confiável, devido a alta prevalência do vírus na população e as chances de um indivíduo vir a desenvolver LEMP.

Além do VJC, o VBK também sofre reativações em condições de tratamento com o Natalizumab, sem que, no entanto, saibamos as possíveis consequências. Infelizmente, existem poucos estudos detalhados a respeito das consequências das reativações virais, e os mecanismos relacionados a essas reativações, em pacientes com EM sob o tratamento prolongado. O Natalizumab foi aprovado para utilização no Brasil em 2011 sendo que o medicamento é custeado pelo Sistema Único de Saúde (SUS). Assim, o número de pacientes com EM que são tratados com Natalizumab tem aumentado constantemente no país. Considerando também a alta prevalência dos VJC e VBK na população, informações acerca dos efeitos desse medicamento na reativação desses vírus são

essenciais para a definição de protocolos que permitam sua ampla utilização. Além disso, uma vez que os pacientes tratados com Natalizumab podem apresentar reativações assintomáticas, a caracterização molecular da RR e da VP1 do VJC presente na urina e no sangue pode ser útil para uma melhor compreensão dos processos patogénicos nesses pacientes. Além disso, informações mais detalhadas acerca das características moleculares dos vírus encontrados na urina poderão ser importantes para o monitoramento adequado dos indivíduos, com a vantagem de ser menos invasivo e detectar a presença de variantes antes mesmo do aparecimento de viremia. Finalmente, a investigação periódica da reativação dos poliomavírus no sangue e urina desses pacientes fornecerá subsídios para estratificação de risco dos pacientes portadores desses vírus, e que estejam sob tratamento com o Natalizumab.

3. Objetivos

3.1 Objetivo principal

O objetivo principal desse trabalho foi investigar, durante um período de até 12 meses, o perfil de excreção urinária e quaisquer indícios de reativação dos poliomavírus humanos JC e BK no sangue de pacientes com EM sob tratamento com Natalizumab, em comparação com indivíduos com EM sob outros tratamentos.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar a frequência de excreção urinária dos poliomavírus nos pacientes com EM;
- Caracterizar a VP1 e a RR do VJC nos pacientes com EM;
- Estimar a carga viral do VJC e do VBK presentes nos indivíduos;
- Contribuir com uma ferramenta para determinação da estratificação de risco para o desenvolvimento de LEMP em pacientes que recebem Natalizumab.

4. Metodologia

4.1 Desenho do estudo

O presente trabalho foi baseado em estudo de coortes prospectivo. Entretanto, em virtude de haverem poucos indivíduos em tratamento regular com Natalizumab, optou-se por utilizar uma amostragem de conveniência.

4.1.1 Pacientes

Foram selecionados adultos de ambos os sexos, diagnosticados com Esclerose múltipla por critérios clínicos e de imagem, e atendidos em regime ambulatorial nos centros participantes do estudo (Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo e do Hospital das Clínicas de São Paulo). Esses pacientes foram divididos em dois grupos.

- (i) Grupo Natalizumab (GN) - Pacientes sob tratamento com Natalizumab;
- (ii) Grupo Controle (GC) - Pacientes sob tratamento com outras drogas.

Adicionalmente a divisão dos grupos, os voluntários foram convidados a preencher um questionário contendo as seguintes informações: idade, gênero, auto classificação étnica, escolaridade, tipo da EM e medicamentos atuais. Alguns médicos solicitaram, aos pacientes do GN testes sorológicos para detecção de IgG anti-VJC. Esse teste é custeado pela empresa fabricante do medicamento e o resultado é enviado ao médico responsável pelo paciente. Dessa forma, esses dados foram cordialmente cedidos pelo grupo de pesquisadores do Hospital das Clínicas de São Paulo.

4.1.2 Critérios de Exclusão

Foram excluídos do estudo os indivíduos portadores do vírus HIV, pacientes submetidos à quaisquer procedimentos de transplante e voluntários que possuíssem outras doenças neurológicas.

4.1.3 Casuística

Para a análise da frequência e possíveis reativações dos poliomavírus VJC e VBK, foram realizadas coletas mensais de urina e sangue de pacientes do Grupo Natalizumab (GN). As coletas de pacientes com EM sob tratamento com Interferons e imunossupressores (GC) foram realizadas em intervalos trimestrais pelas seguintes razões: a- Não há relatos na literatura de que pacientes sob esse tipo de tratamento venham a desenvolver quaisquer tipos de doença associada com nenhum dos poliomavírus avaliados nesse estudo. b- Para garantir a periodicidade das coletas e adesão ao protocolo da pesquisa, o programa de acompanhamento desses pacientes foi desenhado com base nos retornos trimestrais ao ambulatório para avaliação clínica.

4.1.4 Aspectos Éticos

Os pacientes participaram de forma voluntária e apenas foram incluídos no estudo após preenchimento do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 3). As amostras encaminhadas ao laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo (IMTUSP) foram identificadas por letras e números preservando assim sua identidade.

4.2 Logística laboratorial e Extração de DNA

As amostras de sangue foram devidamente identificadas e em seguida, separadas em duas alíquotas em tubos de 1,5ml. Por último, do sangue total restante, foi feita a separação do plasma através de centrifugação a 12.000g por 10 minutos, e também acondicionadas em tubos de 1,5ml. Todas as amostras foram estocadas em freezers -80°C até o momento de sua utilização.

A extração do DNA viral das amostras de sangue, plasma e urina foram realizadas através do *kit* comercial *QIAmp mini blood*, (Qiagen, Alemanha) e *NucleoSpin Blood*, (MN, Alemanha), conforme instruções do fabricante. A extração do DNA com os *kits* conta com a utilização de colunas de sílica, onde o DNA se liga de forma iônica. Após a ligação na coluna, as mesmas foram lavadas com tampão de lavagem contendo altas concentrações de sal e etanol, e o DNA já livre de proteínas e restos celulares, foi posteriormente eluído com tampão de eluição, que por possuir baixas concentrações de sal, permite a quebra das ligações iônicas entre a sílica e o DNA. Depois de extraídas, as amostras foram submetidas às análises moleculares, como se segue descrito resumidamente no fluxograma abaixo (Figura 6).

Figura 6. Fluxograma metodológico das amostras submetidas ao estudo.

4.3. Detecção do DNA viral

Para a investigação da presença de DNA dos Poliomavírus foi realizada inicialmente uma PCR em caráter de triagem, utilizando *primers* genéricos e complementares a região precoce, comum aos Poliomavírus e altamente conservada, o AgT. O protocolo adotado foi o descrito por (Arthur *et al.*, 1989) e posteriormente padronizado por (Fink *et al.*, 2006). Os volumes e concentrações da reação estão descritos na tabela 2.

Tabela 2. Volumes e concentrações dos reagentes utilizados para amplificação dos seguintes genes virais: AgT, VP1 de ambos os vírus e da RR do VJC.

Reagente	Volume	Concentração final
H ₂ O	18,1µl	
Tampão10X(50mM de KCl e 10mM de tris)	5µl	1X
dNTPs 2,5mM	4µl	0,2mM
MgCl ₂ (50mM)	1,5µl	1,5mM
<i>Primer Forward e Reverse</i> 10µM	1µl cada	0,2µM
Glicerol 57%	4µl	4,5%
Cresol Red 2,5µg/µl	5µl	0,25µg
<i>Taq</i> Polimerase 5U/µl	0,4µl	2U
DNA	10 µl	
Volume Total	50µl	

As condições de ciclagem para a amplificação do AgT foram as seguintes: 94°C por 10 minutos para denaturação inicial, seguido de 40 ciclos de 94°C por 1,5 minutos, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1minuto. Por fim, um passo de 72°C por 7 minutos foi adicionado para extensão final.

Após a ciclagem, a revelação dos produtos de PCR foi realizada através de eletroforese em gel de agarose corados com Brometo de Etídeo. Cerca de 4µl do produto de PCR foram aplicados em gel de agarose 1,5% e posteriormente submetidos à corrente de 100A. As amostras positivas deveriam apresentar fragmentos de 173 pares de bases (pb).

4.4 PCR em Tempo Real – Diferenciação entre VJC e VBK

Em caso de positividade no PCR destinado a amplificação do AgT, as amostras eram encaminhadas então para o PCR em Tempo Real para diferenciação entre VJC e VBK, bem como para a determinação da carga viral.

A técnica de PCR em Tempo Real permite observar os produtos sendo amplificados no decorrer da reação e com auxílio de uma curva padrão com concentrações conhecidas, podemos realizar a análise de carga viral bem como a sensibilidade diagnóstica e analítica do teste.

A diferenciação entre VJC e VBK das amostras positivas foi realizada através da técnica de PCR em Tempo Real de acordo com o sistema *TaqMan*[®], cujo protocolo adotado foi descrito por (Pal *et al.*, 2006). Essa diferenciação foi feita através de duas reações distintas, utilizando *primers* e sondas específicos para a região precoce codificadora dos VJC e VBK (AgT) (Tabela 3).

Tabela 3. *Primers* e Sondas utilizadas nas reações de PCR em Tempo Real.

Oligonucleotídeos	Sequência
<i>Forward</i> (VJC)	ATGTTTGCCAGTGATGATGAAAA
<i>Reverse</i> (VJC)	GGAAAGTCTTTAGGGTCTTCTACCTTT
Sonda (VJC)	AGGATCCCAACACTCTACCCACCTAAAAAGA
<i>Forward</i> (VBK)	GAAACTGAAGACTCTGGACATGGA
<i>Reverse</i> (VBK)	GGCTGAAGTATCTGAGACTTGGG
Sonda (VBK)	CAAGCACTGAATCCCAATCACAATGCTC

O volume e concentração dos reagentes utilizados nas reações de PCR em Tempo Real para JC e BK estão descritos na Tabela 4.

As condições de ciclagem do PCR em tempo Real foram as mesmas para JC e para o BK, como se segue: 50°C por 2 minutos para ativação da Uracil-n-glicosilase (UNG), 95°C por 10 minutos para ativação da *Taq gold* e denaturação inicial, seguido de 45 ciclos de 95°C por 15 segundos para denaturação da molécula de DNA e 60°C por 1 minuto para anelamento dos *primers* e extensão da molécula. A reação, assim como a leitura dos produtos amplificados foram realizados em equipamento Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System.

Tabela 4. Volume e concentração dos reagentes utilizados para diferenciação do JC e BK das amostras positivas para AgT.

Reagente	Volume	Concentração final
H ₂ O	6µl	
2X TaqMan Universal PCR Master Mix	12,5l	1X
<i>Primer Forward e Reverse</i> 10µM	0,5µl cada	0,2µM
Sonda 10µM	0,5µl	0,2µM
DNA	5µl	
Volume Total	25µl	

4.4.1 Determinação das curvas padrão para análise de carga viral.

A padronização dos testes para VJC e VBK bem como a determinação da curva padrão, da sensibilidade analítica e sensibilidade diagnóstica foram realizados por (Fink

et al., 2009) e Reis (dados não publicados), respectivamente. Os limites de detecção do PCR em tempo real para os vírus JC e BK são de 6.000 cópias/ml e 1.000 cópias/ml respectivamente (Figura 7 e 8).

Figura 7. Reação de PCR em Tempo Real para a determinação da curva padrão do VBK.

(A) Diluições seriadas dos plasmídeos (B) Regressão linear da curva padrão das diluições seriadas. Fonte: Reis, dados não publicados.

Figura 8. Reação de PCR em Tempo Real para a determinação da curva padrão do VJC.

(A) Diluições seriadas dos plasmídeos (B) Regressão linear da curva padrão das diluições seriadas. Fonte (Fink *et al.*, 2009)

4.5 Caracterização molecular da VP1 do VJC e VBK.

Após a identificação do vírus (VJC ou VBK), as amostras foram submetidas a ensaios de PCR convencional, dessa vez para a caracterização molecular dos mesmos. Esses ensaios utilizam *primers* complementares ao gene que sintetiza a proteína do capsídeo (VP1) do VJC ou do VBK.

Os protocolos utilizados foram baseados nos descritos por (Agostini *et al.*, 1997b) para o VJC e por (Jin *et al.*, 1993) para o VBK, como modificações, em todas as reações de PCR convencional foram adicionados Glicerol 57% e Cresol *Red* a mistura de reagentes. O Glicerol (57%) foi adicionado como um adjuvante para potencializar a amplificação das regiões ricas em ligações G-C (Chou *et al.*, 1992). O Cresol *Red* foi utilizado apenas como corante adicionado à mistura de PCR para posterior aplicação no gel de agarose (Hoppe *et al.*, 1992). As mesmas alterações foram utilizadas anteriormente por (Fink *et al.*, 2009).

Os volumes e concentrações dos reagentes utilizados nas reações de PCR dirigidas ao gene VP1 dos VJC e VBK foram idênticas às utilizadas para o AgT, descritos na Tabela 2, apenas alterando os *primers* utilizados (Tabela 6). As condições de ciclagem para amplificação do gene VP1 do VBK foram as seguintes: 95°C por 5 minutos para denaturação inicial, seguido de 45 ciclos de 95°C por 1 minuto, 63°C por 1, 5 minutos, 72°C por 1 minuto e 72°C por 10 minutos para extensão final. O tamanho do fragmento obtido a partir das amostras amplificadas foi de 353 pb.

As condições de ciclagem para amplificação do gene VP1 do VJC foram as

seguintes: 95°C por 5 minutos para denaturação inicial, seguido de 50 ciclos de 95°C por 1 minuto, 63°C por 1,5 minutos, 72°C por 1 minuto e 72°C por 10 minutos extensão final. O tamanho do fragmento obtido a partir das amostras amplificadas foi de 215pb.

Por razões explicitadas na introdução desse trabalho, e discutidas mais adiante no item “Discussão”, a caracterização molecular do VJC foi de fato, um dos focos principais desse estudo. Entretanto, a PCR comumente utilizada, e inicialmente adotada para amplificação e sequenciamento da VP1 amplifica um fragmento muito pequeno (215pb). Para fins de genotipagem, essa região é adequada. Mas, para um melhor entendimento das possíveis mutações presentes no gene dos vírus de pacientes com excreção e reativação viral, fez-se necessário o desenho de um novo protocolo. Assim, com o objetivo de obter um fragmento maior para caracterização mais completa do gene da VP1 do VJC, novos *primers* foram desenhados. Para isso, utilizou-se 30 sequências de referência disponíveis no banco de sequências GenBank, além de algumas sequências do VBK. A inclusão de sequências do VBK no alinhamento foi feita com o objetivo de assegurar que os oligos escolhidos somente amplificassem o VJC. As sequências foram alinhadas no programa ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) e o alinhamento foi analisado com auxílio do programa Se-Al (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/seal/>). Regiões com alto grau de conservação entre as sequências de VJC, e que gerariam um *amplicon* de tamanho adequado, portanto cobrindo a maior parte do gene VP1, foram escolhidas para a ancoragem dos oligos. Para garantir a amplificação do maior número de amostras possíveis, um segundo par de *primers*, mais interno, foi desenhado. As posições referentes ao gene dos novos *primers* desenhados estão descritos na Figura 9.

Figura 9. Representação esquemática da localização dos *primers* utilizados na amplificação do gene VP1 do VJC.

Inicialmente, a combinação 88_F e 990_R foi utilizada, gerando um *amplicon* de tamanho aproximado de 900pb. Para o caso de ausência de fragmentos visíveis em gel de agarose nessa primeira etapa, as amostras resultantes eram submetidas a *PCR-nested*, dessa vez utilizando a segunda combinação de *primers* mais internos (108_F e 888_R). Os volumes e concentrações dos reagentes utilizados foram idênticas em ambas as reações (tabela 5).

Tabela 5. Volume e concentração dos reagentes utilizados para amplificação do fragmento maior do gene VP1 do VJC.

Reagente	Volume	Concentração final
H ₂ O	12,8µl	
Tampão10X(50mM KCl e 10mM tris)	2,5 µl	1X
dNTPs 2,5mM	1µl	0,1mM
MgCl ₂ (50mM)	1,5µl	3mM
<i>Primer Forward e Reverse</i> 10µM	1µl	0,1mM
<i>Taq</i> Polimerase 5U/µl	0,2µl	1U
DNA	5µl	
Volume Total	25µl	

As condições de ciclagem para amplificação do fragmento de 900 pb do gene da VP1 foram as seguintes: 95°C por 10 minutos para denaturação inicial, seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 50°C por 40 segundos, 72°C por 1 minuto e 72°C por 7 minutos para extensão final. Para a amplificação do fragmento de 780 pb do gene da VP1 as condições foram semelhantes às iniciais, alterando apenas a temperatura de anelamento que por sua vez foi de 55°C por 40 segundos.

Para amplificação da RR do VJC utilizou-se os *primers* descritos por Pfister (Pfister *et al.*, 2001), com modificações. Adotou-se concentrações idênticas às utilizadas na amplificação dos genes AgT e VP1 (Tabela 2), e as condições de ciclagem para amplificação de fragmento de aproximadamente 400 pb foram as seguintes: 94°C por 10 minutos para denaturação inicial, seguido de 40 ciclos de, 94°C por 30 segundos, 58°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e 72°C por 7 minutos para extensão final. Os primers utilizados em todas as reações de PCR convencional estão descritos na tabela 6.

Tabela 6. *Primers* utilizados nas reações de PCR convencional.

<i>Primers</i>	Região Viral	Sequência	Ref.
PEP1	AgT	AGTCTTTAGGGTCTTCTAC	(Arthur <i>et al.</i> , 1989)
PEP2	AgT	GGTGCCACCTATGGAACAG	
JCRS	RR (VJC)	ATTAGTGCAAAAAAGGGAAAAACAA GGG	(Pfister <i>et al.</i> , 2001)
JCRAS	RR(VJC)	CTCGGATCCAGCTGGTGACAAGCCA AAACAG	
88_F	VP1(VJC)	CTCAATGGATGTTGCCTTTAC	(Agostini <i>et al.</i> , 1997b)
108_F	VP1(VJC)	TGACTCAATTACAGAGGTAGAATG	
888_R	VP1(VJC)	AATTGGGTAGGGGTTTTTAACC	
990_R	VP1(VJC)	CCTCAAAAACCTCTAACCTCCTC	
JLP-15	VP1(VJC)	ACAGTGTGGCCAGAATTCACTACC	
JLP-16	VP1(VJC)	TAAAGCCTCCCCCAACAGAAA	
BKV1	VP1(VBK)	GAAGTTCTAGAAGTTAAACTGGG	
BKV2	VP1(VBK)	GTGGAAATTACTGCCTTGAATAGG	

4.6 Clonagem e caracterização da Região Regulatória do VJC

A RR do VJC é uma região variável que pode, além de apresentar-se de duas formas distintas (arquetípica e rearranjada), possuir pequenas deleções e inserções (*indels*) que interfeririam na leitura dos cromatogramas durante o sequenciamento por capilar. Logo, o sequenciamento direto dos produtos de PCR contendo a RR do VJC poderia fornecer resultados pouco satisfatórios. Portanto, uma abordagem que permitisse a identificação das duas formas da RR (quando presente) no sequenciamento fez-se necessária. Assim, para aqueles pacientes que mantivessem uma excreção urinária contínua do VJC, optou-se pela clonagem dos fragmentos amplificados.

Para amplificação da RR do VJC utilizou-se os *primers* descritos por Pfister (Pfister *et al.*, 2001). Para tanto, adotou-se concentrações idênticas às utilizadas na amplificação dos genes AgT e VP1 (Tabela 2). As condições de ciclagem para amplificação de fragmento de aproximadamente 400 pb foram as seguintes: 94°C por 10 minutos para denaturação inicial, seguido de 40 ciclos de, 94°C por 30 segundos, 58°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e 72°C por 7 minutos para extensão final.

4.6.1 Produção de bactérias eletrocompetentes para transformação em plasmídeo

Antes da realização da clonagem propriamente dita, foi necessário o preparo das bactérias para que se tornassem competentes (a receber o plasmídeo por transformação elétrica).

Para a etapa inicial de crescimento bacteriano, bactérias *E.coli* cepa DH5alpha não competentes foram inoculadas pelo método de esgotamento em placa de petri com meio Luria-Bertani (LB) solidificado e incubadas em estufa a 37°C por aproximadamente 18 horas. Após essa etapa, uma única colônia foi recolhida e inoculada em um frasco

contendo 50ml de meio LB líquido, a qual foi encaminhada novamente a estufa por 37°C por 16 horas, agora sob agitação a 200rpm. Após esse período, o meio contendo as bactérias foi transferido a um novo frasco contendo 1L de meio LB líquido, o qual foi novamente levado a estufa por 3 horas a 37°C sob agitação de 200 rpm. Em seguida, o meio com as bactérias foi transferido para garrafas estéreis e incubadas em gelo por 30 minutos para interromper o crescimento bacteriano.

Após o crescimento bacteriano, iniciou-se a lavagem e recuperação das bactérias. As bactérias foram centrifugadas a 2000g por 15 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 250ml de água milliQ gelada e estéril. Essa etapa foi repetida por mais uma vez. Após a segunda lavagem, as bactérias foram ressuspensas em 20ml de glicerol 10% gelado e estéril e novamente encaminhadas para a centrifugação, dessa vez a 4000g por 15 minutos a 4°C. Em seguida foram feitas alíquotas de 50µl em tubos de 1.5ml e as mesmas foram estocadas em *freezers* -80°C, até o momento da transformação.

4.6.2 Transformação das bactérias eletrocompetentes e extração do plasmídeo

Os produtos amplificados da RR foram inseridos em um vetor de clonagem pCR2.1 TOPO TA (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. Resumidamente o protocolo do fabricante sugere incubar por 1 hora a temperatura ambiente, 4 µl produto fresco de PCR com 1µl do vetor e 1µl de solução salina (concentração final 1:4). Após o processo de inserção dos fragmentos de RR no vetor, este foi inserido em bactérias eletrocompetentes *E. coli* da linhagem DH5alpha através de eletroporação.

Dois microlitros da ligação foram adicionados às bactérias eletrocompetentes, a mistura foi transferida para uma cuveta de 2mm, e receberam uma carga de 2.500V. Em

seguida, 250 µl de meio *Super Optimal Catabolite Repression* (SOC) foram adicionados às bactérias e estas foram incubadas a 37 °C por 1h. Após este período, 100µl da transformação foram plaqueados em meio LB sólido com ampicilina (50 µg/ml) e 40µl de X-gal (40 mg/ml) e incubado a 37 °C por 12-16h. Após esse período, as colônias brancas, portanto que continham o inserto, poderiam ser visualmente diferenciadas das azuis, que continham o vetor vazio circularizado. De cada placa foram picadas entre 10 e 25 colônias. Estas foram inoculadas em meio LB líquido com ampicilina (50 mg/µl), e incubadas a 37 °C por 16h para propagação. Para a extração dos plasmídeos utilizou-se o Gene Jet Plasmid Miniprep kit (Fermentas), seguindo as instruções do fabricante e encaminhadas para o sequenciamento.

4.7 Sequenciamento da região Regulatória e da VP1

Os produtos de PCR que não foram submetidos à clonagem foram purificados para a remoção de dímeros de *primers* e restos de tampão e enzima, utilizando um método baseado em precipitação com Polietileno Glicol (PEG). Este consiste em incubação do produto de PCR com PEG, em proporção 1:1, por 15 minutos a 37°C, seguido de duas lavagens com etanol 80% e por fim, ressuspensos em 20µl de H₂O milliQ. A quantificação dos produtos purificados utilizados para o sequenciamento foi realizada indiretamente por comparação com marcador de massa molecular *Low Mass Ladder* por eletroforese em gel de agarose. Para o sequenciamento, cerca de 10ng de DNA para cada 100 pb foram utilizados.

Os produtos de PCR purificados e quantificados foram adicionados a uma mistura contendo 4µl de *Ready Reaction Premix 2.5X*, 2 µl de *BigDye Sequencing Applied Biosystems* 3,2 pmol de cada primer e água para um volume final de 20 µl. As condições de ciclagem da reação de sequenciamento foram: 96°C por 5 minutos para denaturação

inicial, seguidos de 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 10 segundos e 60°C por 4 minutos e 60°C por 7 minutos para extensão final.

Após a reação de sequenciamento, os nucleotídeos terminadores não incorporados foram removidos para a eletroforese. A remoção dos terminadores consistiu em adição de 80µl de isopropanol 75%, seguido de vigorosa agitação em aparelho tipo vórtex. Após 15 minutos de repouso sob proteção da luz, a placa foi centrifugada a 3.200g por 45 minutos. Ao final da centrifugação, o Isopropanol foi removido por inversão da placa e, para completa eliminação do Isopropanol, a placa foi submetida a um *spin* invertido por 5 segundos com papel absorvente. Após essa etapa, 150µl de Etanol a 70% foram então adicionados e novamente a placa foi centrifugada, desta vez por 15 minutos. O etanol foi removido através do mesmo processo realizado para remoção do isopropanol, descrito anteriormente. A placa, com as amostras precipitadas, foi então incubada a 37°C por 10 minutos para completa remoção do etanol. Os produtos purificados foram ressuspensos em formamida 10% e submetidos à eletroforese em “ABI PRISM 3100 Genetic Analyser”.

4.8 Análises das sequências e reconstruções filogenéticas

Após o sequenciamento, os cromatogramas foram analisados quanto a qualidade de acordo com o índice phred. Além disso, mesmo os cromatogramas considerados de alta qualidade foram visivelmente inspecionados em busca de misturas e/ou subpopulações. Os genótipos dos vírus foram determinados através de análises filogenéticas das sequências da região VP1. Utilizando o programa de alinhamento ClustalX (Thompson *et al.*, 1997), essas sequências foram alinhadas juntamente com sequências de referência disponíveis no GenBank, representativas dos diferentes genótipos do VJC ou do VBK (cada vírus foi analisado separadamente). O alinhamento,

salvo no formato nexus, serviu como entrada para o programa de reconstruções filogenéticas PhyML (Guindon *et al.*, 2003). As árvores foram visualizadas no programa FigTree v1.3.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

As regiões regulatórias sequenciadas foram alinhadas incluindo demais sequências de referência de ambos os tipos (arquetípico e rearranjado). O alinhamento foi manualmente construído e visualmente inspecionado com o auxílio do programa Se-Al (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/seal/>).

4.9 Análises estatísticas

Os dados coletados foram inseridos em banco de dados construído no programa SPSS versão 20.0 (Nie *et al.*, 1970) e avaliados por meio de estatística descritiva com cálculos de percentuais, frequências e médias. Para análise dos gráficos foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 6.0 (La Jolla, California).

Para a comparação dos escores dos diferentes grupos foram utilizados testes paramétricos e não paramétricos. Foi utilizado como teste o teste t-student para a comparação dos escores de dois grupos e o teste de chi-quadrado com correção de Yates. Todos os testes foram realizados sob a admissão de probabilidade de erro de primeira espécie (alfa) de 5%.

5. Resultados

5.1 Pacientes e dados demográficos

Foram analisados 97 pacientes provenientes do Hospital das Clínicas de São Paulo e da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. Desses, 79 (81,4%) eram do gênero feminino e 18 (18,6%) do gênero masculino. Sessenta e um (62,9%) foram inseridos no grupo controle (GC) e 36 (37,1%) foram inseridos no grupo Natalizumab (GN). Em relação ao gênero, 31 mulheres (39%) encontram-se dentro do GN e as 48 restantes (61%) pertenciam ao GC. Por outro lado, 9 pacientes (50%) do gênero masculino compunham o GC, e 9 os restantes (50%) ao GN (Tabela 7).

A partir de informações obtidas de 78 indivíduos que responderam os questionários foi possível observar que a idade dos pacientes do GC variou de 20 a 60 anos e a idade dos pacientes do GN variou de 18 a 50 anos. A análise comparativa da idade dos indivíduos dos dois grupos separadamente revelou dados semelhantes, sendo média de 38,8 anos para o grupo GC e 34,3 para o grupo GN e mediana de 39 anos para o GC e de 35 para o GN. Os pacientes foram divididos em grupos de acordo com a sua faixa etária para análise de excreção dos poliomavírus. Essa divisão, bem como a quantidade de pacientes em cada grupo está descrito na tabela 7.

Dentre os pacientes inclusos no estudo, foram recuperados dados étnicos de 77 pacientes, sendo que desses, 57 (74%) declararam-se brancos, cinco (6,5%) negros, 13 (17%) pardos e dois (2,5%) orientais. Obteve-se dados de 74 com relação ao grau de instrução, revelando que a nossa casuística é composta basicamente de indivíduos com ensino médio completo e com ensino superior.

Foi possível obter dados referentes a classificação diagnóstica da EM de 74 pacientes. Desses, 65 (87,9%) possuíam EM do tipo remitente recorrente (RR), três pacientes (4%) foram classificados como Primariamente Progressiva (EMPP), quatro (5,4%) registraram Síndromes Clínicas Isoladas (SCI) e dois pacientes (2,7%) apresentavam o tipo Secundariamente Progressiva (EMSP) da EM.

Tabela 7. Dados clínicos e demográficos dos pacientes com EM analisados no estudo.

Variável (n total)	Categoria	n (%)
Gênero (97)	Feminino	79(81,4)
	Masculino	18 (18,6)
Etnia (77)	Branca	57 (74)
	Negra	5 (6,5)
	Parda	13 (17)
	Oriental	2 (2,5)
Idade (78)	18 a 23 anos	6 (7,5)
	24 a 29 anos	12 (15,6)
	30 a 35 anos	19 (24,4)
	36 a 41 anos	16 (20,4)
	42 a 47 anos	12 (15,6)
	48 a 53 anos	9 (11,5)
	54 a 60 anos	4 (5)
Escolaridade (74)	Fundamental Incompleto	1 (1,3)
	Fundamental Completo	3 (4)
	Médio Incompleto	2 (2,7)
	Médio Completo	30 (40,6)
	Superior Incompleto	7 (9,5)
	Superior Completo	27 (36,5)
	Pós Graduado	4 (5,4)
Classificação da EM (74)	RR	65 (87,9)
	PP	3 (4)
	SCI	4 (5,4)
	SP	2 (2,7)

5.2 Excreção de BK e JC nas amostras de sangue e urina

As amostras de sangue e urina dos 97 pacientes foram testadas para a presença do DNA do JC e BK. Todas as amostras de sangue foram negativas para a presença dos

poliomavírus. Por outro lado, 35 pacientes (36%) apresentaram o DNA do poliomavírus na urina, em pelo menos 1 das coletas analisadas, sendo que desses, 21 (21,6%) excretavam JC, oito (8,2%) excretavam BK e seis (6,2%) pacientes apresentaram excreção urinária de ambos os poliomavírus. Adicionalmente, a frequência de excreção urinária foi avaliada nos dois grupos estudados (GC e GN), e os valores obtidos foram semelhantes. Não foi observado diferença estatística entre eles (Tabela 8).

Tabela 8. Excreção de poliomavírus na urina de pacientes com EM de ambos os grupos do estudo.

Grupos	Poliomavírus (%)	VJC (%)	VBK (%)	Ambos (%)
GC (61)	21 (34,5)	13 (21,3)	5 (8,2)	3 (4,9)
GN (36)	14 (38,9)	8 (22,2)	4(11,1)	2 (5,6)
Total (97)	35 (36)	21 (21,7)	9 (9,3)	5 (5,1)
P	0,668	0,440	0,722	0,367

Não foi observada diferença significativa entre a prevalência de excreção urinária de poliomavírus (VJC, VBK ou ambos) em relação ao gênero dos indivíduos estudados. Os dados de excreção em relação ao gênero estão descritos na tabela 9.

Tabela 9. Excreção de Poliomavírus JC, BK e ambos de acordo com o gênero dos indivíduos estudados.

Vírus	Feminino (n=79) (%)	Masculino (n=18) (%)	P
Poliomavírus	27 (34,2)	6 (33,4)	0,417
VJC	16 (20,3)	3 (16,7)	0,493
VBK	5 (6,3)	3 (16,7)	0,266
Excreção Simultânea	6 (7,6)	-	0,253

Foi investigada também a relação entre prevalência de excreção de Poliomavírus (VJC, VBK ou ambos) por idade. Para tal análise, foram utilizados dados de 78 indivíduos. Foi possível observar uma maior frequência de excreção urinária do VJC do VBK e de ambos os poliomavírus em indivíduos entre 36 e 41 anos, entretanto sem diferença estatística ($p=0.540$) (Tabela 10).

Tabela 10. Excreção de poliomavírus VJC, VBK de ambos os grupos nos pacientes com EM de acordo com diferentes grupos de faixa etária.

Idade(n)	JC(%)	BK(%)	Excreção simultânea(%)
18-23 (6)	-	-	1(16)
24-29 (12)	3 (25)	-	-
30-35 (19)	6 (31,6)	2 (10,5)	-
36-41 (16)	2 (12,5)	3 (18,7)	3 (18,7)
42-47 (12)	2 (16)	2 (16)	-
48-53 (9)	1 (11)	1 (11)	-
54-60 (5)	-	1 (20)	-

5.6 Excreção e determinação da carga viral do JC e BK em amostras seriadas de urina

Dos 97 pacientes incluídos no estudo, 33 do GC apresentaram pelo menos três coletas e 20 pacientes do GN apresentaram mais de quatro coletas. Optou-se, então, analisar esses pacientes separadamente quanto ao perfil de excreção, bem como por variações de carga viral. Dos 20 indivíduos incluídos nessa etapa do estudo, cinco (25%) faziam uso do medicamento por menos de um ano, nove (40%) entre um e dois anos e sete (35%) tratavam com Natalizumab a mais de 2 anos. A estimativa média do tempo de tratamento foi obtida através da data de início da introdução da terapia com Natalizumab até a data da última amostra coletada para o acompanhamento.

Os pacientes em geral, de ambos os grupos, não apresentaram um padrão no perfil de excreção urinária de poliomavírus JC e BK. Pode-se observar ainda, que alguns pacientes excretaram poliomavírus praticamente durante todo o acompanhamento, como no caso dos pacientes PMS09, PMS29, PMS63 e PMS40, enquanto outros apresentaram excreção em apenas uma coleta, exemplificado pelos pacientes PMS18, PMS 68, PMS 44 e PMS 77. Ainda, foram observados indivíduos possuindo excreção intermitente, como por exemplo os pacientes PMS24, PMS38, PMS65, PMS75 e PMS 91 (Tabela 11).

Foi possível observar que alguns pacientes, de ambos os grupos, passaram a excretar poliomavírus após o início do acompanhamento. No caso do GC, três pacientes passaram excretar VBK, sendo dois casos de excreção esporádica apenas. Com relação ao GN, cinco pacientes passaram a excretar poliomavírus após o início do acompanhamento, sendo que desses três passaram a excretar VBK e dois VJC. Dos indivíduos que excretavam o poliomavírus BK, dois apresentaram excreção contínua a partir do momento inicial de detecção, e um apresentou excreção em uma única coleta. Por outro

PMS44	C	X	J	N	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PMS53	C	J	J	J	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PMS63	C	J	J	J	J	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PMS68	C	N	N	N	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PMS09*	Na	J	J	J	J	J	JB	JB	JB	JB	JB	JB	JB	JB
PMS29*	Na	J	X	J	J	JB	JB	JB	JB	X	JB	-	-	-
PMS54*	Na	N	N	N	N	J	N	N	N	-	-	-	-	-
PMS65*	Na	N	J	J	J	J	N	N	JB	JB	-	-	-	-
PMS75	Na	N	N	N	N	J	J	N	N	N	-	-	-	-
PMS77	Na	N	N	N	N	B	-	-	-	-	-	-	-	-
PMS91	Na	JB	N	JB	JB	-	-	-	-	-	-	-	-	-

5.7 Determinação da Carga Viral (CV) do VJC e VBK

Foi possível determinar a CV do VJC em 27 indivíduos. Desses, 19 pertenciam ao GC e 8 ao GN. Os resultados de CV foram analisados de duas formas: análise temporal por paciente, e fazendo a média da CV entre as coletas para a comparação entre grupos. A CV do VJC nos indivíduos do GC variou de 6.000 cópias/ml até $2,21 \cdot 10^9$ cópias/ml, com média de $5,63 \cdot 10^7$ cópias/ml. Por outro lado a CV do VJC dos indivíduos do GN infectados pelo VJC variou de 6.000 cópias/ml $4,03 \cdot 10^8$ cópias/ml, com média de $1,28 \cdot 10^8$. A média de CV do GN foi ligeiramente maior do que a GC, entretanto não foi

observada diferença estatística entre os grupos ($p=0.576$) (Figura 10). Adicionalmente, foi possível observar um aumento na carga viral apenas em duas pacientes constantemente positivas para o VJC (PMS09 e PMS29). A CV da paciente PMS09 subiu de $3,6 \cdot 10^4$ na primeira coleta atingindo um picos de carga viral de $1,47 \cdot 10^9$ cópias/ml no sétimo mês e $1,38 \cdot 10^9$ cópias/ml no décimo mês de tratamento e depois caindo para $9,2 \cdot 10^4$ cópias/ml no último mês de acompanhamento. A paciente PMS29, por sua vez, apresentou 7.103 cópias/ml na primeira amostra positiva para VJC e subiu gradativamente no decorrer dos meses atingindo carga viral de $6,78 \cdot 10^5$ na última coleta.

Figura 10. Carga viral média do poliomavírus JC nos indivíduos com EM. Em azul, os pacientes do GC e em vermelho, os pacientes do GN. Não foi observada diferença estatística entre os grupos ($p=0.576$).

Para o VBK, por sua vez, foi possível determinar a carga viral de 13 indivíduos, sendo que desses, oito pertenciam ao GC e cinco ao GN. Assim como no caso do VJC, para os pacientes que apresentaram positividade para o VBK em mais de uma coleta, foi calculado a média de CV entre as coletas positivas para posterior análise da CV em ambos os grupos. A CV do GC variou de 4000 cópias/ml à $3,75 \cdot 10^7$, com média de

$1,86.10^6$, quanto ao grupo GN a CV variou de 5520 cópias/ml à $2,38.10^6$, com média de $1,45.10^5$. A média do GN também foi ligeiramente maior do que a do GC, entretanto não foi observado diferença estatística ($p=0.278$) (Figura 11). Não observada um aumento na CV dos indivíduos que apresentaram mais de uma coleta para o VBK em ambos os grupo.

Figura 11. Carga viral média do poliomavírus VBK nos indivíduos com EM. Em azul, os pacientes do GC e em vermelho, os pacientes do GN. Não foi observada diferença estatística entre os grupos ($p=0.278$).

5.8 Excreção urinária de VJC e detecção de Anticorpos contra VJC

Segundo o grupo de pesquisadores do HC, 27 pacientes do GN realizaram a pesquisa de anticorpos contra o VJC para sua inclusão no protocolo de tratamento com Natalizumab, como exigência do seu médico. Dos 27 indivíduos, 14 apresentaram anticorpos contra o VJC, representando uma frequência de 52% de indivíduos infectados. Comparando os dados de sorologia com os nossos resultados de excreção, temos que oito (58%) pacientes apresentaram excreção urinária e presença de anticorpos contra o VJC

concomitantemente, por outro lado seis (42%) pacientes com sorologia positiva para o VJC não excretaram o poliomavírus JC em nenhum momento do acompanhamento. Interessantemente, uma paciente (PMS54) apresentou excreção urinária em uma coleta durante o acompanhamento, entretanto não apresentou anticorpos contra o VJC.

5.9 Caracterização molecular da VP1 e da RR de pacientes positivos para VJC

Todas as amostras positivas para VJC no ensaio de PCR em Tempo Real foram submetidas a novos ensaios de PCR convencional, destinadas aos genes da RR e da VP1 para fins de sequenciamento e caracterização molecular. Todas as sequências de RR de JCV obtidas foram caracterizadas como arquetípica, as quais geralmente, não são associadas a LEMP.

Considerando que duas pacientes demonstraram positividade constante do poliomavírus JC durante praticamente todo o estudo e que o método de sequenciamento utilizado foi o de Sanger, cuja cobertura poderia não identificar populações virais minoritárias de características rearranjadas, optou-se por clonar a RR das três últimas coletas positivas dessas pacientes. Cerca de 20 clones foram obtidos para cada uma das amostras clonadas. Todas as sequências demonstram-se idênticas entre si e semelhantes às definidas arquetípicas.

Ao todo 38 amostras positivas para o VJC foram sequenciadas para caracterização da VP1. Não foram encontradas mutações nas sequências consenso do gene VP1 relacionadas a LEMP em nenhuma amostra. Entretanto, uma análise mais cuidadosa dos cromatogramas revelou o surgimento de uma mutação não sinônima de Adenina para Guanina no nucleotídeo 86 do gene VP1 da paciente PMS09 (Figura 12).

Essa posição corresponde ao aminoácido 29 do gene VP1, resultando na substituição de Glutamato para Glicina (E29G), aminoácidos estes com polaridades diferentes entre si. Essa mutação foi detectada somente nos cromatogramas correspondentes aos oitavo, nono e décimo meses após o início de tratamento com Natalizumab, não sendo mais observada no 11º mês. Vale lembrar que essa paciente apresentou positividade para o VJC na urina em todas as amostras analisadas (Tabela 11).

Figura 12. Cromatogramas resultantes do sequenciamento da VP1 do VJC encontrado na urina de paciente com EM sob tratamento com Natalizumab. A linha em azul demonstra o sítio de aparecimento da mutação no nível nucleotídico.

Ainda, de acordo com a análise da carga viral do VJC presente na urina dessa

paciente, a mutação apareceu dentro do período em que a carga viral apresentou-se nos níveis mais elevados de todo o período de acompanhamento (Figura 13).

Figura 13. Cópias virais/ml nas amostras seriadas de urina. O gráfico demonstra cópias virais de JC/ml estimadas por meses de coleta. Tempo 0 corresponde a coleta antes do tratamento. Asteriscos indicam os meses onde a variante da VP1 foi encontrada.

É importante mencionar que essa nova variante viral não atingiu a população majoritária, e a mutação não foi observada nos cromatogramas dos meses subsequentes. Essa mutação não se assemelha com nenhuma das mutações anteriormente descritas que possuem uma relação positiva com LEMP (Sunyaev *et al.*, 2009).

5.10 Genotipagem do poliomavírus JC

Para a análise de genotipagem do VJC, 24 sequências de referência representando diferentes genótipos foram alinhadas junto a sequências de 18 pacientes, sendo que alguns desses possuíam mais de uma amostra sequenciada. Após alinhamento, as sequências foram submetidas a reconstrução filogenética por verossimilhança (Figura 14).

De acordo com a reconstrução, as sequências de 8 pacientes (61%) agruparam com sequências de referência do genótipo 3 (Africano); três indivíduos (17%) excretavam o vírus de genótipo 1 (Europeu), sendo 1a ou 1b; dois pacientes (11%) excretavam JC do genótipo 2 (Asiático); um (5,5%) indivíduo excretava o genótipo 6 (Africano) e um indivíduo (5,5%) excretava o genótipo 4 (Europeu) (Figura 14). Esse dado sugere que vírus provenientes da África, Ásia e Europa circulam entre a população estudada, em diferentes prevalências. Os dados genotípicos foram analisados também de acordo com o grupo de inclusão (GC e GN). Os quatro indivíduos excretadores dos genótipos 1 e 4 fazem parte do GC, os dois indivíduos excretadores do genótipo 2 pertenciam ao GN e finalmente dos 11 indivíduos excretadores dos genótipos 3 e 6, 8 pertenciam ao GC e três pertenciam ao GN (Tabela 12).

Figura 14. Reconstrução filogenética por máxima verossimilhança do vírus VJC dos pacientes com EM do GC (em azul), do GN (em vermelho) e sequências de referência (em preto) de diferentes genótipos. A reconstrução foi feita baseada no fragmento de aproximadamente 900 do gene VP1. Apenas valores de suporte de *bootstrap* maiores que 50 foram demonstrados na árvore.

Os vírus encontrados em pacientes com positividade em mais de uma coleta apresentaram um alto grau de conservação nucleotídica agrupando-se com distância zero ou próxima a zero, nos mesmos genótipos.

Uma vez que temos dados étnicos da maioria dos pacientes, cruzamos essas informações com o genótipo encontrado nos respectivos indivíduos. Não foi observada relação entre genótipo e a etnia declarada pelos pacientes, todos os dados étnicos estão descritos na Tabela 12. Dentre os sete pacientes excretadores dos genótipos 3 e 6, seis indivíduos (86%) classificaram-se como de etnia Branca, enquanto um paciente (14%) classificou-se como sendo da etnia Parda. Com relação aos pacientes excretadores dos genótipos 1 e 4, todos classificaram-se como sendo da etnia Branca. Infelizmente, não foram obtidos dados étnicos dos dois indivíduos excretadores do genótipo 2.

Tabela 12. Descrição da frequência genotípica do VJC dos grupos de estudo.

Genótipos VJC	GN(%)	GC (%)	Etnia(%)
Genótipos Europeus	-	4 (100)	Branco (100)
Genótipos Africanos	3	8	Branco (86) Pardo (14)
Genótipo 2 (Asiático)	2 (100)	-	-

5.11 Genotipagem do poliomavírus BK

Foram obtidas com qualidade sequencias provenientes de oito pacientes excretadores do VBK, sendo que de um deles, mais de uma amostra positiva foi sequenciada. Sendo assim, sete (87,5%) pacientes excretavam o genótipo 1, sendo que desses, cinco excretavam o subtipo 1b e dois o subtipo 1a do VBK e um (12,5%) indivíduo excretava o raro genótipo 3 (Figura 15). Todos os indivíduos excretadores do genótipo 1 (subtipo 1a e 1b) classificaram-se como sendo da etnia Branca.

A amostra positiva para o VBK por mais de uma coleta que foi sequenciada apresentou alto grau de conservação nucleotídica, agrupando-se no mesmo ramo, com similaridade de 100% entre si. Dos oito pacientes que tiveram amostras sequenciadas do VBK, quatro pertencem ao GC e quatro são do GN, sendo que os quatro do GN excretavam o genótipo 1. Desses, dois excretavam o subtipo 1a e dois excretavam o subtipo 1b. No GC por sua vez, três indivíduos excretavam o genótipo 1b e um indivíduo excretava o genótipo 3.

Figura 15. Reconstrução filogenética por máxima verossimilhança do vírus VBK dos pacientes com EM do GC (em azul), do GN (em vermelho) e sequências de referência (em preto) de diferentes genótipos. A reconstrução foi feita baseada no fragmento parcial do gene VP1 de 353 pb. Apenas valores de suporte de *bootstrap* maiores que 50 foram demonstrados na árvore.

6. Discussão

6.1 Dados demográficos dos pacientes com EM

Em nossa casuística, foi encontrado um número maior de mulheres com EM relação aos homens, concordando com o que havia sido relatado anteriormente (Callegaro *et al.*, 2001; Milo *et al.*, 2010). Entretanto, a razão entre o número de homens e mulheres da nossa amostragem (4,5:1) é maior do que a razão mundial descrita de 2 mulheres/1 homem (Milo *et al.*, 2010). Outros estudos de prevalência no Brasil, entretanto, descrevem razão semelhante à observada nessa casuística. Lana-Peixoto *et al.*, descreveram uma razão de 3,3 mulheres/1 homem no estado de Minas gerais (Lana-Peixoto *et al.*, 2012). Outro estudo no mesmo estado relatou prevalência de 2,5 mulheres/1 homem (Ribeiro *et al.*, 2011). Na região Nordeste do país, no estado de Pernambuco, a razão é de 4,1 mulheres/ 1 homem (Ferreira *et al.*, 2004), assim como a encontrada no estado da Bahia (Cardoso *et al.*, 2006). Considerando que ainda existem muitos aspectos a esclarecer sobre a etiologia da EM, os motivos que levam essa grande diferença entre mulheres e homens ainda não estão elucidados.

Apesar da razão de 4,5 mulheres/homem inclusos no estudo, foi observado também que nove homens (50%) estavam inseridos no GN. Esse dado pode ser explicado pelo fato de que a EM apresenta maior progressão do curso da doença nos homens do que nas mulheres (Voskuhl *et al.*, 2012), e por essa razão, os médicos optam mais frequentemente por introduzir o Natalizumab mais precocemente.

De acordo com os dados étnicos descritos na tabela 7, pode-se observar que 74% dos pacientes classificaram-se como brancos. Esse achado já era esperado e está de

acordo com a maioria dos resultados demográficos encontrados em outros trabalhos, mostrando invariavelmente maior prevalência de pacientes brancos que desenvolvem EM quando comparado com as demais etnias (Callegaro *et al.*, 2001; Compston *et al.*, 2008; Milo *et al.*, 2010).

De acordo com os dados de escolaridade de 74 pacientes, 90% deles concluíram o ensino médio, superior ou com pós graduação. Foi interessante observar que esses dados divergem do que foi publicado pelo Instituto Brasileiro de geográfica e Estatística (IBGE) para a população do Estado de São Paulo, onde cerca de 41% é sem instrução ou com o ensino fundamental incompleto (http://www.ibge.gov.br/estadosat/temas.php?sigla=sp&tema=resultprelamostra_censo2010).

Ainda, dentro da população geral, o grupo de pessoas com ensino médio representam 27,8%, e apenas 11.5% possuem ensino superior completo. Uma possível sugestão para esse viés pode ser pelo fato de que indivíduos com um grau de instrução maior tendem a buscar um serviço médico ao aparecimento dos sintomas da EM, entretanto um estudo mais específico seria necessário para melhor explicar essa diferença.

6.2 Detecção do DNA dos poliomavírus nos pacientes com EM

A excreção urinária de VJC de 36% em indivíduos com EM foi semelhante à frequência de excreção encontrada em indivíduos imunocompetentes. Estudos descrevem frequências de excreção urinária que variam de 18,9% a 24% (Egli *et al.*, 2009; Markowitz *et al.*, 1993; McClure *et al.*, 2012).

A taxa de excreção descrita aqui contrasta do que foi descrito anteriormente por Nali *et al.*, Matos *et al.*, e Machado *et al.*, onde os autores descreveram frequências de

VJC superiores a 50% em indivíduos infectados pelo HIV (Machado *et al.*, 2011; Matos *et al.*, 2010; Nali *et al.*, 2012). Entretanto a frequência de excreção do VJC obtida foi semelhante às encontradas por Behzad-behbahani, que foi de 26,9% em pacientes infectados pelo HIV (Behzad-Behbahani *et al.*, 2004). Ainda, em outros grupos de imunocomprometidos como no caso de indivíduos submetidos a transplante renal e de fígado, a excreção urinária de VJC variou de 27,2% a 38% (Drachenberg *et al.*, 2007; Kusne *et al.*, 2012). Essa diferença era esperada, uma vez que indivíduos imunodeprimidos tendem a apresentar uma maior replicação viral em virtude da condição do sistema imunológico.

Com relação a excreção do VJC em indivíduos com EM, há relatos de taxas mais elevadas que as nossas. Um estudo anterior buscou a presença do DNA viral na urina de pacientes com EM tratados com Natalizumab no decorrer de 18 meses. Nesse estudo foi descrito uma variação de 18,75% no início do tratamento com Natalizumab até 63,1% após 18 meses de acompanhamento (Chen *et al.*, 2009). Laroni *et al.*, por sua vez, também buscaram a presença de DNA do vírus na urina de indivíduos tratados com EM, e descreveram excreção em 45,4% (Laroni *et al.*, 2012). Outro estudo que avaliou a presença de DNA viral na urina de pacientes antes do início do tratamento com Natalizumab, encontrou vírus na urina de 26% dos indivíduos (Rudick *et al.*, 2010).

A frequência de excreção do VBK encontrada aqui (9,3%) se assemelha a outros estudos anteriores em indivíduos imunocompetentes, cujas frequências variaram de 7% a 13,5% (Egli *et al.*, 2009; Kling *et al.*, 2012; McClure *et al.*, 2012). Por outro lado, esse dado contrasta com dados de excreção de indivíduos acometidos pelo HIV, que encontraram frequências que variavam de 27,6% a 30,1% (Behzad-Behbahani *et al.*, 2004; Machado *et al.*, 2011). Com relação a indivíduos com outras imunodepressões, estudos relatam frequências de excreção ainda maiores das que foram encontradas em

indivíduos infectados pelo HIV, atingindo 52% a 56,3% em indivíduos submetidos à transplante renal (Drachenberg *et al.*, 2007; Kusne *et al.*, 2012).

Existem poucos trabalhos descrevendo frequência de excreção urinária de VBK em indivíduos com EM. Um deles relatou a virúria de BK em 21% de indivíduos com EM (Chen *et al.*, 2009), e outro, avaliando pacientes com EM sob tratamento com Natalizumab, encontrou virúria em 22,2% dos indivíduos estudados (Lonergan *et al.*, 2009). As razões para essa diferença entre nossa casuística e dados já reportados pode estar relacionado ao tempo de tratamento dos indivíduos, uma vez que aparentemente as populações com o maior tempo de tratamento podem apresentar taxas de excreção maiores, ou ainda nas taxas de soroprevalência de cada população.

Nessa casuística foi observada uma baixa frequência de indivíduos excretando ambos os vírus simultaneamente (5,1%). Ao contrário do que se encontrou para excretores de VJC exclusivamente, excretores simultâneos de VJC e VBK infectados por HIV apresentam frequências similares a encontradas nesta casuística. Três estudos anteriores descreveram frequências de excreção do VJC e VBK que variou de 3,3% a 13,2% (Behzad-Behbahani *et al.*, 2004; Knowles *et al.*, 1999; Markowitz *et al.*, 1993).

De uma maneira geral, as frequências de excreção encontradas para o VJC, VBK e excreção simultânea de ambos vírus na população com EM foram semelhantes às frequências de indivíduos imunocompetentes. Esse achado pode ser explicado pelo fato dos medicamentos utilizados nos pacientes com EM não interferirem de forma crucial no sistema imunológico, portanto, não contribuindo para elevação das taxas de excreção dos poliomavírus.

Finalmente, não foi observada diferença na frequência de excreção entre o GN e o GC, esse dado também foi observado por Rudick *et al.*, que relataram praticamente a

mesma prevalência de excreção em pacientes com EM sem o uso de Natalizumab (26%) e após 1 ano de tratamento com o Natalizumab (25%) (Rudick *et al.*, 2010).

Nenhuma das amostras de sangue testadas para a presença do DNA do VJC e do VBK foram positivas nos ensaios de PCR. O dado descrito aqui concorda com estudos anteriores que afirmam que eventos de viremia são considerados raros em pacientes imunocompetentes e indivíduos com EM. Alguns estudos descreveram episódios raros de viremia onde os autores buscaram a presença do DNA viral em amostras de sangue de indivíduos imunocompetentes e não encontraram em nenhuma das amostras analisadas. (Egli *et al.*, 2009; Koralnik *et al.*, 1999).

Por outro lado, há estudos que chamam a atenção para o fato de que em indivíduos com EM, a viremia pode ocorrer. Por exemplo, enquanto Laroni *et al.*, encontraram o DNA do VJC em células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de apenas 6,1% dos indivíduos pesquisados (Laroni *et al.*, 2012), outro estudo encontrou em 28,5% de amostras de sangue de indivíduos com EM (Mancuso *et al.*, 2012). Ainda, é possível que a ocorrência de viremia seja mais influenciada pelo tratamento prolongado com Natalizumab, uma vez que foi descrito a presença do DNA de VJC em 60% das amostras de CMSP de indivíduos sob tratamento prolongado com Natalizumab (Chen *et al.*, 2009). Apesar de Chen ter encontrado um aumento significativo na frequência da viremia após 18 meses de tratamento com o Natalizumab, esse dado não foi encontrado no presente estudo. Embora o acompanhamento aqui tenha sido realizado por não mais que 13 meses nos voluntários do grupo GN, haviam indivíduos que já faziam uso do medicamento anteriormente ao início do acompanhamento do estudo, ou seja, alguns pacientes tratavam com o Natalizumab por mais de 2 anos.

O fato de não termos observado viremia no presente estudo pode ser explicado

por alguns motivos: (i) os imunomoduladores, imunossupressores e o Natalizumab aparentemente não afetam diretamente a replicação, minimizando assim as possibilidades desse vírus migrar para o sangue; (ii) o N reduzido de indivíduos sob tratamento com Natalizumab por mais de 2 anos, impossibilitando uma análise mais fidedigna. Logo, um estudo mais direcionado, com indivíduos comprovadamente infectados (presença de anticorpos contra VJC) e sob o tratamento com o Natalizumab seria o modelo ideal para essa análise.

Estudos descrevem que a prevalência de poliomavírus tende a aumentar de acordo com a faixa etária (Kitamura *et al.*, 1990; Polo *et al.*, 2004; Zhong *et al.*, 2007), entretanto esse dado não foi observado nesta casuística. É possível que pelo nosso N não ser grande o suficiente, a quantidade de indivíduos que se classificaram dentro de cada faixa etária não fornece dados conclusivos para análise dessa observação.

6.3 Investigações moleculares dos poliomavírus encontrados nos pacientes com EM.

Através de análises moleculares, são conhecidos até o momento oito genótipos do VJC. Ainda, a distribuição global desses vírus parece seguir um padrão geográfico, onde cada genótipo é mais prevalente em determinadas regiões geográficas (Agostini *et al.*, 1997a; Chima *et al.*, 1998; Stoner *et al.*, 2000). Desta forma, sabe-se que o genótipo 3 é originalmente Africano, o genótipo 2 trata-se de um genótipo frequentemente Asiático e finalmente, o genótipo 1 é fundamentalmente Europeu. Assim, foram encontrados vírus dos continentes Africano, Europeu e Asiático na população estudada. Esse dado diverge de populações de outros países nos quais possuem uma distribuição genotípica do VJC mais homogênea com predominância de um genótipo específico (Boukoum *et al.*, 2012; Kmiecik *et al.*, 2008; Matos *et al.*, 2010; Rossi *et al.*, 2007; Sugimoto *et al.*, 1997). Por

outro lado os dados genotípicos do VJC encontrados estão de acordo com outros estudos brasileiros, onde há distribuição homogênea, sem predominância de um genótipo específico, mas com presença principalmente de vírus dos genótipos Africano e Europeu (Fink *et al.*, 2010; Fumian *et al.*, 2010). A distribuição genotípica do VJC provavelmente é fruto de diversas migrações populacionais para o Brasil. A população brasileira foi marcada por várias migrações durante o período de 1890 e 1950, onde cerca de 5 milhões de europeus e asiáticos vieram para o Brasil em busca de melhores oportunidade de trabalho e em busca de segurança durante a I e II Guerra Mundial (Levy *et al.*, 1974). Adicionalmente muitos indivíduos do continente Africano foram trazidos para o Brasil durante o período colonial através do tráfico negreiro. Esses indivíduos representavam uma parcela considerável da população brasileira da época (Adams *et al.*, 1925). Portanto é plausível que os genótipos africanos, europeus e asiáticos do VJC tenham sido trazidos para o país através de grandes migrações populacionais, e durante as migrações internas e aumento da urbanização, esses vírus foram se espalhando e adquirindo diferentes prevalências.

O VBK, por sua vez, possui apenas 4 genótipos descritos até então, os quais são distribuídos pelo mundo de maneira heterogênea, e aparentemente não apresenta relação entre genótipo e região geográfica (Krumbholz *et al.*, 2006).

Foram encontrados no presente estudo os genótipos 1 (subtipo 1a e 1b) na maioria dos indivíduos excretadores de VBK, e apenas um indivíduo com o genótipo 3. De fato, o genótipo 1 é o mais prevalente, conforme constatado em diversos estudos de epidemiologia molecular pelo mundo (Agostini *et al.*, 1995; Boukoum *et al.*, 2011; Di Taranto *et al.*, 1997; Jin *et al.*, 1993; Krumbholz *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2007; Zhong *et al.*, 2009). Ainda de acordo com os nossos achados, o genótipo 4 é mais frequentemente encontrado no leste da Ásia e finalmente os genótipos 2 e 3 são

raramente encontrados (Nishimoto *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2007).

Uma observação interessante é que os subtipos do VBK, ao contrário dos genótipos, parecem apresentar uma relação com alguma região geográfica. O subtipo mais prevalente nesse estudo foi o 1b. Os subtipos 1a e 1b também são encontrados em diversas regiões do mundo, embora o 1a seja mais comum na África e leste Europeu e o subtipo 1b, por sua vez, é encontrado com uma menor frequência África, e mais frequentemente encontrado na Europa (Zheng *et al.*, 2007). Dados referentes à distribuição genotípica do VBK em populações da América do Sul são escassos, mas um estudo brasileiro também descreveu uma maior prevalência de genótipo 1b em sua respectiva casuística (Zalona *et al.*, 2011). Assim como o JCV, a maior prevalência do subtipo 1b na nossa população pode ter sido fruto também das migrações europeias e africanas para o nosso continente no decorrer da história. Porém, as diferenças observadas entre subtipos, podem ser consequência de efeito fundador de cada vírus em determinadas populações.

Durante as análises das sequências de VP1 geradas, foi observado que uma paciente apresentou mutações nesse gene provenientes de uma segunda população viral detectada (Figura 12). Ainda, essa mutação foi encontrada exatamente nos momentos de maior carga viral durante o acompanhamento (Figura 13).

Apesar da identificação de vírus mutantes concomitantemente com o maior pico de carga viral do VJC, essa mutação não era associada a nenhuma das outras mutações frequentemente encontradas em casos de LEMP (Fink *et al.*, 2010; Sunyaev *et al.*, 2009) e não estava mais presente após o 11º mês de tratamento. Entretanto, o aparecimento de variantes na população viral excretada na urina pode não ser um evento tão incomum. É plausível que quanto maior a replicação viral, maiores as chances de emergirem mutantes

durante a síntese de novos DNA virais. Nesse sentido, uma vez que pacientes sob tratamento com Natalizumab podem apresentar altas cargas virais na urina (Laroni *et al.*, 2012), podemos esperar que a chance de mutantes aparecerem durante o tratamento não seja tão pequena. Ainda, é importante lembrar que o aparecimento de uma nova variante que garanta ao vírus um maior *fitness* viral, ou ainda tropismo por diferentes células/tecidos pode acarretar na migração do mesmo para outros tecidos e finalmente, aumentar o risco de desenvolvimento de LEMP.

Diferentes hipóteses são consideradas quando se discute o aparecimento do VJC no SNC, causando ou não LEMP. Alguns autores acreditam que o VJC pode fazer latência em diferentes sítios, como linfócitos e tecido cerebral, e portanto, a viremia ou a LEMP, são nada mais do que consequências da reativação de um vírus dormente, causada principalmente pela imunodepressão (Delbue *et al.*, 2008; Perez-Liz *et al.*, 2008). Por outro lado, existem linhas que acreditam que o aumento da replicação viral na urina, associado a uma transativação do VJC pelo HIV (Daniel *et al.*, 2001) e pela imunodepressão, também causada pelo HIV (Gasnault *et al.*, 2003; Koralnik *et al.*, 2006), possa facilitar o surgimento de variantes (principalmente com mutações na VP1 e RR), que garantiriam ao vírus o escape do sistema imune do hospedeiro. Além disso, se o vírus mutante for capaz de se replicar em outros tecidos, pode migrar para o SNC através de intensa replicação na corrente sanguínea, onde finalmente causaria LEMP. Apesar das discordâncias quanto as teorias da patogênese da LEMP, o que é aceito e tido como praticamente um consenso é que os vírus presentes em líquido e nas células produtoras de mielina do SNC de pacientes com LEMP apresentam características rearranjadas (Daniel *et al.*, 2001; Delbue *et al.*, 2005; Laroni *et al.*, 2012; Marzocchetti *et al.*, 2008; Pfister *et al.*, 2001; Pietropaolo *et al.*, 2003; Yogo *et al.*, 2001). Portanto, o aparecimento de sequências da RR rearranjadas apresentam, de fato um risco extremamente elevado para o

desenvolvimento da doença.

Todas as amostras analisadas nesse estudo apresentaram sequências da RR do VJC do tipo arquetípicas. Há relatos, embora escassos, onde foram detectadas sequências de RR, em pacientes com LEMP, com características arquetípicas, sendo que os mesmos apresentaram um melhor prognóstico da doença comparados aos pacientes com RR rearranjadas (Ferrante *et al.*, 2003; Pfister *et al.*, 2001). Portanto as sequências aqui encontradas, não apresentaram características que representassem reativação viral ou um risco maior de desenvolvimento de LEMP.

A detecção do DNA do VJC no sangue como um marcador preditor de LEMP é uma ideia controversa. Alguns autores afirmam que a detecção do DNA viral no sangue durante o tratamento pode servir como interpretação de risco de LEMP (Chen *et al.*, 2009). Por outro lado, outros afirmam que a detecção do DNA viral no sangue não serve como um bom preditor de LEMP, uma vez que a detecção pode ocorrer apenas no momento do aparecimento dos sintomas da LEMP (Laroni *et al.*, 2012; Rudick *et al.*, 2010). Embora nenhum dos pacientes do presente estudo tenha desenvolvido LEMP, ou sequer viremia, tivemos algumas evidências de que mutantes podem, de fato, emergir na população viral presente na urina. Ainda, esses mutantes foram diretamente relacionados a um aumento na carga viral que ocorreu durante o tratamento com Natalizumab. Embora esse achado não possa ser considerado como evidência direta, acreditamos que a teoria do surgimento de variantes virais com maior *fitness* ou ainda, tropismo por diferentes tecidos, possa ocorrer primariamente na urina. Contudo, as chances dessas variantes migrarem para outros tecidos e atingirem o SNC vai depender de fatores diversos, tais como intrínsecos aos novos mutantes, bem como do estado imunológico do paciente, que poderá ou não controlar a replicação viral.

6.4 Anticorpos contra o VJC e correlação a excreção urinária.

A frequência de 52% de indivíduos com anticorpos contra o VJC do grupo estudado é semelhante à frequência encontrada por outros grupos (Antonsson *et al.*, 2010; Bozic *et al.*, 2011; Egli *et al.*, 2009; Kean *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2010; Trampe *et al.*, 2012). Curiosamente, uma paciente (PMS54) com sorologia negativa apresentou excreção urinária do VJC em uma das coletas analisadas. Esse dado poderia ser explicado de duas maneiras: (i) apesar de não obtermos a data de quando o teste sorológico foi realizado, é possível que o evento único de excreção urinária trata-se de uma primo-infecção, ou (ii) o título de anticorpos da paciente pode estar abaixo do limite de detecção do teste, o qual não conhecemos. Entretanto, uma avaliou a relação entre sorologia e viruria e demonstrou que 37% dos indivíduos estudados apresentaram sorologia negativa e eventos de excreção urinária (Berger *et al.*, 2013), sugerindo que o atual teste sorológico utilizado pode subestimar o real número de indivíduos infectados pelo VJC.

Além disso, foi observado no presente trabalho que 42% dos pacientes com sorologia positiva para o VJC não apresentaram nenhum evento de excreção urinária durante o acompanhamento. É importante lembrar que o vírus, após a primo infecção, fica latente nos rins, e pode se replicar e ser excretado na urina no decorrer da vida de forma esporádica, contínua ou intermitente (Egli *et al.*, 2009). Estudos relatam que pacientes que tratavam com Natalizumab e desenvolveram a LEMP, frequentemente apresentaram eventos de excreção urinária do VJC e em alguns casos, viremia (Laroni *et al.*, 2012; Reid *et al.*, 2011). Portanto, acreditamos que pacientes infectados pelo VJC que não apresentem eventos de excreção provavelmente possuem um risco menor de desenvolver LEMP, uma vez que a presença do DNA do VJC na urina é frequentemente encontrada em indivíduos com LEMP.

6.5 Perspectivas para o futuro dos pacientes com EM no Brasil

Quando o projeto teve início, o Natalizumab era comercializado no Brasil sob rígido controle, e chegava aos pacientes apenas por importação, elevando assim o custo e a acessibilidade ao medicamento. Entretanto foi publicada a portaria 493, em setembro de 2010, permitindo o uso do Natalizumab pela rede SUS. Essa aprovação, ainda em fase final de implantação em diversos centros, permitirá o uso em maior escala e consequentemente aumentará a probabilidade de indivíduos susceptíveis a desenvolverem LEMP. Portanto, ferramentas que contribuam para uma melhor estratificação de risco para LEMP deverá oferecer aos médicos possibilidade de adotar protocolos mais adequados para cada situação/paciente, e assim, mais seguro para a administração do Natalizumab.

A detecção de anticorpos contra o VJC, realizada por enquanto apenas pela *Biogen* dos Estados Unidos, fornece informações referentes apenas a presença ou ausência de infecção, além representar um problema grande de logística. Além disso, indivíduos infectados podem ou não apresentar virúria, e viremia em raras ocasiões, sendo geralmente detectado no sangue no exato momento do aparecimento dos sintomas de LEMP. Em contra partida, a RR com características rearranjadas apresenta forte associação com a LEMP. Finalmente, mutações relacionadas a VP1 pode garantir ao vírus uma forma de escape do sistema imune ou um tropismo por outros tecidos. Com base nessas informações, e nos dados obtidos no presente estudo, propomos um fluxograma para a análise da estratificação de risco dos indivíduos com EM sob tratamento com Natalizumab (Figura 16). Sabemos que as análises moleculares feitas de forma sistemática devem encarecer o protocolo de acompanhamento dos pacientes. Entretanto, o Natalizumab, até o momento da conclusão desse trabalho, é a melhor opção de tratamento para indivíduos com EM que não respondem a outras terapias. Além disso,

como não há consenso sobre a relação tratamento e riscos aumentados de LEMP, muitas vezes os médicos optam por não introduzir o Natalizumab em pacientes infectados pelo VJC, ou ainda, interrompem o medicamento ao menor sinal de virúria. A interrupção é ainda pior pois invariavelmente produz surtos severos no indivíduo. Dessa forma, a relação custo-benefício desse tratamento deve ser cuidadosamente analisada em pacientes portadores do VJC.

Figura 16. Representação esquemática do fluxograma proposto para o monitoramento dos pacientes com EM sob tratamento com Natalizumab para a melhor definição da

estratificação de risco.

7. Conclusões

As frequências de excreção do VJC, VBK e ambos os vírus simultaneamente foram semelhantes nos pacientes que receberam natalizumab e nos que receberam imunossupressores ou imunomoduladores.

Os genótipos 1, 2, 3, 4 e 6 do VJC e os genótipos 1 e 4 do VBK encontrados nesse estudo, reforçam a ideia de estudos anteriores de que vírus oriundos de outras regiões geográficas circulam na população estudada.

Não foi observada diferença na carga viral média do VBK e do VJC entre os indivíduos de ambos os grupos.

A presença da mutação (E29G) na VP1 de uma paciente sob tratamento com Natalizumab concomitantemente com o pico da carga viral, reforça a importância da investigação molecular do VJC na urina de pacientes com EM sob tratamento com esse medicamento para uma melhor estratificação de risco desses pacientes.

Todas as sequências da RR do VJC foram semelhantes às sequências de característica arquetípica.

O tratamento com Natalizumab por mais de um ano pode contribuir para a excreção permanente de VJC+VBK.

Deteção de anticorpos, concomitantemente com a investigação molecular do VJC poderá contribuir para uma melhor determinação da estratificação do risco de desenvolvimento de LEMP em indivíduos com EM sob tratamento com Natalizumab.

8. Referências

1. Adams JE. The Abolition of the Brazilain Slave Trade. *The Journal of Negro History* 1925;10(4):607-37.
2. Agarwal SK. Biologic agents in rheumatoid arthritis: an update for managed care professionals. *J Manag Care Pharm.* 2011;17(9 Suppl B):S14-8. Epub 2011/12/07.
3. Agostini HT, Brubaker GR, Shao J, Levin A, Ryschkewitsch CF, Blattner WA, Stoner GL. BK virus and a new type of JC virus excreted by HIV-1 positive patients in rural Tanzania. *Arch Virol.* 1995;140(11):1919-34. Epub 1995/01/01.
4. Agostini HT, Ryschkewitsch CF, Brubaker GR, Shao J, Stoner GI. Five complete genomes of JC virus type 3 from Africans and African Americans. *Arch Virol.* 1997a;142(4):637-55. Epub 1997/01/01.
5. Agostini HT, Yanagihara R, Davis V, Ryschkewitsch CF, Stoner GL. Asian genotypes of JC virus in Native Americans and in a Pacific Island population: markers of viral evolution and human migration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997b;94(26):14542-6. Epub 1998/02/07.
6. Allander T, Andreasson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, Persson MA, Dalianis T, Ramqvist T, Andersson B. Identification of a third human polyomavirus. *J Virol.* 2007;81(8):4130-6. Epub 2007/02/09.
7. Antonsson A, Green AC, Mallitt KA, O'Rourke PK, Pawlita M, Waterboer T, Neale RE. Prevalence and stability of antibodies to the BK and JC polyomaviruses: a long-term longitudinal study of Australians. *J Gen Virol.* 2010;91(Pt 7):1849-53. Epub 2010/03/12.

8. Arthur RR, Dagostin S, Shah KV. Detection of BK virus and JC virus in urine and brain tissue by the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1989;27(6):1174-9. Epub 1989/06/01.
9. Astrom KE, Mancall EL, Richardson EP, Jr. Progressive multifocal leukoencephalopathy; a hitherto unrecognized complication of chronic lymphatic leukaemia and Hodgkin's disease. *Brain.* 1958;81(1):93-111. Epub 1958/03/01.
10. Behzad-Behbahani A, Klapper PE, Valley PJ, Cleator GM, Khoo SH. Detection of BK virus and JC virus DNA in urine samples from immunocompromised (HIV-infected) and immunocompetent (HIV-non-infected) patients using polymerase chain reaction and microplate hybridisation. *J Clin Virol.* 2004;29(4):224-9. Epub 2004/03/17.
11. Berger JR, Houff SA, Gurwell J, Vega N, Miller CS, Danaher RJ. JC virus antibody status underestimates infection rates. *Ann Neurol.* 2013. Epub 2013/03/26.
12. Biogen. TOUCH™ Prescribing Program. 2006; Available from: <http://www.tysabri.com/safety-with-tysabri.xml>.
13. Bloomgren G, Richman S, Hotermans C, Subramanyam M, Goelz S, Natarajan A, Lee S, Plavina T, Scanlon JV, Sandrock A, Bozic C. Risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med.* 2012;366(20):1870-80. Epub 2012/05/18.
14. Boukoum H, Nahdi I, Abid N, Foulongne V, Sahtout W, Zallema D, Skiri H, Aloui S, Achour A, Segondy M, Aouni M. Distribution of JC polyomavirus genotypes in Tunisian renal transplant recipients between January 2008 and January 2011. *J Med Virol.* 2012;84(11):1818-24. Epub 2012/09/22.
15. Boukoum H, Nahdi I, Foulongne V, Zallema D, Aloui S, Achour A, Segondy M, Aouni M. Distribution of BK polyomavirus genotypes in Tunisian renal transplant recipients. *J Med Virol.* 2011;83(4):725-30. Epub 2011/02/18.

16. Bozic C, Richman S, Plavina T, Natarajan A, Scanlon JV, Subramanyam M, Sandrock A, Bloomgren G. Anti-John Cunningham virus antibody prevalence in multiple sclerosis patients: baseline results of STRATIFY-1. *Ann Neurol.* 2011;70(5):742-50. Epub 2011/12/14.
17. Brinkmann V. FTY720 (fingolimod) in Multiple Sclerosis: therapeutic effects in the immune and the central nervous system. *Br J Pharmacol.* 2009;158(5):1173-82. Epub 2009/10/10.
18. Brown P, Tsai T, Gajdusek DC. Seroepidemiology of human papovaviruses. Discovery of virgin populations and some unusual patterns of antibody prevalence among remote peoples of the world. *Am J Epidemiol.* 1975;102(4):331-40. Epub 1975/10/01.
19. Callegaro D, Goldbaum M, Morais L, Tilbery CP, Moreira MA, Gabbai AA, Scaff M. The prevalence of multiple sclerosis in the city of Sao Paulo, Brazil, 1997. *Acta Neurol Scand.* 2001;104(4):208-13. Epub 2001/10/09.
20. Cardoso E, Fukuda T, Pereira J, Seixas J, Miranda R, Rodrigues B, Saback T, Andrade R, Cardoso G, Martinez R, Avena J, Melo A. Clinical and epidemiological profile of multiple sclerosis in a reference center in the State of Bahia, Brazil. *Arq Neuropsiquiatr.* 2006;64(3B):727-30. Epub 2006/10/24.
21. Casetta I, Invernizzi M, Granieri E. Multiple sclerosis and dental amalgam: case-control study in Ferrara, Italy. *Neuroepidemiology.* 2001;20(2):134-7. Epub 2001/05/19.
22. Chen Y, Bord E, Tompkins T, Miller J, Tan CS, Kinkel RP, Stein MC, Viscidi RP, Ngo LH, Koralnik IJ. Asymptomatic reactivation of JC virus in patients treated with natalizumab. *N Engl J Med.* 2009;361(11):1067-74. Epub 2009/09/11.
23. Chima SC, Ryschkewitsch CF, Stoner GL. Molecular epidemiology of human polyomavirus JC in the Biaka Pygmies and Bantu of Central Africa. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1998;93(5):615-23. Epub 1998/11/27.

24. Chou Q, Russell M, Birch DE, Raymond J, Bloch W. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Res.* 1992;20(7):1717-23. Epub 1992/04/11.

25. Compston A. Story of multiple sclerosis. *McAlpine's Multiple Sclerosis.* London: Churchill Livingstone; 1999. p. 3-42.
26. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet.* 2008;372(9648):1502-17. Epub 2008/10/31.

27. Cook SD, Rohowsky-Kochan C, Bansil S, Dowling PC. Evidence for multiple sclerosis as an infectious disease. *Acta Neurol Scand Suppl.* 1995;161:34-42. Epub 1995/01/01.

28. Daniel DC, Wortman MJ, Schiller RJ, Liu H, Gan L, Mellen JS, Chang CF, Gallia GL, Rappaport J, Khalili K, Johnson EM. Coordinate effects of human immunodeficiency virus type 1 protein Tat and cellular protein Puralpha on DNA replication initiated at the JC virus origin. *J Gen Virol.* 2001;82(Pt 7):1543-53. Epub 2001/06/20.

29. Delbue S, Branchetti E, Boldorini R, Vago L, Zerbi P, Veggiani C, Tremolada S, Ferrante P. Presence and expression of JCV early gene large T Antigen in the brains of immunocompromised and immunocompetent individuals. *J Med Virol.* 2008;80(12):2147-52. Epub 2008/12/02.

30. Delbue S, Sotgiu G, Fumagalli D, Valli M, Borghi E, Mancuso R, Marchioni E, Maserati R, Ferrante P. A case of a progressive multifocal leukoencephalopathy patient with four different JC virus transcriptional control region rearrangements in cerebrospinal fluid, blood, serum, and urine. *J Neurovirol.* 2005;11(1):51-7. Epub 2005/04/05.

31. Di Taranto C, Pietropaolo V, Orsi GB, Jin L, Sinibaldi L, Degener AM. Detection of BK polyomavirus genotypes in healthy and HIV-positive children. *Eur J Epidemiol.* 1997;13(6):653-7. Epub 1997/11/05.

32. Drachenberg CB, Hirsch HH, Papadimitriou JC, Gosert R, Wali RK, Munivenkatappa R, Nogueira J, Cangro CB, Haririan A, Mendley S, Ramos E. Polyomavirus BK versus JC replication and nephropathy in renal transplant recipients: a prospective evaluation. *Transplantation*. 2007;84(3):323-30. Epub 2007/08/19.
33. Egli A, Infanti L, Dumoulin A, Buser A, Samaridis J, Stebler C, Gosert R, Hirsch HH. Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *J Infect Dis*. 2009;199(6):837-46. Epub 2009/05/13.
34. Etemadifar M, Janghorbani M, Shaygannejad V. Comparison of interferon beta products and azathioprine in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurol*. 2007;254(12):1723-8. Epub 2007/12/13.
35. Faber H, Fischer HJ, Weber F. Prolonged and symptomatic bradycardia following a single dose of fingolimod. *Mult Scler*. 2012. Epub 2012/06/26.
36. Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science*. 2008;319(5866):1096-100. Epub 2008/01/19.
37. Ferrante P, Delbue S, Pagani E, Mancuso R, Marzocchetti A, Borghi E, Maserati R, Bestetti A, Cinque P. 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*. 2003;9 Suppl 1:42-6. Epub 2003/04/24.
38. Ferreira ML, Machado MI, Vilela ML, Guedes MJ, Ataíde L, Jr., Santos S, Laurentino SG. [Epidemiology of 118 cases of multiple sclerosis after 15 years of follow-up on the reference center of Hospital da Restauração, Recife, Pernambuco, Brazil]. *Arq Neuropsiquiatr*. 2004;62(4):1027-32. Epub 2004/12/21.
39. Fink MC, de Oliveira AC, Romano CM, Vidal JE, Urbano PR, Tateno AF, Oliveira CM, de Albuquerque Luna EJ, Pannuti CS. Molecular characterization of human polyomavirus JC in Brazilian AIDS patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Clin Virol*. 2010;48(1):6-10. Epub 2010/03/26.

40. Fink MC, Penalva de Oliveira AC, Milagres FA, Vidal JE, Picerno-Pouza AF, Duarte Neto A, Pannuti CS. JC virus DNA in cerebrospinal fluid samples from Brazilian AIDS patients with focal brain lesions without mass effect. *J Infect.* 2006;52(1):30-6. Epub 2005/12/22.
41. Fink MCDdS. Distribuição genotípica do poliomavirus humano JC em pacientes com aids, com e sem leucoencefalopatia multifocal progressiva, em São Paulo, Brasil. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2009.
42. Fishman JA. BK virus nephropathy--polyomavirus adding insult to injury. *N Engl J Med.* 2002;347(7):527-30. Epub 2002/08/16.
43. Frisque RJ, Bream GL, Cannella MT. Human polyomavirus JC virus genome. *J Virol.* 1984;51(2):458-69. Epub 1984/08/01.
44. Fumian TM, Guimaraes FR, Pereira Vaz BJ, da Silva MT, Muylaert FF, Bofill-Mas S, Girones R, Leite JP, Miagostovich MP. Molecular detection, quantification and characterization of human polyomavirus JC from waste water in Rio De Janeiro, Brazil. *J Water Health.* 2010;8(3):438-45. Epub 2010/04/09.
45. Ganne V, Siddiqi N, Kamapath B, Chang CC, Cohen EP, Bresnahan BA, Hariharan S. Humanized anti-CD20 monoclonal antibody (Rituximab) treatment for post-transplant lymphoproliferative disorder. *Clin Transplant.* 2003;17(5):417-22. Epub 2004/01/06.
46. Gardner SD. Prevalence in England of antibody to human polyomavirus (B.k.). *Br Med J.* 1973;1(5845):77-8. Epub 1973/01/13.
47. Gasnault J, Kahraman M, de Goer de Herve MG, Durali D, Delfraissy JF, Taoufik Y. Critical role of JC virus-specific CD4 T-cell responses in preventing progressive multifocal leukoencephalopathy. *AIDS.* 2003;17(10):1443-9. Epub 2003/06/26.

48. Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, Mackay IM, Lambert SB, Wu G, Brennan DC, Storch GA, Sloots TP, Wang D. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog.* 2007;3(5):e64. Epub 2007/05/08.
49. Girardi AJ, Sweet BH, Slotnick VB, Hilleman MR. Development of tumors in hamsters inoculated in the neonatal period with vacuolating virus, SV-40. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1962;109:649-60. Epub 1962/03/01.
50. Gorelik L, Lerner M, Bixler S, Crossman M, Schlain B, Simon K, Pace A, Cheung A, Chen LL, Berman M, Zein F, Wilson E, Yednock T, Sandrock A, Goelz SE, Subramanyam M. Anti-JC virus antibodies: implications for PML risk stratification. *Ann Neurol.* 2010;68(3):295-303. Epub 2010/08/26.
51. Gorelik L, Reid C, Testa M, Brickelmaier M, Bossolasco S, Pazzi A, Bestetti A, Carmillo P, Wilson E, McAuliffe M, Tonkin C, Carulli JP, Lugovskoy A, Lazzarin A, Sunyaev S, Simon K, Cinque P. Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) development is associated with mutations in JC virus capsid protein VP1 that change its receptor specificity. *J Infect Dis.* 2011;204(1):103-14. Epub 2011/06/02.
52. Gosert R, Rinaldo CH, Funk GA, Egli A, Ramos E, Drachenberg CB, Hirsch HH. Polyomavirus BK with rearranged noncoding control region emerge in vivo in renal transplant patients and increase viral replication and cytopathology. *J Exp Med.* 2008;205(4):841-52. Epub 2008/03/19.
53. Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol.* 2003;52(5):696-704. Epub 2003/10/08.
54. Hedstrom AK, Baarnhielm M, Olsson T, Alfredsson L. Tobacco smoking, but not Swedish snuff use, increases the risk of multiple sclerosis. *Neurology.* 2009;73(9):696-701. Epub 2009/09/02.
55. Hilton R, Tong CY. Antiviral therapy for polyomavirus-associated nephropathy after renal transplantation. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62(5):855-9. Epub 2008/07/29.

56. Holmoy T, Kampman MT, Smolders J. Vitamin D in multiple sclerosis: implications for assessment and treatment. *Expert Rev Neurother.* 2012;12(9):1101-12. Epub 2012/10/09.
57. Hoppe BL, Conti-Tronconi BM, Horton RM. Gel-loading dyes compatible with PCR. *Biotechniques.* 1992;12(5):679-80. Epub 1992/05/01.
58. Imperiale MJ ME. Polyomaviruses. *Field's Virology.* New York: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2263-98
59. Jin L. Rapid genomic typing of BK virus directly from clinical specimens. *Mol Cell Probes.* 1993;7(4):331-4. Epub 1993/08/01.
60. Kachuck NJ. Challenges and opportunities: what we are learning from the clinical natalizumab experience. *Expert Rev Neurother.* 2005;5(5):605-15. Epub 2005/09/16.
61. Kappos L, Bates D, Edan G, Eraksoy M, Garcia-Merino A, Grigoriadis N, Hartung HP, Havrdova E, Hillert J, Hohlfeld R, Kremenchutzky M, Lyon-Caen O, Miller A, Pozzilli C, Ravnborg M, Saida T, Sindic C, Vass K, Clifford DB, Hauser S, Major EO, O'Connor PW, Weiner HL, Clanet M, Gold R, Hirsch HH, Radu EW, Sorensen PS, King J. Natalizumab treatment for multiple sclerosis: updated recommendations for patient selection and monitoring. *Lancet Neurol.* 2011;10(8):745-58. Epub 2011/07/23.
62. Kappos L, Radue EW, O'Connor P, Polman C, Hohlfeld R, Calabresi P, Selmaj K, Agoropoulou C, Leyk M, Zhang-Auberson L, Burtin P. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2010;362(5):387-401. Epub 2010/01/22.
63. Kean JM, Rao S, Wang M, Garcea RL. Seroepidemiology of human polyomaviruses. *PLoS Pathog.* 2009;5(3):e1000363. Epub 2009/03/28.
64. Kieseier BC, Jeffery DR. Chemotherapeutics in the treatment of multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord.* 2010;3(5):277-91. Epub 2010/12/24.

65. Kitamura T, Aso Y, Kuniyoshi N, Hara K, Yogo Y. High incidence of urinary JC virus excretion in nonimmunosuppressed older patients. *J Infect Dis.* 1990;161(6):1128-33. Epub 1990/06/01.
66. Kleinschmidt-DeMasters BK, Miravalle A, Schowinsky J, Corboy J, Vollmer T. Update on PML and PML-IRIS occurring in multiple sclerosis patients treated with natalizumab. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2012;71(7):604-17. Epub 2012/06/20.
67. Kleinschmidt-DeMasters BK, Tyler KL. Progressive multifocal leukoencephalopathy complicating treatment with natalizumab and interferon beta-1a for multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2005;353(4):369-74. Epub 2005/06/11.
68. Kling CL, Wright AT, Katz SE, McClure GB, Gardner JS, Williams JT, Meinerz NM, Garcea RL, Vanchiere JA. Dynamics of urinary polyomavirus shedding in healthy adult women. *J Med Virol.* 2012;84(9):1459-63. Epub 2012/07/25.
69. Kmiecik D, Debicki S, Trzeciak WH. Occurrence rate and genotype distribution of the JC virus (JCV) in a sample from the Polish population. *J Med Virol.* 2008;80(6):1079-83. Epub 2008/04/23.
70. Knowles WA, Pillay D, Johnson MA, Hand JF, Brown DW. Prevalence of long-term BK and JC excretion in HIV-infected adults and lack of correlation with serological markers. *J Med Virol.* 1999;59(4):474-9. Epub 1999/10/27.
71. Koralnik IJ. Progressive multifocal leukoencephalopathy revisited: Has the disease outgrown its name? *Ann Neurol.* 2006;60(2):162-73. Epub 2006/07/25.
72. Koralnik IJ, Boden D, Mai VX, Lord CI, Letvin NL. JC virus DNA load in patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurology.* 1999;52(2):253-60. Epub 1999/02/05.
73. Krumbholz A, Zell R, Egerer R, Sauerbrei A, Helming A, Gruhn B, Wutzler P. Prevalence of BK virus subtype I in Germany. *J Med Virol.* 2006;78(12):1588-98. Epub 2006/10/26.

74. Kurtzke JF, Heltberg A. Multiple sclerosis in the Faroe Islands: an epitome. *J Clin Epidemiol*. 2001;54(1):1-22. Epub 2001/02/13.
75. Kusne S, Vilchez RA, Zanwar P, Quiroz J, Mazur MJ, Heilman RL, Mulligan D, Butel JS. Polyomavirus JC urinary shedding in kidney and liver transplant recipients associated with reduced creatinine clearance. *J Infect Dis*. 2012;206(6):875-80. Epub 2012/07/18.
76. Lana-Peixoto MA, Frota ER, Campos GB, Monteiro LP. The prevalence of multiple sclerosis in Belo Horizonte, Brazil. *Arq Neuropsiquiatr*. 2012;70(2):102-7. Epub 2012/02/09.
77. Langer-Gould A, Atlas SW, Green AJ, Bollen AW, Pelletier D. Progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient treated with natalizumab. *N Engl J Med*. 2005;353(4):375-81. Epub 2005/06/11.
78. Lanzillo R, Quarantelli M, Bonavita S, Ventrella G, Lus G, Vacca G, Prinster A, Orefice G, Tedeschi G, Brescia Morra V. Natalizumab vs interferon beta 1a in relapsing-remitting multiple sclerosis: a head-to-head retrospective study. *Acta Neurol Scand*. 2011. Epub 2011/11/24.
79. Laroni A, Giacomazzi CG, Grimaldi L, Gallo P, Sormani MP, Bertolotto A, McDermott JL, Gandoglia I, Martini I, Vitello G, Rinaldi F, Barzon L, Militello V, Pizzorno M, Bandini F, Capello E, Palu G, Uccelli A, Mancardi GL, Varnier OE. Urinary JCV-DNA testing during natalizumab treatment may increase accuracy of PML risk stratification. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2012;7(3):665-72. Epub 2012/05/16.
80. Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol*. 2007;17(2):210-8. Epub 2007/03/29.
81. Lassmann H, van Horssen J, Mahad D. Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. *Nat Rev Neurol*. 2012;8(11):647-56. Epub 2012/09/26.
82. Levy MSF. O Papel da Migração Internaciona na Evolução da população Brasileira (1872 a 1972). *Rev Saúde Públ, São Paulo*. 1974;8:49-90.

83. Liddington RC, Yan Y, Moulai J, Sahli R, Benjamin TL, Harrison SC. Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature*. 1991;354(6351):278-84. Epub 1991/11/28.
84. Liu CK, Wei G, Atwood WJ. Infection of glial cells by the human polyomavirus JC is mediated by an N-linked glycoprotein containing terminal alpha(2-6)-linked sialic acids. *J Virol*. 1998;72(6):4643-9. Epub 1998/05/30.
85. Lonergan RM, Carr MJ, De Gascun CF, Costelloe LF, Waters A, Coughlan S, Duggan M, Doyle K, Jordan S, Hutchinson MW, Hall WW, Tubridy NJ. Reactivation of BK polyomavirus in patients with multiple sclerosis receiving natalizumab therapy. *J Neurovirol*. 2009;15(5-6):351-9. Epub 2009/08/12.
86. Machado DM, Fink MC, Pannuti CS, Succi RC, Machado AA, Carmo FB, Gouvea Ade F, Urbano PR, Beltrao SV, Santos IC, Machado CM. Human polyomaviruses JC and BK in the urine of Brazilian children and adolescents vertically infected by HIV. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106(8):931-5. Epub 2012/01/14.
87. Mancuso R, Saresella M, Hernis A, Marventano I, Ricci C, Agostini S, Rovaris M, Caputo D, Clerici M. JC virus detection and JC virus-specific immunity in natalizumab-treated Multiple Sclerosis patients. *J Transl Med*. 2012;10:248. Epub 2012/12/13.
88. Markowitz RB, Thompson HC, Mueller JF, Cohen JA, Dynan WS. Incidence of BK virus and JC virus viruria in human immunodeficiency virus-infected and -uninfected subjects. *J Infect Dis*. 1993;167(1):13-20. Epub 1993/01/01.
89. Marzocchetti A, Wuthrich C, Tan CS, Tompkins T, Bernal-Cano F, Bhargava P, Ropper AH, Koralnik IJ. Rearrangement of the JC virus regulatory region sequence in the bone marrow of a patient with rheumatoid arthritis and progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurovirol*. 2008;14(5):455-8. Epub 2008/11/08.
90. Matos A, Duque V, Beato S, da Silva JP, Major E, Melico-Silvestre A. Characterization of JC human polyomavirus infection in a Portuguese population. *J Med Virol*. 2010;82(3):494-504. Epub 2010/01/21.

91. McClure GB, Gardner JS, Williams JT, Copeland CM, Sylvester SK, Garcea RL, Meinerz NM, Groome LJ, Vanchiere JA. Dynamics of pregnancy-associated polyomavirus urinary excretion: a prospective longitudinal study. *J Med Virol.* 2012;84(8):1312-22. Epub 2012/06/20.
92. Milo R, Kahana E. Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment. *Autoimmun Rev.* 2010;9(5):A387-94. Epub 2009/11/26.
93. Moreira MA, Tilbery CP, Lana-Peixoto MA, Mendes MF, Kaimen-Maciel DR, Callegaro D. [Historical aspects of multiple sclerosis]. *Rev Neurol.* 2002;34(4):379-83. Epub 2002/05/22. Aspectos historicos de la esclerosis multiple.
94. Murray TJ. The history of multiple sclerosis: the changing frame of the disease over the centuries. *J Neurol Sci.* 2009a;277 Suppl 1:S3-8. Epub 2009/02/10.
95. Murray TJ. Robert Carswell: the first illustrator of MS. *Int MS J.* 2009b;16(3):98-101. Epub 2009/11/03.
96. Nali LH, Centrone Cde C, Urbano PR, Penalva-de-Oliveira AC, Vidal JE, Miranda EP, Pannuti CS, Fink MC. High prevalence of the simultaneous excretion of polyomaviruses JC and BK in the urine of HIV-infected patients without neurological symptoms in Sao Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2012;54(4):201-5. Epub 2012/08/02.
97. Nie NB, DH; Hull, CH. SPSS: Statistical Package for the Social Sciences. New York 1970.
98. Nishimoto Y, Zheng HY, Zhong S, Ikegaya H, Chen Q, Sugimoto C, Kitamura T, Yogo Y. An Asian origin for subtype IV BK virus based on phylogenetic analysis. *J Mol Evol.* 2007;65(1):103-11. Epub 2007/06/27.
99. Noseworthy JH, Kirkpatrick P. Natalizumab. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(2):101-2. Epub 2005/03/11.

100. Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2000;343(13):938-52. Epub 2000/09/28.
101. Ontaneda D, Hara-Cleaver C, Rudick RA, Cohen JA, Bermel RA. Early tolerability and safety of fingolimod in clinical practice. *J Neurol Sci*. 2012;323(1-2):167-72. Epub 2012/10/09.
102. Owens T, Sriram S. The immunology of multiple sclerosis and its animal model, experimental allergic encephalomyelitis. *Neurol Clin*. 1995;13(1):51-73. Epub 1995/02/01.
103. Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet*. 1971;1(7712):1257-60. Epub 1971/06/19.
104. Pal A, Sirota L, Maudru T, Peden K, Lewis AM, Jr. Real-time, quantitative PCR assays for the detection of virus-specific DNA in samples with mixed populations of polyomaviruses. *J Virol Methods*. 2006;135(1):32-42. Epub 2006/03/11.
105. Perez-Liz G, Del Valle L, Gentilella A, Croul S, Khalili K. Detection of JC virus DNA fragments but not proteins in normal brain tissue. *Ann Neurol*. 2008;64(4):379-87. Epub 2008/08/09.
106. Pfister LA, Letvin NL, Koralnik IJ. JC virus regulatory region tandem repeats in plasma and central nervous system isolates correlate with poor clinical outcome in patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Virol*. 2001;75(12):5672-6. Epub 2001/05/18.
107. Pietropaolo V, Videtta M, Fioriti D, Mischitelli M, Arancio A, Orsi N, Degener AM. Rearrangement patterns of JC virus noncoding control region from different biological samples. *J Neurovirol*. 2003;9(6):603-11. Epub 2003/11/07.
108. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, Phillips JT, Lublin FD, Giovannoni G, Wajgt A, Toal M, Lynn F, Panzara MA, Sandrock

AW. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2006;354(9):899-910. Epub 2006/03/03.

109. Polo C, Perez JL, Mielnichuck A, Fedele CG, Niubo J, Tenorio A. Prevalence and patterns of polyomavirus urinary excretion in immunocompetent adults and children. *Clin Microbiol Infect*. 2004;10(7):640-4. Epub 2004/06/25.

110. Rajpoot DK, Gomez A, Tsang W, Shanberg A. Ureteric and urethral stenosis: a complication of BK virus infection in a pediatric renal transplant patient. *Pediatr Transplant*. 2007;11(4):433-5. Epub 2007/05/12.

111. Reid CE, Li H, Sur G, Carmillo P, Bushnell S, Tizard R, McAuliffe M, Tonkin C, Simon K, Goelz S, Cinque P, Gorelik L, Carulli JP. Sequencing and analysis of JC virus DNA from natalizumab-treated PML patients. *J Infect Dis*. 2011;204(2):237-44. Epub 2011/06/16.

112. Ribeiro SB, Maia DF, Ribeiro JB, Cardoso FA, Silva C. Clinical and epidemiological profile of patients with multiple sclerosis in Uberaba, Minas Gerais, Brazil. *Arq Neuropsiquiatr*. 2011;69(2A):184-7. Epub 2011/05/04.

113. Ribeiro T, Fleury MJ, Granieri E, Castellazzi M, Martini F, Mazzoni E, Coursaget P, Tognon M. Investigation of the prevalence of antibodies against neurotropic polyomaviruses BK, JC and SV40 in sera from patients affected by multiple sclerosis. *Neurol Sci*. 2010;31(4):517-21. Epub 2010/06/17.

114. Rosati G. The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurol Sci*. 2001;22(2):117-39. Epub 2001/10/18.

115. Rossi A, Delbue S, Mazziotti R, Valli M, Borghi E, Mancuso R, Calvo MG, Ferrante P. Presence, quantitation and characterization of JC virus in the urine of Italian immunocompetent subjects. *J Med Virol*. 2007;79(4):408-12. Epub 2007/02/22.

116. Rudick RA, O'Connor PW, Polman CH, Goodman AD, Ray SS, Griffith NM, Jurgensen SA, Gorelik L, Forrestal F, Sandroock AW, S EG. Assessment of JC virus DNA

in blood and urine from natalizumab-treated patients. *Ann Neurol.* 2010;68(3):304-10. Epub 2010/08/26.

117. Runia TF, Hop WC, de Rijke YB, Buljevac D, Hintzen RQ. Lower serum vitamin D levels are associated with a higher relapse risk in multiple sclerosis. *Neurology.* 2012;79(3):261-6. Epub 2012/06/16.

118. Sadiq SA, Puccio LM, Brydon EW. JCV detection in multiple sclerosis patients treated with natalizumab. *J Neurol.* 2010;257(6):954-8. Epub 2010/01/07.

119. Sorensen PS, Bertolotto A, Edan G, Giovannoni G, Gold R, Havrdova E, Kappos L, Kieseier BC, Montalban X, Olsson T. Risk stratification for progressive multifocal leukoencephalopathy in patients treated with natalizumab. *Mult Scler.* 2012;18(2):143-52. Epub 2012/02/09.

120. Stoner GL, Jobes DV, Fernandez Cobo M, Agostini HT, Chima SC, Ryschkewitsch CF. JC virus as a marker of human migration to the Americas. *Microbes Infect.* 2000;2(15):1905-11. Epub 2001/02/13.

121. Stoner GL, Ryschkewitsch CF, Walker DL, Webster HD. JC papovavirus large tumor (T)-antigen expression in brain tissue of acquired immune deficiency syndrome (AIDS) and non-AIDS patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(7):2271-5. Epub 1986/04/01.

122. Sugimoto C, Kitamura T, Guo J, Al-Ahdal MN, Shchelkunov SN, Otova B, Ondrejka P, Chollet JY, El-Safi S, Ettayebi M, Gresenguet G, Kocagoz T, Chaiyarasamee S, Thant KZ, Thein S, Moe K, Kobayashi N, Taguchi F, Yogo Y. Typing of urinary JC virus DNA offers a novel means of tracing human migrations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(17):9191-6. Epub 1997/08/19.

123. Sumelahti ML, Tienari PJ, Wikstrom J, Salminen TM, Hakama M. Survival of multiple sclerosis in Finland between 1964 and 1993. *Mult Scler.* 2002;8(4):350-5. Epub 2002/08/09.

124. Sunyaev SR, Lugovskoy A, Simon K, Gorelik L. Adaptive mutations in the JC virus protein capsid are associated with progressive multifocal leukoencephalopathy (PML). *PLoS Genet.* 2009;5(2):e1000368. Epub 2009/02/07.
125. Tan CS, Dezube BJ, Bhargava P, Autissier P, Wuthrich C, Miller J, Koralnik IJ. Detection of JC virus DNA and proteins in the bone marrow of HIV-positive and HIV-negative patients: implications for viral latency and neurotropic transformation. *J Infect Dis.* 2009;199(6):881-8. Epub 2009/05/13.
126. Tan CS, Ellis LC, Wuthrich C, Ngo L, Broge TA, Jr., Saint-Aubyn J, Miller JS, Koralnik IJ. JC virus latency in the brain and extraneural organs of patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Virol.* 2010;84(18):9200-9. Epub 2010/07/09.
127. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(24):4876-82. Epub 1998/02/28.
128. Tilbery CP. *Esclerose Múltipla no Brasil: Aspectos Clínicos e Terapeuticos* São Paulo: Atheneu; 2004.
129. Trampe AK, Hemmelmann C, Stroet A, Haghighi A, Hellwig K, Wiendl H, Goelz S, Ziegler A, Gold R, Chan A. Anti-JC virus antibodies in a large German natalizumab-treated multiple sclerosis cohort. *Neurology.* 2012;78(22):1736-42. Epub 2012/05/18.
130. Tur C, Tintore M, Vidal-Jordana A, Castillo J, Galan I, Rio J, Arrambide G, Comabella M, Arevalo MJ, Horno R, Vicente MJ, Caminero A, Nos C, Sastre-Garriga J, Montalban X. Natalizumab discontinuation after PML risk stratification: outcome from a shared and informed decision. *Mult Scler.* 2012;18(8):1193-6. Epub 2012/03/03.
131. van der Meijden E, Janssens RW, Lauber C, Bouwes Bavinck JN, Gorbalenya AE, Feltkamp MC. Discovery of a new human polyomavirus associated with

trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient. PLoS Pathog. 2010;6(7):e1001024. Epub 2010/08/06.

132. Van Regenmortel M FC, Bishop D, et al., . Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy. 2000.

133. Vidal JE, Fink MC, Cedeno-Laurent F, Delbue S, Ferrante P, Dauar RF, Filho FB, Nogueira RS, Calore EE, Pannuti CS, Trujillo JR, de Oliveira AC. BK virus associated meningoencephalitis in an AIDS patient treated with HAART. AIDS Res Ther. 2007;4:13. Epub 2007/06/15.

134. Voskuhl RR, Gold SM. Sex-related factors in multiple sclerosis susceptibility and progression. Nat Rev Neurol. 2012;8(5):255-63. Epub 2012/03/28.

135. Warnke C, Dehmel T, Posevitz-Fejfar A, Chan A, Berthele A, Schmidt S, Haas J, Kronsbein HC, Seitz F, Tackenberg B, Maurer M, Gerbershagen K, Limmroth V, Adams O, Hartung HP, Gold R, Hemmer B, Wiendl H, Kieseier BC. Anti-JC-virus antibody prevalence in a German MS cohort. Mult Scler. 2012;18(7):1054-5. Epub 2012/06/29.

136. Wingerchuk DM. Smoking: effects on multiple sclerosis susceptibility and disease progression. Ther Adv Neurol Disord. 2012;5(1):13-22. Epub 2012/01/26.

137. Worth A, Conyers R, Cohen J, Jagani M, Chiesa R, Rao K, Goulden N, Veys P, Amrolia PJ. Pre-emptive rituximab based on viraemia and T cell reconstitution: a highly effective strategy for the prevention of Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disease following stem cell transplantation. Br J Haematol. 2011;155(3):377-85. Epub 2011/09/14.

138. Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L, Karin N. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. Nature. 1992;356(6364):63-6. Epub 1992/03/05.

139. Yogo Y, Kitamura T, Sugimoto C, Ueki T, Aso Y, Hara K, Taguchi F. Isolation of a possible archetypal JC virus DNA sequence from nonimmunocompromised individuals. *J Virol*. 1990;64(6):3139-43. Epub 1990/06/01.
140. Yogo Y, Matsushima-Ohno T, Hayashi T, Sugimoto C, Sakurai M, Kanazawa I. JC virus regulatory region rearrangements in the brain of a long surviving patient with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2001;71(3):397-400. Epub 2001/08/21.
141. Zalona AC, Lopes GS, Schrago CG, Goncalves RT, Zalis MG, Varella RB. Molecular characterization of BK polyomavirus subtypes in renal transplant recipients in Brazil. *J Med Virol*. 2011;83(8):1401-5. Epub 2011/06/17.
142. Zheng HY, Nishimoto Y, Chen Q, Hasegawa M, Zhong S, Ikegaya H, Ohno N, Sugimoto C, Takasaka T, Kitamura T, Yogo Y. Relationships between BK virus lineages and human populations. *Microbes Infect*. 2007;9(2):204-13. Epub 2007/01/09.
143. Zhong S, Randhawa PS, Ikegaya H, Chen Q, Zheng HY, Suzuki M, Takeuchi T, Shibuya A, Kitamura T, Yogo Y. Distribution patterns of BK polyomavirus (BKV) subtypes and subgroups in American, European and Asian populations suggest co-migration of BKV and the human race. *J Gen Virol*. 2009;90(Pt 1):144-52. Epub 2008/12/18.
144. Zhong S, Zheng HY, Suzuki M, Chen Q, Ikegaya H, Aoki N, Usuku S, Kobayashi N, Nukuzuma S, Yasuda Y, Kuniyoshi N, Yogo Y, Kitamura T. Age-related urinary excretion of BK polyomavirus by nonimmunocompromised individuals. *J Clin Microbiol*. 2007;45(1):193-8. Epub 2006/11/10.

9. Anexos

Anexo 1. Comprovante de submissão do artigo submetido ao *Journal of NeuroVirology*

Journal of NeuroVirology

Natalizumab treatment for multiple sclerosis in a JCV positive patient: Detection of viral minor variant and considerations for a successful monitoring

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Natalizumab treatment for multiple sclerosis in a JCV positive patient: Detection of viral minor variant and considerations for a successful monitoring
Article Type:	Short Communication
Corresponding Author:	Camila Malta Romano, Ph.D Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo São Paulo, São Paulo BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias, Instituto de Medicina Tropical de São Paulo e Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Luiz Henrique da Silva Nali
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Luiz Henrique da Silva Nali Lenira Moraes, Ph.D Maria Cristina Domingues Fink, Ph.D Dagoberto Callegaro, Ph.D MD Camila Malta Romano, Ph.D Augusto César Penalva-de-Oliveira, Ph.D MD
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	Natalizumab is currently one of the best options for the treatment of Multiple Sclerosis (MS). However, prolonged use has been associated with increased risk of developing Progressive Multifocal Leukoencephalopathy (PML). Here, we followed-up a MS patient receiving Natalizumab for 12 months by monitoring the JCV/DNA in the blood and urine. VP1 gene and regulatory region (RR) were sequenced from positive samples and RR of the last three time-points was cloned. Although viremia was not detected, all urine samples were positive for JCV/DNA. Importantly, the viral load increased substantially throughout therapy with peaks in the 8th to 10th months, concomitant to detection of a nucleotide mutation emergence. We show evidences that monitoring JCV load and viral nucleotide sequences in urine may be crucial to the Natalizumab treatment safety since the emergence of mutants is facilitated by the high viral replication rate achieved during the treatment.
Suggested Reviewers:	
Opposed Reviewers:	

Anexo 2. Carta de Aprovação do CEP do IMT do projeto de pesquisa.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
 INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
 Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
 CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil
 e-mail: cpq-imt@usp.br
 Telefone: (55-11) 3061-7125 e 3061-8650 FAX: (55-11) 3064-5132 e 3062-2174

São Paulo, 28 de setembro de 2011.

Ilmo (a) Sr (a)
Dra. Camila Malta Romano
 (aos cuidados de Luiz Nali)

Em reunião na presente data, a Comissão de Pesquisa e Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, tomou ciência do projeto classificado sob número **CPE-IMT 2011/106** e intitulado "Investigação da reativação dos Poliomavírus JC e BK em pacientes com Esclerose Múltipla (EM) sob tratamento com Natalizumab e pacientes com EM sob outros tratamentos", sob sua responsabilidade.

Atenciosamente

Dr. Paulo Cotrim

Presidente da Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP

Presidente da Comissão de Pesquisa
 Instituto de Medicina Tropical
 de São Paulo

Anexo 3. Carta de aprovação da CAPPESQ do projeto de pesquisa.

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 06/04/2011, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0166/11**, intitulado: **"INVESTIGAÇÃO DA REATIVAÇÃO DE VÍRUS LATENTES EM PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA SOB TRATAMENTO COM NATALIZUMAB"** apresentado pelo **INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Camila Malta Romano**

CAPPesq, 08 de Abril de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
 Coordenador
 Comissão de Ética para Análise de
 Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492
 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

Anexo 4. Exemplo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido apresentado aos voluntários participantes do estudo.

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU
RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME:
.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº
APTO:

BAIRRO: CIDADE
.....

CEP:.....TELEFONE: DDD (.....)
.....

2. RESPONSÁVEL LEGAL
.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO:.....Nº.....A
PTO:

BAIRRO: CIDADE:
.....

CEP:.....TELEFONE: DDD ().....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: INVESTIGAÇÃO DA REATIVAÇÃO DE VÍRUS LATENTES EM PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA SOB TRATAMENTO COM NATALIZUMAB

PESQUISADOR : Dra. CAMILA MALTA ROMANO

CARGO/FUNÇÃO: PESQUISADOR CIENTÍFICO

UNIDADE DO HCFMUSP: LABORATÓRIO DE INVESTIGAÇÃO MÉDICA LIM-52

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO ☒ RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

3. DURAÇÃO DO ESTUDO : 2 ANOS

4. DURAÇÃO DO ACOMPANHAMENTO DOS PACIENTES: 12 MESES

1 – Desenho do Estudo e Objetivo

Estamos realizando um estudo de caráter observacional em indivíduos com Esclerose Múltipla, que estejam recebendo tratamento distintos (interferons e imunossuppressores ou Natalizumab). Isso está sendo proposto pelo fato de que o Natalizumab, o qual tem se mostrado muito promissor para o controle da doença, parece permitir a reativação de

alguns vírus em certos pacientes. Um desses vírus pode causar uma doença grave, que acomete o cérebro. O objetivo deste termo é convidá-lo a participar desse estudo, onde será avaliada a presença e caracterização de alguns tipos de vírus na urina e no sangue de pacientes com Esclerose Múltipla que se encontram sob diferentes tratamentos. É importante mencionar que nenhum tipo de interferência será feita por parte do estudo nos regimes terapêuticos que os voluntários estejam recebendo. Ainda, o acompanhamento proposto nesse estudo será de 12 meses, a ser contado a partir da sua inclusão no estudo.

Dessa forma, de acordo com a decisão do seu médico, você pode ser incluído em um dos seguintes grupos de voluntários:

- Pessoas que tem Esclerose Múltipla e estejam tratando (ou iniciarão o tratamento) com interferons e imunossuppressores;
- Pessoas que tem Esclerose Múltipla e estejam tratando (ou iniciarão o tratamento) com Natalizumab.

2 – Procedimentos de Pesquisa

Após ter sido esclarecido sobre o estudo, você poderá decidir se deseja ou não participar. Se decidir participar, você será solicitado a assinar o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** ou colocar suas impressões digitais em frente a uma testemunha de sua confiança. Uma cópia deste documento lhe será fornecida. O seu acompanhamento e tratamento prosseguirão normalmente a cargo dos médicos que lhe acompanham e não será modificado de maneira alguma caso você decida participar ou não da pesquisa. Além disso, você poderá optar por não participar mais do estudo a qualquer momento, sem que exista qualquer implicação no seu tratamento médico. Caso você aceite participar, será solicitado uma amostra de sangue, e uma amostra de urina, a serem coletadas nos dias do seu retorno ao consultório médico. A cada visita ao consultório para administração do medicamento e/ou acompanhamento de rotina, lhe será dado um potinho de coleta para que você forneça sua urina. Ainda no consultório, cerca de 20 a 30 ml do seu sangue será coletado por punção da veia periférica do membro superior (braço direito ou esquerdo). O seu material e os dados coletados durante este projeto serão utilizados apenas para o estudo da presença do material genético de diferentes vírus, e poderá ser armazenado para posteriores estudos que envolvam a investigação de outros vírus, bem como características genéticas dos pacientes. Entretanto, o paciente deverá ser contatado para permitir o uso da amostra em outro (s) estudo (s).

3 - Benefícios e Obrigações do Participante

Você não terá despesas pessoais por participar desse estudo, e nem qualquer obrigação. Também não haverá compensação financeira por sua participação. A princípio, esse estudo não trará nenhum benefício imediato a você. Entretanto, as informações obtidas de sua participação poderão beneficiar no futuro outras pessoas nas mesmas condições que você.

4 – Riscos para o participante

Por ser um estudo observacional, ou seja, sem qualquer tipo de intervenção nos regimes terapêuticos aos quais os pacientes estão submetidos, esse estudo não oferece riscos para os voluntários envolvidos. A coleta de sangue consiste no único procedimento invasivo, o que pode, em casos extremos, acarretar em hematoma no local da punção, que deve desaparecer em um ou dois dias após a coleta.

5- Garantia de Acesso aos Pesquisadores

Você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Um deles é Camila M. Romano, que pode ser encontrada na Rua Eneas de Carvalho Aguiar, 470, prédio IMTI, 2º andar, SP. Tel: 3061-7020, ou pelo endereço eletrônico cmromano@usp.br. Ainda, você poderá entrar em contato com o Dr Augusto C. Penalva, cujo endereço eletrônico é rdecassia@uol.com.br.

6 – Direito de Confidencialidade

A confidencialidade das informações obtidas nesse estudo será garantida e os dados obtidos serão analisados em conjunto com os de outros voluntários, não sendo divulgada a identificação do voluntário. Sua participação neste estudo é confidencial e sigilosa. Você poderá ter acesso aos resultados dos seus exames colhidos durante o estudo, bem como terá acesso, se assim desejar, às publicações pertinentes.

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 meu sangue e 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 completo do voluntário/representante legal

Data

Assinatura do voluntário/representante legal

Data

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo

Pesquisadora responsável: Camila Malta Romano

Data

Médico responsável :

Data

CONSENTIMENTO

Permissão de armazenamento

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 meu sangue e minha urina podem ser armazenados para que seja possível estudá-los em projetos futuros. Entendo que os pesquisadores deverão entrar em contato comigo caso minha amostra seja utilizada para outro estudo além deste. 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 completo do voluntário/representante legal

Data

Assinatura do voluntário/representante legal

Data

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo

Pesquisadora responsável: Camila Malta Romano

Data

Médico responsável :

Data

Anexo 5. Ficha fornecida aos pacientes para coleta de dados demográficos**Ficha Inicial**

Nº _____

**TENTE PREENCHER OS CAMPOS ABAIXO, CASO NAO SAIBA RESPONDER
ALGUM DELES, NAO SE PREOCUPE, CONVERSAREMOS PESSOALMENTE OU
POR TELEFONE!**

NOME : _____

DATA: _____ IDADE _____

ETNIA: ☐ NEGRA ☐ PARDA ☐ BRANCA ☐ ORIENTAL ☐ INDIGENA

**A FAMILIA DO SEU PAI OU MÃE TEM ORIGEM DE OUTRA NACIONALIDADE? SE
SIM,QUAL?**

ANO DO 1º SURTO: _____

ANO DE DIAGNÓSTICO DA _____ DOENÇA

DATA DO ULTIMO SURTO: ____/____/____

MEDICAMENTO USADO ATUALMENTE PARA A ESCLEROSE MÚLTIPLA:☐ Rebiff ☐ Interferon ☐ Azatioprina ☐ Natalizumab☐ Copaxone ☐ Avonex

Outros: _____

MEDICAMENTO JÁ UTILIZADOS PARA A ESCLEROSE MÚLTIPLA:☐ Rebiff ☐ Interferon ☐ Azatioprina ☐ Natalizumab

☐ Copaxone☐ Avonex

Outros: _____

DATA APROXIMADA DO ÚLTIMO SURTO: _____**POSSUI ALGUMA OUTRA DOENÇA?**

VOCÊ ESTÁ COM NOVOS SINTOMAS HA MENOS DE UM MÊS?☐ Sim☐ Não

Quais? _____

VOCÊ SENTE, OU JÁ SE SENTIU EXTREMAMENTE CANSADO SEM CAUSA APARENTE?☐ Sim☐ Não☐ Razoavelmente**ESCOLARIDADE:**☐ Fundamental Incompleto☐ Fundamental Completo☐ Ensino Médio Incompleto☐ Superior Completo☐ Superior Incompleto☐ Superior Completo☐ Pós Graduação Incompleto☐ Pós Graduação Completo**PROFISSÃO OU ÚLTIMA PROFISSÃO:**

☐ REMITENTE-RECORRENTE ☐ PRIMARIAMENTE PROGRESSIVA

TIPO DA DOENÇA: ☐ SECUNDARIAMENTE PROGRESSIVA ☐ SÍNDROME CLÍNICA ISOLADA

EDSS: _____

OBSERVAÇÕES RELEVANTES: