

João Miguel Figueiredo da Cunha

Pesquisa de Poliomavírus em amostras cervicovaginais

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2017



João Miguel Figueiredo da Cunha

Pesquisa de Poliomavírus em amostras cervicovaginais

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2017

III

João Miguel Figueiredo da Cunha

Pesquisa de Poliomavírus em amostras cervicovaginais

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas com orientação de:

Prof. Dr. Rui Medeiros e Dra. Jani Silva

**Assinatura do Aluno** \_\_\_\_\_

(João Miguel Figueiredo da Cunha)

## Resumo

Os Poliomavírus humanos BK e JC são dois vírus que causam infecções subclínicas persistentes no mundo inteiro, sendo que a população geral entra em contacto com eles em algum ponto da sua vida contraindo infecção. Esta infecção primária é algo que não é preocupante pois é caracterizada por uma sintomatologia moderada podendo em alguns casos ser assintomática. O problema encontra-se quando a infecção, que muitas vezes permanece latente, sofre reactivação quando o indivíduo se encontra imunodeprimido, podendo causar inúmeras complicações.

O Vírus do Papiloma Humano é um vírus cujas certos genótipos causam cancro cervical, entre outros. No entanto, a infecção persistente por genótipos de HPV de alto risco não é o único factor necessário para que o cancro desenvolva, sendo preciso um conjunto de co-factores que potenciem a sua capacidade carcinogénica.

Este estudo teve como objectivo avaliar a presença de JCV e BKV, em amostras cervicovaginais de mulheres residentes no norte de Portugal.

Foram analisadas amostras cervicovaginais de DNA a partir de 60 de mulheres com uma faixa etária entre os 20 e os 43 anos de idade usando o método PCR-RFLP. Estas amostras foram divididas em dois grupos de 30, consoante a sua positividade para HPV (grupo I HPV-negativo e grupo II HPV-positivo).

Os resultados indicaram que a proporção entre JCV e BKV na amostragem total (n=60) foi de 6,7% (4/60) e 5,0% (3/60), respectivamente. No grupo I (n=30), foi de 3,3% tanto para o JCV como para o BKV (1/30, cada). Quanto ao grupo II (n=30), o resultado foi de 10,0% para o JCV (3/30) e de 6,7% para o BKV (2/30).

Não foi encontrada associação estatisticamente significativa relativamente detecção de Poliomavírus (BKV e JCV) nos dois grupos estudados, sugerindo não existir associação entre a presença de Poliomavírus e genótipos de HPV de alto risco [*Odds Ratio* (OR)=2,8; 95 % Intervalo de Confiança (IC) 0,4-23,1;  $p=0,227$ ].

**Palavras-chave:** Poliomavírus, JCV, BKV, PCR-RFLP, HPV, amostras cervicovaginais

## **Abstract**

The human Polyomaviruses JC and BK are two viruses which cause persistent subclinical infections worldwide, being that the general population contact with them at a certain point in their lives therefore contracting the infection. The primary infection is something that is not worrisome since it is characterized by mild symptoms with some cases even being asymptomatic. The problem lies when the infection, which remains latent most of the times, undergoes in reactivation when the person is in a state of immunosuppression, thus causing several and serious health issues.

Certain types of human papillomavirus (HPV) are the main cause of cervical cancer (amongst others). However, the persistent infection high-risk HPV types are not the only factor that is necessary for cancer development, being necessary a group of co-factors that can maximize the carcinogenic potential.

The objective of this research was to analyze the presence of JCV and BKV in cervical samples of women residing in the northern region of Portugal.

DNA from cervical samples given by 60 women with ages between 20 and 43 years of age were analyzed using the method PCR-RFLP. These samples were characterized into two groups of 30, according to the HPV positivity (group I, HPV-negative and group II, HPV-positive).

The results showed that the proportion between JCV and BKV in the whole sample (n=60) was of 6,7% (4/60) and 5,0% (3/60), respectively. In group I (n=30), JCV was detected in 10,0% (3/30) of women and BKV in 6,7% (2/30).

There was no statistically significant association with the detection of Polyomavirus (BKV and JCV) in the two groups, suggesting no association between a presence of Polyomavirus and high-risk HPV genotypes [Odds Ratio (OR) = 2.8; 95% Confidence Interval (CI) 0.4-23.1;  $p = 0.227$ ].

**Keywords:** Polyomavirus, JCV, BKV, PCR-RFLP, HPV, cervical samples



# FCT

Fundação para a Ciência e a Tecnologia  
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR



A investigação foi suportada pelo FP-ENAS- CEBIMEB da Universidade Fernando Pessoa, cnpq; Fundos FEDER através do Programa Operacional de Factores de Competitividade – COMPETE e fundos Portugueses através de FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, sob o projecto UID/Multi/04546/2013.

## **Agradecimentos**

Nesta fase final, deixo aqui expresso o mais profundo dos agradecimentos a todas os colegas e docentes que contribuíram para a minha formação académica, de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, que termina com a realização desta dissertação.

À Universidade Fernando Pessoa agradeço a qualidade de ensino que me ofereceu, contribuindo com todas as condições necessárias para o meu sucesso universitário.

Ao Professor Doutor Rui Medeiros, pela orientação neste projecto, conhecimento científico, pela oportunidade que ofereceu em juntar-me a este projecto, bem como todo o apoio ao longo do trabalho.

Um agradecimento especial à minha co-orientadora, Doutora Jani Silva, pela disponibilidade, apoio, dedicação, acompanhamento, críticas construtivas, orientação científica e conselhos ao longo de todo o período de desenvolvimento desta monografia. Todo o acompanhamento e disponibilidade facilitaram a tarefa de desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos meus pais, por todo o acompanhamento emocional e monetário, o seu apoio incondicional foi imprescindível durante todo o meu percurso académico. Agradeço pela motivação, força e paciência que sempre me deram, tendo sido cruciais para tornarem este meu sonho possível. Agradeço por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos e, principalmente, por acreditarem em mim.

À Francisca, por todas as vezes que este lá para mim ao longo destes 5 anos, por ser a minha principal força motivadora, pela coragem e inspiração, paciência, conselhos e disponibilidade. Não há palavras para descrever o quão importante foi.

Por fim, a todos os meus amigos e colegas que de forma directa ou indirecta, por vezes pelos melhores mas também pelos piores motivos, contribuíram para a realização deste trabalho, deixando aqui expresso o meu sincero obrigado.

## Índice

<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Caracterização Geral dos Vírus.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Poliomavírus.....</b>	<b>3</b>
1.2.1. Componentes Estruturais.....	3
1.2.2. Processo de Replicação.....	4
1.2.3. Diferentes Espécies.....	5
<b>1.3. JCV – John Cunningham Vírus.....</b>	<b>6</b>
1.3.1. Modo de Transmissão/Infecção Inicial.....	6
1.3.2. Estrutura Genómica do JCV.....	6
1.3.3. Componente Clínica – Doença e Diagnóstico.....	7
1.3.4. Tratamento.....	8
<b>1.4. BKV – BK Vírus.....</b>	<b>10</b>
1.4.1. Modo de Transmissão/Infecção Inicial.....	10
1.4.2. Estrutura Genómica do JCV.....	10
1.4.3. Componente Clínica – Doença e Diagnóstico.....	11
1.4.4. Tratamento.....	13
<b>1.5. Epidemiologia de JCV e BKV.....</b>	<b>15</b>
<b>1.6. Interação do HPV com Poliomavírus.....</b>	<b>17</b>
<b>2. Desenvolvimento.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1. Objectivo.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2. Materiais e Métodos.....</b>	<b>21</b>
2.2.1. População em Estudo.....	21
2.2.2. Processamento das amostras.....	21

2.2.3. <i>Polymerase Chain Reaction</i> - PCR.....	21
2.2.3.1. Detecção de DNA de Poliomavírus.....	22
2.2.4. Genotipagem de Poliomavírus por RFLP.....	22
2.2.5. Análise estatística dos dados.....	23
<b>2.3. Resultados.....</b>	<b>24</b>
<b>2.4. Discussão.....</b>	<b>29</b>
<b>3. Conclusão e Perspectivas Futuras.....</b>	<b>31</b>
<b>Bibliografia.....</b>	<b>32</b>

## Índice de Figuras

Figura 1: A Classificação de Baltimore agrupa os vírus em famílias dependendo do seu tipo de genoma.....	2
Figura 2: Estrutura geral do virião de Poliomavírus.....	4
Figura 3: Representação do ciclo de vida do JCV.....	7
Figura 4: Doenças causadas pelo BKV face aos diferentes tipos de infecções ( <i>Primary Disease, Reactivation Disease</i> ), bem como os locais em que o mesmo permanece latente ( <i>Latent Infection</i> ).....	11
Figura 5: Exemplo de uma célula infectada por BKV – Célula redonda azul na zona de baixo ao centro. Amostra de citologia de urina.....	13
Figura 6: Exemplo de electroforese dos produtos de PCR, em gel de agarose a 1,5% (M: Marcador de DNA; 1: Controlo negativo; 2: Controlo positivo; 4-5 e 7: Amostra com resultado positivo; 3, 6 e 8: Amostra com resultado negativo).....	24
Figura 7: Exemplo dos produtos de PCR após digestão enzimática com <i>Bam</i> HI, em gel de agarose a 3% (M: Marcador de DNA; 1: Controlo negativo; 2-3: Amostra positiva para BKV; 4-5: Amostra positiva para JCV).....	25

## **Índice de Tabelas**

Tabela 1: Resultados da análise após genotipagem de Poliomavírus de acordo com as amostras HPV-negativo (Grupo I).....26

Tabela 2: Resultados da análise após genotipagem de Poliomavírus de acordo com as amostras HPV-positivo (Grupo II).....27

## **Lista de Abreviaturas**

BHE: Barreira Hemato-Encefálica

BKV: BK Vírus

BKVAN: Nefropatia Associada a BK Vírus

CIN: Lesões Cervicais Intrapiteliais

ddH<sub>2</sub>O: Água bidestilada

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

ds: *Double Stranded*

EUA: Estados Unidos da América

HAART: *Highly Active Anti-Retroviral Therapy*

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

HPV: Vírus do Papiloma Humano

ICTV: *International Committee on Taxonomy of Viruses*

IgG: Imunoglobulina G

JCV: John Cunningham Virus

LCR: Líquido Cefalorraquidiano

LT: *Large Tumor Antigen*

KIV: *Karolinska Institute Virus*

MCV: *Merkell Cell Virus*

MgCl<sub>2</sub>: Cloreto de Magnésio

pb: Pares de base

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PML: Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva

pRb: Proteína de Retinoblastoma

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*

RNA: Ácido Ribonucleico

SNC: Sistema Nervoso Central

SIDA: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ss: *Single Stranded*

ST: *Small Tumor Antigen*

TSPV: Poliomavírus associado à tricodisplasia espinulosa

WUV: Vírus WU

## 1. Introdução

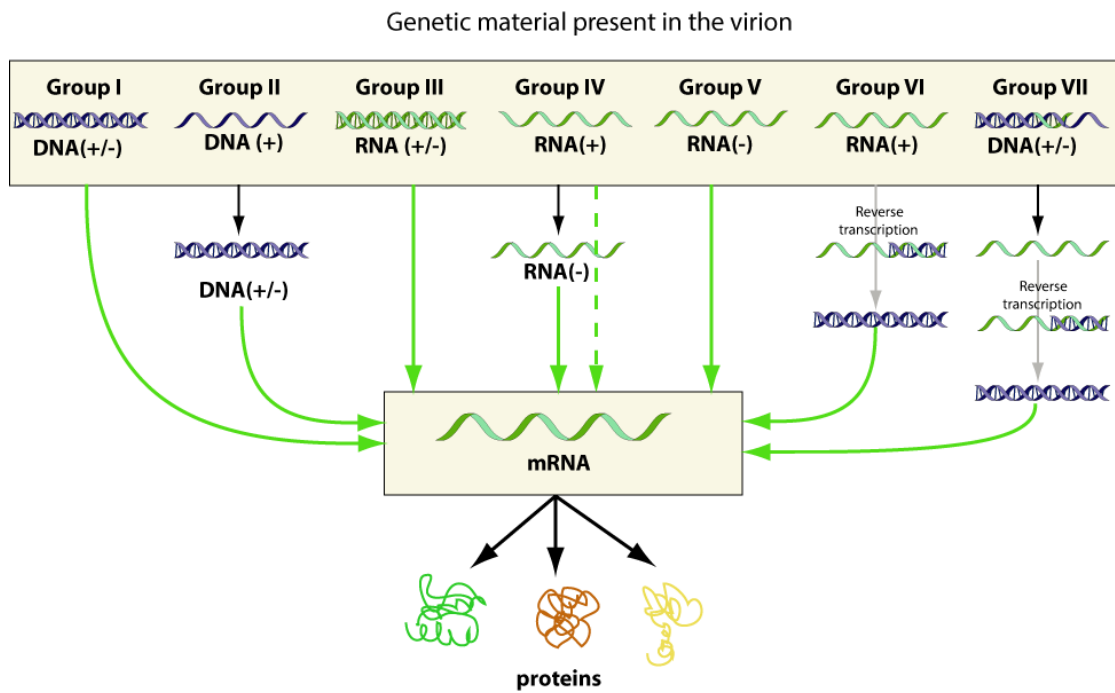
### 1.1. Caracterização geral dos vírus

“Apesar dos Humanos não se aperceberem da existência dos vírus até o final dos anos 1880, as doenças virais moldaram a história e a evolução do planeta” (Fields e Knipe, 2013). Desde que foram descobertos os vírus, o ser humano tem tido cada vez mais a capacidade de juntar as peças do puzzle que é a evolução da humanidade como espécie, pois quando estudado aprofundadamente, descobre-se que todos os organismos vivos estão infectados por vírus, o que indica que têm uma importância enorme em todo o ecossistema (Fields e Knipe, 2013).

Relativamente à sua estrutura, na sua forma mais básica, os vírus são constituídos por um pequeno segmento de ácido nucleico (RNA ou DNA – ácido ribonucleico e ácido desoxirribonucleico, respectivamente), encapsulado numa simples camada proteica – cápside (Koonin, Senkevich e Dolja, 2006). Não possuem metabolismo próprio e, portanto, são parasitas intracelulares obrigatórios, apoderando-se das células-hospedeiras e dos seus mecanismos sub-celulares (Koonin, Senkevich e Dolja, 2006).

A classificação e nomenclatura dos vírus é um tema mais complexo, realizada maioritariamente pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) (Adams et al., 2013) e pela Classificação de Baltimore (Molecular Biology Web Book, s.d.). O ICTV é responsável por desenvolver, definir e manter a taxonomia universal de vírus, iniciando pela Ordem, seguido da Família, Sub-família, Género e terminando na Espécie (Adams et al., 2017). Até 2016, o ICTV definiu oito ordens: *Bunyavirales*, *Caudovirales*, *Herpesvirales*, *Ligamenvirales*, *Mononegavirales*, *Nidovirales*, *Picornavirales* e *Tymovirales* (ICTV, 2017).

A Classificação de Baltimore é baseada no conteúdo genético e na estratégia de replicação de cada espécie de vírus, por exemplo, se é de DNA ou RNA, se é cadeia dupla (*double strand* - ds) ou cadeia simples (*single strand* - ss), dividido em sete grupos identificados por numeração romana, como é possível observar na figura 1 (Fields e Knipe, 2013).



**Figura 1:** A Classificação de Baltimore agrupa os vírus em famílias dependendo do seu tipo de genoma (Adaptado de Expassy, s.d.).

## 1.2. Poliomavírus

Na década de 1980, a família *Polyomaviridae* continha apenas um pequeno conjunto de espécies. Actualmente esta situação alterou-se consideravelmente, dado que até 2015 foram descobertas e caracterizadas genética e biologicamente, cerca de 73 espécies distintas de Poliomavírus (Calvignac-Spencer et al., 2016). Encontrando-se vastamente dispersos pela natureza, os Poliomavírus têm sido isolados em diferentes espécies, sendo que os principais hospedeiros são mamíferos e aves (incluindo o ser humano) (Ahsan e Shah, 2006).

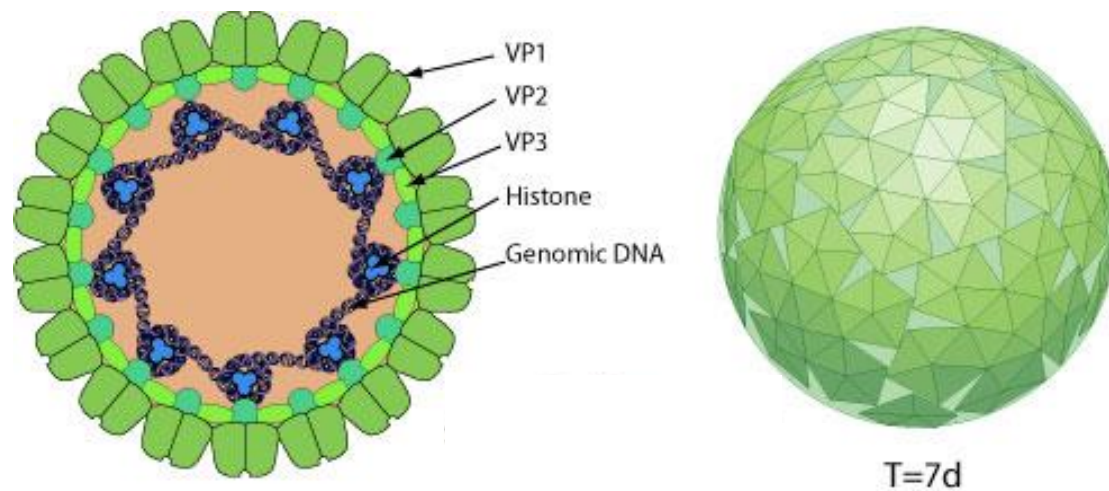
Os vírus da família *Polyomaviridae* podem ser divididos em três géneros: Wukipoliomavírus e o Orthopoliomavírus, que têm a capacidade de infectar mamíferos, e o Avipoliomavírus, capaz de infectar aves (Johne et al., 2011). Dentro dos géneros capazes de infectar mamíferos, o Wukipoliomavírus contém os Poliomavírus humanos vírus KI (KIV), vírus WU (WUV), Poliomavírus humano 6 (HPyV6) e Poliomavírus humano 7 (HPyv7), enquanto que o Orthopoliomavírus inclui todos os restantes Poliomavírus de mamíferos, com excepção do vírus Poliomavírus humano 10 (HPyv10) que ainda se encontra por classificar (Johne et al., 2011).

### 1.2.1. Componentes Estruturais

Os Poliomavírus são vírus com um genoma circular de cadeia dupla (dsDNA, grupo I), envolvidos por uma cápside icosaédrica sem invólucro e com simetria T=7 (figura 2). A cápside é composta por uma proteína capaz de auto-montagem na forma icosaédrica denominada VP1 (proteína *major* da cápside) (DeCaprio e Garcea, 2013). Existem ainda outras proteínas virais: a VP2 e a VP3. Estas, ao contrário da VP1, são proteínas *minor*, isto porque apesar de não serem as principais responsáveis pelo mecanismo infeccioso vão facilitar a entrada do vírus na célula-hospedeira, bem como a entrada do genoma viral no núcleo-hospedeiro (DeCaprio e Garcea, 2013).

Os Poliomavírus possuem ainda dois antigénios virais – O LT e o ST (*Large Tumor Antigen* e *Small Tumor Antigen*, respectivamente) (Fields e Knipe, 2013). O LT tem um papel-chave na regulação do ciclo viral, promovendo a síntese de DNA. O ST é

capaz de activar vários mecanismos celulares e estimular a proliferação celular. Estes são os primeiros genes virais a serem expressos (*early genes*) (Fields e Knipe, 2013). Por último, possuem também a agnoproteína, péptido com aproximadamente sete aminoácidos de comprimento, que facilita a montagem dos vírus recém-formados (Fields e Knipe, 2013).



**Figura 2:** Estrutura geral do virião de Poliomavírus (Adaptado de Viral Zone, s.d.)

### 1.2.2. Processo de Replicação

De uma forma geral, o processo de replicação dos Poliomavírus dá-se através de uma lógica sequência de eventos (Ahsan e Shah, 2006). Inicialmente ocorre a ligação das proteínas virais aos receptores da célula-hospedeira, o que origina uma endocitose mediada por lípidos, do vírus para o interior da célula (Ahsan e Shah, 2006). Após entrada na célula o virião viaja através do retículo endoplasmático onde a cápside viral se desagrega devido à acção de enzimas isomerases-dissulfido, neste ponto o reticulo endoplasmático liberta o virião para o citoplasma (Ahsan e Shah, 2006). Aqui, devido à baixa concentração citoplasmática de cálcio ocorre a perda da VP1, levando o genoma viral a sair da cápside sendo importando para o núcleo-hospedeiro (Ahsan e Shah, 2006).

Com a maquinaria da célula-hospedeira dá-se a transcrição dos *early genes* – LT e ST, estes vão manipular o ciclo celular da célula levando à replicação viral no núcleo (Ahsan e Shah, 2006). Dá-se, portanto, a expressão dos genes que codificam as proteínas estruturais (VP1, VP2 e VP3) no citoplasma-hospedeiro, estas proteínas

dirigem-se ao núcleo para encapsidar o novo DNA genómico viral (Ahsan e Shah, 2006). Dá-se a formação de novos viriões até a célula não aguentar mais, momento no qual ocorre a lise celular e libertação do virião para infectar novas células (Ahsan e Shah, 2006).

### 1.2.3. Diferentes Espécies

Actualmente conhecem-se dez espécies de Poliomavírus humano: O vírus BK (BKV), o vírus JC (JCV), o vírus KI (KIV), o vírus WU (WUV), o vírus das células de Merkel (MCV), o Poliomavírus humano 6 (HPyV6), o Poliomavírus humano 7 (HPyV7), o Poliomavírus associado à tricodisplasia espinulosa (TSPV, também chamado de Poliomavírus humano 8), o Poliomavírus humano 9 (HPyV9) e o Poliomavírus humano 10 (HPyV10) (Dalianis e Hirsch, 2013).

Ao grupo das espécies mais prevalentes no homem pertencem o JCV e o BKV (Gossai et al., 2015), ambos descobertos na década de 70. A maioria da população tem contacto com estes vírus durante a infância, causando uma infecção em que os sintomas são escassos ou até mesmo inexistentes (Pinto e Dobson, 2014). Estes permanecem latentes até idade adulta, na qual podem originar complicações em casos de imunodepressão, por exemplo, em doentes transplantados ou portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (Pinto e Dobson, 2014).

Estão descritas outras espécies de Poliomavírus que foram descobertas desde então, nomeadamente o *Karolinska Institute Virus* (KIV) em 2007 (Allander et al., 2007), com o WUV a ser descoberto no mesmo ano (Gaynor et al., 2007), o MCV em 2008 (Feng et al., 2008), seguido do HPyV6 e HPyV7 em 2010 (Schowalter et al., 2010), o TSPV em 2010 (Van der Meijden et al., 2010) terminando com o HPyV9 em 2011 (Scuda et al., 2011) e por último o HPyV10 em 2012 (Buck et al., 2012).

### 1.3. JCV – John Cunningham Vírus

O JCV foi identificado em 1965 por Zu Rhein e Chou. É designado pelas iniciais do nome do doente – John Cunningham, em que foi isolado pela primeira vez, o qual sofria de Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva (PML), doença principalmente causada pelo JCV (Zu Rhein e Chou, 1965)

#### 1.3.1. Modo de transmissão/Infecção inicial

O local inicial da infecção pode ser nas amígdalas (Eash et al., 2004) ou no trato gastrointestinal (Bofill-Mas et al., 2008), havendo possibilidade de transmissão via respiratória, transplacentária, fecal-oral, transfusão de sangue, transplante de órgãos, bem como através do fluido seminal (Pinto e Dobson, 2014).

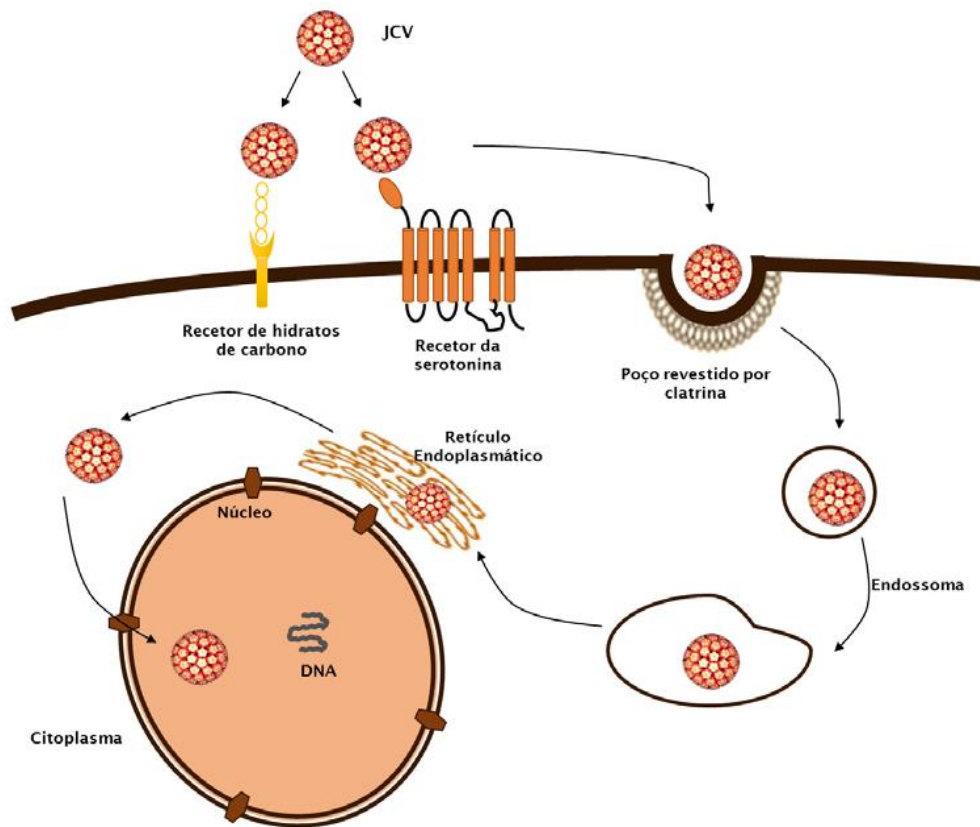
É no trato gastrointestinal que permanece latente até posterior activação, podendo também infectar células tubulares epiteliais renais, onde continua a reproduzir-se e a excretar partículas virais para a urina (Chesters, Heritage e McCance, 1983).

#### 1.3.2. Estrutura Genómica do JCV

A estrutura genómica é semelhante à referida anteriormente da família *Polyomaviridae*, apresentando as mesmas partículas virais – LT e ST, VP1, VP2 e VP3 e a agnoproteína. (Boothpur e Brennan, 2010).

O seu ciclo de vida é idêntico ao descrito para os Poliomavírus, sendo que tem como específico o receptor inicial da célula-hospedeira a clatrina, uma proteína presente na célula-hospedeira que vai provocar a endocitose (Elphick et al., 2004).

Posteriormente segue o esquema de replicação referido na parte 1.2.2, como é possível observar na figura 3. Este vírus consegue atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) de modo a alcançar o sistema nervoso central (SNC), onde vai infectar oligodendrócitos e astrócitos através do receptor de serotonina 5-HT<sub>2A</sub> (Elphick et al., 2004).



**Figura 3:** Representação do ciclo de vida do JCV. O JCV inicialmente liga-se a receptores de hidratos de carbono (que contêm resíduos de ácido siálico) na superfície da célula ou a receptores de serotonina em células humanas da glia. O vírus é então incorporado em poços revestidos por clatrina, formando endossomas. O vírus transita para o retículo endoplasmático que causa alterações conformacionais nos viriões. Posteriormente, é transportado para o citoplasma, admitindo-se que o JCV entre no núcleo através de poros nucleares (adaptado de Ferenczy *et al.* 2012).

### 1.3.3. Componente Clínica – Doença e Diagnóstico

A principal doença causada pelo JCV é a PML, uma doença rara e normalmente fatal, caracterizada pelo dano progressivo e pela inflamação da massa branca do cérebro em múltiplos locais, com sintomas de deterioração cognitiva e de dificuldade de coordenação, bem como actividade epiléptica (Lima, Drislane e Koralnik, 2006).

Para além da PML, o JCV tem também sido referido como causa de cancro colorectal, devido à capacidade que uma célula tem de ser permissiva, ou não, em resposta à

replicação do DNA viral. Em oligodendrócitos esta replicação é permitida, levando à lise das células infectadas (Coelho, Almeida e Lazo, 2010). No entanto, nas células epiteliais coloreticais não se observa este processo, levando a infecções não detectadas, podendo resultar em transformações celulares malignas (Coelho, Almeida e Lazo, 2010).

Em termos de diagnóstico de PML relacionada com o JCV, o *gold standard* é a biopsia cerebral, apresentando uma sensibilidade entre 64 e 96%, e uma especificidade de 100% (Berger et al., 2013).

Devido às dificuldades e riscos associados à obtenção deste tecido cerebral, existe como opção a considerar, a pesquisa de JCV no líquido cefalorraquidiano (LCR) (Berger et al., 2013). O perfil do LCR quando está presente uma infecção por JCV caracteriza-se por aumento no número de glóbulos brancos, níveis proteicos ligeiramente elevados e glucose normal (Berger et al., 2013).

A sensibilidade para detecção de JCV no LCR por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é cerca de 72 a 92% com uma especificidade de 92 a 100% (Cinque et al., 1997). Estes valores eram extremamente elevados antes da introdução da terapia HAART (*Highly Active Anti-Retroviral Therapy*) em pacientes infectados por HIV, nos quais a sensibilidade da PCR para JCV no LCR diminuiu para 58% (Marzocchetti et al., 2005).

### 1.3.4. Tratamento

Relativamente ao tratamento não existe uma terapia antiviral específica para o JCV. O principal objectivo da terapia da PML é otimizar a HAART (Antinori et al., 2003). Caso seja possível, a esperança de vida, em pacientes HIV-positivo, aumenta cerca de um ano em 10 a 50% dos casos. Em doentes HIV-negativo, o objectivo da terapia é a redução da imunodepressão (Antinori et al., 2003).

Outras estratégias incluem, por exemplo, a citarabina, um agente antineoplásico, que interfere com a síntese de DNA, tendo demonstrado efeito na replicação de JCV (Marzocchetti et al., 2009). Pode ainda sugerir-se a utilização de mirtazapina, um fármaco antidepressivo que actua como bloqueador dos receptores de serotonina (5-

HT), importantes na infecção por JCV e consequente evolução para PML (Verma et al., 2007).

#### **1.4. BKV – BK Vírus**

O vírus BKV, descoberto em 1971, foi isolado a partir da urina de um doente submetido a um transplante renal que desenvolveu estenose uretral. Este tinha as iniciais B.K., daí o nome do vírus (Gardner et al., 1971).

##### 1.4.1. Modo de Transmissão/Infecção Inicial

Sabe-se que os mecanismos de transmissão deste vírus ainda não estão totalmente identificados, apesar da transmissão pessoa-pessoa estar descrita como principal via de propagação (Egli et al., 2009). No entanto, tem sido considerado que esta ocorre de forma semelhante ao JCV, através de fluidos respiratórios, urina e também pela via gastrointestinal, visto que os indivíduos infectados apresentam uma excreção elevada de partículas virais na urina (Egli et al., 2009). Normalmente estes vírus ficam alojados nas células renais do hospedeiro (Wong et al., 2007).

##### 1.4.2. Estrutura Genómica do BKV

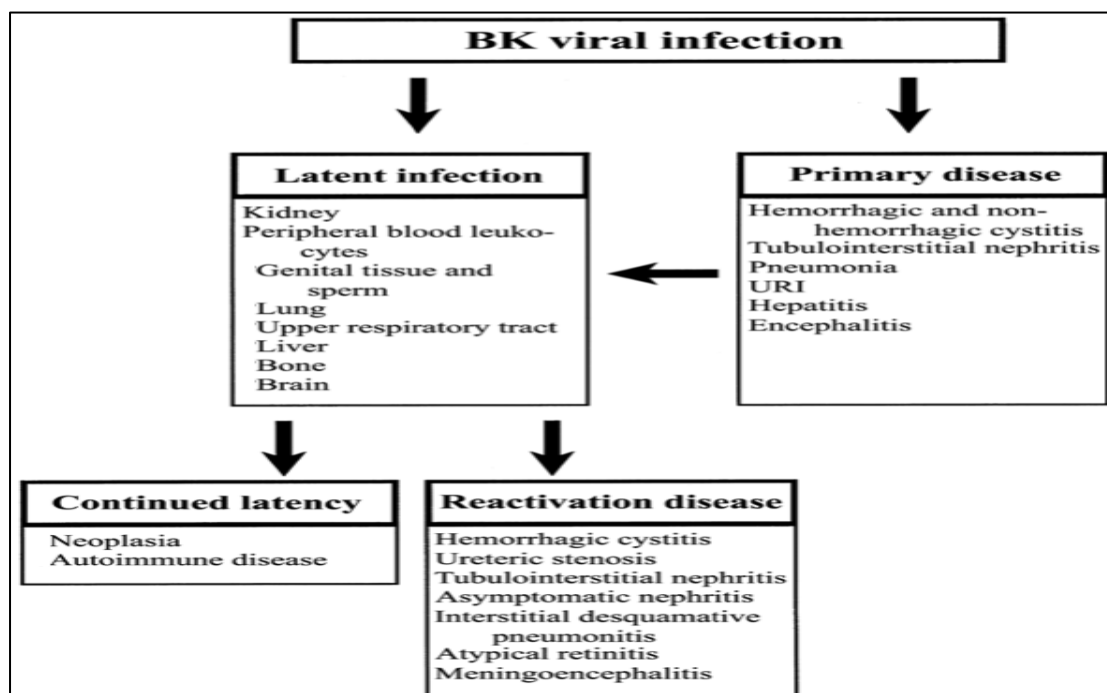
Sabe-se que o BKV e o JCV apresentam uma organização genómica com 75% de similaridade entre si (Pinto e Dobson, 2014). Possuem as mesmas partículas virais (VP1, VP2 e VP3, LT, ST e agnoproteína), bem como o mesmo ciclo de vida (Pinto e Dobson, 2014).

A principal diferença encontra-se no receptor específico de entrada na célula-hospedeira, que para o BKV é uma glicoproteína *N-Linked* (Low et al., 2006). Após ligação a este receptor, o processo de replicação do vírus BK ocorre de maneira comum para os restantes Poliomavírus, em que por endocitose por parte da célula-hospedeira o virião dirige-se para o núcleo-hospedeiro após percorrer uma série de etapas anteriormente referidas no ponto 1.2.2., terminando o seu processo replicativo (Kasamatsu e Nakanishi, 1998).

1.4.3. Componente Clínica – Doença e Diagnóstico

Estando igualmente associado a hospedeiros imunocomprometidos (normalmente transplantados), pode causar cistite hemorrágica e nefropatia associada a BKV (BKVAN – *BK Virus Associated Nephropathy*) (van der Meijden et al., 2010). A BKVAN inclui cistite hemorrágica e não-hemorrágica, hematúria assintomática, estenose uretral e nefrite intersticial. Tem também a possibilidade de causar pneumonia, retinite, doença hepática e meningoencefalite (van der Meijden et al., 2010).

Quanto às manifestações pulmonares que podem surgir, incluem-se sintomas moderados do trato respiratório superior nas infecções primárias em crianças, podendo também resultar em pneumonia intersticial e fibrose pulmonar (Reploeg, Storch e Clifford, 2001). O resumo das diferentes infecções que podem surgir associadas ao BKV, sejam primárias ou reactivadas, está presente na figura 4.



**Figura 4:** Doenças causadas pelo BKV face aos diferentes tipos de infecções (*Primary Disease*, *Reactivation Disease*), bem como os locais em que o mesmo permanece latente (*Latent Infection*) (Adaptado de Reploeg, Storch e Clifford, 2001).

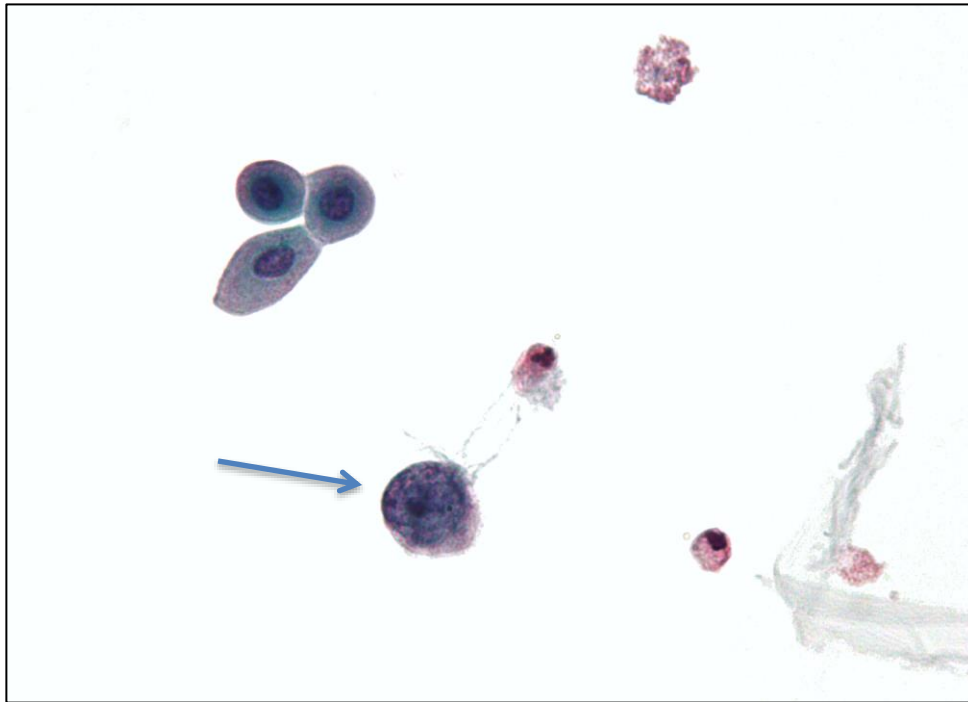
O vírus, que permanece latente até o indivíduo se encontrar em imunossupressão, é reactivado imediatamente após se fazer o transplante renal, observando-se em 30 a

50% dos receptores do transplante renal nos primeiros 3 meses após a operação (Vasudev et al., 2005). A imunossupressão ocorre também nos transplantes de medula óssea, podendo ainda acontecer devido a outros factores como gravidez, diabetes e outras doenças crónicas e envelhecimento (Arthur et al., 1986; Tajima et al., 1990; Taguchi et al., 1975; Kling et al., 2012)

Relativamente à componente de diagnóstico, o BKV pode ser detectado na urina de pacientes sintomáticos ou assintomáticos por PCR, visto que a carga viral na urina é geralmente 1000 vezes superior do que no plasma (Randhawa et al., 2004). O diagnóstico de BKVAN é aceite, caso existam sinais virais de BKV em conjunto com insuficiência renal (Pinto e Dobson, 2014).

Apesar da PCR ser útil em amostras de urina para diagnosticar BKVAN, a sua utilidade diminui no diagnóstico de cistite hemorrágica relacionada com BKV, uma vez que muitos doentes podem ter presença de vírus na urina assintomática, sem apresentarem doença (Tan e Koralnik, 2010). Desta forma e sempre que possível, os testes com resultado positivo na urina devem ser confirmados por PCR recorrendo a amostras de plasma juntamente com a biopsia renal (Tan e Koralnik, 2010).

Outro indicador da infecção por BKV é a presença de células *decoy* na urina, embora também possam ser encontradas na infecção por JCV (Bista et al., 2007). Estas são células epiteliais infectadas com núcleos alargados e anormais, bem como uma forma irregular (Bista et al., 2007), como se pode observar na figura 5.



**Figura 5:** Exemplo de uma célula infectada por BKV – Célula redonda azul na zona de baixo ao centro. Amostra de citologia de urina (Adaptado de Bonert, 2011).

#### 1.4.4. Tratamento

A base do tratamento da BKVAN consiste em diminuir a imunossupressão tanto quanto possível, visto não existir um fármaco antiviral específico para a infecção por BKV (Pinto e Dobson, 2014). Por outro lado, existem outras estratégias farmacológicas em associação, como cidofovir e leflunomida (Pinto e Dobson, 2014).

O cidofovir é um inibidor da polimerase viral, que foi aprovado para o tratamento de retinite causada por citomegalovírus em doentes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) (Kadambi et al., 2003). Kadambi e colaboradores verificaram que, indivíduos em que se efectuaram os testes do uso deste medicamento apresentavam uma estabilização da função renal, apesar de existir um risco de nefrotoxicidade elevado, sendo necessário ponderar a sua utilização (Kadambi et al., 2003).

A leflunomida é um inibidor da síntese da pirimidina, que tem propriedades imunossupressivas e antivíricas, tendo sido aprovado no tratamento da artrite reumatoide (Williams et al., 2005). Este fármaco actua na infecção por BKV através

da inibição das enzimas mitocondriais envolvidas na produção de metabolitos necessários para a progressão do seu ciclo celular, prevenindo assim, a expansão de linfócitos activados (Williams et al., 2005).

### **1.5. Epidemiologia de JCV e BKV**

A infecção primária tanto por vírus JC como BK ocorre tipicamente na infância, com cerca de 50% das crianças a apresentarem seroconversão para BKV entre os 3 a 4 anos de idade, e para JCV entre os 10 e os 15 anos (Pinto e Dobson, 2014).

Anticorpos anti-BKV podem ser encontrados numa proporção substancial em diferentes partes do mundo, por exemplo, na Europa, América do Norte e do Sul, Irão, Austrália, África e zona do Pacífico Sul (Gardner e Knowles, 2009). Apenas em certas tribos localizadas em zonas remotas da América do Sul e Malásia os anticorpos para este vírus são raros. Em Portugal não existe uma diferença significativa entre a seroprevalência em zonas urbanas e rurais (Rodrigues, Pinto e Medeiros, 2007).

Relativamente ao JCV, a seroprevalência em indivíduos na América do Norte e Sul, Inglaterra, Índia, Malásia e zona do Pacífico Sul, é relativamente semelhante ao BKV (Gardner e Knowles, 2009), e tal como este, algumas tribos remotas não apresentam qualquer sinal de contacto com o JCV. Em várias comunidades, as infecções por JCV podem ser comuns, embora as infecções por BKV sejam raras, por exemplo, a taxa de seroprevalência entre populações adultas varia entre os 44% e os 77% nos Estados Unidos da América (EUA) e Inglaterra, e entre os 85 a 92% no Brasil, Japão e Alemanha (Knowles, 2006).

Normalmente, a maioria das infecções por JCV e BKV são adquiridas na infância, noutras, a seroprevalência de JCV aumenta gradualmente com a idade (Rodrigues, Pinto e Medeiros, 2007). Estas variações podem indicar que a transmissão de JCV está mais dependente das diferenças culturais e socioeconómicas do que está a transmissão de BKV (Rodrigues, Pinto e Medeiros, 2007).

A primo-infecção é normalmente assintomática, podendo ser associada a sintomas moderados do trato respiratório superior (Pinto e Dobson, 2014). Em idade adulta, 80% das pessoas já foram infectadas por JCV, BKV ou ambos. No entanto, a presença de vírus na urina é detectada tanto em pacientes saudáveis como imunocomprometidos (Pinto e Dobson, 2014).

A infecção permanece latente na maioria dos casos, podendo mais tarde reactivar em casos de imunossupressão, por exemplo em indivíduos transplantados, em doentes que tenham feito terapia imunossupressiva ou simplesmente que desenvolvam imunodeficiência individual (Tan e Koralnik, 2010). A patogénese da reactivação viral envolve um processo de interacção entre a predisposição do hospedeiro para a reactivação e a função imunológica do doente (Tan e Koralnik, 2010).

Alguns factores de risco para a reactivação de BKV incluem a seropositividade para BKV, apresentarem idade avançada e consequentemente um sistema imunitário mais frágil e haver a existência de Imunoglobulina G (IgG) anti-BK (Wong et al., 2007).

Já o JCV está frequentemente associado a doentes com SIDA (5%), ou que se encontram a receber terapia imunossupressiva (Berger et al., 1988).

### **1.6. Interação do Poliomavírus com outros vírus: HPV**

O HPV é um vírus com um variado número de genótipos, no entanto apenas alguns se apresentam com propriedades oncogénicas conhecidas, podendo causar lesões pré-cancerosas no cérvix, na vulva, vagina, zona anal, pénis e orofaringe. Este tipo de lesões aumenta a predisposição para desenvolver uma neoplasia associada ao HPV (Ljubojevic e Skerlev, 2014). A maior parte das complicações relacionadas com o HPV envolvem o cancro cervical, sendo que este tipo de cancro apresenta este vírus como factor comum (99,9% dos casos) (zur Hausen, 2009).

Contudo, os genótipos HPV 16, HPV 18, HPV 31 e HPV 45 estão classificados de alto risco, estando, alguns destes, presentes nas vacinas existentes. Os restantes genótipos, como por exemplo o HPV 6, 11, 42 ou 44, estão mais associados como sendo a principal causa de verrugas genitais e papilomatose respiratória (Kumar et al., 2008).

Mais de 40 genótipos de HPV são transmitidos através de contacto sexual, infectando a zona genital e/ou anal (World Health Organization, 2016). A vacinação contra os genótipos de alto risco (HPV 16 e 18) é eficaz num sentido profilático, sendo que é recomendada a toma da vacina entre os 9 e os 13 anos de idade, preferencialmente antes de haver contacto com HPV (World Health Organization, 2016).

Todavia, apesar do papel etiológico do HPV no cancro cervical estar bem estabelecido, apenas uma pequena percentagem de mulheres infectadas por HPV desenvolve esta neoplasia (Guidry e Scott, 2017). A presença de HPV é necessária, contudo não suficiente para o desenvolvimento de cancro cervical (Guidry e Scott, 2017).

Alguns co-factores ambientais e biológicos têm sido relacionados com o desenvolvimento de carcinoma associado a HPV, incluindo o estado imunológico, o genótipo da infecção, alterações hormonais, a paridade, a existência de múltiplos parceiros sexuais, hábitos dietéticos, uso de tabaco e co-infecção com outros agentes sexualmente transmissíveis (CDC.gov, 2015). Estes co-factores contribuem para a infecção persistente por HPV através de diversos mecanismos relacionados com o

controlo imunológico, a eficiência da infecção e as influências na iniciação tumoral bem como a sua progressão (CDC.gov, 2015).

Os Poliomavírus partilham semelhanças estruturais e funcionais com os Papilomavírus. Os primeiros, como referido anteriormente, apresentam um genoma de dsDNA circular pequeno, envolvido por uma cápside icosaédrica sem invólucro e infectam células epiteliais de vários órgãos (Guidry e Scott, 2017). Estes têm como principal característica oncogénica o LT, que tal como as oncoproteínas E6 e E7 do HPV conseguem bloquear a funcionalidade da p53 (proteína que regula o crescimento celular, impedindo que este seja descontrolado) e a proteína do retinoblastoma (pRb – proteína de supressão tumoral), respectivamente. Isto permite suspeitar que os Poliomavírus possam aumentar as propriedades de transformação do HPV durante uma co-infecção viral (Guidry e Scott, 2017).

O BKV tem um potencial carcinogénico controverso que é apoiado por estudos *in vitro* (Grossi et al., 1982), como tal um papel para a co-infecção de HPV/BKV na iniciação e progressão do cancro cervical tem sido sugerido, visto que o BKV foi detectado em amostras cervicais tanto em indivíduos HPV-positivo (4%) como em HPV-negativo (12%) (Fraase et al., 2012).

No estudo de Comar e colaboradores (Comar et al., 2011), o BKV foi detectado em 35% das lesões cervicais pré-cancerígenas, apresentando uma correlação da sua presença com a infecção por génotipos de alto risco de HPV. Por outro lado, o número de cópias de DNA de BKV apresentou-se bastante elevado em lesões cervicais intraepiteliais (CIN) de alto grau, sugerindo que o HPV pode potenciar o processo replicativo do BKV (Comar et al., 2011).

O JCV está também associado com doenças relacionadas com o HPV, tendo sido detectado em 9% de CIN de baixo grau e em 7% de elevado, não estando presente em amostras cervicais saudáveis (Comar et al., 2011). Contudo, não foi encontrada uma associação entre JCV e HPV, embora a detecção de JCV tenha sido 3 vezes mais elevada em mulheres com carcinoma cervical comparativamente ao grupo controlo, em mulheres seropositivas para HIV, sugerindo um papel do JCV no cancro cervical face a imunossupressão e em co-infecção com o HIV (Alosaimi et al., 2013).

## Pesquisa de Poliomavírus em amostras cervicovaginais

Alosaimi et al., (2013) ao contrário de Comar et al., (2011), utilizando amostras cervicais com HPV 16/18 positivo (n=122) e HPV 16/18 negativo (n= 115), obteve um resultado ligeiramente diferente, apresentando 5/122 amostras positivas para JCV na amostragem com HPV positivo e 9/115 no grupo HPV negativo. Com base nestes resultados, os autores sugeriram que não existe uma relação significativa entre os dois vírus.

## **2. Desenvolvimento**

### **2.1. Objectivo**

O presente estudo tem como objectivo principal avaliar a presença de Poliomavírus, nomeadamente JCV e BKV, em amostras cervicovaginais de mulheres residentes no Norte de Portugal.

Como objectivos específicos:

-Detecção de Poliomavírus por PCR em amostras cervicovaginais com resultado positivo ou negativo para a presença de genótipos de alto risco de HPV;

-Genotipagem dos casos positivos para Poliomavírus, identificando a presença dos genótipos JCV e BKV, através da técnica de restrição enzimática – RFLP.

## 2.2. Materiais e Métodos

### 2.2.1. População em estudo

Neste estudo foram incluídas 60 mulheres Portuguesas residentes no Norte de Portugal com idades compreendidas entre os 20 e os 43 anos.

### 2.2.2. Processamento das amostras

As amostras usadas foram células esfoliativas do colo do útero, as quais foram obtidas por auto-colheita cervicovaginal, através de um kit comercial (DNA Pap™ Cervical sampler™, Qiagen®). A partir das células do colo do útero, foi isolado o DNA através do kit de extracção, QIAmp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen® 51106), de acordo com o procedimento laboratorial fornecido pelo fabricante.

As amostras incluídas neste estudo foram previamente testadas para a presença de HPV sendo as positivas genotipadas de acordo com o descrito na literatura (Nobre, Almeida e Martins, 2008).

### 2.2.3. *Polymerase Chain Reaction* - PCR

Foram incluídos controlos negativos e positivos em todas as reacções de PCR. Como controlo negativo, substitui-se o DNA de amostra por água bidestilada estéril (ddH<sub>2</sub>O). O controlo positivo para Poliomavírus consistiu DNA extraído de amostra clínica, cedido pelo serviço de Virologia do Instituto Português de Oncologia do Porto.

As reacções de amplificação foram efetuadas no termociclador programável *Bio-Rad MyCycler™* (*Bio-Rad®*) num volume total de 25 µL.

#### 2.2.3.1. Detecção de DNA de Poliomavírus

A presença de DNA viral foi avaliada com recurso à técnica da PCR com os *primers* *PolyoF/* (*Polyo - Forward*) (5'- AGT CTT TAG GGT CTT CTA CC-3') e *PolyoR* (*Polyo - Reverse*) (5'-GGT GCC AAC CTA TGG AAC AG -3'), que amplificam um fragmento de 176 e 173 pares de base (pb) para BKV e JCV, respetivamente.

A reacção com os *primers* *PolyoF/ PolyoR* continha 10 ng de DNA, 1U Taq DNA Polimerase (*KapaBiosystem*®) e o respetivo tampão de reacção 1X, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Cloreto de Magnésio) (*KapaBiosystem*®), 0.2 mM de dNTPs (*KapaBiosystem*®) e 0.3 µM de cada *primer*. As condições de amplificação foram as seguintes:

- Pré-desnaturação durante 10 minutos a 95°C;
- 35 ciclos de 10 segundos a 95°C, 30 segundos a 55°C de *annealing* e 30 segundos a 72°C de extensão;
- Extensão final de 7 minutos a 72°C.

#### Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos amplificados

De modo a verificar a amplificação dos fragmentos de DNA, 15 µL dos produtos obtidos na PCR foram analisados por electroforese em géis de agarose a 1,5% (p/v), corados com *Midori* (*Grisp*®). Em seguida, os géis foram visualizados, utilizando um transiluminador (*Quantity one, Bio-Rad*®) de luz ultravioleta e com o suporte do programa informático.

#### 2.2.4. Genotipagem de Poliomavírus por RFLP

As amostras positivas por PCR foram genotipadas pelo método RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*, conforme o descrito por Rodrigues e colaboradores (Rodrigues, Pinto e Medeiros, 2007). Este método permite a diferenciação dos de dois genótipos de Poliomavírus, BKV e JCV, pela análise de clivagem do DNA feita pela

enzima *Bam*HI (Grisp®). No caso do genótipo JCV, origina 2 fragmentos, um de 53 pb e outro de 120 pb, mantendo-se o fragmento de 176 pb para o BKV.

Cerca de 5 µL dos produtos de PCR foram submetidos a digestões, num volume total de 20 µL, que continha, 2µL de 10X de tampão e 10U da enzima *Bam*HI (Grisp®). As digestões ocorreram durante 30 minutos a 37°C.

#### Eletroforese em gel de agarose dos fragmentos obtidos por RFLP

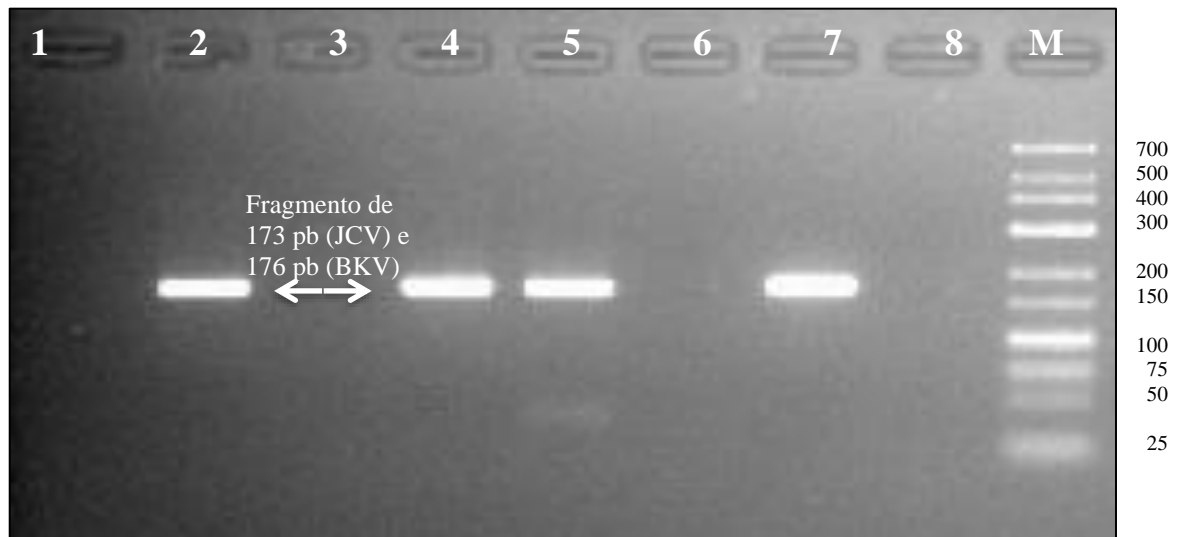
Os fragmentos obtidos por RFLP foram analisados por eletroforese em géis de agarose a 3% (p/v), corados com *Midori* (Grisp®) e visualizados sob luz ultravioleta. A identificação dos tipos de Poliomavírus foi realizada de acordo com o descrito por Rodrigues e colaboradores (Rodrigues, Pinto e Medeiros, 2007).

#### 2.2.5. Análise estatística dos dados

Foi calculada a frequência de Poliomavírus, BKV e JCV, considerando dois grupos classificados de acordo com a positividade para HPV (grupo I, HPV-negativo e grupo II, HPV-positivo para genótipos de alto risco). Foram considerados os seguintes genótipos de HPV de alto risco: HPV16, 18, 31, 33, 45, 56 e 58. O quociente *Odds Ratio* (OR) e intervalo de confiança 95% (IC 95%) foram calculados como uma medida da associação entre a presença de Poliomavírus e HPV. O valor de  $p$  foi obtido pelo teste de  $\chi^2$ , que foi considerado estatisticamente significativo quando inferior a 0,05.

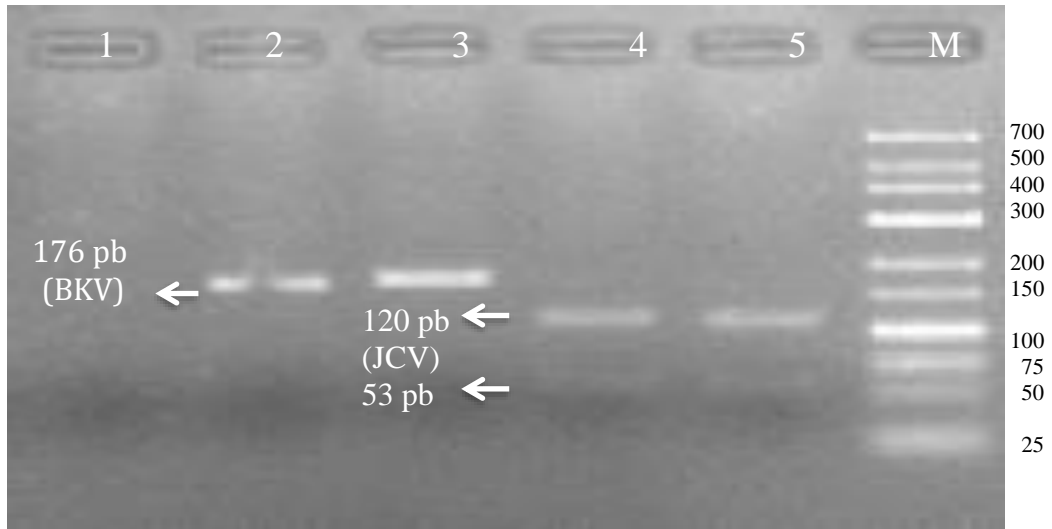
### 2.3. Resultados

A pesquisa de DNA de Poliomavírus foi realizada em 60 amostras de DNA. Os produtos de PCR compreenderam fragmentos de 176 e 173 pb para BKV e JCV, respectivamente (figura 6), sendo que não foi possível distinguir entre eles nesta fase.



**Figura 6** - Exemplo de electroforese dos produtos de PCR, em gel de agarose a 1,5% (p/v) (M: Marcador de DNA; 1: Controle negativo; 2: Controle positivo; 4-5 e 7: Amostra com resultado positivo; 3, 6 e 8: Amostra com resultado negativo).

Após a digestão enzimática com a enzima *Bam*HI, foi possível distinguir as amostras com resultados positivos para BKV (176 pb) e JCV (53 e 120 pb) (figura 7).



**Figura 7** – Exemplo dos produtos de PCR após digestão enzimática com a enzima *Bam*HI, em gel de agarose a 3% (p/v) (M: Marcador de DNA; 1: Controle negativo; 2-3: Amostra positiva para BKV; 4-5: Amostra positiva para JCV).

A análise foi dividida em dois grupos:

- Grupo I, HPV-negativo (n=30), que incluiu as amostras nº 1, 2, 5, 6, 13, 16, 18, 21, 22, 24, 25, 29, 31, 33-39, 42-47 e 50-53;
- Grupo II, HPV-positivo para genótipos de alto risco (n=30), que incluiu as amostras nº 3, 4, 7-12, 14,15,17,19, 20, 23, 26-28, 30, 32, 40, 41, 48, 49 e 54-60.

Após a obtenção dos resultados, foi possível observar que das 60 amostras testadas, apenas 7 (11,7%) apresentaram resultado positivo para Poliomavírus, sendo que dessas 7, 2 foram detectadas no grupo I (a azul na tabela 1) e 5 no grupo II (a vermelho na tabela 2).

Nas duas amostras positivas para Poliomavírus do grupo I obteve-se um de cada dos genótipos pesquisados. A amostra nº 36 apresentou resultado positivo para JCV e a amostra nº 46 para BKV. As idades eram 34 e 32 anos, respectivamente.

Pesquisa de Poliomavírus em amostras cervicovaginais

**Tabela 1** – Resultados da análise após genotipagem de Poliomavírus de acordo com as amostras HPV-negativo (grupo I)

<b>Nº Amostra</b>	<b>Idade</b>	<b>Resultado HPV</b>	<b>Resultado Poliomavírus</b>	<b>Genótipo Poliomavírus</b>
1	37	Negativo	Negativo	---
2	37	Negativo	Negativo	---
5	24	Negativo	Negativo	---
6	24	Negativo	Negativo	---
13	21	Negativo	Negativo	---
16	21	Negativo	Negativo	---
18	41	Negativo	Negativo	---
21	20	Negativo	Negativo	---
22	22	Negativo	Negativo	---
24	20	Negativo	Negativo	---
25	22	Negativo	Negativo	---
29	25	Negativo	Negativo	---
31	33	Negativo	Negativo	---
33	23	Negativo	Negativo	---
35	34	Negativo	Negativo	---
35	41	Negativo	Negativo	---
36	34	Negativo	Positivo	JCV
37	43	Negativo	Negativo	---
38	28	Negativo	Negativo	---
39	33	Negativo	Negativo	---
42	25	Negativo	Negativo	---
43	32	Negativo	Negativo	---
44	28	Negativo	Negativo	---
45	34	Negativo	Negativo	---
46	32	Negativo	Positivo	BKV
47	35	Negativo	Negativo	---
50	38	Negativo	Negativo	---
51	35	Negativo	Negativo	---

Pesquisa de Poliomavírus em amostras cervicovaginais

52	43	Negativo	Negativo	---
53	38	Negativo	Negativo	---

Relativamente ao grupo II, foram identificadas 3 positivas para JCV e 2 para BKV. O nº de amostra, idade e genótipo do HPV encontra-se na tabela 2.

**Tabela 2** – Resultados da análise após genotipagem de Poliomavírus de acordo com as amostras HPV-positivo (grupo II)

Nº Amostra	Idade	Resultado HPV	Genótipo HPV	Resultado Poliomavírus	Genótipo Poliomavírus
3	39	Positivo	31	Positivo	JCV
4	24	Positivo	31	Negativo	---
7	34	Positivo	16	Negativo	---
8	22	Positivo	56	Negativo	---
9	43	Positivo	16	Negativo	---
10	21	Positivo	18	Negativo	---
11	35	Positivo	18	Negativo	---
12	24	Positivo	58	Negativo	---
14	21	Positivo	16	Negativo	---
15	20	Positivo	16	Negativo	---
17	23	Positivo	31	Negativo	---
19	21	Positivo	16	Negativo	---
20	21	Positivo	58	Negativo	---
23	22	Positivo	33	Negativo	---
26	20	Positivo	16	Positivo	JCV
27	20	Positivo	16	Negativo	---
28	21	Positivo	31	Negativo	---
30	31	Positivo	31	Positivo	BKV
32	23	Positivo	16	Positivo	BKV
40	36	Positivo	16	Negativo	---
41	27	Positivo	16	Negativo	---
48	24	Positivo	45	Negativo	---
49	24	Positivo	33	Negativo	---

Pesquisa de Poliomavírus em amostras cervicovaginais

54	32	Positivo	58	Negativo	---
55	24	Positivo	58	Negativo	---
56	25	Positivo	45	Negativo	---
57	28	Positivo	58	Negativo	---
58	24	Positivo	56	Negativo	---
59	25	Positivo	58	Negativo	---
60	41	Positivo	31	Positivo	JCV

A proporção entre JCV e BKV na amostragem total (n=60) foi de 6,7% (4/60) e 5,0% (3/60), respectivamente. No grupo I (n=30), foi de 3,4% tanto para o JCV como para o BKV (1/30, cada). Quanto ao grupo II (n=30), o resultado foi de 10,0% para o JCV (3/30) e de 6,7% para o BKV (2/30).

Foi possível observar que apenas as amostras com os genótipos HPV16 e HPV31 apresentaram resultados positivos para Poliomavírus, sendo que o JCV foi detectado numa amostra com genótipo HPV16 e em duas com HPV31. Por outro lado, o BKV foi detectado em apenas duas amostras HPV-positivo, com os genótipos HPV16 e HPV31. O Poliomavírus não foi detectado nas amostras positivas para os restantes genótipos de alto risco de HPV, nomeadamente o 18, 33, 45, 56 e 58.

A proporção entre JCV e BKV na amostragem total (n=60) foi de 6,7% (4/60) e 5,0% (3/60), respectivamente. No grupo I (n=30) foi de 3,3% tanto para o JCV como para o BKV (1 positiva em 30, cada). Quanto ao grupo II (n=30), o resultado foi de 10,0% para o JCV (3/30) e de 6,7% para o BKV (2/30).

Não se verificou associação estatística entre a presença de HPV e Poliomavírus (OR=2,8; 95 % IC 0,4-23,1;  $p=0,227$ ).

## 2.4. Discussão

Com este trabalho, pretendeu-se determinar a frequência de Poliomavírus (BKV e JCV) em amostras cervicovaginais com resultado negativo ou positivo para a presença de genótipos de alto risco de HPV.

Rodrigues e colaboradores (Rodrigues, Pinto e Medeiros, 2007) caracterizaram a frequência de Poliomavírus em populações aparentemente saudáveis, usando como amostra 498 indivíduos portugueses, sendo 213 do sexo feminino e 285 do sexo masculino. Os autores obtiveram uma percentagem para resultado negativo de 74,3% relativamente a ambos os vírus. Quanto aos resultados positivos para o JCV e BKV, as percentagens foram, nomeadamente, 23,9% e 1,8%. No grupo feminino, 79,34% apresentou resultado negativo para ambos os vírus, 19,72% positivo para JCV e 0,94% positivo para BKV, enquanto que para o grupo masculino apenas 70,5% apresentou resultado negativo para Poliomavírus. Os autores concluíram que a população masculina apresenta um maior risco de presença de vírus na urina, quando comparada com a população feminina. Uma hipótese que surgiu para explicar estes valores assenta nas diferenças fisiológicas que existem entre ambos os sexos (Rodrigues, Pinto e Medeiros, 2007).

Com os resultados obtidos neste trabalho, observamos 11,7% (7/60) amostras positivas para a presença do Poliomavírus (n=60) em ambos os grupos, sendo que para o grupo I a percentagem de BKV foi de 3,3% (1/30), enquanto que para o grupo II foi de 6,7% (2/30). Tendo como base o estudo realizado por Fraase e colaboradores (Fraase et al., 2012), em que detectaram a presença de BKV em 4% de indivíduos HPV-positivo e em 12% HPV-negativo, é possível afirmar que os resultados que se obtiveram nesta pesquisa vão de encontro aos descritos relativamente ao grupo II. O mesmo não se verificou no grupo I, visto que a percentagem deste foi consideravelmente menor do que o esperado, quando comparado com o estudo de Fraase et al., (2012).

Quanto ao JCV, no presente estudo foi observado para o grupo I uma prevalência de 3,3% (1/30) e de 10,0% (3/30) para o grupo II. A interpretação destes resultados diverge em comparação com o publicado por Comar et al., (2011), que não detectou a

presença do vírus JCV em amostras cervicais normais, sugerindo não existir uma relação entre ambas as infecções. Por outro lado, os resultados obtidos vão de encontro com o estudo publicado por Alosaimi et al., (2013), apresentando uma prevalência de 4,0% JCV em amostras HPV 16/18 positivo e 6,6% para amostras HPV 16/18 negativo.

Os resultados alcançados apontam para uma baixa frequência dos vírus nas amostras utilizadas, havendo uma ligeira diferença entre o número de amostras positivas para Poliomavírus entre o grupo I e o grupo II. Contudo, esta diferença não é significativa ( $OR=2,8$ ;  $p=0,227$ ), não permitindo estabelecer que a presença de HPV nas amostras utilizadas seja uma causa potenciadora para a presença de Poliomavírus ou vice-versa.

Outro parâmetro estudado no grupo II foi apenas os genótipos HPV16 e HPV31 apresentarem amostras com a detecção de Poliomavírus, sendo que 2 das amostras pertencem ao genótipo 16 e as restantes 3 ao genótipo 31. Observou-se uma prevalência tanto do JCV como do BKV de 50% (1/2) para o genótipo 16, enquanto que para o genótipo 31 foi de 66,7% para o JCV (2/3) e 33,3% para o BKV (1/3). Ainda assim o número de amostras com HPV16 e HPV31 que apresentam resultado negativo para Poliomavírus é superior. Por outro lado, seria interessante fazer uma pesquisa mais aprofundada quanto ao porquê de apenas amostras positivas para estes genótipos de HPV apresentarem resultados positivos para Poliomavírus

Não foi possível estabelecer uma associação entre as idades e os resultados obtidos para a presença do Poliomavírus nos diferentes grupos estudados. A idade das participantes com resultado positivo para os Poliomavírus teve o seu intervalo entre os 21 e os 41 anos. Este facto pode ser explicado devido ao número limitado de amostras, em comparação com outros estudos, podendo assim justificar a discrepância entre idades.

Um factor limitante deste estudo foi a quantidade de amostras utilizadas, e numa investigação futura, seria importante expandir a área geográfica, bem como, o número de amostras recolhidas. Neste sentido, são necessários mais estudos epidemiológicos, recorrendo a métodos de biologia molecular, para uma melhor compreensão da biologia, e interacção entre o hospedeiro e os Poliomavírus BK e JC.

### **3. Conclusão e Perspectivas Futuras**

Apesar do JCV e BKV serem dois vírus da família Poliomavírus com elevada prevalência na população nacional e mundial, poucos estudos foram realizados para avaliar a sua frequência em amostras cervicovaginais, bem como a sua relação com outros vírus com tropismo para células epiteliais da zona anogenital, como é o caso do HPV.

Os estudos realizados entre 2011 e 2013 referidos anteriormente, mostram uma baixa frequência de JCV e BKV em amostras vaginais, não tendo como objectivo principal avaliar a prevalência deste, mas sim como se relacionavam em casos de potenciação oncogénica do HPV, aferindo não só a prevalência destes em amostras cervicais com citologia normal, mas também a sua presença em lesões cervicais de vários graus.

O presente trabalho serviu para verificar se os vírus podem demonstrar relevância nas amostras testadas e se o facto de a mulher estar ou não infectada por HPV poderia ou não influenciar essa frequência. Desta forma, não foi possível estabelecer uma relação entre os resultados obtidos relativamente aos vírus JC e BK, e vários parâmetros testados: idade, presença de HPV e o genótipo de alto risco do mesmo.

Numa perspectiva futura, a avaliação dos factores de risco associados à infecção por Poliomavírus poderá esclarecer os resultados observados e o potencial sinergismo entre esses vírus e outros, como é no caso da capacidade oncogénica do HPV em casos de cancro cervical na presença de BKV ou JCV.

## **Bibliografia**

Adams, M., Lefkowitz, E., King, A., *et al.* (2017). 50 years of the International Committee on Taxonomy of Viruses: progress and prospects. *Archives of Virology*, 162(5), pp.1441-1446.

Adams, M., Lefkowitz, E., King, A., *et al.* (2013). Recently agreed changes to the International Code of Virus Classification and Nomenclature. *Archives of Virology*, 158(12), pp.2633-2639.

Ahsan, N. e Shah, K. (2006). Polyomaviruses and Human Diseases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp.1-18.

Allander, T., Andreasson, K., Gupta, *et al.* (2007). Identification of a Third Human Polyomavirus. *Journal of Virology*, 81(8), pp.4130-4136.

Alosaimi, B., Hampson, L., He, X., *et al.* (2013). Increased prevalence of JC polyomavirus in cervical carcinomas from women infected with HIV. *Journal of Medical Virology*, 86(4), pp.672-677.

Antinori, A., Cingolani, A., Lorenzini, P., *et al.* (2003). Clinical Epidemiology and Survival of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy in the Era of Highly Active Antiretroviral Therapy: Data from the Italian Registry Investigative Neuro AIDS (IRINA). *Journal of Neurovirology*, 9(2), pp.47-53.

Arthur, R., Shah, K., Baust, S., *et al.* (1986). Association of BK Viruria with Hemorrhagic Cystitis in Recipients of Bone Marrow Transplants. *New England Journal of Medicine*, 315(4), pp.230-234.

Berger, J., Aksamit, A., Clifford, D., *et al.* (2013). PML diagnostic criteria: Consensus statement from the AAN Neuroinfectious Disease Section. *Neurology*, 80(15), pp.1430-1438.

Berger, J., Kaszovitz, V., Donovas., *et al.* (1988). Progressive multifocal leukoencephalopathy associated with human immunodeficiency virus infection. *Alzheimer Disease & Associated Disorders*, 2(2), p.137.

Bista, B., Gasper, G., Ishwar, C.,*et al.* (2007). Development Of Loop Mediated Isothermal Amplification Assay For Rapid Detection Of BK Virus. *Transplantation*, 82(Suppl 2), p.939.

Bofill-Mas, S., Formiga-Cruz, M., Clemente-Casares., *et al.* (2008). Potential Transmission of Human Polyomaviruses through the Gastrointestinal Tract after Exposure to Virions or Viral DNA. *Journal of Virology*, 82(16), pp.8244-8244.

Bonert, M. (2011). *Micrograph showing a polyomavirus infected cell — large (blue) cell below-center-left. Urine cytology specimen..* [em linha] Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=9084468> [Consultado em 5/09/2017].

Boothpur, R. e Brennan, D. (2010). Human polyoma viruses and disease with emphasis on clinical BK and JC. *Journal of Clinical Virology*, 47(4), pp.306-312.

Buck, C., Phan, G., Raiji, M., *et al.* (2012). Complete Genome Sequence of a Tenth Human Polyomavirus. *Journal of Virology*, 86(19), pp.10887-10887.

Calvignac-Spencer, S., Feltkamp, M., Daugherty, M., Moens, U., Ramqvist, T., Johne, R. and Ehlers, B. (2016). A taxonomy update for the family Polyomaviridae. *Archives of Virology*, 161(6), pp.1739-1750.

Cdc.gov. (2015). *HPV | What is HPV | Human Papillomavirus | CDC.* [em linha] Disponível em: <https://www.cdc.gov/hpv/parents/whatishpv.html> [Consultado em 5/09/2017].

Chesters, P., Heritage, J. e McCance, D. (1983). Persistence of DNA Sequences of BK Virus and JC Virus in Normal Human Tissues and in Diseased Tissues. *Journal of Infectious Diseases*, 147(4), pp.676-684.

Cinque, P., Scarpellini, P., Vago, L., , *et al.* (1997). Diagnosis of central nervous system complications in HIV-infected patients. *AIDS*, 11(1), pp.1-17.

Coelho, T., Almeida, L. e Lazo, P. (2010). JC virus in the pathogenesis of colorectal cancer, an etiological agent or another component in a multistep process?. *Virology Journal*, 7(1), p.42.

Comar, M., Bonifacio, D., Zanconati, F., *et al.* (2011). High prevalence of BK Polyomavirus Sequences in Human Papillomavirus-16-Positive Precancerous Cervical Lesions. *Journal of Medical Virology*, 83(10), pp.1770-1776.

Dalianis, T. e Hirsch, H. (2013). Human polyomaviruses in disease and cancer. *Virology*, 437(2), pp.63-72.

DeCaprio, J. e Garcea, R. (2013). A cornucopia of human polyomaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, 11(4), pp.264-276.

Eash, S., Tavares, R., Stopa, E., *et al.* (2004). Differential Distribution of the JC Virus Receptor-Type Sialic Acid in Normal Human Tissues. *The American Journal of Pathology*, 164(2), pp.419-428.

Egli, A., Infanti, L., Dumoulin, A., *et al.* (2009). Prevalence of Polyomavirus BK and JC Infection and Replication in 400 Healthy Blood Donors. *The Journal of Infectious Diseases*, 199(6), pp.837-846.

Elphick, G., Querbes, W., Jordan, J., *et al.* (2004). The Human Polyomavirus, JCV, Uses Serotonin Receptors to Infect Cells. *Science*, 306(5700), pp.1380-1383.

Expasy (s.d.). *Baltimore Classification*. [em linha] Disponível em: <http://viralzone.expasy.org/254> [Consultado em 28/01/2017].

Feng, H., Shuda, M., Chang, Y., *et al.* (2008). Clonal Integration of a Polyomavirus in Human Merkel Cell Carcinoma. *Science*, 319(5866), pp.1096-1100.

Ferenczy, M., Marshall, L., Nelson, C., *et al.* (2012). Molecular Biology, Epidemiology, and Pathogenesis of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy, the JC Virus-Induced Demyelinating Disease of the Human Brain. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(3), pp.471-506.

Fields, B. e Knipe, D. (2013). *Fields' virology*. 6th ed. New York, NY: Raven Press, p.23.

Flægstad, T., Rønne, K., Filipe, A., *et al.* (1989). Prevalence of Anti BK Virus Antibody in Portugal and Norway. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 21(2), pp.145-147.

Fraase, K., Hart, J., Wu, H., *et al.* (2012). BK virus as a potential co-factor for HPV in the development of cervical neoplasia. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 42(2), pp.130-134.

Gardner, S. e Knowles, W. (2009). *Principles and practical clinical virology*. 6th ed. UK: Wiley, pp.635-651.

Gardner, S., Field, A., Coleman, D., *et al.* (1971). New Human Papovavirus (B.K.) Isolated From Urine After Renal Transplantation. *The Lancet*, 297(7712), pp.1253-1257.

Gaynor, A., Nissen, M., Whiley, D., *et al.* (2007). Identification of a Novel Polyomavirus from Patients with Acute Respiratory Tract Infections. *PLoS Pathogens*, 3(5), pp. 64.

Gossai, A., Waterboer, T., Nelson, H., *et al.* (2015). Seroepidemiology of Human Polyomaviruses in a US Population. *American Journal of Epidemiology*, 183(1), pp.61-69.

Grossi, M., Caputo, A., Meneguzzi, G., *et al.* (1982). Transformation of Human Embryonic Fibroblasts by BK Virus, BK Virus DNA and a Subgenomic BK Virus DNA Fragment. *Journal of General Virology*, 63(2), pp.393-403.

Guidry, J. e Scott, R. (2017). The interaction between human papillomavirus and other viruses. *Virus Research*, 231, pp.139-147.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). (2017). *Taxonomy*. [em linha] Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> [Consultado em 29 Jan. 2017].

Johne, R., Buck, C., Allander, T., *et al.* (2011). Taxonomical developments in the family Polyomaviridae. *Archives of Virology*, 156(9), pp.1627-1634.

Kadambi, P., Josephson, M., Williams, J., *et al.* (2003). Treatment of Refractory BK Virus-Associated Nephropathy With Cidofovir. *American Journal of Transplantation*, 3(2), pp.186-191.

Kasamatsu, H. e Nakanishi, A. (1998). How Do Animal DNA Viruses Get To The Nucleus?. *Annual Review of Microbiology*, 52(1), pp.627-686.

Kling, C., Wright, A., Katz, S., *et al.* (2012). Dynamics of urinary polyomavirus shedding in healthy adult women. *Journal of Medical Virology*, 84(9), pp.1459-1463.

Knowles, W. (2006). Discovery and Epidemiology of the Human Polyomaviruses BK Virus (BKV) and JC Virus (JCV). *Polyomaviruses and Human Diseases*, 577, pp.19-45.

Koonin, E., Senkevich, T. e Dolja, V. (2006). The ancient Virus World and evolution of cells. *Biology Direct*, 1(1), p.29.

Kumar, V., Fausto, N., Abbas, A., *et al.* (2008). *Robbins Basic Pathology*. 8th ed. Philadelphia, Pa: W.B. Saunders.

Lima, M., Drislane, F. e Koralnik, I. (2006). Seizures and their outcome in progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurology*, 66(2), pp.262-264.

Ljubojevic, S. e Skerlev, M. (2014). HPV-associated diseases. *Clinics in Dermatology*, 32(2), pp.227-234.

Low, J., Magnuson, B., Tsai, B., *et al.* (2006). Identification of Gangliosides GD1b and GT1b as Receptors for BK Virus. *Journal of Virology*, 80(3), pp.1361-1366.

Marzocchetti, A., Di Giambenedetto, S., Cingolani, A., *et al.* (2005). Reduced Rate of Diagnostic Positive Detection of JC Virus DNA in Cerebrospinal Fluid in Cases of Suspected Progressive Multifocal Leukoencephalopathy in the Era of Potent Antiretroviral Therapy. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(8), pp.4175-4177.

Marzocchetti, A., Lima, M., Tompkins, T., *et al.* (2009). Efficient in vitro expansion of JC virus-specific CD8+ T-cell responses by JCV peptide-stimulated dendritic cells from patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Virology*, 383(2), pp.173-177.

Molecular Biology Web Book. (s.d.). *Baltimore Classification of Viruses*. [em linha] Disponível em: <http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch1E2.htm> [Consultado em 29/01/2017].

Ninds.nih.gov. (s.d.). *Progressive Multifocal Leukoencephalopathy Information Page / National Institute of Neurological Disorders and Stroke*. [em linha] Disponível em: <https://www.ninds.nih.gov/Disorders/All-Disorders/Progressive-Multifocal-Leukoencephalopathy-Information-Page> [Consultado em 8/02/2017].

Nobre, R., Almeida, L. e Martins, T. (2008). Complete genotyping of mucosal human papillomavirus using a restriction fragment length polymorphism analysis and an original typing algorithm. *Journal of Clinical Virology*, 42(1), pp.13-21.

Padgett, B. e Walker, D. (1973). Prevalence of Antibodies in Human Sera against JC Virus, an Isolate from a Case of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *Journal of Infectious Diseases*, 127(4), pp.467-470.

Pinto, M. e Dobson, S. (2014). BK and JC virus: A review. *Journal of Infection*, 68, pp.S2-S8.

Randhawa, P., Ho, A., Shapiro, R., *et al.* (2004). Correlates of Quantitative Measurement of BK Polyomavirus (BKV) DNA with Clinical Course of BKV Infection in Renal Transplant Patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(3), pp.1176-1180.

Replogle, M., Storch, G. e Clifford, D. (2001). BK Virus: A Clinical Review. *Clinical Infectious Diseases*, 33(2), pp.191-202.

Rodrigues, C., Pinto, D. e Medeiros, R. (2007). Molecular epidemiology characterization of the urinary excretion of polyomavirus in healthy individuals from Portugal—a Southern European population. *Journal of Medical Virology*, 79(8), pp.1194-1198.

Schwalter, R., Pastrana, D., Pumphrey, K., *et al.* (2010). Merkel Cell Polyomavirus and Two Previously Unknown Polyomaviruses Are Chronically Shed from Human Skin. *Cell Host & Microbe*, 7(6), pp.509-515.

Scuda, N., Hofmann, J., Calvignac-Spencer, S., *et al.* (2011). A Novel Human Polyomavirus Closely Related to the African Green Monkey-Derived Lymphotropic Polyomavirus. *Journal of Virology*, 85(9), pp.4586-4590.

Taguchi, F., Nagaki, D., Saito, M., *et al.* (1975). Transplacental Transmission of BK Virus in Human. *Japanese Journal of Microbiology*, 19(5), pp.395-398.

Tajima, M., Takeda, F., Mori, M. *et al.* (1990). Prevalence of the Antibody against Human Polyoma Viruses (JCV and BKV) in Aged Persons. *Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases*, 64(12), pp.1507-1513.

Tan, C. e Koralnik, I. (2010). Progressive multifocal leukoencephalopathy and other disorders caused by JC virus: clinical features and pathogenesis. *The Lancet Neurology*, 9(4), pp.425-437.

Van der Meijden, E., Janssens, R., Lauber, C., *et al.* (2010). Discovery of a New Human Polyomavirus Associated with Trichodysplasia Spinulosa in an Immunocompromized Patient. *PLoS Pathogens*, 6(7).

Vasudev, B., Hariharan, S., Hussain, S., *et al.* (2005). BK virus nephritis: Risk factors, timing, and outcome in renal transplant recipients. *Kidney International*, 68(4), pp.1834-1839.

Verma, S., Cikurel, K., Koralnik, I., *et al.* (2007). Mirtazapine in Progressive Multifocal Leukoencephalopathy Associated with Polycythemia Vera. *The Journal of Infectious Diseases*, 196(5), pp.709-711.

Viral Zone (s.d.). *VIRION*. [em linha] Disponível em: [http://viralzone.expasy.org/148?outline=all\\_by\\_species](http://viralzone.expasy.org/148?outline=all_by_species) [Consultado em 3/02/2017].

Williams, J., Javaid, B., Kadambi, P., *et al.* (2005). Leflunomide for Polyomavirus Type BK Nephropathy. *New England Journal of Medicine*, 352(11), pp.1157-1158.

Wong, A., Chan, K., Cheng, V., *et al.* (2007). Relationship of Pretransplantation Polyoma BK Virus Serologic Findings and BK Viral Reactivation after Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Clinical Infectious Diseases*, 44(6), pp.830-837.

World Health Organization. (2016). *Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer*. [em linha] Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/> [Consultado em 5/09/2017].

Zu Rhein, G. e Chou, S. (1965). Particles Resembling Papova Viruses in Human Cerebral Demyelinating Disease. *Science*, 148(3676), pp.1477-1479.

zur Hausen, H. (2009). Papillomaviruses in the causation of human cancers — a brief historical account. *Virology*, 384(2), pp.260-265.