

FABIANA MESQUITA BARROS

**Detecção dos poliomavírus humanos BK, JC, de células Merkel e TSV em
fluídos orais de indivíduos HIV positivos**

São Paulo

2017

FABIANA MESQUITA BARROS

**Detecção dos poliomavírus humanos BK, JC, de células Merkel e TSV em
fluídos orais de indivíduos HIV positivos**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de
odontologia da Universidade de São Paulo,
para obter o título de Doutor, pelo Programa
de Pós-Graduação em Ciências
Odontológicas

Área de Concentração: Patologia Oral e
Maxilofacial e Pacientes Especiais

Orientador: Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto
Junior

São Paulo

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Barros, Fabiana Mesquita.

Detecção dos poliomavírus humanos BK, JC, de células Merkel e TSV em fluídos orais de indivíduos HIV positivos / Fabiana Mesquita Barros; orientador Décio dos Santos Pinto Junior -- São Paulo, 2017.

116 p. : fig., tab.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.
Área de Concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais --
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Poliomavírus. 2. Saliva. 3. Fluido crevicular gengival. 4. HIV. I. Pinto Junior, Décio dos Santos. II. Título.

Barros FM. Detecção dos poliomavírus humanos BK, JC, de células Merkel e TSV em fluídos orais de indivíduos HIV positivos. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Odontológicas: área de concentração Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais.

Aprovado em: / /2018

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Dedico este trabalho a minha família que participaram diretamente ou indiretamente para construção deste desafio.

Ao meu marido Marcio, pelo companheirismo, compreensão, carinho, apoio, e incentivo durante toda a realização deste doutorado.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Junior pelo convite para fazer parte deste departamento tão especial, oportunidade de convívio, partilhando de sua amizade, ensinamentos, dedicação, orientando, conversando e discutindo sempre as melhores alternativas e forma de desenvolvimento dos trabalhos realizados e ainda me orientando para ser uma profissional melhor, meus agradecimentos especiais.

A minha co-orientadora Profa. Marina Gallottini, o meu agradecimento pela receptividade, amizade, respeito, cordialidade, parceria no projeto de endodontia no CAPE. E principalmente em me convidar para fazer parte do projeto poliomavírus, que por sua vez se transformou na minha tese.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por guiar meus passos e colocar em meu caminho pessoas boas e amigas que me encorajaram e apoiaram para que eu vencesse os obstáculos desta jornada.

Aos professores do Departamento de Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais, Professora Doutora Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa, a *Lady* do departamento (os alunos a chamam assim nos bastidores), sempre prestativa e com boa vontade de nos atender e nos ensinar sobre Patologia. Ao Professor Doutor Fábio Daumas Nunes, Professora Doutora Karem Ortega, Professor Doutor Paulo Braz e Professora Doutora Marília Trierveiler pelos ensinamentos e convivência.

A Professora e Doutora Maria Cristina Fink e Paulo Urbano pela realização da parte experimental (PCRs) do Trabalho.

Aos técnicos do departamento Adriana, Elisa e Juvani pelos ensinamentos das técnicas, manuseio com as células e preparo do material.

A equipe da secretaria do departamento de Patologia, Zilda, Néia, Fátima e Vinicius por toda orientação, auxílio em todos os momentos desta jornada.

As minhas amigas de CAPE-FOUSP, Gilmara, Sandra, Andressa, Jeanne, Fátima e Leninha, pela amizade, parceria e paciência. Gil, agradeço a paciência por organizar as nossas agendas do Projeto de Endodontia, as vezes deixamos tudo em suas mãos, obrigada amiga.

Aos meus amigos da pós-graduação, vou colocar em ordem alfabética, Angélica, Bruno Matuck, Cibele, Dani Assis, Fernanda, Flavia, Jefferson Karin, Lara, Leticia, Lilia, Lú Miguita, Marcos, Maria Fernanda (LPM), Maria Fernanda, Maria Patricia, Marina, Marina (CAPE), Mariana, Michelle, Natália Andrade, Nathália Tuany, Priscila, Rodrigo (primo que eu descobri dentro da USP), Sophia, Solange, Thalita. Obrigada pelo convívio, companheirismo, parcerias nas rotinas e na clínica.

A amiga Stephanie pelo convívio e parceria no laboratório, créditos, rotina e pesquisas.

As minhas amigas Talita e Marília pela parceria no projeto do poliomavírus. Talita, obrigada pela presença em todos meus momentos no desenvolvimento da pesquisa e conselhos.

Ao meu amigo Dmitry, que arrumou tempo em sua agenda apertada para realizar a parte estatística, sou muito grata.

Ao meu amigo Rubens pela parceria em vários momentos e principalmente em me ensinar a parte cirúrgica na clínica.

As minhas amigas Marcela e Mariana que são minhas parceiras e tornaram o Projeto de Endodontia do CAPE-FOUSP em realidade.

À Daniela Felipe que mesmo de longe me dava os seus palpites e auxiliou quando mais precisei.

Ao um grande amigo que fiz nesta jornada, Bruno Sedassari, aprendi muito com ele, quando comecei a fazer a rotina achei que não fosse conseguir, mas ele com sua paciência e didática me fez aprender e a gostar; ele me tirou um trauma que me acompanhava desde a minha primeira faculdade. Obrigada pela ajuda, conselhos e amizade.

Meu agradecimento a todos os Professores da minha equipe de Especialização de Endodontia da FAOA, Alex, Edson, Eduardo Kado, Carla, Juliana Eto, Kazuzo, Marko, Gustavo, Guilherme, Ruy Hizatugu, Sidney, Shin, Nelson, pelo apoio, paciência, auxílio e compreensão pelas minhas ausências.

E não poderia deixar de agradecer a todos os meus familiares, meus pais, meus irmãos, sobrinhos, tios, cunhados, sogros, compadres, afilhados e amigos mais próximos, por me darem força, acreditar em mim e entenderem que as vezes minha ausência se fez necessário para uma realização pessoal. A minha Tia Lia, professora de português, que carinhosamente se propôs a corrigir a minha tese.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa do curso de doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para a realização deste Trabalho.

A todos os pacientes que aceitaram em fazer parte da pesquisa e confiaram em mim para realizar as coletas e punções.

"A educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo"

Nelson Mandela

RESUMO

Barros FM. Detecção dos poliomavírus humanos BK, JC, de células Merkel e TSV em fluídos orais de indivíduos HIV positivos [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2017. Versão Corrigida.

Os poliomavírus compõem uma grande família de vírus que causam infecções primárias geralmente na infância, e se mantem em condições subclínicas. Em situações de imunossupressão podem causar algumas doenças. Os indivíduos com HIV/AIDS frequentemente apresentam deficiência imunológica e por isso podem exibir maior risco de doenças causadas pelos poliomavírus. A utilização da saliva no diagnóstico e acompanhamento de doenças infecciosas tem sido explorado na literatura. As vantagens de usar a saliva para rastreio se pautam especialmente na coleta não invasiva e segurança no manuseio. O presente estudo teve como objetivo, detectar e quantificar o DNA dos poliomavírus BKV, JCV, de células Merkel e TSV, em fluídos orais (saliva, lavado bucal e fluído gengival crevicular) e comparar com a detecção em soro e urina, meios usualmente utilizados para detecção. Foram coletadas 299 amostras de 42 indivíduos, sendo 22 HIV positivos (GE) e 20 pacientes controle (GC). No GE, 63,6% dos pacientes apresentaram positividade para JCV em pelo menos uma amostra analisada, 54,5% foram positivos para BKV, 18,2% para células Merkel e não houve amostra positiva para TSV. No GC, 45% exibiu positividade para o JCV em pelo menos uma amostra analisada, 80% para BKV e nenhuma participante controle exibiu positividade para células Merkel e TSV. Não houve diferença de frequência de detecção viral entre os grupos estudados em relação às amostras coletadas, ou ainda em relação à idade ou sexo. Entretanto, nas amostras de fluídos orais houve maior prevalência de detecção para o BKV e para células Merkel. Concluímos que fluídos orais, especialmente saliva e lavado bucal, podem ser usados para o rastreamento do BK e JC; e que os indivíduos HIV positivos, sob tratamento antirretroviral não exibem frequências maior de poliomavírus, comparativamente a indivíduos controle.

Palavras-chave: Poliomavírus humano BK. Poliomavírus JC. Poliomavírus TSV. Poliomavírus Merkel. Portadores de HIV. Saliva. Fluído gengival crevicular. PCR

ABSTRACT

Barros FM. Human polyomavirus BK, JC, Merkel cell and TSV detection in oral fluid of HIV patients [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2017. Versão Corrigida.

Polyomavirus is one of the large family of viruses that cause primary infections usually in childhood, and can remain subclinical. In immunosuppression may cause some diseases. Individuals with HIV/AIDS often have immune deficiencies and may be at increased risk for diseases caused by polyomaviruses. The use of saliva in the diagnosis and follow-up of infectious diseases has been explored in the literature. The advantages of using saliva for screening are based on non-invasive collection and handling safety. The aim of present study was to detect and quantify the DNA from BKV, JCV, Merkel cell and TSV polyomaviruses in oral fluids (saliva, mouthwash and gingival crevicular fluid) and to compare it with serum and urine detection, the means usually used for detection. A total of 299 samples were collected from 42 individuals, 22 HIV positive (GE) and 20 control patients (GC). In GE, 63,6% of the patients presented positive for JCV in at least one sample analyzed, 54,5% were positive for BKV, 18,2% for Merkel cell and there was no positive sample for TSV. In GC, 45% showed JCV positivity in at least one analyzed sample, 80% in BKV, and no control participant exhibited positivity for Merkel cell and TSV. There was no difference in the frequency of viral detection among the groups studied in relation to the samples collected, or in relation to age or gender. However, in oral fluid samples there was a higher prevalence of detection for BKV and Merkel cell. We conclude that oral fluids, especially saliva and mouthwash, can be used for the screening of BK e JC; and that HIV positive individuals under antiretroviral treatment do not exhibit higher frequencies of polyomavirus compared to healthy control subjects.

Keywords: Human polyomavirus BK. Human Polyomavirus JC. Human Polyomavirus TSV, Human Polyomavirus Merkel. HIV patients Saliva. Crevicular gingival fluid. PCR

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Relação filogenética entre os poliomavírus com base na sequência genômica.....	32
Figura 2.2 – Morfologia da cápside do JCV.....	35
Figura 2.3 – Esquema do genoma do BKV.....	36
Figura 2.4 – Esquema do genoma dos poliomavírus de célula Merkel.....	36
Figura 2.5 – Distribuição mundial dos genótipos mais frequentes de JC.....	38
Figura 2.6 – Distribuição mundial dos genótipos mais frequentes de BK.....	39
Figura 2.7 – Representação esquemática do ciclo viral do JCV.....	40
Figura 2.8 – Representação esquemática do ciclo do BKV.....	41
Figura 2.9 – Representação dos órgãos afetados pelos poliomavírus JCV, BKV e de células Merkel.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Oligonucleotídeos e sonda responsáveis pela amplificação dos fragmentos no sistema de PCR tempo real para JCV e BKV	59
Tabela 4.2 - Oligonucleotídeos e sonda responsáveis pela amplificação dos fragmentos no sistema de PCR tempo real TSV	60
Tabela 4.3 - Oligonucleotídeos e sonda responsáveis pela amplificação dos fragmentos no sistema de PCR tempo real para células de Merkel ...	61
Tabela 5.1 - Informações coletadas durante a anamnese.....	63
Tabela 5.2 - Distribuição dos indivíduos do grupo de estudo (pacientes HIV positivos), por sexo e faixa etária	64
Tabela 5.3 - Distribuição dos indivíduos do grupo controle, por sexo e faixa etária ...	65
Tabela 5.4 - Resultados das amostras por indivíduos do GE para poliomavírus JC ..	66
Tabela 5.5 - Número e porcentagem de indivíduos positivos para JCV em cada grupo nas diferentes amostras	67
Tabela 5.6 - Resultados das amostras por indivíduos do GE para poliomavírus BK	68
Tabela 5.7 - Número e porcentagem de indivíduos positivos para BKV em cada grupo nas diferentes amostras	69
Tabela 5.8 - Resultados das amostras por indivíduos do GE para poliomavírus de células Merkel.....	70
Tabela 5.9 - Número e porcentagem de indivíduos positivos para poliomavírus de células Merkel em cada grupo nas diferentes amostras.....	71
Tabela 5.10 - Resultados das amostras por indivíduos do GE para poliomavírus TS..	72
Tabela 5.11 - Número e porcentagem de indivíduos positivos para TSV em cada grupo nas diferentes amostras	73
Tabela 5.12 - Associação entre urina e saliva com relação a detecção do JCV no GE	73
Tabela 5.13 - Associação entre urina e lavado bucal com relação a detecção do JCV no GE	74
Tabela 5.14 - Associação entre urina e FGC (fluido gengival crevicular) com relação a detecção do JCV noGE	74

Tabela 5.15 - Associação entre urina e a saliva com relação a detecção do BKV no GE.....	74
Tabela 5.16 - Associação entre urina e lavado bucal com relação a detecção do BKV no GE.....	75
Tabela 5.17 - Associação entre urina e FGC (fluido gengival crevicular) com relação a detecção do BKV no GE	75
Tabela 5.18 - Associação do soro e saliva com relação ea detecção do BKV no GE ..	75
Tabela 5.19 - Associação entre soro e lavado bucal com relação a detecção do BKV no GE.....	76
Tabela 5.20 - Associação entre soro e FGC (fluido gengival crevicular) com relação a detecção do BKV no GE	76
Tabela 5.21 - Positividade do CD4+ em relação as amostras coletadas para o poliomavírus JC	77
Tabela 5.22 - Positividade do CD4+ em relação as amostras coletadas para o poliomavírus BK.....	77
Tabela 5.23 - Positividade do CD4+ em relação as amostras coletadas para o poliomavírus de células Merkel.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag-T	antígeno T grande
Ag-t	antígeno t pequeno
AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida
BKV	poliomavírus humano BK
BKPyV	poliomavírus humano BK
CAPE	Centro de Atendimento a Pacientes Especiais
CD4	linfócito T
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPS	Desoxirribonucleotídeo Trisfosfato
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FGC	flúido gengival crevicular
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
GC	grupo controle
GE	grupo de estudo
HAART	terapia antirretroviral potente
HHV-6	herpes vírus tipo 6
HIV	vírus da imunodeficiência humana
IF	inibidores de fusão
II	inibidores de integrase
IMTSP	Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
IP	inibidores de protease
ITRN	inibidores de transcriptase reversa análogos de nucleosídeos
ITRNN	inibidores de transcriptase reversa não análogo de nucleosídeos
JCV	poliomavírus humano JC

JCPyV	poliomavírus humano JC
LEMP	leucoencefalopatia multifocal progressiva
MCV	poliomavírus de células Merkel
MERKEL	poliomavírus de células Merkel
MCPyV	poliomavírus de células Merkel
NCCR	região não codificada
OMS	organização mundial da saúde
pb	pares de base
PCR	polimerase chain reaction
RNA	ácido ribonucleico
RNA-m	ácido ribonucleico mensageiro
RR	região regulatória
TAE	tampão Tris-Acetato_EDTA
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	região de controle transcricional
TRAV	terapia antirretroviral
TS	Tricodisplasia espinulosa
TSV	poliomavírus tricodisplasia espinhosa
TSPyV	poliomavírus tricodisplasia espinhosa
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

pH	potencial hidrogeniônico
ml/min	mililitro por minuto
®	produto com marca registrada
ml	mililitro
°C	graus Celsius
pb	partes por bilhão
μl	microlitro
μM	micromolar
POS NQ	positivo não quantificável
cp/ml	cópias por mililitro de amostra

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1	Pacientes HIV positivos	29
2.1.1	Terapia antirretroviral	29
2.1.2	Epidemia de HIV/Aids no Brasil	30
2.2	Poliomavírus Humano	31
2.2.1	Descrição do poliomavírus ou descobrindo o poliomavírus	31
2.2.2	Estrutura Viral	34
2.2.3	Epidemiologia molecular dos poliomavírus e distribuição dos genótipos e subtipos	37
2.2.4	Replicação do vírus ou propagação no hospedeiro	39
2.2.5	Transmissão e Soroconversão	42
2.2.6	Disseminação e persistência do vírus (transmissão e propagação)	43
2.2.7	Reativação do vírus	44
2.2.8	Doenças relacionadas com cada poliomavírus e seu mecanismo	45
2.3	Flúidos Orais e Diagnósticos	49
3	PROPOSIÇÃO	53
4	MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1	Casuística do experimento	55
4.2	Coletas das amostras	56
4.2.1	Coleta das amostras de sangue periférico e o soro	56
4.2.2	Coletadas amostras de saliva	57
4.2.3	Coleta das amostras de lavado bucal	57
4.2.4	Coleta das amostras de fluído gengival crevicular	57
4.2.5	Coleta das amostras de urina	58
4.2.6	Realização do PCR real time	59
4.2.7	Análise Estatística	62

5	RESULTADOS63
6	DISCUSSÃO79
7	CONCLUSÕES.....	..89
	REFERÊNCIAS91
	APÊNDICES.....	109
	ANEXOS.....	117

1 INTRODUÇÃO

Cerca de 70 a 80% da população possui anticorpos contra os poliomavírus; os subtipos mais comuns são os Poliomavírus Humano JC (JCV) e o BK (BKV). A nomenclatura se origina do latim POLI (múltiplos) e OMA (câncer) (Hirsch; Steiger, 2003). Em indivíduos imunocompetentes os vírus não causam doenças ou infecções; entretanto, em indivíduos imunocomprometidos, o JCV está associado a doença leucoencefalopatia multifocal progressiva (LEMP), doença fatal do sistema nervoso central. O BKV se associa à cistite hemorrágica em pacientes receptores de transplante de células troncos hematopoiéticas e também à nefropatia intersticial em transplantados renais. Recentemente, as pesquisas também associam o BKV a complicações neurológicas (Nali et al, 2012). O Poliomavírus TSV (Tricodisplasia Espinhosa associada a poliomavírus) promove lesões cutâneas, com manifestações clínicas como eritema facial e desenvolvimento de papilas foliculares e espinhas (van der Meijden et al., 2010). O Poliomavírus de células Merkel (MCV) está associado a neoplasias de pele. O MCV pode ser encontrado em pele de pacientes saudáveis e de 30 à 60% em pacientes imunocomprometidos (Showalter et al., 2010; Garneski et al., 2009; Foulogne et al., 2010)

Em pacientes HIV positivos e que estejam imunodeprimidos, poderá ocorrer reativação dos poliomavírus, desenvolvendo as doenças anteriormente descritas.

Os fluídos orais contêm diversos biomarcadores, estes também encontrados no material biológico, como na urina e no sangue. Os fluídos orais estão sendo utilizado na detecção e dosagens de diversos exames laboratoriais como, anticorpos, hormônios, proteínas, bactérias, fungos, glicemia e inclusive DNA. Uma excelente alternativa no processo de diagnóstico de várias doenças, pois sua coleta não é invasiva, fácil manipulação e armazenamento, sendo viável também no campo da biologia molecular.

O objetivo de nossa pesquisa foi avaliar a prevalência de JC vírus, BK vírus, TS vírus, células de Merkel vírus no soro, saliva, lavado bucal, fluido gengival crevicular e urina em pacientes HIV positivos sem sintomas neurológicos, para a avaliação levou-se em conta a idade do paciente, local, medicação utilizada, incidência dos vírus. A metodologia utilizada foi por rTPCR PCR real time.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Pacientes HIV positivos

O primeiro caso de AIDS no Brasil foi em 1980 classificado em 1982 (Fiocruz). Neste mesmo ano, sete se tratavam no Hospital Emilio Ribas em São Paulo. Nos Estados Unidos, pesquisadores descobriram o fator etiológico da doença. No ano seguinte, ocorre a primeira conferência sobre AIDS em Denver, quando 33 países tinham relatos da doença, 3.000 casos diagnosticados e 1.283 casos de morte (Brasil, 2017a).

Na AIDS ou síndrome da imunodeficiência adquirida, o indivíduo é infectado por um retrovírus que afeta a sua resposta imunológica, o tornando suscetível a infecções oportunistas. O contágio ocorre por via parenteral, ou seja, contato sanguíneo ou fluídos, tais como, transfusão, transmissão vertical (mãe para filho), entre outros (Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e das hepatites virais – Ministério da Saúde).

Atualmente as terapias antirretrovirais são muito eficientes e podem levar o paciente a ter a mesma expectativa de vida de um não infectado com o vírus HIV (Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e das hepatites virais – Ministério da Saúde).

2.1.1 Terapia antirretroviral

Atualmente existem 22 medicamentos para a terapia antirretroviral, em 38 apresentações farmacêuticas (Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e das hepatites virais – Ministério da Saúde).

A terapia antirretroviral inibe a replicação viral, retarda a progressão da imunodeficiência e restaura a imunidade do indivíduo, aumentando o tempo e

qualidade de vida do portador do HIV ou do paciente com Aids. O controle da terapia é realizada através da contagem dos linfócitos T CD4+; é expresso por número de células por milímetro cúbico (células/mm³), através deste valor também categorizamos a doença: **categoria 1**, considerado imunossupressor, os valores de CD4 estão entre zero e 199 células/mm³, **categoria 2**, seus valores encontram-se entre 200 e 499 células/mm³, estes pacientes são considerados moderados, se os valores de CD4 encontram-se acima de 500 células/mm³, estes pacientes são considerados imunocompetentes, **categoria 3**. Parâmetros virológicos chamados também de carga viral, são dosados e de suma importância. A carga viral avalia também o grau de comprometimento do sistema imune e a recuperação da resposta imunológica, informando se o tratamento antirretroviral está sendo eficiente. Carga viral indetectável e contagem de linfócito T CD4+ acima de 350 células/mm³, o paciente é normocompetente e a escolha da medicação está coerente, indicando a supressão viral. Para o Ministério da Saúde e a OMS os pacientes que apresentarem a carga viral indetectável e o valor de linfócito CD4+ acima de 500 células/mm³, a expectativa de vida deste indivíduo é semelhante à população em geral (Brasil, 2017b).

Os fármacos estão divididos em quatro classes, inibidores de fusão (IF), inibidores de transcriptase reversa análogos de nucleosídeos (ITRN), inibidores de transcriptase reversa não análogo de nucleosídeos (ITRNN) e inibidores de protease (IP) e inibidores de integrase (II) (Cunico et al., 2008).

2.1.2 Epidemia de HIV/Aids no Brasil

Segundo dados divulgados pela UNAIDS em junho de 2017, o Brasil é o país da América Latina que mais concentra casos de novas infecções de HIV na região. O país responde por 49% das novas infecções enquanto o México responde por 13%. As estimativas, no ano de 2016 apontavam 830.000 pessoas vivendo com HIV, 48.000 novas infecções pelo HIV e 14.000 mortes relacionadas à AIDS (UNAIDS, 2017).

O Ministério da Saúde acredita que 87% da população vivendo com HIV já foi diagnosticada, e deste número 64% estão em tratamento antirretroviral, e cerca de

90% apresentam carga viral indetectável. O Ministério da saúde tem uma meta de 90-90-90 até 2020, ou seja, 90% da população com diagnóstico, 90% em tratamento e 90% com carga viral indetectável (UNAIDS, 2017; Brasil, 2017c).

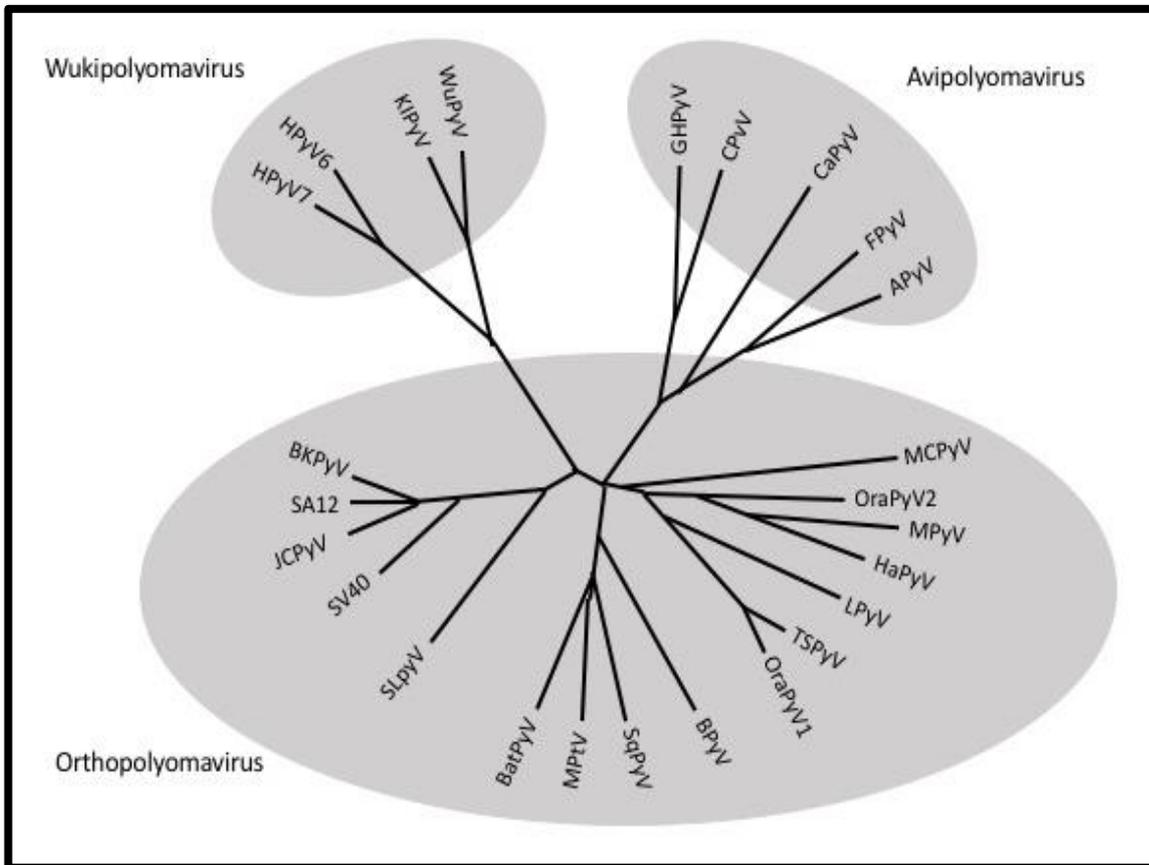
A epidemia entre os jovens continua sendo uma preocupação ao Ministério da Saúde. De 2006 a 2015 os jovens na faixa de 15 a 19 anos quase triplicaram (de 2,4 para 6,9 casos por 100 mil habitantes) e entre jovens de 20 a 24 anos a taxa mais que dobrou (de 15,9 para 33,1 casos por 100 mil habitantes) (UNAIDS, 2017; Brasil 2017c).

2.2 Poliomavírus Humano

2.2.1 Descrição do poliomavírus ou descobrindo o poliomavírus

Os poliomavírus são pequenos vírus não envelopados com dupla-fita de DNA e foram descobertos acidentalmente por volta de 1950, seu nome provém de POLI de múltiplos, OMA do câncer segundo Hirsch e Steiger (2003). A família *Polyomaviridae* é formada por vírus que infectam diferentes espécies animais, dentre elas o homem (Arthur et al., 1989; Randhawwa et al., 2002). A família composta por 25 membros está dividida em três grupos, *Wukipolyomavirus*, *Avipolyomavirus* e *Orthopolyomavirus* (Johne et al., 2011). Os grupos *Orthopolyomavirus* e *Wukipolyomavirus* infectam mamíferos e o grupo *Avipolyomavirus* infectam aves. Os vírus BK, JC, TSV e células Merkel são integrantes da família *Polyomaviridae*, do grupo *Orthopolyomavirus* (Johne et al., 2011) (Figura 2.1).

Figura 2.1 - Relação filogenética entre os poliomavírus com base na sequência genômica (Johne et al., 2011)



Os primeiros poliomavírus humanos, o vírus BK (BKV) e o vírus JC (JCV), foram isolados em 1971; o primeiro (BKV) foi encontrado na urina de um paciente transplantado renal, portador de uma estenose uretral (Gardner et al., 1971); o segundo (JCV), isolado a partir do tecido cerebral de um paciente portador de um linfoma de Hodgkin que desenvolveu leucoencefalopatia multifocal progressiva (Padgett et al., 1971), ambos nomeados com as iniciais dos pacientes dos quais os vírus foram isolados (Gardner et al., 1971; Padgett et al., 1971). (Figura 2.1) O sequenciamento do DNA dos dois vírus foram realizados por Frisque e colaboradores em 1982 (Frisque et al., 1984), e depois de 2 décadas, foram descobertos mais três novos membros, o poliomavírus KI (KI), poliomavírus WU (WU) e o poliomavírus de células Merkel (MCV); os dois primeiros, isolados em secreções respiratórias de pacientes com infecção do trato respiratório (Allander et

al., 2007) e MCV, identificado em carcinoma de células de Merkel (Feng et al., 2008; Jiang 2009).

O Poliomavírus de células Merkel foi (MCV ou MCPyV) apresentado em 2008 por Feng e colaboradores, associando um agente etiológico no desenvolvimento do Carcinoma de Células de Merkel, portanto, sua principal característica. Para este estudo, foram utilizados tecidos congelados possibilitando uma melhor extração do DNA que foi detectado em 80% das amostras avaliadas. A principal característica do Poliomavírus de células de Merkel (MCV) é causar um carcinoma raro de pele (Vahabpour et al., 2016). Entretanto, é mais frequentemente encontrado em pacientes transplantados, portadores do HIV, e em pacientes com mais idade (Feng et al., 2008; Becker et al., 2009; Viscidi; Shah, 2009).

O poliomavírus TSV (*Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus*), está associado a uma doença cutânea rara, com manifestações clínicas como eritema facial, papilas foliculares e espinhas, na face, orelhas, extremidades e tronco (Kazem et al., 2013; van der Meijden et al., 2010; Kassir et al., 2017). O genoma deste poliomavírus foi desvendado e descrito pela primeira vez em 2010 por van der Meijden e colaboradores. A Tricodisplasia espinhosa tem sido observada exclusivamente em pacientes imunocomprometidos, especialmente pacientes transplantados renais (40%), de coração (20%), seguidos de pacientes com leucemia linfocítica aguda (12%), leucemia linfocítica crônica (8%), transplantados de pulmão (8%), linfoma não Hodgkin (4%) (Kazem et al., 2013).

O último poliomavírus descrito na literatura é o poliomavírus humano tipo 9; pouco se sabe sobre este vírus e o seu grau de patogenicidade (Moens et al., 2011). Entretanto, este vírus foi encontrado em amostras de sangue e urina de pacientes imunocomprometidos, mas ainda não foi associada a nenhuma doença (Moens et al., 2011; Scuda et al., 2011).

2.2.2 Estrutura Viral

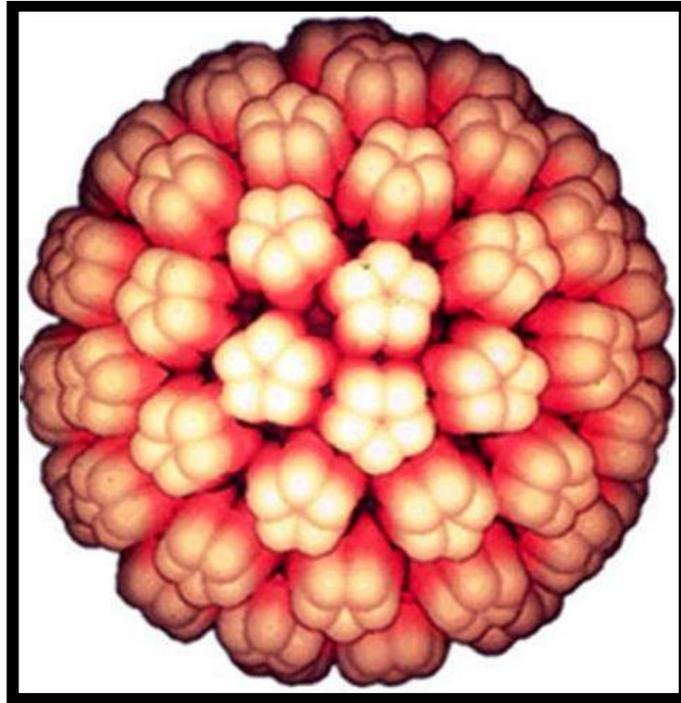
Os poliomavírus são pequenos vírus icosaédricos (~45nm), não envelopados, com genoma composto por dupla fita de DNA circular (~5170pb) (Figura 2.2).

A primeira região é chamada de “precoce”, onde se localizam genes que codificam proteínas não estruturais, denominadas de antígeno T grande (Ag-T) e o antígeno t pequeno (Ag-t) (Randhawa et al., 2002). O antígeno t-pequeno ainda não tem a função totalmente conhecida, entretanto, parece que auxilia a progressão do ciclo celular e ajuda na indução da fase S celular junto com o Ag-T (Mullane et al., 1998; Pallas et al., 1990) (Figura 2.3 e 2.4).

Outra região, mais externa, denominada região “tardia”, codifica as proteínas estruturais como VP1, VP2, VP3 e a agnoproteína, cuja função ainda não está totalmente elucidada. A proteína VP1 do capsídeo viral está exposta na face externa do vírus, codificada por um gene homônimo e sintetizada na região tardia do vírus (Nishimoto et al., 2006; Luo et al., 2008). Esta proteína contém epítomos de indução e reconhecimento de anticorpos (Hilton; Tong, 2008). A proteína VP1 distingue os subtipos dos genótipos dos poliomavírus JC e BK. As proteínas VP2 e VP3 fazem parte da cápside viral e formam complexos com a proteína VP1, permitindo a conclusão da montagem viral (Chang et al., 1992; Barouch; Harrison, 1994). A agnoproteína, ou proteína tardia, tem a função reguladora na transcrição viral, na transdução e na formação e maturação de novos vírus; ela também interage com o AgT influenciando a replicação viral e transcrição do DNA (Rhadhawa et al., 2002) (Figura 2.3 e 2.4).

Possuem, ainda, uma região de controle não codificante (NCCR); esta região do vírus regula a replicação do DNA e ocorre a transcrição do RNA (Olsen et al., 2006), e a sua montagem é realizada no núcleo celular (Chang et al., 1992). (Figuras 2.3 e 2.4) Na cepa arquetípica, que é a circulante na população geral (indivíduos sadios), essa região (NCCR) é altamente conservada (Moens, 1995). Em cepas patogênicas, encontrada em indivíduos imunocomprometidos, a região regulatória rearranjada apresenta pequenas variações de nucleotídeos, cuja função também está associada à transcrição viral (Randhawa, 2002).

Figura 2.2 - Morfologia da cápside do JCV (Ahsan N; Shah KV, 2006)



No poliomavírus TSV, o genoma é formado por 5232pb; a sua transcrição é regulada pela região de controle não codificante NCCR (Kazem et al., 2013; van der Meijden et al., 2010). Com tudo, ainda pouco se sabe sobre os padrões de transcrição deste poliomavírus (Kazem et al., 2013).

Figura 2.3 - Esquema do genoma do BKV (modificado do artigo Slavov et al., 2006)

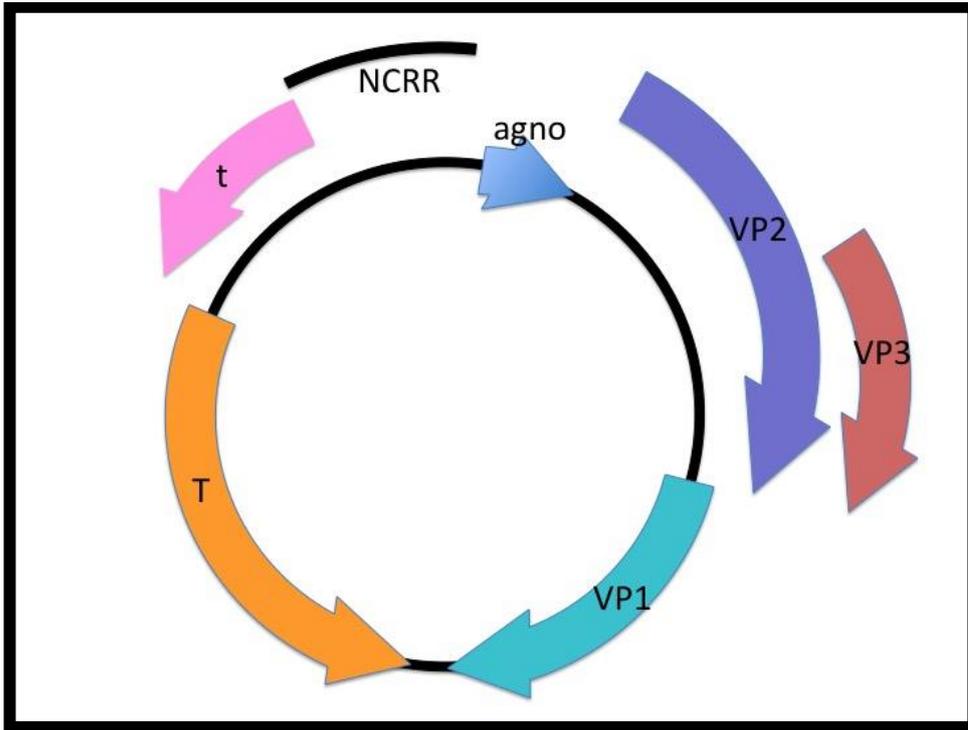
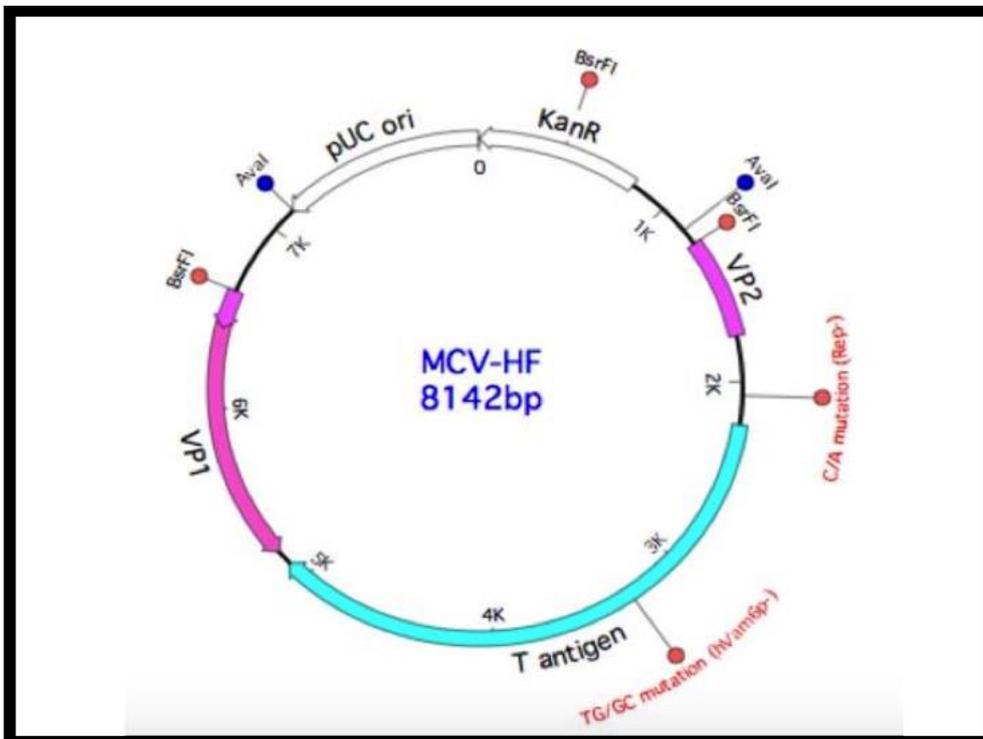


Figura 2.4 - Esquema do genoma do poliomavírus de célula Merkel (Feng et al., 2011)



2.2.3 Epidemiologia molecular dos poliomavírus e distribuição dos genótipos e subtipos

Com base no sequenciamento genômico da região da proteína VP1 dos poliomavírus, é possível identificar o genótipo e subtipos para os poliomavírus JC e BK; com isso, identificar a sua origem. Estão distribuídos na população dos continentes, sugerindo a origem da ancestralidade desta população (Figura 2.5).

O vírus JC possui diferentes genótipos já identificados/classificados. O genótipo 1, tem três subtipos; é encontrado principalmente em indivíduos com origem Europeia, mas também encontrado nos Estados Unidos (Frisque, 1983; Agostini et al., 1998; Agostini et al., 2001).

Os genótipos 2 e 7 são comumente encontrados na Ásia; o genótipo 2 é predominantemente da região nordeste da Ásia; e o genótipo 7 mais frequente na região sul da China e sudeste asiático (Agostini et al., 2001; Jobes et al., 1998; Guo et al., 1998; Sugimoto et al., 1997).

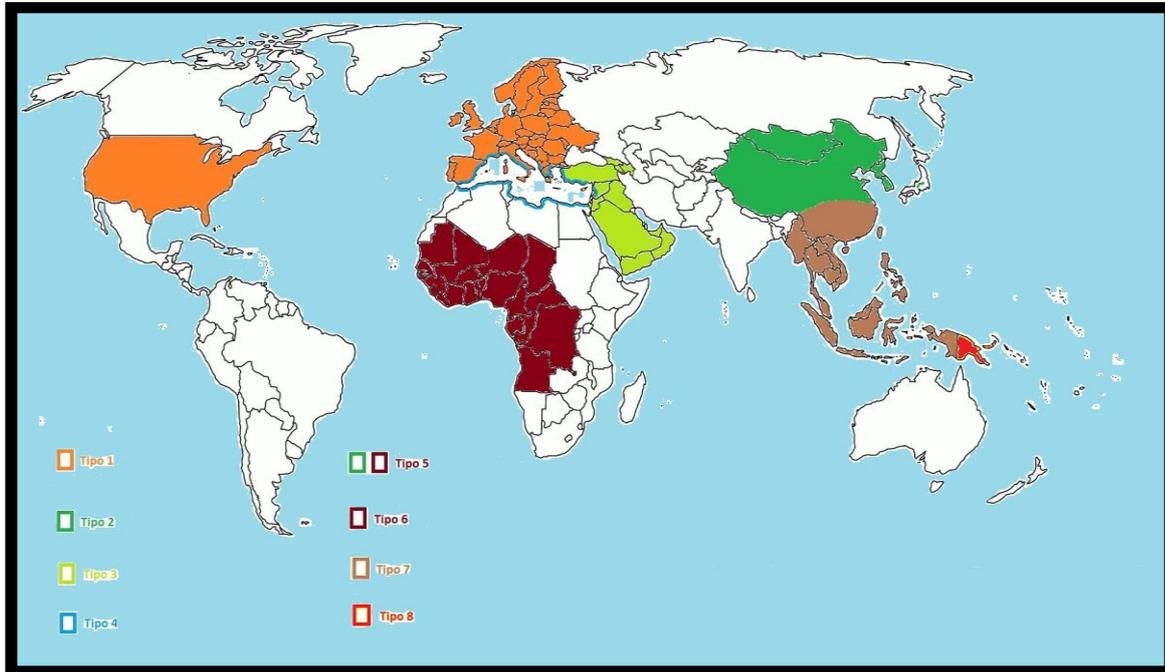
O genótipo 3 é proveniente da Ásia oriental (Agostini et al., 1997) e o genótipo 4 da região do Mediterrâneo (Agostini et al., 2001).

O genótipo 5 é formada a partir de uma combinação de uma parte da sequência genótipos 2 e, outra, do 6 (Agostini et al., 1996; Jobes et al., 1998; Hatwell; Sharp, 2000).

O genótipo 6 está presente na região oeste e central da África (Hatwell e Sharp, 2000; Guo et al., 1996).

E o genótipo 8 está presente na população da Papua Nova Guiné e Micronésia (Jobes et al., 2001).

Figura 2.5 - Distribuição mundial dos genótipos mais frequente de JC



Também foi realizado o sequenciamento da proteína VP1, para a identificação do BK, e foram encontrados 4 genótipos e diversos subtipos. O genótipo está distribuído em relação à distribuição geográfica da população. Através desta detecção há uma grande acurácia da determinação geográfica do indivíduo (Figura 2.6).

O genótipo 1 está dividido em subtipos. O subtipo 1A, o mais comum, é encontrado no continente africano; o subtipo 1-B1, encontrado no sudeste asiático; o subtipo 1-B2, encontrado na Europa e oeste da Ásia; e o subtipo 1C, no Japão (Krumbholz et al., 2008; Luo et al., 2008; Takasaka et al., 2004; Zheng et al., 2007; Zhong et al., 2009b).

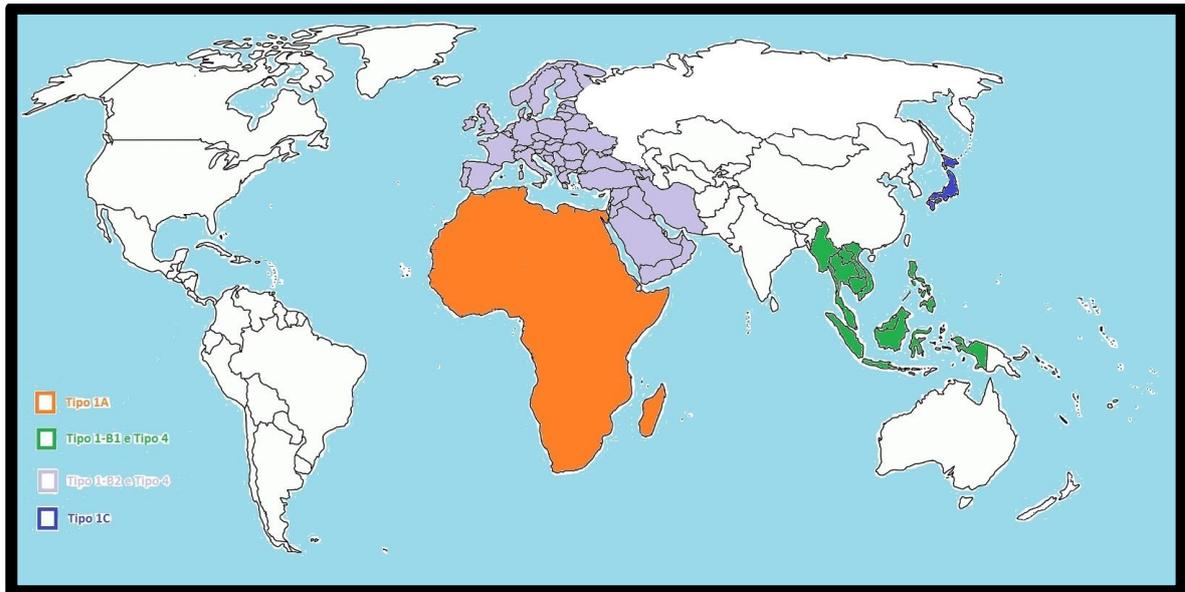
O genótipo 4 é dividido em 6 subtipos: a1, a2, b1, b2, c1 e c2. Todos com maior prevalência na Ásia e Europa (Nishimoto et al., 2007; Zhong et al., 2009a).

Os genótipos 2 e 3 são os mais raros, e ainda não foram identificados até o presente momento, a origem desse genótipo (Nishimoto et al., 2006; Ikegaya et al., 2007; Yogo et al., 2007).

No Brasil, foram publicados dois trabalhos que realizaram a identificação da genotipagem para o BK em nossa população. Em São Paulo, o genótipo 1 foi encontrado em 80% da amostra estudada, seguido pelo genótipo 4 (Urbano et al.,

2016). No Rio de Janeiro, o genótipo 1 foi encontrado em 96% e apenas em 4%, o genótipo 2 (Zalona et al., 2011).

Figura 2.6 - Distribuição mundial dos genótipos mais frequentes de BK



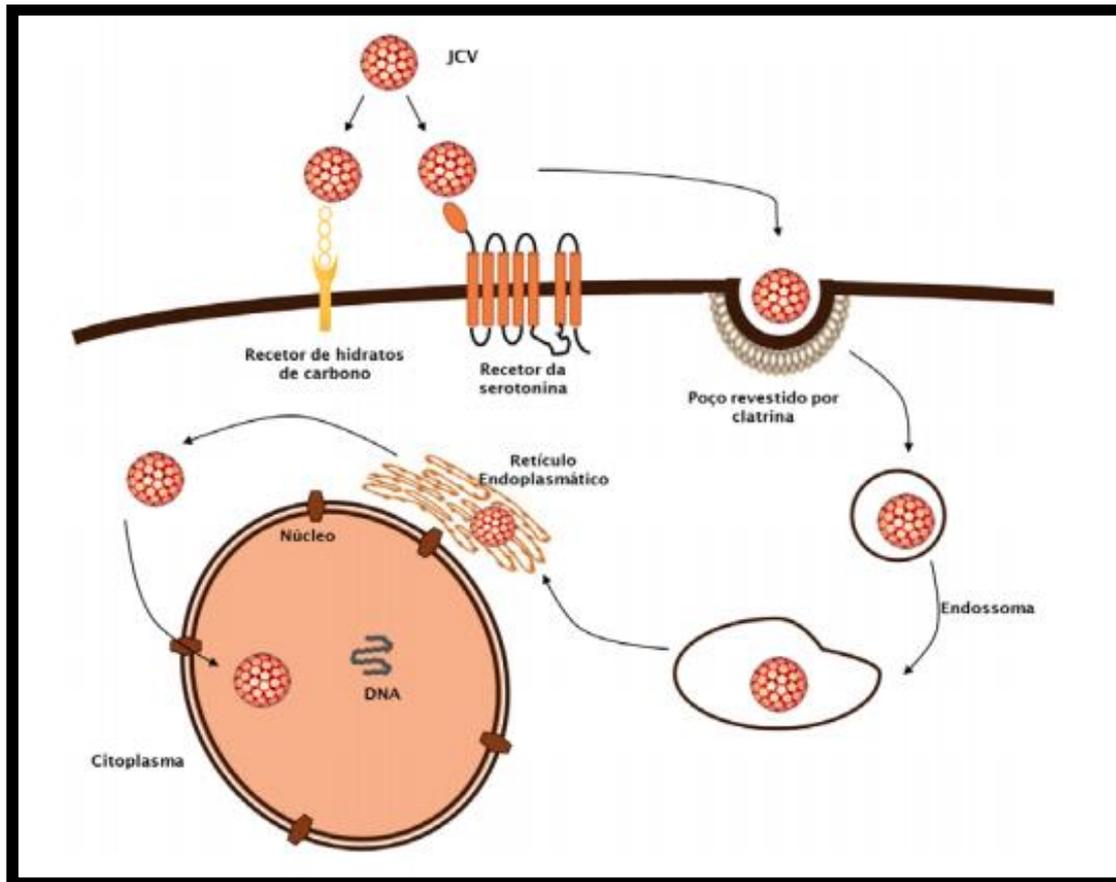
2.2.4 Replicação do vírus ou propagação no hospedeiro

Sabe-se que a proteína VP1 tem um papel fundamental na infecção da célula pelo poliomavírus. Os receptores com resíduos de ácido siálico também têm um papel importante. No poliomavírus JC, o vírus, para penetrar na célula, depende de uma glicoproteína para se ligar à membrana (Seganti et al., 1981), ocorrendo endocitose; após 12 a 16 horas, o JCV irá integrar o retículo endoplasmático, causando alterações conformacionais (Querbes et al., 2006).

No caso do BKV, os receptores de membrana são os gangliosídeos (Sinibaldi et al., 1990), entrando, assim, no citoplasma celular e transportado para o núcleo celular. Nesta fase, se inicia a transcrição de RNA mensageiro, envolvendo todas as partes das estruturas do vírus, como VP1, VP2, VP3, AgT, agnoproteína, entre outras estruturas e, assim, a replicação viral. A replicação viral do DNA dos

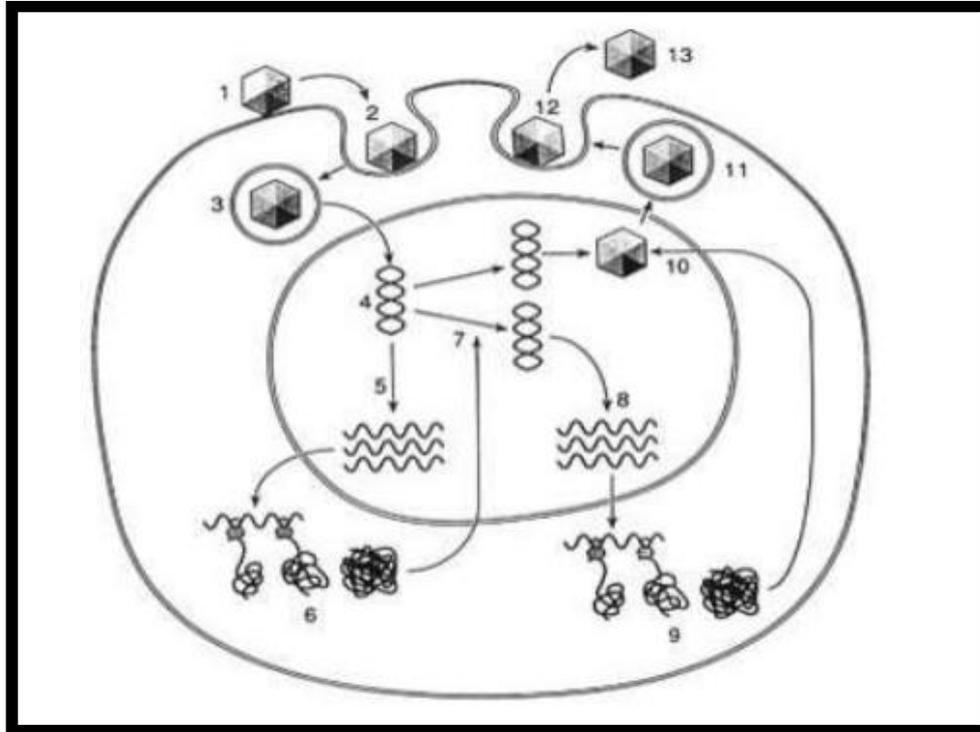
poliomavírus não está bem elucidada. O ciclo replicativo tem duração de aproximadamente de 40 horas e as proteínas virais maduras são liberadas (Trowbridge; Frisque, 1995; Prins, Frisque., 2001; Shishido-Hara et al., 2000) (Figuras 2.7 e 2.8).

Figura 2.7 - Representação esquemática do ciclo viral do JCV



O vírus JC se liga ao receptor de hidratos de carbono na superfície da célula ou no receptor de serotonina em células humanas da glia. O vírus é incorporado por poços revestidos por clatrina, formando endossomo. O vírus seguirá até o retículo endoplasmático, causando alterações conformacionais. Na sequência, ele será transportado para o citoplasma e, conseqüentemente, atingindo o núcleo da célula (Ferenczy et al., 2012).

Figura 2.8 - Representação esquemática do ciclo viral do BKV



1 - O vírus BKV se ligando à célula. 2 - É formado endossomo. 3 - O vírus é transportado para o núcleo da célula. 4 - Exposição do genoma viral. 5 - Expressão dos genes precoces. 6 - Síntese das proteínas. 7 e 8 - Duplicação do DNA viral. 9- Síntese de proteínas tardias. 10 - Formação de novos vírus. 11 - Liberação dos vírus para o citoplasma. 12 - Vírus sendo conduzido para o meio extracelular. 13- Disseminação do vírus (Cole et al., 2001).

O poliomavírus de célula Merkel se desenvolve da mesma maneira que os demais; de forma resumida Feng et al., (2011) descreveram que as atividades se iniciam no AgT; na região tardia ocorre a codificação das proteínas da capsídeo viral; nas VP1, VP2 ocorre a replicação viral (Feng et al., 2011).

Após a infecção primária, os poliomavírus se disseminam pelo corpo através da corrente sanguínea (Dörries et al., 1994), atingindo sítios com potenciais de replicação (Hirsch et al., 2003).

2.2.5 Transmissão e Sorocoversão

Os poliomavírus são vírus ubíquos que infectam o hospedeiro sem causar uma doença primária e sem manifestações clínicas. Após a infecção primária, geralmente persistem sem causar sintomas clínicos e ficam latentes (Kazem et al., 2013). Os humanos são hospedeiros naturais para o poliomavírus humano BK e JC, WU, KI, de células Merkel e TSV (Kazem et al., 2013; Allander et al., 2007; Feng et al., 2008; Becker et al., 2009; van der Meijden et al., 2010). O BKV e o JCV são vírus não patogênicos para indivíduos imunocompetentes, ou saudáveis, e sua ativação está associada à imunodeficiência (Hirsch e Steiger, 2003; Machado et al., 2011). Segundo estudos soropidemiológicos, aproximadamente 85% da população adulta já foi infectada com os poliomavírus (Knowles et al., 2001; Kean et al., 2009). As infecções primárias podem ocorrer com frequência na infância. Em crianças imunocomprometidas, a infecção pelo BKV pode se manifestar clinicamente como uma cistite ou nefrite (Mylonakis et al., 2001; Krumbholz et al., 2008).

O modo de transmissão por BKV e JCV ainda não está bem definido, assim como o mecanismo do vírus para entrar no estado de latência ou manter baixos níveis de expressão gênica ou replicação, não estão totalmente estabelecidos (Ling et al., 2003; Vanchiere et al., 2009; Robaina et al., 2013a). Existe ainda, uma especulação alternativa que não pode ser descartada, como por exemplo, transmissão por unino-oral, transplacentária, transfusão de sangue, sêmen e órgão transplantado (Bofill-Mas et al., 2001; Bofill-Mas et al., 2000; Hirsch; Steiger, 2003). A soroprevalência em adultos para BKV e JCV é alta, e acontece em cerca de 90% de BKV em adultos (Knowles et al., 2003) e para JCV em torno de 50 a 80% (Khalili et al., 2007; Knowles, 2006, Jiang, et al., 2009).

Pouco se tem na literatura sobre o TSV. Em algum estágio da vida o TSPyV infecta a pele e causa a doença numa minoria de pacientes imunocomprometidos. Estudos relatam que apenas 5% de positividade foi encontrada (Kazem et al., 2013; van der Meijden et al., 2010; Scuda et al., 2011).

2.2.6 Disseminação e persistência do vírus (transmissão e propagação)

As infecções primárias por BKV e JCV geralmente são subclínicas no início da vida (Pal et al., 2006; Goudsmit et al., 1981; Goudsmit et al., 1982; Jiang et al., 2009). Produzem uma viremia transitória seguida pela da instalação da infecção; algumas podem causar casos de latência clínica, quando o nível da replicação viral é baixa (Pal et al., 2006; Fioriti et al., 2005; Goudsmit et al., 1982) ou realmente instalar as doenças relacionadas ao vírus. Cerca de 60% dos casos, podem ser acompanhados por doenças nos sistemas respiratório ou do trato urinário (Fioriti et al., 2005; Goudsmit et al., 1982). Em estudo prospectivo, foram avaliadas 66 crianças saudáveis apresentando problemas respiratórios; 11 delas foram soropositivas para o BKV. Sete ou 63,6% apresentavam doença respiratória moderada, e apenas quatro ou 36,4% eram assintomáticas (Goudsmit et al., 1982). Um local de persistência do vírus BKV e JCV são em células renais e do trato urinário (Chesters et al., 1983; Heritage et al., 1981; Jiang et al., 2009), também são encontrados na circulação sanguínea (Dörries et al., 2003; Dörries et al., 1994; Monaco et al., 1996; Tornatore et al., 1992; Jiang et al., 2009) e na urina (Dörries, 2001; Knowles et al., 2001; Jiang et al., 2009; Zhong et al., 2007), apenas 3% em urinas de mulheres grávidas durante o segundo e terceiro trimestre de gestação (Arthur et al., 1989; Chang et al., 1996b; Coleman et al., 1980; Markowitz et al., 1991; Jiang et al., 2009). Foram identificadas sequências de BKV com alta frequência em tecidos e fluídos urogenitais, tais como cérvix, vulva, próstata e sêmen, e em uma baixa frequência em tecidos cerebrais (Dörries, 2006; Monini et al., 1996; Elsner; Dörries, 1992; Martini et al., 2004; Monini et al., 1996; Monini et al., 1995; Pietropaolo et al., 2003; Jiang et al., 2009). O vírus JC é frequentemente encontrado em infecções do encéfalo; não está claro se, em tecido cerebral normal, o vírus está presente (Dörries, 2001). Muitos pesquisadores descrevem que há a presença do JCV (Caldarelli-Stefano et al., 1999; Elsner; Dörries, 1992; Mori et al., 1992) ou ausência nos cérebros de pacientes sem leucoencefalopatia multifocal progressiva (Chesters et al., 1983; Stoner et al., 1988; Quinlivan et al., 1992;). Podem ser detectadas de sequencias de JCV em vários tecidos e células como, fígado, baço, pulmão, linfonodo e epitélio colorretal (Caldarelli-Stefano et al., 1999; Dörries, 2001; Grinnell et al., 1983; Laghi et al., 1999; Newman; Frisque, 1997;

Newman; Frisque, 1999; Jiang et al., 2009). O DNA do BKV e JCV foi detectado em vários tipos de neoplasias (Flaegstad et al., 1999), mas não há prova concreta de que estes poliomavírus estejam diretamente associados à carcinogênese ou atuando como ativador para algum tipo de câncer humano (Fioriti et al., 2005). Eash et al. (2006) concluíram que ocorre um aumento na incidência da detecção do poliomavírus na urina (virúria) e no sangue (viremia), em pacientes receptores de células tronco hematopoiéticas, rim e coração e em indivíduos infectados pelo HIV. Zhong et al. (2007) realizaram um estudo para conhecer a incidência de BKV na urina e comparar e confirmar os resultados descritos na literatura de JCV. Foram utilizados 50 indivíduos distribuídos em 9 grupos, divididos por idade. Concluíram que a taxa de virúria de BK foi relativamente baixa em indivíduos com idade menor que 30 anos, mas houve um aumento gradual em indivíduos com idade maior de 30 anos. O BK foi menos frequente do que JC virúria em adultos.

2.2.7 Reativação do vírus

Os poliomavírus humanos causam doenças em indivíduos imunocomprometidos, permitindo a reativação no estado subclínico conduzindo a uma infecção, resultando em uma virúria ou viremia, levando a doenças graves ou fatais. A reativação viral pode se desencadear em diferentes momentos, em especial na imunossupressão, desenvolvendo a replicação viral sem o controle do sistema inume. A infecção primária é diagnosticada pela detecção de genes virais em um indivíduo soronegativo. A infecção secundária é definida com a replicação do vírus em um indivíduo previamente positivo. A reativação ou reinfecção é considerada, quando a replicação do latente ou de um novo subtipo for detectada, respectivamente. Já a doença pelo BKV é considerada quando a replicação viral causa a disfunção do órgão (presença da replicação do BKV no tecido alterado) (Hirsch; Steiger, 2003). A reativação do BKV, em um transplantado renal ou de medula óssea, resulta em uma cistite hemorrágica e nefropatia por poliomavírus (Chang et al., 1996a; Muñoz et al., 2005; Sundsfjord et al., 1999). Exemplificando, JCV é reativado quando o paciente está imunossuprimido com HIV, a reativação

ocorre no cérebro levando o paciente a uma leucoencefalopatia multifocal progressiva (Berger; Concha, 1995; Brooks; Walker, 1984). Em contrapartida, a virulência de JCV não se correlaciona com o grau de imunossupressão (Dörries, 2001).

2.2.8 Doenças relacionadas com cada poliomavírus e seu mecanismo

Doenças relacionadas ao BKV, podem causar nefropatia em pacientes com transplante renal; de 1 a 10% estenose uretral em transplante renal; 3% cistite hemorrágica, 10 a 25% em pacientes transplantados de medula óssea. Podem raramente causar pneumonia, retinite, doença hepática e meningoencefalite (Pinto; Dobson, 2014).

O vírus JC está relacionado a leucoencefalopatia multifocal progressiva (LEMP) em pacientes imunocomprometidos. Foram encontrados pacientes com diagnóstico de LEMP, em 80% em imunossuprimidos graves com AIDS, malignidade hematológicas 13%, receptores de transplante de órgãos sólidos e medula óssea 5% e doenças inflamatórias crônicas 2% (Pinto e Dobson, 2014). O LEMP está envolvido na desmielinização progressiva da substância branca do cérebro levando a uma deterioração cognitiva, a distúrbios da marcha e coordenação, paresia dos membros e convulsões (Pinto; Dobson, 2014). Há estudos que encontraram o DNA do antígeno T grande (Ag-T) do vírus JC, presentes em 28 a 30% dos carcinomas colorretais, sugerindo que o vírus JC possa contribuir para o desenvolvimento desta neoplasia (Pinto; Dobson, 2014).

Em 2009, o estudo de Jeffers e colaboradores, foi o primeiro estudo a detectar o BVK em saliva de pacientes portadores de HIV e em indivíduos saudáveis, e também a replicação nas células das glândulas salivares em cultivo celular; através do método de PCR real time quantitativo. Concluíram que as células salivares humanas podem estar infectadas e serem um local de latência, além dos rins e trato urogenital, possibilitando assim uma via de transmissão oral.

Robaina et al., em 2013a, avaliaram a presença de poliomavírus na saliva de crianças infectadas pelo HIV e observaram a presença do DNA dos poliomavírus

BK, JC, WU, KI nas amostras de saliva, tanto nas portadoras de HIV quanto no grupo controle, com frequência de infecção significativamente maior no grupo de crianças portadoras de HIV.

Existem alguns trabalhos que demonstram a presença de BKV e JCV na saliva, mas nenhum trabalho até o momento demonstrou sua presença em fluido gengival crevicular (Jeffers et al., 2009; Robaina et al., 2013a; Robaina et al., 2013b; Burger-Calderon et al., 2014).

A leucoencefalopatia multifocal progressiva (LEMP) é considerada uma doença rara, mas geralmente fatal, que ocorre quase exclusivamente em pacientes com imunossupressão grave, em indivíduos portadores de HIV, com doenças hematológicas malignas, neoplasias de órgão sólidos, transplantados de órgão ou indivíduos que fazem tratamentos com imunossupressores. Os sintomas desta doença (LEMP) são deficiências motoras, alteração de consciência, comprometimento da marcha e distúrbios visuais (Delbue et al., 2013).

A alta frequência de JCV excretado na urina sugere que os rins sejam um local de latência deste vírus. Mas outros reservatórios estão sendo investigados. A hibridização *in situ* já demonstrou a presença de JCV em linfócitos B, medula óssea e outros tecidos retículo-endoteliais, como pulmão, linfonodos e tonsilas. A presença do DNA do JCV no tecido tonsilar e a frequência deste vírus nas vias respiratórias, sugerem que o JCV possa ser transmitido por essas vias (Goudsmit et al., 1982; Jeffers et al., 2009; Robaina et al., 2103a).

Ling et al., em 2003, estudaram a reativação e eliminação dos poliomavírus em 30 indivíduos saudáveis por mais de 14 meses; evidenciando que a eliminação do JCV na urina foi dependente da idade nos indivíduos saudáveis e ocorrendo com maior frequência nos indivíduos com mais de 40 anos. O estudo também demonstrou que a eliminação do JCV na urina foi mais frequente na primavera e outono, mostrando que a variação sazonal da reatividade do vírus pode influenciar no resultado das coletas. No ano de 2007, Zhong et al., confirmaram parte deste estudo, e demonstraram que a taxa de virúria de BK foi relativamente baixa em indivíduos com idade menor de 30 anos, mas obteve um aumento gradual em indivíduos com idade maior de 30 anos.

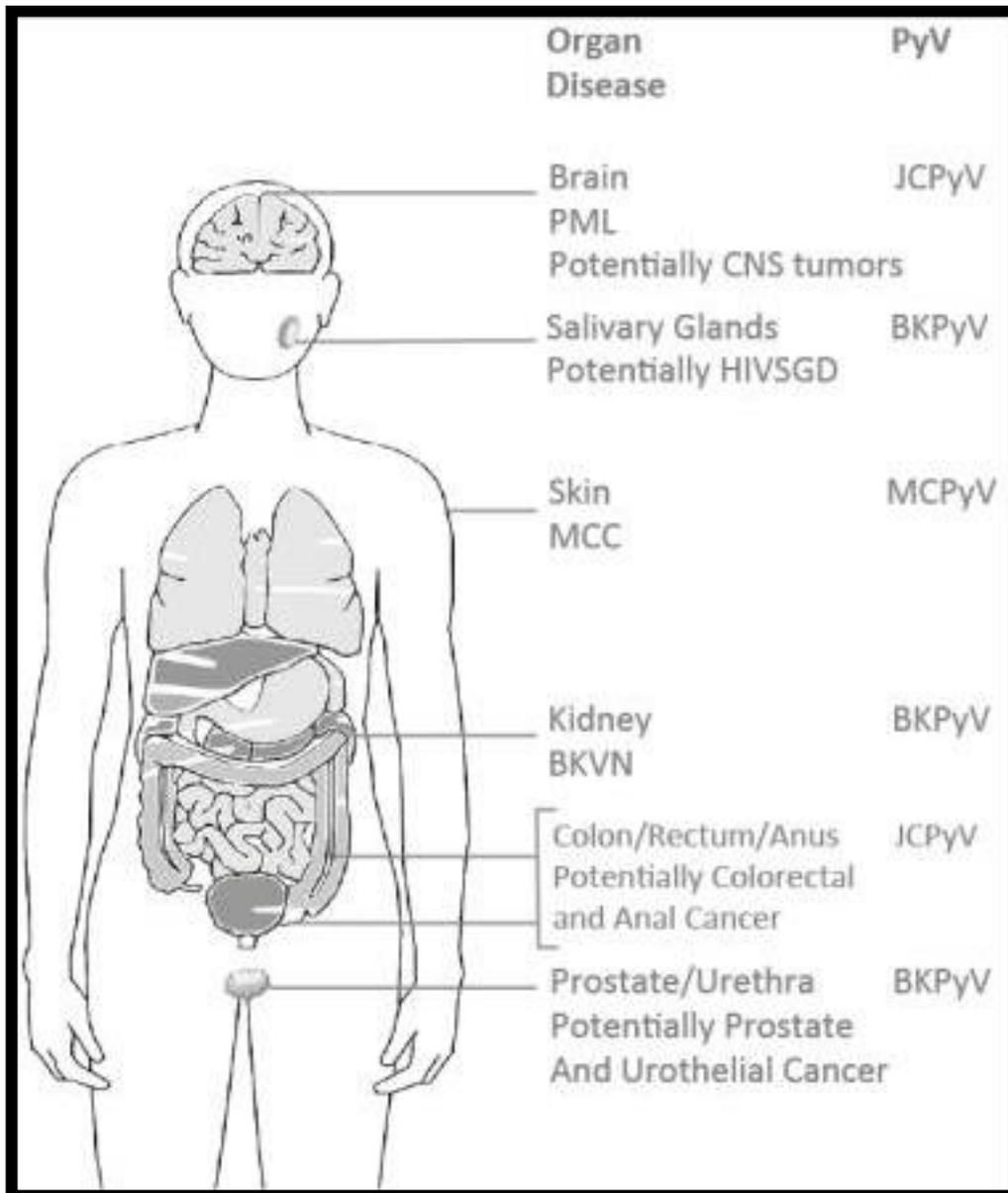
O Poliomavírus de células Merkel, único poliomavírus que está envolvido no desenvolvimento de câncer (Feng et al., 2008), está associado a um câncer de pele raro e agressivo, denominado de carcinoma de células de Merkel, pacientes

portadores de HIV tem 13,4% risco maior de desenvolvimento do câncer. Por este motivo, a incidência do câncer triplicou nos últimos 20 anos (Vahabpour et al., 2017).

O TSV está relacionado a lesões cutâneas em pacientes imunocomprometidos, a Tricodisplasia espinhosa. Este vírus não faz parte da microbiota normal da pele (Kazem et al., 2013). A lesão é caracterizada por eritema com desenvolvimento de papilas foliculares distribuída pela face, orelhas, podendo aparecer raramente nas extremidades, tronco e couro cabeludo (Kazem et al., 2013; Kassar et al., 2017). Podem levar a alopecia de sobrancelhas. Com a progressão da doença as sobrancelhas, orelhas e o nariz podem se desconfigurar e causar alteração da aparência facial do paciente (Kazem et al., 2013).

Através da figura a seguir (Figura 2.9) os autores Burger-Calderon e Webster-Cyriaque (2015) descrevem de uma forma sucinta onde podemos encontrar os poliomavírus acometendo alguns órgãos no ser humano.

Figura 2.9 - Representação dos órgãos afetados pelos poliomavírus JCV, BKV e de células Merkel (Burger-Calderon; Webster-Cyriaque, 2015).



2.3 Fluídos Orais e Diagnósticos

Na tentativa de diagnóstico laboratorial ou clínico, o monitoramento de alguns pacientes tem sido o método menos invasivo, quando comparado às biópsias e punção venosa com resultados confiáveis. Novas abordagens se empregam em pacientes com doenças sistêmicas, como a utilização de fluídos orais (saliva, lavado bucal e o fluído gengival crevicular (FGC)) (Malamud, 2011). Pesquisadores defendem que o seu armazenamento e manuseio são mais seguros.

A saliva contém múltiplos biomarcadores, tornando-a útil em qualquer experimento, principalmente no campo molecular, auxiliando no diagnóstico de doenças orais e sistêmicas (Malamud, 2011). Malamud (2011) em seu estudo, demonstra que a maioria dos biomarcadores, presente no sangue e na urina, também podem ser detectados em uma amostra de saliva.

Recentemente, diagnóstico para detecção de anticorpos anti-HIV pelo fluído oral foi confirmado (Parisi et al., 2009; White et al., 2009).

Segundo Malamud, podem ser encontrados na saliva: hormônios, anticorpos, fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, ácidos nucleicos, proteínas e drogas. Na saliva é possível diagnosticar doenças orais por fungos, carcinoma epidermoide, doenças causadas por vírus (HPV, EBV, CMV, Herpes simples 1, Herpes Zoster) e doenças causadas por bactéria (gengivite, periodontite).

Priyanka et al., (2012) diz que a saliva é um “espelho do corpo”, pois é um indicador de saúde, não apenas da cavidade oral, mas de todo o corpo. A saliva tem componentes moleculares hormonais, imunológicos, toxicológicos e resíduos medicamentosos. Além disso, a saliva contém quantidades suficientes de biomarcadores de doenças, RNA e DNA, tornando a saliva um fluído de potencial valor e excelente alternativa no processo de diagnóstico de várias doenças, e a sua coleta é minimamente invasiva. A saliva é utilizada informalmente há mais de 2.000 anos. A viscosidade e odor eram utilizados como diagnóstico para algumas doenças, dentre elas a diabetes mellitus, a insuficiência renal e insuficiência hepática.

A saliva não estimulada é mais adequada e mais utilizada para diagnóstico, já que não há alteração do pH ou diluição da concentração das suas proteínas, causadas pelos métodos de estímulo (Priyanka et al., 2012). A saliva é mais fácil de se manusear, pois não coagula, apresenta um menor potencial para transmissão de doenças infecciosas, em casos de acidentes com perfurocortantes (Priyanka et al., 2012).

Nova modalidade de coleta de amostra de saliva - bochecho/lavado bucal - tem mostrado resultados tão específicos e sensíveis quanto os resultados obtidos por meio de amostras de sangue e urina, para a detecção de anticorpos anti-HIV, antívirus da hepatite e do sarampo, hormônios, glicemia e DNA, pelo método de ELISA ou PCR (Johnson et al., 2011; Giannobile et al., 2011; Malamud, 2011; Mitterhofer et al., 2012; Fatahzadeh et al., 2013).

Para a realização do bochecho/lavado bucal é necessária a utilização de um antisséptico bucal. Heath e colaboradores (2001) pesquisaram diferentes marcas comerciais de enxaguatório bucal/antisséptico bucal com relação à efetividade em exames diagnósticos e consideraram o Listerine[®] eficaz para a quantificação de DNA através do PCR em amostras de lavado bucal, amplificação, sequenciamento e armazenamento do material.

O fluido gengival crevicular (FGC) está presente no sulco gengival, é um biofluido intersticial ou um transudato inflamatório. No FGC são encontrados anticorpos séricos, principalmente a globulina G, citocinas, além de vários produtos inflamatórios, produzidos através do tecido periodontal inflamado ou da circulação sistêmica. Encontramos ainda no FGC, células do descamado epitelial, neutrófilos, linfócitos, monócitos, patógenos, eletrólitos e componentes orgânicos semelhantes ao plasma (potássio, cálcio, albumina, globulinas, inibidores de protease, lactato, ureia, e outras enzimas) (Johnson et al., 2011). Segundo Malamud (2011), o FGC tem um papel importante como protetor da cavidade oral, por remover, com eficiência, células prejudiciais, moléculas, patógenos e ainda ter uma função antibacteriana, capaz de neutralizar os patógenos. Pollock et al., 1984, demonstraram que o antígeno de superfície para hepatite B (anti-HBsAg) foi quantificado através do FGC em indivíduos com hepatite B. Klemenc et al., 2005, encontraram acentuada

prevalência de EBV e HHV-6 no FGC de indivíduos com periodontite, demonstrando uma relação entre herpes vírus e a periodontite agressiva. Johnson et al., 2011, afirmaram que a coleta do FGC requer treinamento do indivíduo que irá coletar a amostra, pois o volume coletado é pequeno e influenciará no resultado de diagnóstico. Até o presente momento, poucos trabalhos demonstraram a detecção dos poliomavírus humanos em amostras salivares (Jeffers et al., 2009; Robaina et al., 2013a; Robaina et al., 2013b; Burger-Calderon et al., 2014; Castro et al., 2017) e apenas um trabalho procurou a presença dos poliomavírus em FGC (Castro et al., 2017).

3 PROPOSIÇÃO

Detectar e quantificar poliomavírus humano BK, JC, TS e de células Merkel através da biologia molecular, identificando o DNA em fluídos orais (saliva, lavado bucal, fluído gengival crevicular) comparando com a detecção deste no soro e na urina de indivíduos HIV positivos e controles imunocompetentes.

Comparar a positividade e frequência destes poliomavírus em todos os locais de coleta.

Comparar a positividade dos poliomavírus nos dois grupos estudados, indivíduos HIV positivos e indivíduos normocompetentes.

Comparar a correlação da positividade dos poliomavírus em relação aos valores de linfócitos CD4+.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Casuística do experimento

Pacientes portadores de HIV (n=22) atendidos no Centro de Atendimento a Pacientes Especiais da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (CAPE/FOUSP) e voluntários saudáveis (n= 20) foram incluídos na pesquisa, após serem informados sobre a mesma; concordaram em participar e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo A)

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (CEP- FOUSP), número CAAAE 15042613.6.0000.0075, número do parecer 317.638; aprovado em julho de 2013 (Anexo B).

O termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A) foi aplicado a todos os indivíduos que aceitaram participar da pesquisa, antes do início das coletas dos materiais biológicos.

O projeto de pesquisa obteve o apoio financeiro do CNPq Edital Universal número 455173/2014-1.

a) Critério de inclusão para os indivíduos HIV positivos

Todos os pacientes maiores de 18 anos e portadores que aceitam participar da pesquisa e que estão com seus exames de sangue atualizados, os exames solicitados foram a carga viral para HIV e os valores/contagem/quantificação de linfócitos T CD4+, resultados inferiores de 4 meses.

b) Critério de exclusão para os indivíduos HIV positivos

Os pacientes que não concordaram em participar da pesquisa, menores de 18 anos ou aqueles cujos os exames de sangue estavam muito antigos ou desatualizados, superiores à 4 meses ou os que não conseguiram colher todos as

amostras determinadas para a pesquisa (soro, saliva, lavado bucal, fluído gengival crevicular e urina).

c) Critério de inclusão para indivíduo controle

Perfil referente ao sexo, idade e etnia semelhantes ao grupo de pacientes HIV positivos.

4.2 Coletas das amostras

4.2.1 Coleta das amostras de sangue periférico, e o soro:

Por meio da venopunção periférica, profissional habilitado (biomédica), foram coletados 5 ml de sangue periférico dos participantes, em tubos sem anticoagulante (Vacuette) e acondicionados sob refrigeração a 4°C.

Após meia hora da coleta, as amostras de sangue periférico dos tubos sem anticoagulante foram centrifugadas a 3.000 rotações por minuto (1.597 xg) por 15 minutos, a temperatura ambiente, usando centrífuga de bancada (Coleman, Centrifuge model 80-2, Santo André, Brasil). O soro livre de células foi removido e aliquotado em tubo cônico de plástico de 1,5 ml (Eppendorf), as alíquotas foram armazenadas em freezer -20° C.

4.2.2 Coleta das amostras de saliva:

Amostras de saliva não estimuladas foram coletadas de todos os participantes da pesquisa. Para isso, foram orientados a enxaguar a boca com água filtrada e a preencher um tubo cônico plástico de polipropileno de 50 ml (Falcon

– BD Bioscience, EUA) com 10 ml da saliva acumulada no assoalho bucal. O tubo plástico foi mantido em recipiente de isopor contendo gelo triturado. Em seguida, a saliva foi transferida para tubos cônicos plásticos de 1,5 ml (Eppendorf) e armazenados em freezer -20°C.

4.2.3 Coleta das amostras de lavado bucal:

Os pacientes foram orientados a realizarem um bochecho com 10 ml de Listerine® por 30 segundos e depositá-lo (o líquido bochechado) em um tubo cônico de plástico de polipropileno de 50 ml (Falcon – BD Bioscience, EUA). Em seguida, parte do lavado bucal foi transferido para tubos cônicos plástico de 1,5 ml (Eppendorf) e armazenados em freezer -20°C.

4.2.4 Coleta das amostras de fluído gengival crevicular:

Foi realizada a remoção da placa supragengival dos quatro (4) dentes selecionados para a coleta do fluído; cada dente pertencia a um quadrante bucal. A coleta da placa foi realizada com cureta manual e observou-se a ocorrência de sangramento; se houvesse sangramento este dente seria descartado e selecionado outro. Os dentes foram isolados com rolo de algodão e um sugador de saliva para evitar risco de contaminação salivar. Os dentes foram delicadamente secos com jato de ar por 10 segundos. E foi selecionado apenas um sítio em cada dentes.

Utilizou-se um cone de papel filtro, muito usado na secagem de canais radiculares na endodontia, introduzido no sítio selecionado no sulco gengival onde permaneceu por 30 segundos; realizaram-se duas coletas com duas unidades de cone de papel filtro, devido à quantidade reduzida de fluído para a realização da análise por PCR; entre as coletas foi respeitado o intervalo de 5 minutos. No momento da coleta, se houvesse a contaminação por sangue do sulco gengival, este

cone de papel foi descartado e eleito outro sítio ou, se necessário, outro dente. Num paciente que apresentava ausência de todos os dentes superiores, não, portanto, feita coletada nesta região. O mesmo caso ocorreu com outro paciente, por ausência de dente no quadrante 3.

Após cada coleta, o cone de papel filtro foi colocado em tubo de eppendorf contendo 1 ml de *Trizol*® (*TRizol Reagent*®) a 4°C e, ao final da coleta, foram imediatamente congelados em freezer a -20°C. O *Trizol*® é um reagente pronto para uso e tem a capacidade de isolar DNA, RNA e proteínas advindas de células e amostras teciduais de humanos, sendo muito utilizado em PCR real time (www.lifetechnologies.com)

4.2.5 Coleta das amostras de urina:

Coletou-se uma única amostra de urina de cada paciente e no mesmo dia das outras coletas. Os pacientes foram orientados a realizarem uma assepsia com gaze umedecida em agente antibacteriano na região e a desprezarem o primeiro jato da urina para não contaminar a amostra. Em seguida, foi transferida uma alíquota da urina para tubos cônicos plástico de 1,5 ml (Eppendorf) e armazenados em freezer -20°C.

4.2.6 Realização do PCR real time:

Em todas as amostras coletadas, como soro, saliva, lavado bucal, fluido gengival crevicular e urina, foram realizadas pesquisas de detecção e quantificação do poliomavírus humano dos subtipos BK, JC, TS e de células Merkel através do método de PCR em tempo real. Os procedimentos laboratoriais foram realizados no laboratório de virologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo (IMTSP-USP).

A extração do DNA foi feita com o *kit* de extração QIAamp DNA QIAGEN. O protocolo escolhido para a reação de PCR em tempo real foi descrito por Pal et al., 2006 e padronizado por Fink et al., 2006, que utiliza *primers* e sondas específicas para o gene que codifica o AG-T dos poliomavírus BK e JC, originando um fragmento de 80pb (Tabela 4.1).

As sondas para BK e JC, de ambas as reações foram marcadas com FAM (6-carboxyfluorescein) como *reporter* na porção terminal 5' e com TAMRA (6-carboxytetramethylrhodamine) como *quencher* na porção 3'.

A reação final foi preparada com 12,5 µl de “*TaqMan Universal PCR Master Mix (2X)*” (*Applied Biosystems*®), 0,5 µl de cada *primer* (10µM), 0,5 µl da sonda (5 µM) e 6 µl de água DEPC. Os parâmetros da reação foram de 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguidos de 45 ciclos (15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C), submetidos em equipamento ABI 7300 (*Applied Systems*®).

Tabela 4.1 - Oligonucleotídeos e sondas responsáveis pela amplificação dos fragmentos no sistema de PCR tempo real para JCV e BKV

	Sequência
Forward	5'-GAAACTGAAGACTCTGGACATGGA-3'
Reverse	5'-GGCTGAAGTATCTGAGACTTGGG-3'
Sonda JCV	AGGATCCCAACACTCTACCCACCTAAAAGA
Sonda BKV	CAAGCACTGAATCCCAATCACAATGCTC

O protocolo empregado apresenta alta sensibilidade analítica dos testes, com limite de detecção de 100 cópias/ml do vírus BK e 600 cópias/ml do vírus JC. Além disso, os testes também apresentam especificidade de 100% na identificação do DNA desses vírus.

A extração do DNA foi realizada com o *kit* de extração QIAamp DNA QIAGEN (quiagen, Hiden, Alemanha). O protocolo escolhido para a reação de PCR em tempo real foi descrito por Urbano et al. 2014, o fragmento que é amplificado do gene é o

antígeno T grande (AgT) que utiliza *primers* e sondas específicas para o poliomavírus TSV originando um fragmento de 83pb (Tabela 4.2).

Na sonda para TSV, as reações foram marcadas com FAM (6-carboxyfluorescein) como *repórter* na porção terminal 5' e com BHQ-1 (Black Hole Quencher®) como *quencher* na porção 3'.

A reação final foi preparada com 12,5 µl de “*TaqMan Universal PCR Master Mix (2X)*” (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA), 0,5 µl de cada *primer* (10µM), 0,5 µl da sonda (5 µM) e 6 µl de água DEPC. Os parâmetros da reação foram de 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, seguidos de 45 ciclos (15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C), submetidos em equipamento ABI 7300 (Applied Systems®). O protocolo empregado apresenta alta sensibilidade analítica dos testes, com limite de detecção de 500 cópias/ml do vírus TS. Além disso, os testes também apresentam especificidade de 100% na identificação do DNA desse vírus.

Tabela 4.2 - Oligonucleotídeos e sonda responsáveis pela amplificação dos fragmentos no sistema de PCR tempo real para TSV

	Sequência
Forward	5'-TGGTGGATTCATGGCAGAAGAG-3'
Reverse	5'-GCTGGTGGGAAAGCTTCAATC-3'
Sonda TSV	FAM TCTGGGTCCTGCATGGTGTCAA BHQ-1

Para a detecção do Merkel usou-se a metodologia de SYBR Green (Tabela 4.3). A solução final para realização do PCR foi preparada com 25 µl, sendo 20 µl do mix e 5 µl da amostra. A solução foi preparada a partir de 10x de solução tampão (50 mM de KCl com 10 mM solução de Tris) (Invitrogen), acrescido de 200µM de desoxirribonucleotídeo fosfatado (Invitrogen). Na placa foi colocado primeiro 0,5 µM acrescido de 1,5 mM cloreto de magnésio (MgCl₂) e 1 U de amostra de *Taq polymerase* (Invitrogen). O parâmetro utilizado para reação de amplificação do Merkel foi a região Antígeno T grande (LT). Os parâmetros da reação foram de 30 segundos a 94°C, 50 segundos a 60°C, seguidos de 45 ciclos (1 minuto a 75°C e 7

minutos a 72°C), submetidos em equipamento Applied 7500 real time (*Applied Systems®*); resultou num fragmento de 146pb para amostras positivas. O protocolo empregado apresenta alta sensibilidade analítica dos testes, com limite de detecção de 500 cópias/ml do vírus Merkel.

Tabela 4.3 - Oligonucleotídeos e sonda responsáveis pela amplificação dos fragmentos no sistema de PCR tempo real para células de Merkel

	Sequência
Forward	5'-CCACAGCCAGAGCTCTTCCT-3'
Reverse	5'-TGGTGGTCTCCTCTCTGCTACTG-3'

4.2.7 Análise Estatística

Os participantes da pesquisa foram identificados por um número em ordem de atendimento e separados por grupos (GE e GC). Todos os dados dos pacientes foram registrados em uma base de dados própria, feita através do Excel. A análise foi realizada através do programa SPSS 20.0. Testes de Qui-quadrado, Exato de Fisher, Teste de Levene, Mann Whitney e teste de t student. O nível de significância estabelecido foi de 0,05 ou 5%.

5 RESULTADOS

No total foram coletadas 299 amostras de 42 indivíduos, sendo 22 portadores de HIV e 20 pacientes controle. Todas as coletas dos participantes da pesquisa foram realizadas na Clínica do Centro de Atendimento a Pacientes Especiais da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (CAPE/FOUSP).

Todas as amostras pertencentes ao paciente foram colhidas no mesmo dia, e a mais próxima possível do exame da carga viral e dosagem dos linfócitos T CD4+ (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 – Informações coletadas durante a anamnese

Pac	Sexo	Idade	Valor do CD4+	Categoria do CD4+
1	MASC	47	396	2
2	FEM	49	940	3
3	FEM	42	928	3
4	FEM	52	725	3
5	FEM	54	876	3
6	MASC	37	1237	3
7	MASC	60	550	3
8	FEM	44	950	3
9	MASC	50	1000	3
10	FEM	43	418	2
11	MASC	56	600	3
12	MASC	53	219	2
13	FEM	45	1200	3
14	FEM	42	419	2
15	MASC	56	500	3
16	FEM	46	374	2

17	FEM	45	577	3
18	MASC	63	554	3
19	FEM	56	1347	3
20	MASC	37	906	3
21	MASC	56	318	2
22	FEM	55	316	2
Legenda: categoria do CD4+, 2 = 200 a 499 células/mm ³ ; 3 = acima de 500 células/mm ³				

O grupo de estudo foi formado por 22 sujeitos portadores de HIV, sendo 12 do sexo feminino e 10 masculino, com a média de idade de 49 anos (a máxima de 63 anos e a mínima de 37 anos). O grupo controle foi formado por 20 indivíduos imunocompetentes, 14 do sexo feminino e 6 masculino, a média de idade foi de 48 anos (máxima de 62 anos e a mínima de 22 anos). Os grupos foram pareados por idade, não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si ($p > 0.05$). Os dados estão representados nas tabelas a seguir, divididos por faixa etária e sexo (Tabelas 5.2 e 5.3).

Tabela 5.2 - Distribuição dos indivíduos do grupo de estudo (pacientes HIV positivo), por sexo e faixa etária

Faixa Etária	Número de pacientes	Homens	Mulheres
21 – 30	0	0	0
31 – 40	2	2	0
41 – 50	10	2	8
51 – 60	9	5	4
61 - 70	1	1	0

Tabela 5.3 - Distribuição dos indivíduos do grupo controle, por sexo e faixa etária

Faixa Etária	Número de pacientes	Homens	Mulheres
21 – 30	2	0	2
31 – 40	2	0	2
41 – 50	5	2	3
51 – 60	10	4	6
61 - 70	1	0	1

Dos 22 indivíduos do grupo de estudo, 14 (63,6%) indivíduos estavam excretando JCV, pelo ao menos em uma amostra coletada; em relação ao BKV 12 (54,5%) indivíduos o excretavam; 4 (18,2%) indivíduos excretavam Merkel e nenhum dos nossos pacientes excretaram TSV. Encontramos em nossos resultados 7 (31,8%) indivíduos do grupo de estudo excretando ao mesmo tempo JCV e BKV, 1 (4,5%) paciente excretando JCV e Merkel e 1 (4,5%) indivíduo excretando os três poliomavírus ao mesmo tempo: JCV, BKV e células de Merkel. E apenas 1 (4,5%) indivíduo deste grupo não excretava nenhum destes poliomavírus.

O perfil de excreção de JCV nos 22 pacientes no momento da coleta foi de ausência de positividade nas amostras de soro. No entanto, nas salivas, 1 paciente (4,5%) estava excretando JCV; no lavado, um paciente (4,5%) excretava JCV; no FGC, 2 pacientes (9,1%), e 12 (99,1%) estavam excretando pela urina (Tabela 5.4). No grupo controle, os resultados encontrados no momento da coleta, nenhum pacientes excretou JCV através do soro, saliva e lavado bucal. No fluido gengival crevicular, apenas 3 (25%) dos indivíduos estavam excretando o vírus JC, seis (33,3%) indivíduos excretavam pela urina (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 - Resultados das amostras por indivíduos do GE para poliomavírus JC

JCV						
GE	Soro	Saliva	Lavado	FGC	Urina	
1	-	-	-	-	+	
2	-	-	-	-	-	
3	-	-	-	-	+	
4	-	+	-	-	+	
5	-	-	-	-	-	
6	-	-	-	-	-	
7	-	-	-	+	+	
8	-	-	-	-	-	
9	-	-	-	-	+	
10	-	-	-	+	+	
11	-	-	-	-	+	
12	-	-	-	-	-	
13	-	-	-	-	-	
14	-	-	-	-	+	
15	-	-	-	-	-	
16	-	-	-	-	-	
17	-	-	-	-	+	
18	-	-	-	-	+	
19	-	-	+	-	-	
20	-	-	-	-	+	
21	-	-	-	-	+	
22	-	-	-	-	-	

Legenda: + = positivo, - = negativo

Na comparação das amostras do grupo de estudo e do grupo controle, a positividade do JCV nos locais de coletas está representada na tabela 5.5 (Apêndice A). A uma prevalência maior na excreção do JCV na urina, em ambos os grupos.

Tabela 5.5 - Número e porcentagem de indivíduos positivos para JCV em cada grupo nas diferentes amostras

Grupo (n total)	JCV				
	Soro	Saliva	Lavado	FGC	Urina
GE (22)	0 (0%)	1 (4,5%)	1 (4,5%)	2 (99,1%)	12 (99,1%)
GC (20)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (25%) *	6 (33,3%) **

Legenda: FGC fluido gengival crevicular; (*) total de 12 amostras FGC coletadas; (**) total de 18 amostras de urina coletadas

O vírus BK foi mais excretado em nosso grupo de pacientes de estudo, 12 estavam excretando pelo menos em um dos cinco locais. Pelo soro, o BKV foi excretado por 3 (13,6%); na saliva, a positividade do BKV se apresentou em 4 (18,2%) indivíduos. No lavado bucal, estava presente em 6 (27,3%) indivíduos. No fluido gengival crevicular, em 11 pacientes (50%) e 2 (9,1%) indivíduos excretavam pela urina (Tabela 5.6). Nos resultados do grupo controle, o BKV estava sendo excretado em 3 (15%) indivíduos pelo soro, 10 (50%) indivíduos pela saliva e 9 (45%) indivíduos pelo lavado bucal. No fluido gengival crevicular, 7 (58,3%) indivíduos e 5 (27,8%) estavam excretando BKV pela urina.

Tabela 5.6 - Resultados das amostras por indivíduos do GE para o poliomavírus BK

BKV					
GE	Soro	Saliva	Lavado	FGC	Urina
1	+	-	+	+	-
2	-	-	-	+	+
3	+	+	+	+	-
4	-	+	+	+	-
5	-	+	+	+	-
6	-	-	+	+	-
7	+	-	-	+	-
8	-	-	+	+	-
9	-	-	-	+	-
10	-	+	-	-	+
11	-	-	-	-	-
12	-	-	-	+	-
13	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-
21	-	-	-	+	-
22	-	-	-	-	-

Legenda: + = positivo, - = negativo

Comparando as amostras do grupo de estudo e grupo controle, a positividade do BKV nos locais de coletas está representada na tabela 5.7 (Apêndice B). A excreção do BKPyV pelo fluido gengival crevicular teve uma expressão significativa, em ambos os grupos. Observamos ainda, um número significativo para o lavado, em ambos os grupos, e uma excreção intensa no grupo controle na saliva.

Tabela 5.7 - Número e porcentagem de indivíduos positivos para BKV em cada grupo nas diferentes amostras

Grupo (n total)	BKV				
	Soro	Saliva	Lavado	FGC	Urina
GE (22)	3 (13,6%)	4 (18,2%)	6 (27,3%)	11 (50%)	2 (9,1%)
GC (20)	3 (15%)	10 (50%)	9 (45%)	7 (58,3%) *	5 (27,8%) **

Legenda: FGC fluido gengival crevicular; (*) total de 12 amostras FGC coletadas; (**) total de 18 amostras de urina coletadas

Para o poliomavírus de células Merkel, encontramos 1 (9,1%) indivíduo do grupo de estudo que excretava o vírus pela saliva (4,5%); 2 (9,1%) indivíduos, pelo FGC. E apenas 1 (4,5%) indivíduo, pela urina no momento da coleta (Tabela 5.8). Contudo, no grupo controle nenhum indivíduo excretou MCPyV nas amostras coletadas.

Tabela 5.8 - Resultados das amostras por indivíduos no GE para poliomavírus de células Merkel

MERKEL						
GE	Soro	Saliva	Lavado	FGC	Urina	
1	-	-	-	-	-	
2	-	-	-	-	-	
3	-	-	-	-	-	
4	-	-	-	-	+	
5	-	-	-	-	-	
6	-	-	-	-	-	
7	-	-	-	-	-	
8	-	-	-	-	-	
9	-	-	-	-	-	
10	-	-	-	-	-	
11	-	-	-	-	-	
12	-	-	-	-	-	
13	-	-	-	+	-	
14	-	-	-	-	-	
15	-	-	-	+	-	
16	-	+	-	-	-	
17	-	-	-	-	-	
18	-	-	-	-	-	
19	-	-	-	-	-	
20	-	-	-	-	-	
21	-	-	-	-	-	
22	-	-	-	-	-	

Legenda: + = positivo, - = negativo

Na comparação das amostras do grupo do estudo e do grupo controle, a positividade do poliomavírus de células Merkel nos locais de coletas está representada na tabela 5.9 (Apêndice C). Encontramos pouca excreção do MCPyV em nossos grupo, tendo uma maior prevalência no fluído gengival crevicular.

Tabela 5.9 - Número e porcentagem de indivíduos positivos para poliomavírus de células de Merkel em cada grupo nas diferentes amostras

Grupo (n total)	MERKEL				
	Soro	Saliva	Lavado	FGC	Urina
GE (22)	0 (0%)	1 (4,5%)	0 (0%)	2 (9,1%)	1 (4,5%)
GC (20)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%) *	0 (0%) **

Legenda: FGC fluído gengival crevicular; (*) total de 12 amostras FGC coletadas; (**) total de 18 amostras de urina coletadas

Todos nossos participantes coletados no grupo de estudo e no grupo controle não excretam TSV através dos locais de coleta de material biológico (soro, saliva, lavado, FGC e urina), no momento da coleta (Tabela 5.10).

Tabela 5.10 - Resultados das amostras por indivíduos do Ge para o poliomavírus TS

TSV						
GE	Soro	Saliva	Lavado	FGC	Urina	
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-
22	-	-	-	-	-	-

Legenda: + = positivo, - = negativo

Não houve positividade do poliomavírus de TSV nas amostras do grupo de estudo e do grupo controle, representada na tabela 5.11 (Apêndice D).

Tabela 5.11 - Número e porcentagem de indivíduos positivos para TSV em cada grupo nas diferentes amostras

Grupo (n total)	TSV				
	Soro	Saliva	Lavado	FGC	Urina
GE (22)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
GC (20)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%) *	0 (0%) **

Legenda: FGC fluido gengival crevicular; (*) total de 12 amostras FGC coletadas; (**) total de 18 amostras de urina coletadas

Encontramos resultados (ou prevalência) semelhantes entre os locais de coleta em relação à positividade de JCV e BKV. Porém, para JCV a frequência de positividade foi maior no FGC e urina, nos dois grupos (estudo e controle); enquanto para o BKV a distribuição foi mais homogênea, no grupo de estudo encontramos mais excreção nas amostras do FGC e para o grupo controle, uma maior excreção nas salivas.

Correlacionando as amostras de urina com as de saliva, lavado bucal e fluido gengival crevicular através dos valores encontrados de JCV, estão demonstradas nas tabelas a seguir (Tabela 5.12, 5.13 e 5.14).

Tabela 5.12 - Associação entre urina e saliva com relação a detecção do JCV no GE

		Saliva		p-valor (Exato de Fisher's)
		Ausência de JCV	Presença de JCV	
Urina	Ausência de JCV	10 (100%)	0 (0%)	0,54
	Presença de JCV	11 (92%)	1 (8,3%)	

Tabela 5.13 - Associação entre urina e lavado bucal com a relação a detecção do JCV no GE

		Lavado		p-valor (Exato de Fisher's)
		Ausência de JCV	Presença de JCV	
Urina	Ausência de JCV	9 (90%)	1 (10%)	0,45
	Presença de JCV	12 (100%)	1 (4,5%)	

Tabela 5.14 - Associação entre urina e FGC (fluido gengival crevicular) com relação a detecção do JCV no GE

		FGC		p-valor (Exato de Fisher's)
		Ausência de JCV	Presença de JCV	
Urina	Ausência de JCV	10 (100%)	0 (0%)	0,29
	Presença de JCV	10 (100%)	2 (16,7%)	

Correlacionando as amostras de urina com as de saliva, lavado bucal e fluido gengival crevicular através dos valores encontrados de BKV, estão demonstradas nas tabelas a seguir (Tabela 5.15, 5.16 e 5.17).

Tabela 5.15 - Associação entre urina e a saliva com relação a detecção do BKV no GE

		Saliva		p-valor (Exato de Fisher's)
		Ausência de BKV	Presença de BKV	
Urina	Ausência de BKV	17 (85%)	3 (15%)	0,34
	Presença de BKV	1 (50%)	1 (50%)	

Tabela 5.16 - Associação entre urina e lavado bucal com a relação a detecção do BKV no GE

		Lavado Bucal		p-valor (Exato de Fisher's)
		Ausência de BKV	Presença de BKV	
Urina	Ausência de BKV	14 (70%)	6 (30%)	0,52
	Presença de BKV	2 (100%)	0 (0%)	

Tabela 5.17 - Associação entre urina e FGC (fluido gengival crevicular) com relação a detecção do BKV no GE

		FGC		p-valor (Exato de Fisher's)
		Ausência de BKV	Presença de BKV	
Urina	Ausência de BKV	10 (50%)	10 (50%)	0,76
	Presença de BKV	1 (50%)	1 (50%)	

Associando as amostras de soro, amostra comumente coletada nos dias de hoje para diagnóstico de poliomavírus, com as de saliva, lavado bucal e fluido gengival crevicular através dos valores encontrados de BKV, estão demonstradas nas tabelas a seguir (Tabela 5.18, 5.19 e 5.20).

Tabela 5.18 - Associação entre soro e saliva com relação a detecção do BKV no GE

		Saliva		p-valor (Exato de Fisher's)
		Ausência de BKV	Presença de BKV	
Soro	Ausência de BKV	16 (88,9%)	3 (75%)	0,47
	Presença de BKV	2 (11,1%)	1 (25%)	

Tabela 5.19 - Associação entre soro e lavado bucal com relação a detecção do BKV no GE

		Lavado		p-valor (Exato de Fisher's)
		Ausência de BKV	Presença de BKV	
Soro	Ausência de BKV	15 (93,8%)	4 (66,7%)	0,17
	Presença de BKV	1 (6,3%)	2 (33,3%)	

Tabela 5.20 - Associação entre soro e FGC (fluido gengival crevicular) com relação a detecção do BKV no GE

		FGC		p-valor (Exato de Fisher's)
		Ausência de BKV	Presença de BKV	
Soro	Ausência de BKV	11 (100%)	8 (72,7%)	0,47
	Presença de BKV	0 (0%)	3 (13,6%)	

As análises relacionadas a idade e ao sexo, não apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$).

Realizamos análises para correlacionar a positividade dos poliomavírus nas amostras coletadas em relação aos valores de linfócitos CD4+, e não encontramos relação entre elas estatisticamente significantes (Tabela 5.21, 5.22 e 5.23).

Tabela 5.21 – Positividade do CD4+ em relação as amostras coletadas para o poliomavírus JC

		(N)	Média	Desvio padrão	p
Saliva	Sim	1	725,00	-	0,935
	Não	21	696,43	73,73	
Lavado	Sim	1	1347,00	-	0,41
	Não	21	666,81	66,23	
FGC	Sim	2	66,00	66,00	0,67
	Não	20	75,65	75,65	
Urina	Sim	12	615,92	65,48	0,24
	Não	10	795,90	130,86	

Tabela 5.22 – Positividade do CD4+ em relação as amostras coletadas para o poliomavírus BK

		(N)	Média	Desvio padrão	p
Soro	Sim	3	624,67	78,65	0,664
	Não	19	709,67	158,05	
Saliva	Sim	4	736,75	114,64	0,747
	Não	18	689,06	83,21	
Lavado	Sim	6	639,88	113,76	0,185
	Não	16	852,00	84,14	
FGC	Sim	11	739,91	103,92	0,561
	Não	11	655,55	98,01	
Urina	Sim	11	679,00	261,00	0,950
	Não	11	699,55	75,16	

Tabela 5.23 – Positividade do CD4+ em relação as amostras coletadas para o poliomavírus de células Merkel

		(N)	Média	Desvio padrão	p
Saliva	Sim	1	373,00	-	0,327
	Não	21	713,14	71,95	
FGC	Sim	2	850,00	350,00	0,716
	Não	20	682,50	72,33	
Urina	Sim	1	725,00	-	0,935
	Não	21	696,43	73,73	

6 DISCUSSÃO

Os poliomavírus BK, JC, célula de Merkel e TSV não são patogênicos para indivíduos normocompetentes, mas podem causar doenças clinicamente significativas em indivíduos imunocomprometidos. O BKV está presente em pacientes nefropáticos associados a transplantados de órgão, principalmente transplantado renal (Hirsch et al., 2005). O JCV está presente em pacientes com leucoencefalopatia multifocal progressiva em portadores de HIV (Berger; Houff, 2006).

O BKV infecta aproximadamente 90% da população geral (Hirsch e Steiger, 2003). Este poliomavírus geralmente está relacionado com doenças no trato urinário, como a cistite hemorrágica em transplantados de medula óssea e nefrite intersticial em transplantados renais. Houve um crescimento significativo na incidência de BKV e complicações após os anos 90; isso ocorreu devido ao aumento no número de transplantes renais realizados e a utilização de novas drogas imunossupressoras, principalmente Tacrolimus e Micofenolato Mofetil. As complicações decorrentes do BKV ocorreram por uma nefropatia associada a disfunção do órgão transplantado ou pela perda prematura do mesmo (Hirsch, 2002; Drachenberg et al.; 2007; Kumar, 2010).

O Poliomavírus de células Merkel é o único poliomavírus que está envolvido no desenvolvimento de câncer (Feng et al., 2008). Ele está associado a um câncer de pele raro, porém agressivo, chamado de carcinoma de células de Merkel, pacientes HIV positivos têm 13,4% risco maior de desenvolvimento deste tipo de câncer e por este motivo, a incidência do câncer triplicou nos últimos 20 anos (Vahabpour et al., 2017).

O poliomavírus TSV está relacionado a lesões cutâneas em pacientes imunocomprometidos, causando espículas na pele chamadas de Tricodisplasia espinhosa. Este vírus não faz parte da microbiota normal da pele (Kazem et al., 2013). A lesão é caracterizada por eritema com desenvolvimento de papilas foliculares espinhosas distribuídas pelo face, orelhas, podendo aparecer raramente nas extremidades, tronco e couro cabeludo (Kazem et al., 2013, Kassir et al., 2017). Podem levar a alopecia de sobrancelhas. Com a progressão da doença as

sobrancelhas, orelhas e o nariz podem se desconfigurar e causar alteração da aparência facial do paciente (Kazem et al., 2013).

As amostras estudadas para as excreções dos vírus apresentaram-se maior positividade no grupo de estudo, mas não foram estatisticamente significante. A hipótese inicial é que encontraríamos os poliomavírus nos fluídos orais com uma maior frequência. Em nosso estudo o BKV foi detectado mais no fluído gengival crevicular (FGC) e lavado bucal. O poliomavírus de célula Merkel também teve uma maior frequência no FGC, enquanto as amostras mais positivas para JCV foram na urina.

Encontramos excreção do poliomavírus pela urina. Quatorze pacientes excretavam poliomavírus, 12 o JCV; 2, o BKV. Behzad-Behbahani et al. (2004) pesquisaram e encontraram em seu grupo portador de HIV a excreção de 21% de JCV na urina e de BKV, 24%. Na população utilizada por Nali et al. (2012) encontraram 56% de positividade para JCV e BKV, sendo 14,7% e 18,7% respectivamente. No estudo de Urbano et al. (2016), no grupo estudado, 62% estavam excretando poliomavírus, sendo 22,5% de BKV e 26,7% de JCV. Para o nosso grupo de estudo encontramos a excreção do JCV de 54,5% e apenas de 9,1% de BKV, tendo assim uma similaridade com os estudos de Nali e Urbano. Urbano et al. (2016) realizou uma dosagem de JCPyV e BKPyV em urinas; estas urinas forma coletadas mensalmente durante 6 meses, e encontraram indivíduos que em um mês estavam excretando e em outro mês não estavam excretando. Assim, a sua positividade aumentou para 53,5%. Reafirmamos que os resultados às vezes não se assemelham, pois dependem do momento da coleta, dependem do indivíduo estar ou não replicando o vírus e, conseqüentemente, estar excretando os poliomavírus.

Matos et al. (2010) dosaram JCV na urina (234 amostras) e no soro (78 amostras), e concluíram que na urina há mais prevalência que no soro; não encontraram diferenças significativas em relação a sexo, idade, CD4+ entre os grupos estudados, que foram pacientes saudáveis e pacientes HIV positivos. Em nosso estudo encontramos uma maior frequência de excreção de JCV na urina. No grupo de estudo, 12 urinas positivas para JCV (54,5%) e, no soro nenhuma amostra positiva. No grupo controle, 6 urinas positivas (33,3%) e nenhuma positividade no soro. Não encontramos diferenças significantes em relação a idade, sexo e CD4+.

No estudo de Wierland et al. (2014), coletaram *swabs* de pele (região da testa) em 449 pacientes, sendo 210 HIV positivos e 239 pacientes controle, ambos os grupos formados por homens (idade média HIV 43 anos e GC 48 anos). TSPyV não parece ser de microbiota normal na pele dos humanos. A reexposição e a reativação do TSV não ocorrem com frequência, a pele não é o principal local de reativação e persistência do vírus. Acreditam também que o grupo estudado tem falhas, por ter colhido apenas uma amostra (*swab*) e um só local foi investigado. E concluíram que o TSPyV está mais presente na pele dos pacientes homens portadores de HIV, comparado com o grupo controle.

Em nossos resultados não encontramos positividade de TSV para ambos os grupos analisados. E os resultados não coincidem com os relatos da literatura. Alguns trabalhos encontraram 5% de positividade TSV, em pacientes assintomáticos, independente do estado imunológico (van der Meijden et al., 2010; Scuda et al., 2011; Kazem et al., 2013). Os locais de coleta mais comumente utilizados são esfregaço de pele, biópsia cutânea, sobrancelhas arrancadas, soro e urina (Kazem et al., 2012).

Não encontramos estudos de poliomavírus de células Merkel na literatura utilizando coleta além de esfregaço ou *swabs* de pele, os nossos resultados foram bem inferiores do que imaginávamos, esperávamos uma maior positividade nos resultados, entretanto, a metodologia empregada foi diferente dos trabalhos disponíveis na literatura. Encontramos na literatura algumas considerações onde o Merkel pode ser detectado ou encontrado na pele de 30 à 60% dos indivíduos saudáveis ou em pacientes imunocomprometidos, independentemente do estado imune destes pacientes (Schowalter et al., 2010; Ganeski et al., 2009; Foulongne et al., 2010).

Soroprevalência de poliomavírus em seres humanos indicam que as infecções por poliomavírus humano (HPyV) da população geral são altamente prevalentes e comuns na idade precoce. Em adultos saudáveis e imunocompetentes, foram relatados a soroprevalência de 80-100% BKPyV, 40-70% JCPyV, 55-90% para KIPyV, 70-100% para WUPyV, 40-80% MCPyV, 60% para HPyV6, 35% HPyV7, 35-50% para HpyV9 (Kazem et al., 2013).

Na detecção do anticorpo VP1 contra TSPyV, dois estudos utilizaram a método de sorologia múltipla através da proteína de fusão Glutamina-S-transferase (GST) e um estudo a detecção do anticorpo VP1 e VLP pelo método Elisa. Nos três

estudos encontraram a prevalência de 70% de positividade. Em relação a idade encontraram uma positividade de VP1 TSPyV 41% em crianças de 0-9 anos e 75% em adultos acima de 30 anos (Kazem et al., 2013). Kazem acredita que a infecção pelo TSPyV é comum em idade mais jovem.

Trabalhos como de Feng et al., 2008 investigaram a existência do vírus em 10 amostras de carcinoma de células Merkel; em 8 havia o DNA do vírus (MCPyV). Kuwamoto et al. (2011) analisaram 59 amostras de tecidos de diversas partes do corpo; apenas 5 amostras (8%) deram resultados positivos. Bhatia et al. (2010) através da imuno-histoquímica analisaram 25 amostras de pele normal e que não possuía carcinoma de células Merkel: 4 amostras positivas (16%). Quando estudada em pacientes com carcinoma de células Merkel este número aumenta.

Poucos estudos existem na literatura em relação à excreção dos poliomavírus de células Merkel e TSV, dificultando a comparação com os nossos resultados. O nosso estudo foi realizado através da biologia molecular, DNA alvo de um gene que seja íntegro, que pode sofrer menos mutações, alvo AgT. O nosso perfil é de excreção, e por isso, não podemos comparar com sorologia que estuda o VP1, pois são coisas diferentes.

Nali et al., 2012 realizaram uma pesquisa para avaliar a excreção do BKV e JCV na urina, em pacientes HIV positivos com ausência de sintomas neurológicos, 75 paciente entre 24 e 69 anos de idade. Destes 75 pacientes, 49 eram homens e 26 mulheres. A prevalência de virúria foi de 89,3%, detectados 18,7% de BKV e 14,7% para JCV, e 56,0% excretando simultaneamente os dois subtipos. Uma prevalência maior em homens, mas não foi estatisticamente significativa; o mesmo ocorreu em relação à idade dos pacientes.

Com base nestes estudos segundo Malumud (2011), a capacidade de avaliar com precisão os biomarcadores em amostras obtidas a partir da cavidade oral, depende da natureza bioquímica do marcador, da fonte, e do tipo de amostra e de que forma este marcador estaria na cavidade oral. O perfil genômico é método eficaz, podendo prever a suscetibilidade de uma doença (Malamud, 2011).

Os testes com FGC são cada vez mais utilizados no diagnóstico de várias doenças orais e sistêmicas, como anticorpos para o HIV, ácido nucleico, vírus do herpes, sarcoma de Kaposi e herpesvírus humano (Johnson et al., 2011).

Utilizar a saliva para a detecção e quantificação do BKV e JCV é eficiente, uma vez que pode indicar que as glândulas salivares são um dos locais de latência

desse vírus, concordando com as observações dos estudo de Jeffers et al., 2009. A coleta de saliva é um procedimento simples e não invasivo, por isso deve ser considerada importante ferramenta no diagnóstico e monitoramento do BKV nos indivíduos imunossuprimidos. A presença do BKV em altas concentrações na saliva, também sugere um alto potencial de transmissão por essa via. Jeffers et al., 2009, avaliaram saliva de pacientes HIV positivos imunossuprimidos e pacientes saudáveis, e concluíram que os níveis de DNA de BKV na saliva eram, significativamente maiores em pacientes infectado pelo HIV. E também demonstraram a capacidade do BKV se replicar na glândula salivar e sugeriram que as glândulas salivares servem como reservatório para o BKV.

Outro estudo significativo para a nossa pesquisa foi o de Robaina et al., 2013a, que pesquisam em crianças HIV positivas e classificou em 3 grupos: CD4+ maior que 500 cel/m³ (n 38), CD4+ entre 200-499 cel/m³ (n 13), e CD4+ menor que 200 cel/m³ (n 9). Encontraram um aumento do HPyV nas crianças com imunossupressão severa. Em relação ao BKPyV, JCPyV ou WUPyV as cargas foram semelhantes entre os grupos. E sugerem em seu estudo que a saliva pode ser uma via de transmissão do HPV e que a cavidade oral pode ser um local de replicação e persistência do vírus. Comparando com nosso estudo, o CD4+ não influenciou na excreção dos poliomavírus, os nossos participantes tinham uma média de CD4+ de 697 cel/m³; os consideramos pacientes normocompetentes, portanto não foi significativa para nossos resultados homogêneos.

Machado et al., 2011, investigaram a excreção urinária de BKV e JCV entre crianças e adolescente HIV positivos e pacientes saudáveis e demonstraram um virúria BKV significativamente maior em pacientes infectados pelo HIV. Nenhuma diferença foi observada para excreção de JCV, no entanto, nenhuma associação foi encontrada entre os valores de CD4+ e excreção do vírus. Os resultados encontrados em nosso estudo foi divergente; no nosso grupo, formado por adultos (média de 49,5 anos), e o que encontramos foi uma maior excreção de JCV em 12 (54,5%) indivíduos e para BKV apenas 2 (9,1%) indivíduos estavam excretando pela urina. Entretanto, em nosso estudo, quando se comparam com os valores de CD4+, também não encontramos associação com a excreção dos poliomavírus aqui estudados. Podemos ainda comparar com os resultados do estudo de Behzad-Behbahani et al. 2004, em que não encontraram uma correlação de excreção de

JCV na urina com o número de CD4+, mas para BKV parece influenciar, mas não foi estatisticamente significativa. É provável que as doenças vinculadas ao BKV e JCV estejam associadas a uma deficiência imune específica, como a depleção de células T CD4+, que acontece em pacientes HIV positivos com LEMP e em pacientes transplantados renais (em decorrência dos imunossuppressores utilizados) (Jiang et al., 2009).

Poucos trabalhos utilizaram a saliva, e pouquíssimos compararam as amostras de saliva com amostras de outros fluídos (como sangue e urina). A comparação entre fluídos na literatura restringe-se mais em comparar amostra de sangue e urina. Em nosso estudo, utilizamos amostras de soro, saliva, lavado bucal, fluido gengival crevicular (FGC) e urina, para a identificação dos vírus. A saliva e lavado bucal podem parecer amostras similares, mas estudos anteriores demonstraram uma eficiência maior na detecção de papiloma vírus humano em lavado, a positividade foi de 87% no lavado ao ser comparado em outros estudos, em que os resultados positivos foram de 14 à 52% com outros materiais biológico, como por exemplo o *swab* oral ou esfregaço (Fatahzadeh et al., 2013). Essa eficiência estaria vinculada ao fato de que o lavado seria capaz de coletar células esfoliadas de toda a cavidade oral, aumentando a quantidade de células epiteliais presentes na amostra (Fatahzadeh et al., 2013). Outra vantagem da técnica seria a presença de álcool na formulação do enxaguatório, que teria a capacidade de fixar melhor as células descamadas do epitélio.

Robaina et al., 2013b, analisaram 291 amostras de salivas pacientes de saudáveis, voluntários; 71 amostras (24,3%) foram positivas pelo menos um dos vírus HPyV testados, ou seja, 12,7% (37/291) foram positivos para WUV, 7,2% (21/291) positivo para BKV, 2,4% (7/291) positivo para KIV e 0,3% (1/291) positivo para JCV. Se for observar o grupo por idade encontram BKV positivo em 3 pacientes, idade entre 15 e 19 anos (n 50, 6%), positivo em 10 pacientes entre 20 e 29 anos (n 149, 6,7%), 3 pacientes positivos entre as idades de 30-39 anos (n 35, 8,6%), 3 pacientes positivos entre 40 e 49 anos (n 30, 10%), e acima de 50 anos, 2 pacientes positivos para BKV (n 27, 7,4%). Para a detecção de JCV, t somente 1 amostra positiva, entre as idades de 20 e 29 anos (n 149, 0,7%); nos demais grupos as amostras foram negativas para JCV. Logo, os poliomavírus podem ser encontrados positivos em pacientes saudáveis. Estes autores reafirmam que o JCV aumenta a soroprevalência com o aumento da idade, com picos em indivíduos com

70 anos, e a soroprevalência de BKV é maior em indivíduos com idade menor de 10 anos e diminuem gradativamente após a quarta década de vida e para Merkel vírus a soroprevalência é durante a quinta década de vida. Como nosso grupo foi composto apenas por indivíduos adultos acima de 37 anos (média de 49,5 anos), encontramos uma excreção de BKV entre as idades de 37 a 60 anos. Portanto para excreção de JCV foi um pouco divergente dos resultados de Robaina et al., (2013b), onde no nosso caso de positividade na saliva foi em um indivíduo acima de 50 anos. Todavia, não havendo estudos para comparação mas para a fim de relato, os indivíduos que excretaram o poliomavírus de células Merkel tinham entre 45 e 56 anos.

Um trabalho pioneiro da literatura, primeiro estudo a detectar e quantificar BKV e JCV no fluido gengival crevicular (FGC) foi por Castro et al. 2017, onde estudaram 46 indivíduos divididos em 3 grupos: grupo 1 com 14 pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise, grupo 2 composto de pacientes com transplante renais e o grupo 3 com 20 pacientes saudáveis. Eles pesquisaram em vários locais de coleta, no fluido gengival crevicular, saliva, lavado bucal, sangue e urina. Concluíram que os fluídos orais são igualmente eficientes para detectar BKV e JCV em comparação com a urina e o sangue. Ainda, os fluídos podem ser substituídos pela urina para realizar os diagnósticos de BKV e JCV. Alta concentração de BKV e JCV na saliva sugere uma via de transmissão. (Castro et al., 2017).

Figueiredo et al. (2017), em segundo estudo, também pesquisaram o BKV e o JCV em fluídos orais (saliva e lavado bucal), além de soro e urina em pacientes em pré-transplantes de fígado. Analisaram em dois grupos, grupo 1 (de estudo), formado por pacientes pré-transplante e grupo 2 (de controle), composto por pacientes normorreativos. Os resultados encontrados no grupo 1 foram de 25% positivos para BKPyV e 11,9% positivos para JCPyV. No grupo controle foram detectados valores de positividade de 34,6% para BKPyV e 7,69% para JCPyV; em ambos os grupos não houve diferença estatisticamente significativa. Portanto, os pacientes que estão na fila de espera de um transplante de fígado não apresentaram maior prevalência de BKPyV e JCPyV em comparação com o grupo controle.

Gallottini et al. (2017) realizaram um estudo para detectar e quantificar JCV e BKV em fluídos orais em 4 grupos diferentes: grupo 1, composto por indivíduos com

insuficiência renal crônica, grupo 2, indivíduos receptores de transplante renal, grupo 3, indivíduos portadores de HIV e o grupo 4, indivíduos saudáveis. Total de amostras analisadas foram 483, compostas por FGC, saliva, lavado bucal, soro e urina. Os resultados obtidos, no grupo 1, 100% dos indivíduos foram positivos pelo menos em uma das amostras, e 14% foram positivos para JCV. No grupo 2, 91,7%, positivas para BKV e 51%, para JCV. No grupo 3, 55% foram positivos para BKV e 59%, positivos para JCV. No grupo 4, encontraram 80% de positividade para BKV e 45% para JCV. E ainda concluíram que os fluídos não são substituto para os exames de sangue.

Os fluídos orais estão se tornando um excelente alternativa para diagnóstico de várias doenças, além de ser uma coleta não invasiva, fácil manipulação, fácil armazenagem, contem múltiplos bio marcadores, sendo viável também no campo biomolecular. E para nós cirurgiões dentistas sendo possível aplicar em nossa rotina da clínica.

7 CONCLUSÕES

Nossos resultados permitiram nos concluir que:

- 1) A excreção dos poliomavirus foi semelhante nos dois grupos estudados, pessoas HIV positivas e controle, nos diversos tipos de amostras analisadas;
- 2) Os fluídos orais (saliva, lavado bucal e fluído gengival crevicular) se mostraram eficientes na detecção do DNA dos poliomavirus humanos BK e de células Merkel;
- 3) Os fluídos orais apresentaram maior positividade, ou seja, maior frequência de BKV e de células Merkel comparando-se com soro e urina. Contudo, para JCV, as amostras de urina foram mais eficientes;
- 4) A positividade das amostras não teve relação com o nível de linfócitos T CD4+ nos indivíduos do grupo de estudo;
- 5) Não houve correspondência ou associação na presença e na quantificação dos poliomavirus humanos JC, BK, TSV e de células Merkel, detectados nas diferentes amostras.

REFERÊNCIAS¹

Agostini HT, Ryschkewitsch CF, Stoner GL. Genotype Profile of Human Polyomavirus JC Excreted in Urine of Immunocompetent Individuals. *J Clin Microbiol.* 1996 Jan;34(1):159-64.

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 USA.* 1997 Dec 23;94(26):14542-6.

Agostini HT, Shishido-Hara Y, Baumhefner RW, Singer EJ, Ryschkewitsch CF, Stoner GL. JC virus type 2: definition of subtypes based on DNA sequence analysis of ten complete genomes. *J Gen Virol.* 1998 May;79(Pt5):1143-51.

Agostini HT, Ryschkewitsch CF, Stoner GL. JC virus type 1 has multiple subtypes: three new complete genomes. *J Gen Virol.* 1998 Apr;79 (Pt4):801-5.

Agostini HT, Deckhut A, Jobes DV, Girones R, Schlunck G, Prost MG, Frias C, Pérez-Trallero E, Ryschkewitsch CF, Stoner GL. Genotypes of JC virus in East, Central and Southwest Europe. *J Gen Virol.* 2001 May;82 (Pt 5):1221-331.

Ahsan N, Shah KV. Polyomaviruses and human diseases. *Adv Exp Med Biol.* 2006;577:1-18.

Allander T, Andreasson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, Persson MA, et al. Identification of a third human polyomavirus. *J Virol.* 2007 Apr;81(8):4130-6.

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 Jun;27(6):1174-9.

¹ De acordo com estilo Vancouver

Bhatia K, Goedert JJ, Madali R, Preiss L, Ayers LW. Immunological detection of viral large T antigen identifies a subset of Merkel cell carcinoma tumors with higher viral abundance and better clinical outcome. *Int J Cancer*. 2010 Sep;127(6):1493-6. doi: 10.1002/ijc.25136.

Barouch DH, Harrison SC. Interactions among the major and minor coat proteins of polyomavirus. *J Virol*. 1994 Jun;68(6):3982-9.

Becker JC, Houben R, Ugurel S, Trefzer U, Pföhler C, Schrama D. MC polyomavirus is frequently present in Merkel Cell Carcinoma of European patients. *J Invest Dermatol*. 2009 Jan;129(1):248-50. doi:10.1038/jid.2008.198.

Berger JR, Houff S. Progressive multifocal leukoencephalopathy: lessons from AIDS and natalizumab. *Neurol Res*. 2006 Apr;28(3):299-305.

Berger JR, Concha M. Progressive multifocal leukoencephalopathy: the evolution of a disease once considered rare. *J Neurovirol*. 1995 Mar;1(1):5–18.

Behzad-Behbahani A, Klapper PE, Vallely PJ, Cleator GM, Khoo SH. Detection of BK virus DNA in urine sample from immunocompromised (HIV-infected) and immunocompetent (HIV-non-infected) patients using polymerase chain reaction and microplate hybridisation. *J Clin Virol*. 2004 Apr;29(4):224-9.

Bofill-Mas S, Pina S, Girones R. Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Appl Environ Microbiol*. 2000 Jan;66(1):238-45.

Bofill-Mas S, Formiga-Cruz M, Clemente-Casares P, Calafell F, Girones R. Potential transmission of human polyomaviruses through the gastrointestinal tract after exposure to virions or viral DNA. *J Virol*. 2001 Nov;75(21):10290-9.

Brasil, Ministério da Saúde – Fundação Oswaldo Cruz. O vírus da Aids, 20 anos depois. A Epidemia da AIDS através do tempo. 2017a [acessado 31 ago. 2017]. Disponível em: <http://www.ioc.fiocruz.br/aids20anos/linhadotempo.html>

Brasil, Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos – Site do Ministério da saúde, Secretaria de vigilância em saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais 2017b [acessado 31 ago. 2017]. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2013/protocolo-clinico-e-diretrizes-terapeuticas-para-manejo-da-infeccao-pelo-hiv-em-adultos> acessado 31 de agosto de 2017.

Brasil, 2017c – Boletim Epidemiológico HIV/Aids 2017 - Site do Ministério da saúde, Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e Hepatites Virais. 2017c [acessado 31 ago. 2017]. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2017/boletim-epidemiologico-hivaid-2017>. Acessado em 31 de agosto de 2017.

Brooks BR, Walker DL. Progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurol Clin.* 1984 May;2(2):299–313.

Burger-Calderon R, Madden V, Hallett RA, Gingerich AD, Nickeleit V, Webster-Cyriaque J. Replication of oral BK viruses in human salivary gland cells. *J Virol.* 2014 Jan;88(1):559-73. doi: 10.1128/JVI.02777-13.

Burger-Calderon R, Webster-Cyriaque J. Human BK polyomavirus – the potential for head and neck malignancy and disease. *Cancers (Basel).* 2015 Sep;7(3):1244-70. doi: 10.3390/cancers7030835.

Caldarelli-Stefano R, Vago L, Omodeo-Zorini E, Mediatì M, Losciale L, Nebuloni M, Costanzi G, Ferrante P. Detection and typing of JC virus in autopsy brains and extraneural organs of AIDS patients and non-immunocompromised individuals. *J Neurovirol.* 1999 Apr;5(2):125-33.

Castro T, Fink MC, Figueiredo M, Braz-Silva PH, Pannuti CM, Ortega KL, Gallottini M. Polyomavirus BK and JC in individuals with chronic kidney failure, kidney transplantation, and healthy controls. *J Clin Virol.* 2017 Apr;89:5-9. doi: 10.1016/j.jcv.2017.02.003.

Chang D, Haynes JI 2nd, Brady JN, Consigli RA. Identification of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP2. *Virology* 1992 Dec;191(2):978-83.

Chang D, Tsai RT, Wang M, Ou WC. Different genotypes of human polyomaviruses found in patients with autoimmune diseases in Taiwan. *J Med Virol.* 1996a Feb;48(2):204-9.

Chang D, Wang M, Ou WC, Lee MS, Ho HN, Tsai RT. Genotypes of human polyomaviruses in urine samples of pregnant women in Taiwan. *J Med Virol.* 1996b Jan;48(1):95-101.

Chesters PM, Heritage J, McCance DJ. Persistence of DNA sequences of BK virus and JC virus in normal human tissues and in diseased tissues. *J Infect Dis.* 1983 Apr;147(4):676-84.

Cole CM, Conzen SM. Polyomaviridae; the viruses and their replication. In *Field Virology Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkens 4th Edition .2001:.* p 2141-7.

Coleman DV, Wolfendale MR, Daniel RA, Dhanjal NK, Gardner SD, Gibson PE, Field AM. A prospective study of human polyomavirus infection in pregnancy. *J Infect Dis.* 1980 Jun;142(1):1-8.

Cunico W, Gomes CRB, Vellasco Junior, W T. HIV highlights in drug research. *Quím Nova* 2008;31(8) São Paulo
http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422008000800035
<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-404220080000200035>

Delbue S, Ferrareso M, Ghio L, Carloni C, Carluccio S, Belingheri M, Edefonti A, Ferrante P. A review on JC virus infection in kidney transplant recipients. *Clin Dev Immunol.* 2013;2013:926391. doi: 10.1155/2013/926391.

Dörries K, Vogel E, Günther S, Czub S. Infection of human polyomaviruses JC and BK in peripheral blood leukocytes from immunocompetent individuals. *Virology.* 1994 Jan;198(1):59-70.

Dörries K. Latent and Persistent Polyomavirus Infection. In: Khalili K, Stoner GL, editors. *Human Polyomaviruses: Molecular and Clinical Perspectives.* ; New York: Wiley-Liss; 2001. p. 197–235.

Dörries K, Sbiera S, Drews K, Arendt G, Eggers C, Dörries R. Association of human polyomavirus JC with peripheral blood of immunodeficient and healthy individuals. *J Neurovirol.* 2003;9 suppl 1:81–7.

Doerries K. Human polyomavirus JC and BK persistent infection. *Adv Exp Med Biol.* 2006;577:102–16.

Drachenberg CB, Hirsch HH, Papadimitriou JC, Goset 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 Aug 15;84(3):323-30.

Eash S, Manley K, Gasparovic M, Querbes W, Atwood WJ. The human polyomaviruses. *Cell Mol Life Sci*. 2006 May;63(7-8):865-76. doi: 10.1007/s00018-005-5454-z.

Elsner C, Dörries K. Evidence of human polyomavirus BK and JC infection in normal brain tissue. *Virology*. 1992 Nov;191(1):72–80.

Fatahzadeh M, Schlecht NF, Chen Z, Bottalico D, McKinney S, Ostoloza J, et al. Oral human papillomavirus detection in older adults who have human immunodeficiency virus infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013 Apr;115(4):505-14. doi: 10.1016/j.oooo.2012.11.004.

Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS. Clonal Integration of a polyomavirus in human Merkel Cell carcinoma. *Science*. 2008 Feb;319(5866):1096-100. doi: 10.1126/science.1152586.

Feng H, Kwun HJ, Liu X, Gjoerup O, Stolz DB, Chang Y, et al. Cellular and viral factors regulating Merkel Cell polyomavirus replication. *PLoS One*. 2011;(6(7));e22468. doi:10.1371/journal.pone.0022468.

Ferenczy MW, Marshall LJ, Nelson CD, Atwood WJ, Nath A, Khalili, Major EO. Molecular biology, epidemiology, and pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating. *Clin Microbiol Rev*. 2012 Jul;25(3):471-506. doi: 10.1128/CMR.05031-11.

Figueiredo MA, Domingues Fink MC, Castro T, Braz-Silva PH, Steffens JC, Eduardo FP, Gallottini M, Ortega KL. Detection of human polyomaviruses JC and BK in liver pretransplant patients. *Oral Dis*. 2017 Nov;23(8):1127-1133. doi: 10.1111/odi.12707.

Fink MC, Penalva de Oliveira AC, Milagres FA, Vidal JE, Picerno-Pouza AF, Duarte Neto A, Pannuti CS. JC virus DNA in cerebrospinal fluid sample from Brazilian AIDS patients with focal brain lesions without mass effects. *J Infect*. 2006 Jan;52(1):30-6.

Fioriti D, Videtta M, Mischitelli M, Degener AM, Russo G, Giordano A, Pietropaolo V. The human polyomavirus BK: Potential role in cancer. *J Cell Physiol*. 2005 Aug;204(2):402-6.

Flaegstad T, Andresen PA, Johnsen JI, Asomani SK, Jorgensen GE, Vignarajan S, Kjuul A, Kogner P, Traavik T. A possible contributory role of BK virus infection in neuroblastoma development. *Cancer Res*. 1999 Mar 1;59(5):1160-3.

Foulongne V, Kluger N, Dereure O, Mercier G, Moles JP, Guillot B, Segondy M. Merkel cell polyomavirus in cutaneous swabs. *Emerg Infect Dis*. 2010 Apr;16(4):685-7. doi: 10.32101/eid1604.091278.

Frisque RJ. Nucleotide sequence of the region encompassing the JC virus origin of DNA replication. *J Virol*. 1983 Apr;46(1):170-76.

Frisque RJ, Bream GL, Cannella MT. Human poliomyelovirus JC virus genome. *J Virol*. 1984 Aug; 51(2):458-69.

Funk GA, Steiger J, Hirsch HH. Rapid dynamics of polyomavirus type BK in renal transplant recipients. *J Infect Dis*. 2006 Jan;193(1):80-7.

Gallottini M, Castro T, Mesquita F, Figueiredo M, Fink M, Braz-Silva P. Human polyomavirus BK and JC in oral fluids of immunocompromised patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2017 Sep;124(3):e218.

Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B. New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet*. 1971 Jun 19; 1(7712):1253- 1257.

Garneski KM, Warcola AH, feng Q, Kiviat NB, Leonard JH, Nghiem P. Merkel cell polyomavirus more frequently presente in North American than Australian Merkel cell carcinoma tumors. *J Invest Dermatol*. 2009 Jan;129(1):246-8. doi: 10.1038/jid.2008.229.

Giannobile WV, McDevitt JT, Niedbala RS, Malamud D. Translational and Clinical Applications of Salivary Diagnostics. *Adv Dent Res*. 2011 Oct;23(4):375-80. doi: 10.1177/0022034511420434.

Ginevri F, Azzi A, Hirsch HH, Basso S, Fontana I, Cioni M, Bodaghi S, Salatti V, Rinieri A, Botti G, Perfumo F, Locatelli F, Commoli P. Prospective monitoring of polyomavirus BK replication and impact of pre-emptive intervention in pediatric kidney recipients. *Am J Transplant*. 2007 Dec;7(12):2727-35.

Goudsmit J, Baak ML, Sletterus KW, Van der Noordaa J. Human papovavirus isolated from urine of a child with acute tonsillitis. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1981 Nov 21;283(6303):1363-1364.

Goudsmit J, Wertheim-van Dillen P, van Strien A, van der Noordaa J. The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils. *J Med Virol.* 1982 ;10(2):91-9.

Grinnell BW, Padgett BL, Walker DL. Distribution of nonintegrated DNA from JC papovavirus in organs of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Infect Dis.* 1983 Apr;147(4):669-75.

Guo J, Kitamura T, Ebihara H, Sugimoto C, Kunitake T, Takehisa J, Na YQ, Al-Ahdal MN, Hallin A, Kawabe K, Taguchi F, Yogo Y. Geographical distribution of the human polyomavirus JC types A and B and isolation of a new type of Ghana. *J Gen Virol.* 1996 May;77(Pt 5):919- 27.

Guo J, Sugimoto C, Kitamura T, Ebihara H, Kato A, Guo Z, Lui J, Zheng SP, Wang YL, Na YQ, Suzuki M, Taguchi F, Yogo Y. Four geographically distinct genotypes of JC virus are prevalent in China and Mongolia: implications for the racial composition of modern China. *J Gen Virol.* 1998 Oct;79(Pt 10):2499-2505.

Hatwell JN, Sharp PM. Evolution of human polyomavirus JC. *J Gen Virol.* 2000 May;81(Pt 5):1191-200.

Heath EM, Morken NW, Campbell KA, Tkach D, Boyd EA, Strom DA. Use of buccal cells collected in mouthwash as a source of DNA for clinical testing. *Arch Pathol Lab Med.* 2001 Jan;125(1):127-33.

Heritage J, Chesters PM, McCance DJ. The persistence of papovavirus BK DNA sequences in normal human renal tissue. *J Med Virol.* 1981;8(2):143-50.

Hilton R, Tong CY. Antiviral therapy for polyomavirus-associated nephropathy after renal transplantation. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Nov;62(5):855-9. doi: 10.1093/jac/dkn305.

Hirsch HH. Polyomavirus BK nephropathy: a (re-)emerging complication in renal transplantation. *Am J Transplant.* 2002 Jan;2(1):25-30.

Hirsch HH, Steiger J. Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis.* 2003 Oct;3(10):611-63.

Hirsch HH, Brennam DC, Drachenberg CB, Ginevri F, Gordon J, Limaye AP, et al. Polyomavirus associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation.* 2005 May;79(5):1277-86.

Hymes LC, Warshaw BL. Polyomavirus (BK) in pediatric renal transplants: evolution of viremic patients with and without BK associated nephritis. *Pediatr Transplant*. 2006 Dec;10(8):920-2.

Ikegaya H, Motani H, Saukko P, Sato K, Akutsu T, Sakurada K. Bk virus genotype distribution offers information of tracing the geographical origins of unidentified cadaver. *Forensic Sci Int*. 2007 Nov 15;173(1):41-6.

Jeffers LK, Madden V, Webster-Cyriaque J. BK virus has tropism for human salivary gland cells in vitro: Implications for transmission. *Virology*. 2009
doi:10.1016/j.virol.2009.07.022

Jiang M, Abend J.R, Johnson S. F; Imperiale MJ. The role of Polyomaviruses in human disease. *Virology*. 2009 Feb20;384(2):266-73. doi:
10.1016/j.virol.2008.09.027

Jobes DV, Chima SC, Ryschkewitsch CF, Stoner GL. Phylogenetic analysis of 22 complete genomes of the human polyomavirus JC virus. *J Gen Virol*. 1998 Oct;79(Pt 10):2491-98.

Jobes DV, Friedlaender JS, Mgone CS, Agostini HT, Koki G, Yanagihara R, Ng TCN, Chima SC, Ryschkewitsch CF, Stoner GL. New JC virus (JCV) genotypes from Papua New Guinea and Micronesia (Type 8 and Type 2E) and evolutionary analysis of 32 complete JCV genomes. *Arch Virol*. 2001;146(11):2097- 113.

Johne R, Buck CB, Allander T, Atwood Wj, Garcea RL, Imperiale MJ, Major EO, Ramqvist T, Norkin LC. Taxonomical development in the Family Polyomaviridae. *Arch Virol*. 2011 Sep;156(9):1627-34. doi: 10.1007/s00705-001-1008-x.

Johnson NW, Malamud D, Reznik D, Speicher DJ, Phelan J. Mucosal Fluids and Biomarkers of Clinical Disease: Workshop 3B. *Adv Dent Res*. 2011 Apr;23(1):137-41. doi: 10.1177/002203451140078.

Kassar R, Chang J, Chan AW, Lilly LB, Al Habeeb A, Rotstein C. Leflunomide for the treatment of trichodysplasia spinulosa in a liver transplant recipient. *Transpl Infect Dis*. 2017 Aug;19(4). doi: 10.1111.tid.12702.

Kazem S, van der Meijden E, Feltkamp MC. The trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus: virological background and clinical implications. *APMIS*. 2013 Aug;121(8):770-82. doi: 10.1111/apm.12092.

Kazem S, van der Meijden E, Kooijman S, Rosenberg AS, Hughey LC, Browning JC, et al. Trichodysplasia spinulosa is characterized by active polyomavirus infection. *J Clin Virol*. 2012 Mar;53(3):225-30. doi: 10.1016/j.jcv.2011.11.007

Kean J, Rao S, Wang M, Garcea RL. Seroepidemiology of Human Polyomaviruses. *PLoS Pathog*. 2009 Mar;5(3)e1000363. doi: 10.1371/journal.ppat.1000363.

Khalili K, White MK, Lublin F, Ferrante P, Berger JR. Reactivation of JC virus and development of PML in patients with multiple sclerosis. *Neurology*. 2007 Mar 27;68(13):985–90.

Klemenc P, Skaleric U, Artnik B, Nogrsek P, Marin J. Prevalence of some herpesviruses in gingival crevicular fluid. *J Clin Virol*. 2005 Oct; 34(2):147-52.

Knowles WA, Khalili K, Stoner GL. The epidemiology of BK Virus and the occurrence of antigenic and genomic subtypes. In: Khalili K, Stoner GL, eds. *Human polyomaviruses: molecular and clinical perspectives*. New York: Wiley-Liss. 2001;p.527–59.

Knowles WA, Pipkin P, Andrews N, Vyse A, Minor P, Brown DW, Miller E. Population-based study of antibody to the human polyomaviruses BKV and JCV and the simian polyomavirus SV40. *J Med Virol*. 2003 Sep;71(1):115-23.

Knowles WA. Discovery and epidemiology of the human polyomaviruses BK virus (BKV) and JC virus (JCV). *Adv Exp Med Biol*. 2006;577:19-45.

Krumbholz A, Bininda-Emonds OR, Wutzler P, Zell R. Evolution of four BK virus subtypes. *Infect Genet Evol*. 2008 Sep;8(5):632-43. doi: 10.1016/j.meegid.2008.05.006.

Kumar D. Emerging viroses in transplantation. *Curr Opin Infect Dis*. 2010; 23:374-8.

Kuwamoto S, Higaki H, Kanai K, Iwasaki T, Sano H, Nagata K, et al. Association of Merkel cell polyomavirus infection with morphologic difference in Merkel cell carcinoma. *Hum Pathol*. 2011 May;42(5):632-40. doi: 10.1016/j.humpath.2010.09.011.

Laghi L, Randolph AE, Chauhan DP, Marra G, Major EO, Neel JV, Boland CR. JC virus DNA is present in the mucosa of the human colon and in colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jun;96(13):7484-89.

Ling PD, Lednicky JA, Keitel WA, Poston DG, White ZS, Peng R, Liu Z, Mehta SK, Pierson DL, Rooney CM, Vilchez RA, Smith EO, Butel JS. The dynamics of herpesvirus and polyomavirus reactivation and shedding in healthy adults: a 14-month longitudinal study. *J Infect Dis.* 2003 May 15;187(10):1571-80.

Luo C, Bueno M, Kant J, Randhawa P. Biologic diversity of polyomavirus BK genomic sequences: Implications for molecular diagnostic laboratories. *J Med Virol.* 2008 Oct;80(10):1850-7. doi: 10.1002/jmn.21281.

Machado DM, Fink MC, Pannuti CS, Succi RC, Machado AA, do Carmo FB, Gouvêa Ade F, Urbano PR, Beltrão 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 Dec;106(8):931-5.

Malamud D. Saliva as a diagnostic fluid. *Dent Clin North Am.* 2011 Jan; 55(1):159-78. doi: 10.1016/j.cden.2010.08.004.

Markowitz RB, Eaton BA, Kubik MF, Latorra D, McGregor JA, Dynan WS. BK virus and JC virus shed during pregnancy have predominantly archetypal regulatory regions. *J Virol.* 1991 Aug;65(8):4515-9.

Martini F, Laccheri L, Martinelli M, Martinello R, Grandi E, Mollica G, Tognon M. Papilloma and polyoma DNA tumor virus sequences in female genital tumors. *Cancer Invest.* 2004 Nov 10;22(5):697-705.

Matos A, Duque V, Beato S, da Silva JP, Major E, Meliço-Silvestre A. Characterization of JC human polyomavirus infection in a Portuguese population. *J Med Virol.* 2010 Mar;82(3):494-504. doi: 10.1002/jmv.21710.

Mitterhofer B, Tinti F, Umbro I, Pietropaolo V, Fiacco F, Bellizzi A, et al. Polyomavirus BK infection before liver transplantation in patients with Chronic Kidney Disease. *Transplant Proc.* 2012 Sep;44(7):1934-7. doi: 10.1016/j.transproceed.2012.06.052.

Moens U, Johansen T, Johnsen JI, Seternes OM, Travik T. Noncoding control region of naturally occurring BK virus variants: sequence comparison and functional analysis. *Virus Genes* 1995; 10(3):261-5

Moens U, Ludvigsen M, Van Ghelue M. Human Polyomaviruses in Skin Diseases. *Patholog Res Int.* 2011 Sep;(741):123491. doi: 10.4061/2011/123491.

Monaco MC, Atwood WJ, Gravell M, Tornatore CS, Major EO. JC virus infection of hematopoietic progenitor cells, primary B lymphocytes, and tonsillar stromal cells: implications for viral latency. *J Virol*. 1996 Oct;70(10):7004-12.

Monini P, Rotola A, Di Luca D, De Lellis L, Chiari E, Corallini A, Cassai E. DNA rearrangements impairing BK virus productive infection in urinary tract tumors. *Virology*. 1995 Dec 1;214(1):273-79.

Monini P, Rotola A, de Lellis L, Corallini A, Secchiero P, Albini A, Benelli R, Parravicini C, Barbanti-Brodano G, Cassai E. Latent BK virus infection and Kaposi's sarcoma pathogenesis. *Int J Cancer*. 1996 Jun 11;66(6):717-22.

Mori M, Aoki N, Shimada H, Tajima M, Kato K. Detection of JC virus in the brains of aged patients without progressive multifocal leukoencephalopathy by the polymerase chain reaction and Southern hybridization analysis. *Neurosci Lett*. 1992 Jul 22;141(2):151-5.

Mullane KP, Ratnofsky M, Cullere X, Schaffhusen B. Signaling from Polyomavirus middle T and small T defines different role for protein phosphatase 2A. *Mol Cell Biol*. 1998 Dec;18(12):7556-64.

Munõz P, Fogeda M, Bouza E, Verde E, Palomo J, Bañares R. Prevalence of BK virus replication among recipients of solid organ transplants. *Clin Infect Dis*. 2005 Dec 15;41(12):1720-25.

Mylonakis E, Goes N, Rubin RH, Cosimi AB, Colvin RB, Fishman JA. BK virus in solid organ transplant recipients: an emerging syndrome. *Transplantation*. 2001 Nov 27;72(10):1587-92.

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 BKV in the urine of HIV-infected patients without neurological symptoms in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2012 Aug;54(4):201-5.

Newman JT, Frisque RJ. Detection of archetype and rearranged variants of JC virus in multiple tissues from a pediatric PML patient. *J Med Virol*. 1997 Jul;52(3):243-52.

Newman JT, Frisque RJ. Identification of JC virus variants in multiple tissues of pediatric and adult PML patients. *J Med Virol*. 1999 May;58(1):79-86.

Nishimoto T, Takasaka T, Hasegawa M, Zheng HY, Chen Q, Sugimoto C, Kitamura T, Yogo Y. Evolution of BK virus based on complete genome data. *J Mol Evol.* 2006 Sep;63(3):341-52.

Nishimoto T, 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 Jul;65(1):103-11.

Olsen GH, Andresen PA, Hilmarsen HT, Bjorng O, Scott H, Midtvedt K, Rinaldo CH. Genetic variability in BK Virus regulatory regions in urine and kidney biopsies from renal-transplant patients. *J Med Virol.* 2006 Mar;78(3):384-93.

Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. *Lancet.* 1971 Jun 19;1(7712):1257-60.

Pal A, Sirota L, Maudru T, Peden K, Lewis Jr AM. Real-time, quantitative PCR assay for the detection of virus-specific DNA in sample with mixed populations of polyomaviruses. *J Virol Methods.* 2006 Jul;135(1):32-42.
doi:10.1016/j.jviromet.2006.01.018.

Pallas DC, Shahik LK, Martin BL, Jaspers S, Miller TB, Brautigan DL, Roberts TM. Polyoma small and middle T antigens and SV40 small t antigen form stable complexes with protein phosphatase 2A. *Cell.* 1990 Jan;60(1):167-76

Parisi MR, Soldini G, Di Perri G, Tiberi S, Lazzarin A, Lilo FB. Offer of rapid testing and alternative biological samples as practical tools to implement HIV screening programs. *New Microbiol.* 2009 Oct;32(4):391-6.

Pietropaolo V, Fioriti D, Simeone P, Videtta M, Di Taranto C, Arancio A, Orsi N, Degener AM. Detection and sequence analysis of human polyomaviruses DNA from autoptic samples of HIV-1 positive and negative subjects. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2003 Sep-Dec;16(3):269-76.

Pinto M, Dobson S. BK and JC virus: a review. *J Infect.* 2014 Jan;68 suppl 1:S2-8.
doi: 10.1016/j.jinf.2013.09.009.

Pollock JJ, Andors L, Gulumoglu A, Ells PF. Direct measurement of hepatitis B viral antibody and antigen markers in gingival crevicular fluid. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1984 May; 57(5):499-503.

Prins C, Frisque RJ. JCV virus T' proteins encoded by alternatively spliced early mRNAs enhance T antigen-mediated viral DNA replication in human cells. *J Neurovirol.* 2001 Jun;7(3):250-64.

Priyanka N, Kalra N, Shanbhang N, Kumar K, Seema, Brijet B, Uma SR, Pradeep AR. Recent approaches in saliva as a credible periodontal diagnostic and prognostic maker. *AOSR* 2012;2(1):40-46

Querbes W, O'Hara BA, Williams G, Atwood WJ. Invasion of host cells by virus indentifies a novel role for caveolae in endosomal sorting of noncaveolar ligands. *J Virol*, 2006 Oct;80(19):9402-13.

Quinlivan EB, Norris M, Bouldin TW, Suzuki K, Meeker R, Smith MS, Hall C, Kenney S. Subclinical central nervous system infection with JC virus in patients with AIDS. *J Infect Dis.* 1992 Jul;166(1):80-5.

Randhawa PS, Khaleel-Ur-Rehman K, Swalsky PA, Vats A, Scantlebury V, Shapiro R, et al. DNA sequencing of viral capsid protein VP-1 region in patients with BK virus interstitial nephritis. *Transplantation.* 2002 Apr 15;73(7):1090-4.

Randhawa P, Ho A, Shapiro R, Vats A, Swalsky P, Finkelstein S, et al. Correlates of quantitative measurement of BK polyomavirus (BKV) DNA with clinical course of BKV infection in renal transplant patients. *J Clin Microbiol.* 2004 Mar;42(3):1176-80.

Randhawa P, Vats A, Shapiro R, Weck R, Scantlebury V. BK virus: Discovery, epidemiology, and biology. *Graft v.5* 2002 Dec: S19-27. Doi: 10.1177/1522162802238454.

Robaina TF, Mendes GS, Benati FJ, Pena GA, Silva RC, Montes MAR, Otero R, Castro GF, Camara FP, Santos N. Polyomavirus in saliva of HIV-infected children, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2103a Jan;19(1):155-7. doi: 10.3201/eid1901.120563.

Robaina TF, Mendes GS, Benati FJ, Pena GA, Silva RC, Montes MAR, Janini MER, Câmara FP, Santos N. Shedding of Polyomavirus in the saliva of immunocompetent individuals. *J Med Virol.* 2013b Jan;85(1):144-8. doi: 10.1002/jmv.23453

Saribas AS, Ozdemir A, Lam C, Safak M. JC virus-induced Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *Future Virol.* 2010 May;5(3):313-23. doi: 10.2217/fvl.10.12.

Scuda N, Hofmann J, Calviagnac-Spencer S, Ruprecht K, Liman P, Kühn J, Hengel H, Ehlers B. A Novel Human Polyomavirus Closely Related to the African Green Monkey-Derived Lymphotropic Polyomavirus. *J Virol*. 2011 May;85(9):4586-90. doi: 10.1128/JVI.02602-10.

Schowalter RM, Pastrana DV, Pumphrey KA, Moyer AL, Buck CB. Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomavirus are chronically shed from human skin. *Cell Host Microbe* 2010 Jun;7(6):509-15. doi: 10.1016/j.chom.2010.05.006.

Seganti L, Mastromarino P, Superti F, Sinibaldi L, Orsi N. Receptors for BK virus on human erythrocytes. *Acta Virol*. 1981 Jul; 25(4):177-81.

Shishido-Hara Y, Hara Y, Larson T, Yasui K, Nagashina K, Stoner G. Analysis of capsid formation of human polyomavirus JC (Tokyo-1 strain) by a eukaryotic expression. System: splicing of late RNAs, translation and nuclear transport of major capsid protein VP1, and capsid assembly. *J Virol*, 2000 Apr;74(4):1840-53. doi: 10.1128/JVI.74.4.1840-1853.2000.

Sinibaldi L, Goldoni P, Pietropaolo V, Longhi C, Orsi N. Involvement of gangliosides in the interaction between BK virus and Vero cells. *Arch Virol*. 1990;113(3-4):291-6.

Slav S, Zalvatchev. Molecular virology and clinical aspects of the human polyomavirus BK infection. *J Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2006;20(2):9-16.

Stoner GL, Ryschkewitsch CF, Walker DL, Soffer D, Webster HD. A monoclonal antibody to SV40 large T-antigen labels a nuclear antigen in JC virus-transformed cells and in progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) brain infected with JC virus. *J Neuroimmunol*. 1988 Mar;17(4):331-45.

Sugimoto C, Kitamura T, Guo J, Al-Ahdal M N, Shchelkunov SN, Otava B, et al. Typing of urinary JC virus DNA offer a novel means of tracing human migrations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997 Aug 19;94(17):9191-96.

Sundsford A, Osei A, Rosenqvist H, Van Ghelue M, Silsand Y, Haga HJ, Rekvig OP, Moens U. BK and JC viruses in patients with systemic lupus erythematosus: prevalent and persistent BK viremia, sequence stability of the viral regulatory regions, and nondetectable viremia. *J Infect Dis*. 1999 Jul;180(1):1-9.

Takasaka T, Goya N, Tokumoto T, Tanabe K, Toma H, Ogawa Y, Hokama S, Momose A, Funyu T, Fujioka T, Omori S, Akiyama H, Chen Q, Zheng HY, Ohta N, Kitamura T, Yogo Y. Subtypes of BK virus prevalent in Japan and variation in their transcriptional control region. *J Gen Virol*. 2004 Oct;85(Pt 10):2821-7.

Tornatore C, Berger JR, Houff SA, Curfman B, Meyers K, Winfield D, Major EO. Detection of JC virus DNA in peripheral lymphocytes from patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann Neurol*. 1992 Apr;31(4):454-62.

Trowbridge, PW, Frisque RJ. Identification of three new JC virus proteins generated by alternative splicing of the early viral mRNA. *J Neurovirol*, 1995 Jun. 1(2):195-206.

Urbano, PRP, Oliveira RR, Romano CM, Pannuti CS, Fink MC. Occurrence, genotypic characterization, and patterns of shedding of human polyomavirus JCPyV and BKPyV in urine samples of healthy individuals in São Paulo, Brazil. *J Med Virol*. 2016 Jan;88(1):153-8. doi: 10.1002/jmv.24318.

Vahabpour R, Aghasadeghi M R, Salehi-Vaziri M, Mohajel N, Keyvani H, Nasimi M, Esghaei M, Monavari S H. Prevalence of Merkel cell polyomavirus in Tehran: an age-specific serological study. *Iran Red Crescent Med J*. 2016 May;18(5):e26097. doi: 10.5812/ircmj.26097.

Vahabpour R, Nasimi M, Naderi N, Salehi-Varizi M, Mohajel N, Sadeghi F, Keyvani H, Monavari SH. Merkel cell polyomavirus IgG antibody levels are associated with progression to AIDS among HIV-infected individuals. *Arch Virol*. 2017 Apr;162(4):963-9. doi: 10.1007/s00705-016-3186-z.

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 Jun 29;6(7):e1001024. doi: 10.1371/journal.ppat1001024.

Vanchiere JA, Abudayyeh S, Copeland CM, Lu LB, Graham DY, Butel JS. Polyomavirus shedding in the stool of healthy adults. *J Clin Microbiol*. 2009 Aug;47(8):2388-91.

Viscidi RP, Shah KV. A Skin cancer virus? *Science*. 2008 Feb;319(5866):1049-50. doi: 10.1126/Science.1155048.

White DA, Scribner AN, Huang JV. A comparison of patient acceptance of fingerstick whole blood and oral fluid rapid HIV screening in a emergency department. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2009 Sep;52(1):75-8. doi: 10.1097/QAI.0b013e3181afd33d.

Wieland U, Silling S, Hellmich M, Potthoff A, Pfister H, Kreuter A. Human polyomaviruses 6,7,9,10 and Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus in HIV-infected men. *J Gen Virol*. 2014 Apr;95(Pt 4):928-32. doi: 10.1099/vir.0.061259-0.

Yogo Y, Zhong S, Suzuki M, Shibuya A, Kitamura T. Occurrence of the European subgroup of subtype I BK polyomavirus in Japanese-Americans suggests transmission outside the Family. *J Virol*. 2007 Dec;81(23):13254-58.

Zalona AC, Lopes GS, Schrago CG, Gonçalves RT, Zalis MG, Varella RB. Molecular characterization of BK polyomavirus subtypes in renal transplant recipients in Brazil. *J Med Virol*. 2011 Aug;83(8):1401-05. doi: 10.1002/jmv.22117.

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 Infection*. 2007 Feb;9(2):204-13.

Zhong S, Zheng H, 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 Jan;45(1)193-8. doi:10.1128/JCM.01645-06

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*. 2009a Jan;90(Pt 1):144-52. doi: 10.1099/vir.0.83611-0.

Zhong S, Jeong BH, Ikegaya H, Kim YS, Xu Y, Zhu M, Chao Y, Suzuki M, Kitamura T, Homma Y, Yogo Y. Comparison of the distribution patterns of BK polyomavirus lineages among China, Korea and Japan: Implications for human migrations in northeast Asia. *Microbiol Immunol*. 2009b May;53(5):266-76. doi: 10.1111/j.1348-0421.2009.00121.x.

APÊNDICE A - Detecção e quantificação do poliomavírus humano JC em amostras de soro, saliva, lavado bucal, fluído gengival crevicular e urina dos indivíduos da pesquisa

GRUPO	PAC	JCV								
		SORO	SALIVA	LAVADO	FLUÍDO GENGIVAL CREVICULAR				URINA	
					SITIO1	SITIO2	SITIO3	SITIO4		
GE	1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
	2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	3	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
	4	NEG	POS	NEG	X	X	NEG	NEG	NEG	POS
	5	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	6	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	7	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS
	8	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	9	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
	10	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
	11	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
	12	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	13	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	14	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
	15	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	16	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	17	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
	18	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
	19	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	20	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
	21	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
	22	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	X	NEG	NEG
GC	1	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
	2	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	X

3	NEG								
4	NEG								
5	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	POS	NEG	NEG
6	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	X
7	NEG	POS							
8	NEG								
9	NEG								
10	NEG								
11	NEG								
12	NEG	POS							
13	NEG	NEG	NEG	X	X	X	X	NEG	NEG
14	NEG	NEG	NEG	X	X	X	X	NEG	NEG
15	NEG	NEG	NEG	X	X	X	X	NEG	NEG
16	NEG	NEG	NEG	X	X	X	X	NEG	NEG
17	NEG	NEG	NEG	X	X	X	X	POS	POS
18	NEG	NEG	NEG	X	X	X	X	NEG	NEG
19	NEG	NEG	NEG	X	X	X	X	POS	POS
20	NEG	NEG	NEG	X	X	X	X	POS	POS

Legenda: GE = grupo de estudo; GC = grupo control; POS = positivo; NEG = negativo; x = não coletado

APÊNDICE B - Detecção e quantificação do poliomavírus humano BK em amostras de soro, saliva, lavado bucal, fluído gengival crevicular e urina dos indivíduos da pesquisa

GRUPO	PAC	BKV							
		SORO	SALIVA	LAVADO	FLUÍDO GENGIVAL CREVICULAR				URINA
					SITIO1	SITIO2	SITIO3	SITIO4	
GE	1	POS	NEG	POS	NEG	POS	POS	NEG	NEG
	2	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS	POS
	3	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	NEG
	4	NEG	POS	POS	X	X	POS	POS	NEG
	5	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	NEG	NEG
	6	NEG	NEG	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG
	7	POS	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS	NEG
	8	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS	POS	NEG
	9	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	POS	NEG	NEG
	10	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
	11	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	12	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG
	13	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	14	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	15	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	16	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	17	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	18	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	19	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	20	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
	21	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG
	22	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	X	NEG
GC	1	NEG	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
	2	NEG	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	X

3	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
4	NEG	POS	POS	POS	NEG	POS	POS	NEG
5	NEG	POS	NEG	POS	POS	POS	POS	POS
6	NEG	POS	NEG	POS	POS	POS	NEG	X
7	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	POS	NEG
8	NEG	POS	POS	NEG	POS	NEG	NEG	POS
9	POS	NEG						
10	NEG							
11	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	POS	NEG
12	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG
13	NEG	NEG	POS	X	X	X	X	POS
14	POS	POS	POS	X	X	X	X	POS
15	NEG	POS	NEG	X	X	X	X	NEG
16	POS	NEG	POS	X	X	X	X	NEG
17	NEG	NEG	NEG	X	X	X	X	NEG
18	NEG	POS	NEG	X	X	X	X	NEG
19	NEG	NEG	NEG	X	X	X	X	NEG
20	NEG	NEG	NEG	X	X	X	X	NEG

Legenda: GE = grupo de estudo; GC = grupo control; POS = positivo; NEG = negativo; x = não coletado

3	NEG								
4	NEG								
5	NEG								
6	NEG	X							
7	NEG								
8	NEG								
9	NEG								
10	NEG								
11	NEG								
12	NEG								
13	NEG	NEG	NEG	X	X	X	X	NEG	NEG
14	NEG	NEG	NEG	X	X	X	X	NEG	NEG
15	NEG	NEG	NEG	X	X	X	X	NEG	NEG
16	NEG	NEG	NEG	X	X	X	X	NEG	NEG
17	NEG	NEG	NEG	X	X	X	X	NEG	NEG
18	NEG	NEG	NEG	X	X	X	X	NEG	NEG
19	NEG	NEG	NEG	X	X	X	X	NEG	NEG
20	NEG	NEG	NEG	X	X	X	X	NEG	NEG

Legenda: GE = grupo de estudo; GC = grupo control; POS = positivo; NEG = negativo; x = não coletado

3	NEG								
4	NEG								
5	NEG								
6	NEG	X							
7	NEG								
8	NEG								
9	NEG								
10	NEG								
11	NEG								
12	NEG								
13	NEG	NEG	NEG	X	X	X	X	NEG	NEG
14	NEG	NEG	NEG	X	X	X	X	NEG	NEG
15	NEG	NEG	NEG	X	X	X	X	NEG	NEG
16	NEG	NEG	NEG	X	X	X	X	NEG	NEG
17	NEG	NEG	NEG	X	X	X	X	NEG	NEG
18	NEG	NEG	NEG	X	X	X	X	NEG	NEG
19	NEG	NEG	NEG	X	X	X	X	NEG	NEG
20	NEG	NEG	NEG	X	X	X	X	NEG	NEG

Legenda: GE = grupo de estudo; GC = grupo control; POS = positivo; NEG = negativo; x = não coletado

ANEXO A – Termo de consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**“Detecção dos poliomavírus humano JC e BK em fluidos orais de indivíduos imunossuprimidos”**

Este termo tem a finalidade de esclarecer ao participante sobre o projeto de pesquisa “Detecção dos poliomavírus humano BK e JC em fluidos orais de indivíduos imunossuprimidos” a ser desenvolvido pelas alunas de pós graduação Talita de Castro Alves, Fabiana Mesquita Barros, e Marília Andrade Figueiredo, sob orientação das Profas. Dra. Marina Helena Cury Gallottini e Karem Lopez Ortega.

Esse estudo visa detectar a possível presença dos poliomavírus humano na saliva e fluido crevicular, comparativamente a urina e sangue, em pessoas normorreativas e também com diversas formas de imunossupressão, tais como insuficiência renal crônica, pessoas HIV positivas, hepatopatas (cirrose) e pessoas transplantadas.

Os indivíduos que concordarem em participar da pesquisa responderão a um questionário sobre a sua história médica atual e passada, medicações em uso e dados demográficos (sexo, idade, raça). Será também realizado um exame de boca simples para a detecção de doença periodontal (gengiva), cárie e eventuais lesões na boca.

Em todos os indivíduos desta pesquisa, será realizada uma limpeza dos dentes (profilaxia) e serão coletadas amostras de sua saliva, bochecho com Listerine®, uma amostra do fluido de sua gengiva e uma amostra de urina e de sangue para avaliar a presença dos vírus da família polioima.

Esta pesquisa lhe trará o benefício de saber se você tem ou não alguma doença de boca e, se ela existir, você poderá tratá-la no CAPE. Além disso, poderemos detectar a presença do vírus polioima e, neste caso, encaminhá-lo para avaliação especializada. Sendo que indivíduos sem imunossupressão não apresentam risco de desenvolverem doença relacionada com a presença desse vírus.

Os riscos e desconfortos do exame clínico, preenchimento do questionário e coleta de saliva e urina serão mínimos, já que fazem parte dos cuidados de todos os pacientes. Com relação à coleta de sangue, há risco de formação de hematoma no local da coleta. A coleta do fluido gengival crevicular poderá trazer mínimo desconforto no momento em que é realizado.

A identificação do paciente será preservada de forma que seu nome e dados pessoais não aparecerão nas publicações subsequentes à pesquisa nem serão citados em cursos, palestras ou aulas expositivas.

O paciente não receberá e não efetuará nenhum pagamento pela sua participação na pesquisa, nem para a realização dos exames laboratoriais.

Os exames a serem realizados serão:

- Coleta de saliva: através da eliminação de toda a sua saliva por 5 minutos em um recipiente e através de um bochecho com Listerine®, que também será colocado em um recipiente próprio e estéril;
- Fluido da gengiva: será coletado com a ajuda de um pequeno papel absorvente colocado pelo dentista em sua gengiva;
- Sangue: Um tubo de sangue será coletado através da punção na região da dobra do cotovelo.
- Urina: a coleta de urina será realizada pelo próprio paciente, em tubo coletor fornecido pelo pesquisador.

Todas as amostras serão analisadas para detectar a presença do poliomavírus.

Existem outros vírus de interesse que podem estar presentes nas amostras coletadas e por isso elas podem ser usadas em outros estudos, desta forma:

() NÃO AUTORIZO a utilização de dados ou do material biológico (saliva, fluido gengival, urina e sangue) em outra pesquisa. Neste caso, serão descartados em lixo biológico.

() SIM AUTORIZO a utilização de dados ou material biológico (saliva, fluido gengival e sangue) em outra pesquisa.

Para utilizar os dados ou material biológico (saliva, fluido gengival e sangue) em outra pesquisa você quer ser consultado?

() NÃO quero ser consultado da utilização dos meus dados ou material biológico (saliva, fluido gengival e sangue) em outra pesquisa, desde que a nova pesquisa seja aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

() SIM quero ser consultado da utilização dos meus dados ou material biológico (saliva, fluido gengival e sangue) em outra pesquisa.

Você poderá ter todas as informações que quiser sobre esta pesquisa ou pesquisas futuras que envolvam suas amostras. Fica claro que você terá o direito de não aceitar participar da pesquisa ou de interromper a realização de seu exame a qualquer momento sem prejuízo de qualquer benefício que esteja recebendo.

A qualquer momento durante o andamento do estudo as pesquisadoras Fabiana Mesquita Barros, Talita de Castro Alves e Marília Andrade Figueiredo estarão disponíveis para dúvidas e esclarecimentos pelo telefone (11) 3091-7838.

Se houver dúvidas sobre a ética da pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia (Av. Lineu Prestes 2227, 05508-000 São Paulo, telefone 30917960 ou pelo e-mail cepfo@usp.br). O paciente receberá uma cópia deste termo de consentimento.

Eu, _____, portador do RG - _____ li e/ou ouvi as informações deste termo e compreendi para que serve o estudo e qual o procedimento a qual serei submetido. A explicação que recebi esclarece os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não afetará o meu tratamento. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e que não receberei dinheiro por participar deste estudo e que devo entrar em contato com a Talita de Castro Alves, Fabiana Mesquita Barros e Marília Andrade Figueiredo caso tenha alguma dúvida. Eu concordo voluntariamente em participar do estudo "Detecção dos poliomavírus humano BK e JC em fluidos orais de indivíduos imunossuprimidos".

Assinatura do participante

Assinatura do pesquisador

São Paulo, _____ de _____ de _____.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP DADOS DO PROJETO DE PESQUISA Título da Pesquisa: DETECÇÃO DOS POLIOMAVÍRUS HUMANO JC E BK EM SALIVA, FLUIDO GENGIVAL CREVICULAR E SANGUE DE PACIENTES COM INSUFICIÊNCIA RENAL **Pesquisador:** Marina Helena Cury Gallottini

Área Temática: Versão: 4 CAAE: 15042613.6.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER Número do Parecer: 500.250

Data da Relatoria: 18/12/2013

Apresentação do Projeto:

A insuficiência renal é caracterizada pela perda da capacidade de filtração dos nefrons. De acordo com seu estágio, o tratamento é baseado na introdução de terapias de substituição renal, como a hemodiálise e a diálise peritoneal, além do transplante renal. Estes tratamentos levam a alterações imunológicas nos pacientes submetidos à eles, permitindo a reativação de vírus que encontram-se latentes e sem manifestações clínicas

consideráveis em indivíduos imunocompetentes. Uns destes, são os vírus da família dos Poliomavírus humano, mais especificamente, os vírus BKV e JCV, que são associados ao desenvolvimento de nefrite em pacientes transplantados renais, podendo culminar com a perda do órgão transplantado. Seu principal local de latência são os rins, e por isso, sua detecção pode ser feita através de amostras de sangue e urina. Além disso, estudos mostram que as glândulas salivares também servem como local de depósito destes vírus, podendo a saliva ser tanto uma via de contaminação como de diagnóstico para presença destes vírus.

Objetivo da Pesquisa:

Detectar a presença e quantificar os poliomavírus humanos (BK e JC) na saliva e fluido gengival crevicular de pessoas com insuficiência renal crônica, em terapia dialítica, comparando com os valores encontrados no sangue e urina dos mesmos indivíduos e verificar se há relação entre doença periodontal e presença e quantidade deste vírus na saliva e no fluido crevicular.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos ou desconfortos do exame clínico e coleta de saliva serão mínimos, já que o questionário e o exame bucal são parte dos cuidados a serem tomados com estes pacientes. Com relação à coleta de sangue, há risco da formação de hematoma no local da coleta, associado ou não à dor local. O poliomavírus humano nos subtipos

BK e JC estão associados à casos de insucesso de transplante renal. Desta forma, a detecção deste vírus na saliva permitirá não só a determinação de um teste menos invasivo para detecção destes vírus, bem como o encaminhamento destes pacientes para avaliação especializada previamente ao transplante renal.

Maria Gabriela Haye Biazevic (Coordenador) Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é importante pois objetiva viabilizar a utilização da saliva como meio de diagnóstico da presença do poliomavírus humanos (BK e JC). Este fluido tem coleta mais simples e mais confortável para o paciente. Os riscos, apesar de presentes, são justificados e aceitáveis.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados TCLE, onde foram incluídos o endereço e o CEP, a carta de autorização da co-participante, em que serão realizadas as análises e anexado parecer consubstanciado da CONEP.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 18 de Dezembro de 2013