

ANA RITA CLARO MARTINS

## **Deteção e Caracterização Genotípica do JC vírus: Implicações Médico-legais na Determinação Geográfica Individual**

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Medicina Legal submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

**Orientador** – Professor Doutor Rui Manuel de Medeiros Melo Silva

**Categoria** – Professor Associado Convidado

**Afiliação** – Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto e Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral, Centro de Investigação do Instituto Português de Oncologia do Porto.

**Co-orientador** – Doutora Ana Luísa Pereira Teixeira

**Afiliação** – Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral, Centro de Investigação do Instituto Português de Oncologia do Porto.

## **Informação Técnica**

TÍTULO: Detecção e Caracterização ; genotípica do JC vírus: implicações Aédico-  
@egais na 8eterminação ; eográfica #ndividual

Tese de Candidatura ao Grau de Mestre em Medicina Legal submetida ao Instituto  
de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto

AUTOR: Ana Rita Claro Martins

DATA: Outubro de 2014

EDITOR: Ana Rita Claro A Ufhjbg

MORADA: Rua Frei João Pinto da Piedade, nº 154

LOCALIDADE: Abrantes

CÓDIGO POSTAL: 2200-134

CORREIO ELETRÓNICO: ritamartiins@gmail.com

1ªEDIÇÃO: Outubro de 2014

“Algo só é impossível até que alguém  
duvide e prove o contrário”

*(Albert Einstein)*



## **Agradecimentos**

Mesmo sendo uma secção opcional, os *Agradecimentos* assumem um papel importante, dado que nenhum estudante realiza um trabalho universitário desta natureza sem a contribuição de outras pessoas.

É expresso um sentimento repleto de gratidão. Portanto, agradeço:

Ao meu orientador Prof. Doutor Rui Medeiros por todo o aconselhamento e rigor científico, por sempre acreditar no meu trabalho e pela oportunidade que me facultou ao embarcar neste projeto.

À minha orientadora Doutora Ana Luísa Teixeira, que para além da sua constante e permanente disponibilidade, acompanhou-me sempre na minha investigação com uma combinação única e assertiva de críticas, sugestões e incentivos. Obrigado pela forma incansável com que leu o trabalho (e não foram poucas as vezes!) e pela paciência com que sistematicamente me ajudou a resolver com eficiência os obstáculos que tive pelo caminho. Devo o meu reconhecimento pelo carinho com que sempre atendeu às minhas dúvidas e pela confiança que continuamente me transmitiu.

À minha coordenadora de Mestrado Prof. Dra. Maria José Pinto da Costa pelo apoio e pela transmissão de conhecimento durante esta etapa.

Aos meus colegas e amigos do Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral do Instituto Português de Oncologia do Porto, pelo incentivo e ajuda que sempre me deram, por fazerem parte da minha formação e por todos os momentos passados no piso 1. Momentos que valem mais que dois ou três parágrafos escritos nesta secção.

Ao Dr. Carlos Resende pela forma como me ajudou com a segunda parte laboratorial realizada no IPATIMUP. Obrigado pelos conselhos, críticas e sugestões que me fez e pela disponibilidade que sempre demonstrou.

Aos participantes pela colaboração e por tornarem possível todo o estudo.

À família, em especial aos meus pais e ao meu irmão, por todo o suporte incondicional que me deram e por fazerem de mim a pessoa que sou hoje.

Aos amigos que sempre tiveram uma palavra de conforto e incentivo.

Ao Tiago, que me deu todo o apoio e força para lutar e acreditar que seria possível.

*A todos, o meu muito obrigado.*



## Abreviaturas

### A

ATP Adenosina Trifosfato

### B

BKV *BK Virus*

BLAST *Basic Local Alignment Search Tool*

### D

DNA *Deoxyribonucleic acid* (em português: ácido desoxirribonucleico)

dNTP Desoxirribonucleotídeo fosfatado

### E

EUA Estados Unidos da América

### H

HPyV10 Poliomavírus humano 10

HPyV6 Poliomavírus humano 6

HPyV7 Poliomavírus humano 7

HPyV9 Poliomavírus humano 9

### I

ICTV *International Committee on Taxonomy of Viruses* (em português: Comité Internacional de Taxonomia de Vírus)

### J

JCV *John Cunningham Virus*

### K

Kb Kilobases

KIV *Karolinska Institute Virus*

### L

LEMP Leucoencefalopatia multifocal progressiva

### M

MCV Vírus das Células de Merkel

MgCl<sub>2</sub> Cloreto de magnésio

mRNA RNA mensageiro

### N

NCCR Região reguladora não codificante

**O**

ORF	<i>Open Reading Frame</i>
ORI	<i>Origin of replication</i>

**P**

pb	pares de base
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	potencial de Hidrogénio
pp2A	Proteína fosfatase 2A
pRB	Proteína do retinoblastoma

**R**

5HT <sub>2A</sub> R	Receptor da serotonina
RE	Retículo endoplasmático
Região IG	Região Intergénica
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>

**S**

SNC	Sistema nervoso central
SV40	<i>Simian vacuolating virus 40</i>

**T**

TBE	<i>Tris/Borate/EDTA</i>
TSPV	Poliomavírus associado à tricodisplasia espinulosa

**V**

VIH	Vírus da imunodeficiência humana
-----	----------------------------------

**W**

WUV	<i>Washington University Virus</i>
-----	------------------------------------

## Índice Geral

### Resumo

### Abstract

<b>1. Introdução</b> .....	2
1.1. Os Poliomavírus .....	2
1.1.1. Contextualização Histórica .....	2
1.1.2. Classificação .....	3
1.2. O JCV como Modelo de Estudo .....	5
1.2.1. Epidemiologia .....	5
1.2.2. Morfologia .....	6
1.2.3. Estrutura Genómica .....	6
1.2.4. Ciclo Viral .....	11
1.2.5. Entrada, Replicação e Transcrição do JCV .....	11
1.2.6. Modos de Transmissão, Infecção Inicial e Latência do JCV.....	15
1.3. Implicações Médico-Legais .....	19
1.3.1. Classificação Genotípica do JCV .....	20
1.3.2. Epidemiologia Molecular do JCV.....	21
1.3.3. Origem Geográfica.....	22
<b>2. Objetivos</b> .....	25
2.1. Objetivo Geral .....	25
2.2. Objetivos Específicos.....	25
<b>3. Material e Métodos</b> .....	29
3.1. Detecção do Poliomavírus Humano JC .....	30
3.1.1. População em Estudo .....	30
3.1.2. Extração de DNA de Amostras Biológicas .....	30
3.1.3. Avaliação da Qualidade de DNA .....	31

---

3.1.4. Detecção de DNA dos Poliomavírus Humanos JCV e BKV por <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) com Amplificação do Fragmento de DNA Codificante do Antígeno T .....	31
3.1.5. Identificação Molecular do JCV e do BKV por <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> (RFLP).....	32
3.2. Genotipagem do Poliomavírus Humano JC .....	34
3.2.1. Amplificação do Fragmento de DNA Viral Correspondente à Região VP1 do JCV por <i>Polymerase Chain Reaction Semi-nested</i> (PCR <i>Semi-nested</i> ) .....	34
3.2.2. Sequenciação Automática .....	35
3.2.3. Alinhamento Genético.....	36
3.3. Análise Estatística .....	37
<b>4. Resultados</b> .....	41
4.1. População em Estudo .....	41
4.2. Detecção do Poliomavírus Humano JC nas Amostras Biológicas.....	41
4.2.1. Detecção do Poliomavírus JCV pela Técnica PCR-RFLP com Amplificação do Fragmento Correspondente ao Antígeno T .....	41
4.2.2. Detecção do Poliomavírus JCV pela Técnica PCR <i>semi-nested</i> com Amplificação do Fragmento Correspondente a VP1 .....	42
4.3. Sensibilidade, Especificidade e Valores Preditivos .....	42
4.4. Análise da Frequência do JCV pela Técnica de PCR <i>semi-nested</i> – VP1 .....	44
4.5. Genotipagem do Poliomavírus Humano JC .....	47
4.5.1. Sequenciação Automática e Alinhamento Genético.....	47
4.6. Comparação de Estudos de Genotipagem do JCV.....	48
<b>5. Discussão</b> .....	51
<b>6. Conclusão</b> .....	57
<b>7. Referências Bibliográficas</b> .....	60

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Relação filogenética entre os poliomavírus com base na sequência genómica .....	4
<b>Figura 2</b> - Representação da cápside do JCV .....	6
<b>Figura 3</b> - Diagrama esquemático do genoma do JCV.....	7
<b>Figura 4</b> - Representação esquemática das duas formas de organização do genoma do JCV.....	10
<b>Figura 5</b> - Representação dos eventos iniciais envolvidos na infeção por JCV.....	12
<b>Figura 6</b> - Transcritos de mRNA tardio do JCV: M1 a M6 .....	13
<b>Figura 7</b> - Distribuição mundial dos génotipos mais frequentes do JCV.....	21
<b>Figura 8</b> - Representação esquemática da metodologia aplicada no presente estudo .....	29
<b>Figura 9</b> - Representação de um gel de agarose com as bandas correspondentes à região amplificada pelos primers PEP-1 e PEP-2.....	32
<b>Figura 10</b> - Representação de um gel de agarose com as bandas correspondentes à digestão pela enzima <i>BamHI</i> .....	33
<b>Figura 11</b> - Representação de um gel de agarose com a banda correspondente à região amplificada de 495 pb dentro da região VP1 .....	35
<b>Figura 12</b> - Gráfico de sequenciação automática.....	36
<b>Figura 13</b> - Deteção da presença de poliomavírus na população em estudo de acordo com a técnica de PCR-RFLP.....	41
<b>Figura 14</b> - Deteção da presença de JCV na população em estudo de acordo com a técnica de PCR semi-nested .....	42
<b>Figura 15</b> - Distribuição de casos positivos para JCV de acordo com o género ..	45
<b>Figura 16</b> - Distribuição dos casos positivos, negativos e indeterminados para o poliomavírus JCV por faixa etária.....	45
<b>Figura 17</b> - Distribuição dos casos positivos para JCV, dentro de cada faixa etária .....	46
<b>Figura 18</b> - Distribuição de casos positivos para JCV dentro de cada faixa etária por género .....	46
<b>Figura 19</b> - Distribuição genotípica dos casos positivos para JCV.....	47
<b>Figura 20</b> - Distribuição dos vários tipos e subtipos europeus de JCV .....	53



## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Proteínas do JCV e respetivas principais funções.....	9
<b>Tabela 2</b> - Lista de 22 tipos de JCV classificada de acordo com Jobes e colaboradores (1998) .....	20
<b>Tabela 3</b> - <i>Primers</i> usados na amplificação da região VP1 .....	34
<b>Tabela 4</b> - Amostras positivas para JCV estratificadas por género para cada técnica utilizada neste estudo .....	43
<b>Tabela 5</b> - Sensibilidade, Especificidade e Valores Preditivos .....	43
<b>Tabela 6</b> - Estudos de genotipagem do JCV de indivíduos saudáveis.....	48



# Resumo





## Resumo

O vírus JC (JCV) é um poliomavírus humano, membro da família *Polyomaviridae* cujo genoma é uma única molécula de DNA de cadeia dupla, circular com tamanho aproximado de 5100 pb. Trata-se de um vírus ubíquo na população humana uma vez que infeta crianças de forma assintomática, podendo persistir no tecido renal. Deste modo, observa-se que a maioria dos adultos excreta JCV na urina, a partir da qual fragmentos de DNA viral do JCV podem ser facilmente detetados pela técnica de *polymerase chain reaction* (PCR). Este vírus é endêmico para a maioria das regiões mundiais, sendo classificado em 8 genótipos e vários subtipos. Estas características genóticas do JCV são consideradas favoráveis para a determinação das origens geográficas de cadáveres não identificados. A variabilidade genómica do JCV encontrada é associada a um determinado genótipo que por sua vez está associado a uma área geográfica.

O presente estudo visou a caracterização genotípica do JCV em 88 indivíduos da população portuguesa, a partir de amostras biológicas de urina. Foi realizada a deteção do poliomavírus humano JCV pelas técnicas de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) com amplificação do fragmento correspondente ao Antígeno T e posterior amplificação da região VP1 pela técnica de PCR *semi-nested*. Em seguida, foi realizada a sequência automática dos produtos amplificados e o alinhamento genético dos mesmos.

De acordo com os resultados, a presença de DNA viral de JCV foi detetada em sessenta e cinco amostras (73,9%) pela técnica de PCR *semi-nested*. Destes casos, foram identificados através da sequenciação automática, os genótipos 1, 2, 3 e 4, sendo que os mais frequentes foram os genótipos 1 (60%) e 4 (24,6%), seguidos dos genótipos 2 (13,9%) e 3 (1,5%). Dentro dos subtipos detetados, o mais frequente foi o subtipo 1B pelo que se encontra de acordo com a prevalência genotípica da população europeia ocidental.

Os métodos de genotipagem aplicados no estudo revelaram-se úteis na caracterização genotípica do JCV na população portuguesa, realçando a potencial utilização da variabilidade genómica do JCV na inferência da origem geográfica individual. Deste modo, a identificação e a caracterização molecular do JCV em seres humanos pode apresentar um papel relevante no processo de identificação de um cadáver ou restos cadavéricos, tornando-se uma forte ferramenta científica no âmbito médico-legal.





*Abstract*



***Abstract***

The JC virus (JCV) is a human polyomavirus, a Polyomaviridae family member, whose genome is a single molecule of circular double-stranded DNA about 5100 bp in length. It is an ubiquitous virus in the human population since it infects children asymptotically, and then may persist in renal tissue. Most adults excrete JCV in urine, thus the fragments of JCV DNA can be easily detected by polymerase chain reaction (PCR). This virus is endemic to most world regions, being classified into 8 genotypes and several subtypes. These JCV genotypic characteristics are considered useful for the determination of the geographical origins of unidentified bodies since the genomic variability is associated with a particular genotype, which is associated with a geographical area.

The present study aimed the genotypic characterization of JCV from urine biological samples of 88 subjects of the Portuguese population. The human JC polyomavirus was detected by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) with amplification of the T antigen encoding fragment and subsequent amplification of the fragment which corresponds to the VP1 region by semi-nested PCR. Then, was performed the automatic sequence of the amplified products and the genetic alignment thereof.

According to the results, the presence of JCV viral DNA was detected in sixty-five samples (73.9%) by semi-nested PCR. In these cases, we identify by automatic sequencing the genotypes 1, 2, 3 and 4. The most prevalent genotypes were 1 (60%) and 4 (24.6%), followed by genotypes 2 (13.9 %) and 3 (1.5%). Within all subtypes, the most frequently found was 1B and these results are in concordance with expected genotype prevalence from a western European population.

The genotyping methods used in the study have shown to be useful in JCV genotypic characterization in the Portuguese population, emphasizing the potential use of genomic variation in the determination of the individual geographical origin. Thus, the identification and molecular characterization of JCV in humans can present a relevant role in the identification of a cadaver or cadaveric remains, making it a strong scientific tool in forensic sciences.



# 1. Introdução





## 1. Introdução

### 1.1. Os Poliomavírus

Recentemente, tem sido relatada a presença de poliomavírus humanos como meio de estabelecimento da origem geográfica dos indivíduos [1, 2]. O vírus JC (JCV), um membro da família *Polyomaviridae*, em consequência da sua variabilidade genética, revelou-se com elevado potencial para ser utilizado como marcador molecular para se inferir a origem geográfica individual [1, 2]. O JCV é um poliomavírus humano cujo genoma é uma única molécula de DNA de cadeia dupla, circular com cerca de 5100 pb de comprimento [3].

O JCV após infeção inicial, pode persistir no rim, mas, podendo também ser gradualmente excretado pela urina [4]. A sua localização no rim poderá ser bastante útil sob o ponto de vista das ciências forenses, uma vez que este órgão está entre os últimos dos tecidos moles a entrar em degradação, mesmo em situações extremas em que o corpo se encontra em estado avançado de putrefação.

Apesar dos recentes avanços na investigação científica, o aumento do número de cadáveres não identificados tem sido cada vez mais um problema mundial [2]. Deste modo, a identificação e a caracterização molecular do JCV em seres humanos pode apresentar um papel relevante e útil no processo de identificação de um cadáver ou restos cadavéricos [2]. Este processo de identificação passa por analisar a variabilidade genómica do JCV, encontrando-se de acordo com a literatura diferentes genótipos do JCV associados a diferentes regiões geográficas mundiais [4].

Desta forma, a Virologia torna-se um pilar essencial como meio auxiliar no campo médico-legal potenciando o sucesso da investigação forense.

#### 1.1.1. Contextualização Histórica

A identificação dos poliomavírus ocorreu em 1953, quando Ludwig Bruto, casualmente, isolou o primeiro poliomavírus como agente contaminante de culturas células de ratinhos com vírus de leucemia murina [5]. Trabalhos desenvolvidos por *Gross* e colaboradores em 1953, permitiram verificar que o vírus uma vez inoculado em ratinhos, não só causava o aparecimento de leucemia bem como de adenocarcinomas na glândula parótida [6].

Cumulativamente, a inoculação em ratinhos de extratos de tumores infectados com o vírus, induzia a formação de vários tipos de tumores diferentes [7]. Este vírus foi denominado como poliomavírus em consequência da sua capacidade de provocar vários tumores em ratinhos (em grego *poli* significa vários e *oma* refere-se a cancro) [8].

Os poliomavírus pertencem à família *Polyomaviridae* e caracterizam-se pela sua forma icosaédrica sem envelope e um pequeno genoma circular de DNA de cadeia dupla de aproximadamente 5000 pares de base (pb) [3]. A família *Polyomaviridae* tem a capacidade de infetar dois grupos de hospedeiros: um que inclui aves e outro que inclui os mamíferos [9, 10].

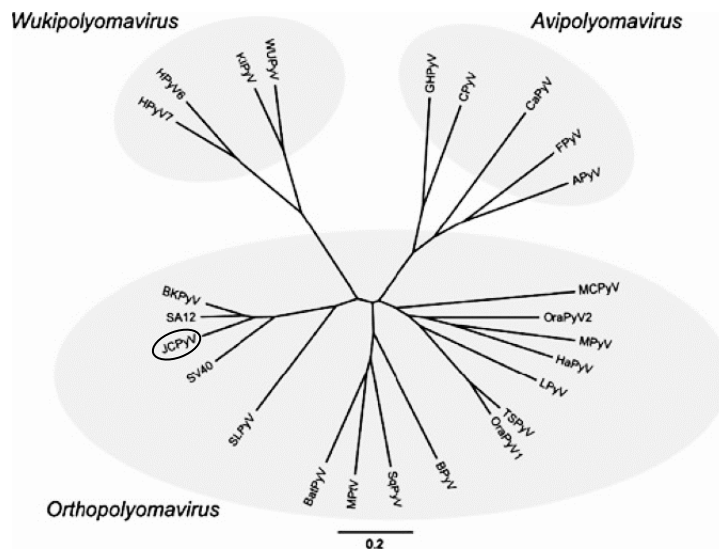
Atualmente conhecem-se dez espécies de poliomavírus humano: o vírus BK (BKV), o vírus JC (JCV), o vírus KI (KIV), o vírus WU (WUV), o vírus das células de Merkel (MCV), o poliomavírus humano 6 (HPyV6), o poliomavírus humano 7 (HPyV7), o poliomavírus associado à tricodisplasia espinulosa (TSPV), o poliomavírus humano 9 (HPyV9) e o poliomavírus humano 10 (HPyV10) [3, 11-17].

Designado pelas iniciais do nome do doente, em que foi isolado pela primeira vez, o vírus JC (JCV - *John Cunningham* vírus) é um dos poliomavírus atualmente reconhecido como causador de doença em humanos, nomeadamente a Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva (LEMP) [18-20].

A descoberta dos poliomavírus humanos restantes é recente, tendo na sua maior parte alcançada a partir de 2007. Depois do JCV e do BKV, foi descoberto o poliomavírus KIV. Seguiu-se o WUV, o MCV, o HPyV6 e HPyV7, o TSV, o HPyV9 e por último o HPyV10 [11-16]. Até ao momento, só o BKV, o JCV, o MCV e o TSV demonstraram estar associados a patologia em seres humanos [12, 16, 21, 22].

### 1.1.2. Classificação

Os vírus pertencentes à família *Polyomaviridae* são divididos em três géneros: o *Wukipolyomavirus* e o *Orthopolyomavirus* que têm a capacidade de infetar mamíferos e o *Avipolyomavirus* capaz de infetar aves (Figura 1) [9].



**Figura 1** - Relação filogenética entre os poliomavírus com base na sequência genómica (adaptado de *Johns et al.* 2011) [9].

Esta classificação está de acordo com o Comité Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV) e é baseada nos seguintes critérios [9]:

a) O Hospedeiro: Os poliomavírus que infetam os mamíferos apresentam uma grande especificidade para o tecido do hospedeiro *in vivo* e um crescimento celular eficiente *in vitro*. Por outro lado, o poliomavírus que infeta as aves exibe uma ampla gama de hospedeiros e é capaz de se replicar numa variedade de tecidos [9, 23].

b) Capacidade de transformação oncogénica *in vitro* e *in vivo*: Os Poliomavírus que infetam os mamíferos são capazes de imortalizar células *in vitro*, incluindo células humanas, e induzir tumores *in vivo*. As proteínas reguladoras dos poliomavírus intervêm no ciclo celular interferindo com proteínas chave do hospedeiro como a p53 e a proteína do retinoblastoma (pRB) [7].

c) Os sintomas da infeção primária: Em geral, a infeção primária dos poliomavírus capazes de infetar mamíferos não está associada a sintomas clínicos [24, 25]. Contudo, existem exceções e no caso de JCV e BKV, as consequências desta infeção primária em doentes imunossuprimidos, como doentes transplantados ou portadores do vírus da imunodeficiência humana (VIH), são muito severas. Por outro lado, dois dos poliomavírus que infetam aves podem levar a doenças inflamatórias agudas e crónicas [26].

d) A estrutura genómica: Os poliomavírus que infetam os mamíferos e as aves também diferem na sua estrutura genómica. Por exemplo, em diversas aves, ocorre a expressão da proteína VP4, que não existe nos poliomavírus que infetam os mamíferos [27, 28].

Com base nestes critérios, a divisão dos poliomavírus capazes de infetar os mamíferos foi feita em dois géneros: o *Wukipolyomavirus* que contém os poliomavírus humanos KIV, WUV, HPyV6 e HPyV7 e o *Orthopolyomavirus*, que inclui todos os outros poliomavírus de mamíferos, à exceção do HPyV10 que ainda se encontra por classificar (Figura 1) [9].

## 1.2. O JCV como Modelo de Estudo

### 1.2.1. Epidemiologia

Diversos estudos indicam que uma elevada percentagem da população está infetada com JCV [29-31].

Aproximadamente 60 a 80% da população humana apresenta anticorpos anti-JCV, o que indica a ocorrência de algum contacto com este agente [30]. Estas taxas de prevalência apresentam elevada variação entre as populações e faixa etária [32]. Cumulativamente, aproximadamente um quinto da população mundial excreta JCV na urina [33]. Só uma fração muito pequena destes indivíduos apresenta sintomatologia, no entanto, isto ocorre apenas na presença de alterações subjacentes ao sistema imunológico, o que revela que indivíduos imunocompetentes apresentam mecanismos imunológicos capaz de controlar a infeção por JCV [34].

Apesar das limitações dos atuais estudos epidemiológicos, admite-se que a seroconversão ocorre precocemente, sensivelmente aos seis anos de idade. Estes dados suportam o facto da infeção do poliomavírus humano JC ser adquirido durante a primeira infância [31].

### 1.2.2. Morfologia

Os viriões do JCV são partículas com cerca de 40-45 nm de diâmetro [35]. São compostos por proteínas estruturais VP1, VP2 e VP3; por uma molécula de DNA de cadeia dupla e circular, com o peso molecular de  $3,2 \times 10^6$  daltons e aproximadamente 5 Kb de tamanho, a qual está associada a quatro histonas nucleossomais celulares, a H2A, a H2B, a H3 e a H4 [3, 36, 37].

A cápside apresenta uma simetria icosaédrica e é composto por 72 capsómeros pentaméricos (Figura 2). Apenas as moléculas de VP1 estão expostas na superfície da cápside e o virião é constituído por cerca de 12% de DNA viral e 88% de proteínas [38, 39].



**Figura 2** - Representação da cápside do JCV (adaptado de Nasimul Ahsan, 2006) [40].

### 1.2.3. Estrutura Genómica

A análise genómica dos poliomavírus permite observar uma ampla homogeneidade genética entre os vários vírus [3]. O JCV possui uma semelhança de 75% em relação ao vírus BK e 69% ao SV40, o que sugere uma relação evolucionária comum [3, 41].

O genoma dos poliomavírus divide-se em três regiões: uma região precoce, uma região tardia e uma região reguladora não codificante (Figura 3). A transcrição de genes das regiões precoce e tardia inicia-se numa região reguladora comum (ORI – *origin of replication*) [3, 41].



T, encontram-se algumas envolvidas na replicação, tal como a proteína A [47, 48]; o complexo de DNA-polimerase  $\alpha$ -primase [49]; proteínas, tais como a pRb e a p53 [50, 51].

No início da infeção, o antígeno T liga-se a três locais específicos na região reguladora de forma a modular os transcritos da região precoce e da região tardia. A ligação ao sítio I regula a transcrição da região precoce e pode estar envolvida na destabilização da cadeia dupla de DNA ou suportar um passo mais tardio, quando atua como uma DNA helicase [52, 53]. A ligação ao sítio II regula a replicação viral, enquanto a função da ligação de baixa afinidade ao sítio III continua desconhecida.

O Antígeno t executa uma função auxiliar, em cooperação com o antígeno T (Tabela 1). Contém diversos domínios funcionais entre os quais um que interage com a fosfatase 2A (PP2A), inativando-a, processo envolvido na transformação celular [54, 55].

A região tardia codifica duas classes de proteínas: as proteínas estruturais da cápside e a agnoproteína. As proteínas estruturais da cápside são a VP1 (354 aminoácidos), a VP2 (344 aminoácidos) e a VP3 (225 aminoácidos) as quais são transcritas após o início da replicação genómica [56]. Ocorre a partir da ORI na direção oposta à precoce e a partir da cadeia de DNA complementar. A tradução de um gene tardio também está sujeita a um processo de *splicing*. Neste caso, a partir de um dos mRNAs gera-se a proteína VP1 e a partir de outro são geradas as proteínas VP2 e VP3 [44].

A proteína VP1 está localizada mais externamente à cápside e constitui aproximadamente 70% das proteínas totais do poliomavírus. Está envolvida na interação do vírus com o recetor presente na célula hospedeira no momento da adsorção viral, sendo também responsável pela capacidade hemaglutinante do vírus, *in vitro* e *in vivo* (Tabela 1) [57, 58]. Anticorpos anti-VP1 têm a capacidade de neutralizar a infeção e prevenir a hemaglutinação [59].

As VP2 e VP3 são duas proteínas internas que são necessárias para a encapsulação adequada do genoma viral após a replicação, formando complexos com a proteína VP1 através do seu terminal carboxilo permitindo, assim, a formação de viriões (Tabela 1) [60, 61].

A agnoproteína (71 aminoácidos) difere de todas as outras proteínas codificadas pelas regiões precoce e tardia, por se localizar primariamente, no citoplasma e na região perinuclear das células infetadas [62]. A distribuição intracelular da agnoproteína sugere que ela participa na reunião da cápside viral,

na lise celular e na libertação do vírus da célula hospedeira [62]. Embora a função exata seja desconhecida, é conhecida como sendo essencial para a propagação eficiente do vírus em cultura de células [63, 64].

**Tabela 1** – Proteínas do JCV e respetivas principais funções.

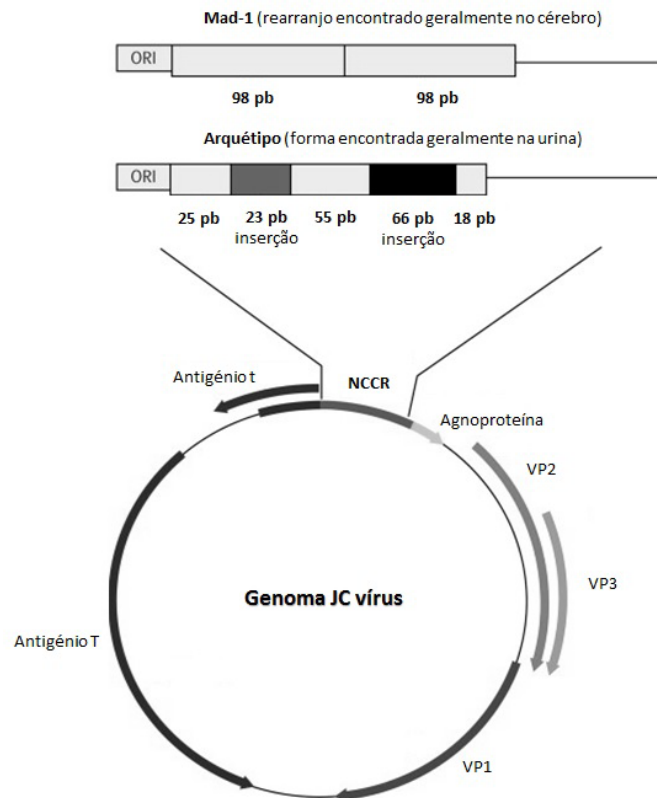
Proteína	Função
Antigénio T	Essencial na replicação bidirecional do genoma bem como na transcrição dos genes precoces e tardios
Antigénio t	Auxilia a replicação bidirecional do genoma em cooperação com o Antigénio T
VP1	Interage com o recetor das células do hospedeiro, sendo responsável pela capacidade hemaglutinante do vírus
VP2	Responsáveis pela encapsulação adequada do genoma viral
VP3	
Agnoproteína	Auxilia na formação da cápside viral, na lise celular e na libertação dos virões, sendo essencial na propagação do vírus

A agnoproteína parece facilitar o transporte de VP1 do citoplasma para o espaço perinuclear, durante a infeção lítica [65]. Esta proteína desempenha funções reguladoras na transcrição viral, na tradução e na formação/maturação dos viriões, porém não faz parte dos viriões maduros (Tabela 1). A sua presença resulta na supressão do crescimento celular, quando esta se liga diretamente à proteína supressora tumoral - p53, e na supressão da proliferação celular devido à desregulação do ciclo celular (acumulação de células na fase G2/M) [66]. A agnoproteína interage também com antigénio T, influenciando a replicação e transcrição do DNA viral, e inibe a reparação do DNA celular quando este sofreu algum dano [66, 67]. O facto de alguns poliomavírus humanos não possuírem sugere que há diferenças na regulação da maturação viral e na capacidade de transformação celular [68]. A região reguladora não codificante (NCCR) é o local de controlo da replicação e da transcrição do DNA viral e situa-se entre as regiões codificantes precoce e tardia, contendo a origem da transcrição de ambas [69, 70]. É composta pela origem de replicação bidirecional, por locais de ligação do antígeno T grande e por locais de ligação de fatores de transcrição que regulam a transcrição de genes precoces e tardios (Tabela 1) [23, 71].

Esta região é hipervariável nas diversas estirpes, talvez devido a rearranjos genéticos como resultado da adaptação a diferentes ambientes [72]. Provavelmente essa diversidade confere uma vantagem seletiva para o vírus, permitindo uma replicação e transcrição mais eficientes do genoma viral [73]. Estudos realizados *in*

*in vitro* demonstraram a ocorrência de mutações, deleções e duplicações nas regiões de ligação de fatores de transcrição, podendo estas variações alterar o funcionamento normal do promotor e do *enhancer*, influenciando desta forma a replicação [74, 75].

Atualmente, admite-se a ocorrência de duas formas de organização do genoma de JCV - o arquétipo e a forma rearranjada (Figura 4).



**Figura 4** - Representação esquemática das duas formas de organização do genoma do JCV. A região reguladora não codificante detetada no cérebro de indivíduos com LEMP geralmente consiste em repetições de 98 pb, como na estirpe Mad-1. A maioria dos genomas isolados a partir de amostras de urina de indivíduos saudáveis são idênticas à forma arquétipo. O arquétipo do JCV tem um elemento de 98 pb com uma inserção de 23 pb e uma inserção de 66 pb (adaptado de *Tan et al.* 2010) [76].

O arquétipo é a forma conservada mais frequente na população humana e é encontrado primariamente no rim e excretado na urina [77, 78]. No arquétipo, a NCCR está organizada em seis domínios: A (25 pb), B (23 pb), C (55 pb), D (66 pb), E (18 pb) e F (Figura 4) [79]. Os rearranjos que são encontrados no arquétipo do JCV podem influenciar a distribuição do vírus pelos tecidos e o seu potencial de replicação [77, 78, 80, 81].

### 1.2.4. Ciclo Viral

Todos os poliomavírus dispõem de tipos celulares específicos para a infecção lítica. A especificidade do JCV para os seres humanos tem comprometido o desenvolvimento da investigação da LEMP utilizando modelos animais [82]. *In vivo*, a infecção por JCV é provavelmente restrita às células do epitélio renal, células do estroma de amígdalas, linhagens de células derivadas da medula-óssea, oligodendrócitos e astrócitos [82-87].

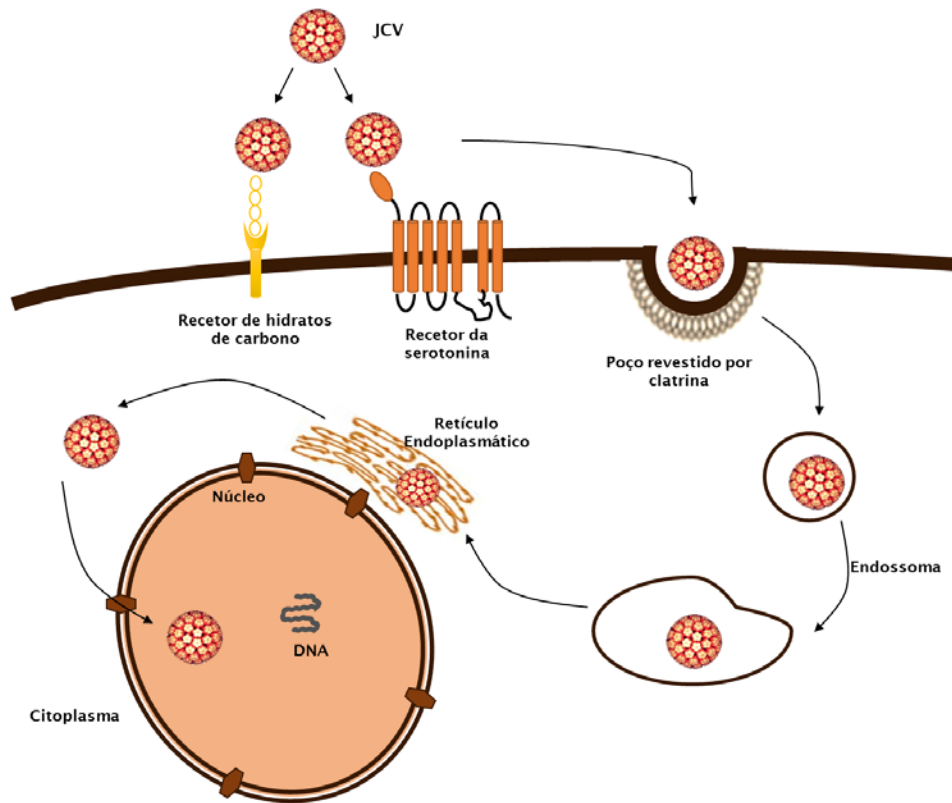
Pensa-se que o vírus estabelece uma baixa persistência ou infecções latentes no rim e nas linhagens celulares derivadas da medula-óssea devido à fraca replicação viral neste tipo de células [88]. Uma vez no sistema nervoso central (SNC), o vírus replica-se vigorosamente em oligodendrócitos, conduzindo à doença desmielinizante LEMP. O principal tropismo de JCV para células gliais humanas não é totalmente compreendido, no entanto, múltiplos fatores parecem ser responsáveis por contribuir para a replicação viral robusta neste tipo de células.

A célula hospedeira e fatores específicos de transcrição e replicação de cada espécie contribuem significativamente para a especificidade restrita exibida por JCV e outros membros do género. Além disso, a interação entre os recetores virais colabora no aumento do tropismo celular [89-91].

Em todos os poliomavírus estudados até ao momento, a adsorção das partículas virais a recetores específicos das células hospedeiras, envolve resíduos de ácido siálico de gangliosídeos que são reconhecidos pela proteína VP1 [92]. Além do ácido siálico como recetor, foi demonstrado recentemente o uso de recetores da serotonina, 5HT<sub>2A</sub>R, para infetar as células gliais [93].

### 1.2.5. Entrada, Replicação e Transcrição do JCV

Ao contrário de outros poliomavírus, o JCV penetra nas células por endocitose dependente de clatrina (Figura 5) [94, 95]. O JCV desloca-se de poços revestidos por clatrina para novos endossomas [96]. Em 12 a 16 horas após a infecção, o JCV integra o retículo endoplasmático (RE), sugerindo a preparação de uma infecção produtiva [97].



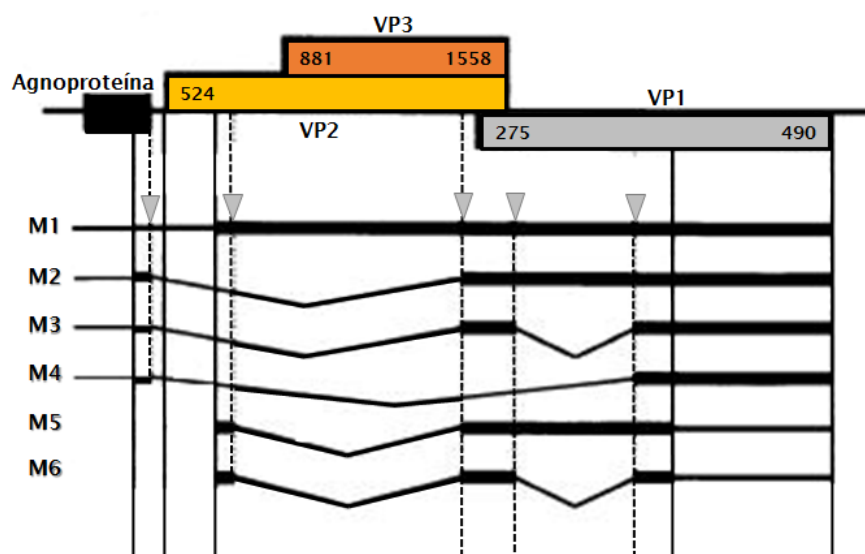
**Figura 5** - Representação dos eventos iniciais envolvidos na infecção por JCV. O JCV inicialmente liga-se a receptores de hidratos de carbono (que contêm resíduos de ácido siálico) na superfície da célula ou a receptores de serotonina em células humanas da glia. O vírus é então incorporado em poços revestidos por clatrina, formando endossomas. O vírus transita para o retículo endoplasmático que causa alterações conformacionais nos viriões. Posteriormente, é transportado para o citoplasma, admitindo-se que o JCV entre no núcleo através de poros nucleares (adaptado de *Ferenczy et al.* 2012) [42].

Um segundo passo crítico no RE é a translocação do virião através da membrana. Resultados de estudos recentes, apontam para que os poliomavírus utilizem a degradação associada ao RE como via de acesso ao citoplasma, através de um poro [98].

Após a entrada no citoplasma, as baixas concentrações de cálcio encontradas pelo vírus no citosol podem perturbar a estabilidade da cápside. Esta desestabilização tem sido associada à liberação de pentâmeros virais [99]. Como consequência, sinais de localização nuclear são expostos, resultando no transporte deste virião parcialmente desmontado para o núcleo através de um poro nuclear [100-103]. É provável que alguma combinação de VP1, VP2 e VP3, permaneça associada ao genoma viral durante a entrada nuclear, como minicromossomas que contêm o genoma viral e são transcritos [102].

Nesta fase, é iniciada a transcrição de um pré-mRNA que por *splicing* alternativo origina, geralmente, dois transcritos de mRNA precoce que codificam o antígeno T e o antígeno t. No entanto, já foi descrita a presença de outros transcritos de mRNA que codificam antígenos diferentes e que teriam sido originados a partir de mecanismos de *splicing* alternativo [104, 105].

Relativamente aos transcritos de mRNA tardio, o JCV pode apresentar seis tipos – M1 a M6 (Figura 6) [106]. Os diferentes padrões de *splicing* na sequência *leader* (sequência a montante da *open reading frame* – ORF – para as proteínas da cápside) determinam a presença ou ausência da ORF da agnoproteína. A maioria dos transcritos de mRNA tardio não sofre *splicing* na sequência *leader* e por isso a ORF da agnoproteína é codificada. O transcrito M1 traduz a agnoproteína, a VP2 e a VP3. Do transcrito M2 resulta a agnoproteína e a VP1. E dos transcritos M3, M4, M5 e M6 gerados a partir de diferentes locais de *splice*, resultam proteínas tardias incompletas. Os transcritos M3 e M4 e provavelmente os transcritos M5 e M6 são tipos de mRNA únicos do JCV [106].



**Figura 6** - Transcritos de mRNA tardio do JCV: M1 a M6. Os locais de *splice* alternativo (triângulos) foram identificados nas posições nucleotídicas 490, 730, 1425, 1583 e 1952 (adaptado de *Shishido-Hara et al.* 2012) [106].

Assim, torna-se cada vez mais claro que os poliomavírus utilizam um percurso complexo para finalmente ter acesso ao núcleo da célula hospedeira. Mais estudos serão necessários para determinar quais as moléculas recetoras que contêm os resíduos de ácido siálico para o qual JCV se liga para iniciar uma infecção produtiva, entre outros detalhes.

O JCV tem uma replicação limitada no hospedeiro. Há duas formas identificadas para a replicação em tipos de células não permissivas: a transcrição de genes precoces ou a replicação do DNA. A ativação da transcrição dos genes tardios só é iniciada após a replicação do DNA, embora a replicação do DNA não seja necessária para a atividade de um gene tardio *in vitro* [107, 108].

Existem alguns fatores da célula hospedeira que são necessários e podem contribuir para a transcrição precoce do JCV. O antígeno T, a polimerase do DNA do hospedeiro, e outras proteínas celulares, participam na replicação do DNA do JCV [109].

A cinética da replicação JCV indica que se trata de um processo lento. Mesmo nas células permissivas nas quais o antígeno T já está presente, a replicação do DNA é indetetável por vários dias [110]. A replicação do DNA pode ser detetada entre 3 a 5 dias após a infecção, em tipos de células suscetíveis e continua por várias semanas [89].

Verifica-se que a transcrição é regulada por fatores celulares específicos, enquanto a replicação do DNA é provavelmente regulada por fatores específicos da espécie em questão. Esta última especificidade, que pode ser de um componente ou de componentes da DNA polimerase, permite a replicação do DNA de JCV apenas em primatas [89]. A replicação do DNA de JCV não está bem estudada como a do SV40, mas é provável que seja semelhante. Admite-se que na replicação do DNA, o antígeno T forma um hexâmero duplo e atua como uma helicase, formando complexos com a topoisomerase I, com a DNA-polimerase, e com a proteína de replicação A. O Antígeno T, também contribui para o alongamento da cadeia de DNA pela sua interação com a polimerase de DNA, proliferando antígenos nucleares e o fator de replicação C. A replicação prossegue bidireccionalmente e conduz a dois círculos de DNA interligados, por meio da ação das topoisomerases I e II [53].

Com o objetivo de promover um ambiente favorável à replicação do DNA, o antígeno T liga-se a proteínas celulares e o DNA induz sinais de modo a levar células quiescentes à fase S [111-113].

O antígeno t tem sido menos estudado, no entanto, parece haver uma relação com a família de proteínas Rb bem como com a PP2A [109]. A interação com a PP2A aparenta prevenir a desfosforilação da agnoproteína e, assim, faz com que se desenrole uma replicação viral eficiente [114].

O ciclo replicativo tem a duração de aproximadamente 40 horas e as proteínas virais maduras são libertadas aquando da lise celular.

O genoma do JCV está fechado, superenrolado e circular, estando ligado a nucleossomas derivados das quatro histonas centrais da célula hospedeira. Uma vez que o genoma é integrado na célula infetada, ele adquire a histona H1 e assemelha-se a uma cromatina celular [36, 115-117].

No núcleo, o genoma do JCV serve como um molde para a RNA polimerase II do hospedeiro. A transcrição dos genes precoces do JCV ocorre na ausência de síntese proteica e utiliza apenas proteínas do hospedeiro. A regulação da transcrição é dependente da disponibilidade de fatores de transcrição da maquinaria do hospedeiro.

Embora as funções da proteína viral tardia agnoproteína não se encontrem completamente elucidadas, foi postulado ter capacidade de interagir com o antigénio T grande para reduzir o aumento da expressão genética tardia [67]. A proteína celular conhecida por estimular a expressão de genes tardios virais é a Tst-1, também denominada por Out-6 ou SCIP [118]. Esta proteína aumenta a expressão dos genes precoce e tardio e liga-se a antigénios T grandes e pequenos, podendo sinergicamente aumentar tanto a expressão destes genes como a presença de ambos os antigénios [118, 119].

### 1.2.6. Modos de Transmissão, Infecção Inicial e Latência do JCV

Os mecanismos de transmissão e propagação do JCV ainda não estão totalmente esclarecidos. No entanto, existem três hipóteses de transmissão: por via gastrointestinal [120], por via respiratória [85, 121], e maioritariamente de pais para filhos, por co-habitação prolongada [122, 123].

Trabalhos desenvolvidos por Suzuki e colaboradores em que recolheram amostras de urina a partir de uma população de Japoneses-Americanos cujos pais e avós eram originalmente japoneses e migraram para os EUA, observaram que os dois genótipos mais frequentes do JCV detetados são coincidentes com os que ocorrem tipicamente no Japão. Tendo em conta estes resultados, presume-se que o JCV seja transmitido, principalmente, de pais para filhos durante a convivência de longo prazo [123].

Também estudos desenvolvidos por Kunitake e colaboradores, demonstraram a transmissão horizontal do JCV ao selecionar famílias em que ambos os pais e as crianças excretavam JCV na urina. Fragmentos de DNA do JCV foram amplificados por PCR e comparados por meio de análise de fragmentos de

restrição (RFLP) [122]. Como resultado, identificou-se o mesmo genótipo de JCV tanto na descendência como nos progenitores das seis famílias, exceto uma família. No total, genótipos comuns foram detetados em metade das crianças. Como a maioria dos indivíduos são infetados durante a infância, a presença de genótipos comuns em crianças e pais indica que a transmissão de JCV de pais para filhos ocorre com frequência [122]. Com base neste estudo, estima-se que cerca de 50% da transmissão JCV entre seres humanos ocorre por esta via. Esta via de transmissão deve ser diferenciada da vertical, uma vez que os dados mostram que o JCV foi transmitido não só de mães, mas também de pais [122].

Foi descoberto que em duas famílias, vários filhos excretaram o mesmo tipo de JCV, o que sugere também uma via de transmissão de JCV entre irmãos. Uma criança que foi infetada pelo JCV transmitido pela mãe pode ter expandido uma descendência genotípica de JCV durante a infeção primária. Este genótipo por sua vez, pode ter causado a infeção secundária noutras crianças. No entanto, este modo de transmissão parece ser raro [122]. Estes autores defendem que o modo de transmissão de JCV revelado neste estudo, a transmissão de pais para filhos, poderá permitir que o JCV persista na população humana por um longo tempo [122, 124].

O vírus também foi detetado por PCR em amostras de fezes e é prevalente em esgotos e rios de todo o mundo. Isto levou à hipótese de que a transmissão pode ocorrer a partir da ingestão de água inquinada [125, 126].

O vírus JC exhibe uma complexa interação com células do sistema imunitário, em que a determinação da resposta imune à infeção deste vírus tem sido geralmente limitada a doentes com sistemas imunitários alterados nos quais JCV replica e provoca a LEMP. Além disso, determinadas células do sistema imunitário são suscetíveis ao JCV e desempenham um papel crítico no ciclo de vida do vírus, bem como na patologia LEMP [42].

Embora o vírus JC seja conhecido por agente causador da LEMP, as vias de transmissão viral inicial e posterior disseminação para o cérebro continuam por ser totalmente elucidadas.

A via hemática da infeção do SNC parecia provável após ter sido descoberto que o JCV interagiu com as células B no cérebro, amígdalas e medula óssea e que se replicava em níveis baixos nas células B [82-84, 87, 127, 128]. Alguns anos mais tarde, foi demonstrado que JCV poderia também infetar as células progenitoras hematopoiéticas [85, 129]. Além disso, ainda foram encontradas evidências de que um dos sítios iniciais de infeção poderia ser nas amígdalas [86].

Estas descobertas conduziram a um modelo em que a infecção primária ocorre mais provavelmente em qualquer célula do estroma ou células imunes do sistema respiratório superior, quer por inalação ou por via oral respiratória através da ingestão de material contaminado com o vírus [130]. O vírus é, então, transportado para a medula óssea e para os rins por linfócitos infetados, onde pode persistir durante a vida do hospedeiro. Após a imunossupressão ou uma mudança nas células imunitárias, o vírus mobiliza-se a partir da medula óssea e atravessa a barreira hematoencefálica, seja isoladamente ou em conjunto com uma célula B. Uma vez que os oligodendrócitos são infetados, a infecção lítica começa [84]. Também é possível que o vírus se replique nos rins, entre na circulação periférica, instala-se em tecidos linfóides tais como a medula óssea, e em seguida é submetido a rearranjos da região reguladora.

Como alternativa, o cérebro ou o rim podem servir como um local de latência [131]. O DNA do vírus tem sido encontrado tanto em cérebros de dadores saudáveis como de imunocomprometidos sem LEMP ou outras doenças neurológicas [132-135]. Isto sugere que o JCV tem acesso ao SNC, antes do início da doença e pode viajar até ao cérebro de alguns indivíduos imunocompetentes. É possível que, após a infecção inicial por JCV e disseminação do vírus, possivelmente por meio de precursores hematopoiéticos ou células B, o vírus atinja as células gliais do cérebro, onde se mantém latente. Esta observação leva a crer que o JCV se instala no cérebro e permanece latente a não ser que haja mudanças na região reguladora, que pode ocorrer antes ou durante a latência no cérebro, em que os fatores de ligação ficam disponíveis na presença de imunossupressão.

Em ambos os modelos de latência viral, mesmo que os locais de latência possam ser diferentes, eventos semelhantes devem ocorrer na progressão para a LEMP [42].

A LEMP é uma infecção destrutiva no (SNC) que provoca défices neurológicos associados à desmielinização [18]. A característica central da patologia associada ao JCV é a infecção dos oligodendrócitos, o que leva à lise das células. A infecção dissemina-se em torno dos oligodendrócitos e resulta na destruição focal de mielina [18]. Os oligodendrócitos infetados têm coleções de partículas virais no núcleo, que dão a aparência de corpos de inclusão e perda da estrutura da cromatina. O tamanho do núcleo também pode aumentar de tamanho 2 a 3 vezes. Os oligodendrócitos morfológicamente normais também podem ser infetados com o vírus. Estas células estão geralmente presentes em áreas onde a mielina parece

ser normal. A natureza multifocal das lesões sugere uma propagação hematogénica do vírus para o cérebro. Em menor medida, também os astrócitos são infetados com JCV. Essas células parecem grandes, os núcleos são irregulares e lobulados, e aparecem em fase pré-mitótica mas não se tornam neoplásicas. Astrócitos reativos também estão presentes, embora seja uma evidência pouco sustentada [76]. Embora os neurónios sejam raramente infetados por JCV, a desmielinização leva à disfunção axonal, e o axónio desmielinizado é suscetível a lesões por produtos celulares libertados pelas células da glia. Esta lesão axonal pode resultar numa perda retrógrada do corpo celular neuronal [135].

O JCV é um vírus neurotrópico que infeta apenas os seres humanos. Desta forma, a investigação da patogénese do JCV tem sido dificultada pela ausência de um modelo animal [76].

A sequência da região reguladora do vírus normalmente encontrada na urina é conhecida como sequência arquétipo, por se julgar que todas as outras formas evoluem a partir desta. A sequência da região reguladora do vírus isolado a partir de líquido cefalorraquidiano e de tecido cerebral dos pacientes com LEMP é denominado de vírus protótipo ou vírus neurotrópico, apresentando rearranjos, incluindo duplicações, repetições *em tandem*, inserções e deleções. É então provável que os rearranjos observados na região reguladora ocorram durante a imunossupressão sendo este processo necessário para a reativação do vírus e subsequente infeção do SNC [18, 136, 137].

### 1.3. Implicações Médico-Legais

O aumento no número de cadáveres não identificados tornou-se um problema forense em diversas áreas pelo mundo devido à crescente internacionalização, das interações sociais e das ocorrências de desastres de grande escala [2].

Geralmente, impressões digitais e DNA humano são usados para a identificação individual. No entanto, mesmo executando a genotipagem do DNA de um cadáver não identificado, mantém-se impossível identificar imediatamente o indivíduo, se não houver amostras de referência para comparação. Deste modo, um método que reduz rapidamente as possíveis identidades dos cadáveres não identificados, fornecendo informações geográficas seria extremamente valioso [2].

Recentemente, a variabilidade genética do JCV foi proposta como útil na inferência da origem geográfica dos seus portadores [1]. Por exemplo, quando existe um cadáver não identificado num episódio de crime, não se pode estabelecer as origens da vítima do crime se não houver bens materiais que o revelem, testemunhas ou impressões digitais no registo. Nesses casos, é possível recolher uma amostra biológica, nomeadamente urina ou tecido renal, para detetar o JCV. Caso seja positivo, a partir do conhecimento dos vários genótipos e da sua distribuição mundial, pode-se inferir a origem geográfica da vítima.

Após a infeção primária, que ocorre na primeira infância, o JCV persiste no tecido renal da maioria dos casos, sendo excretado na urina. As mesmas estirpes virais são mantidas nos rins e excretadas na urina durante toda a vida, apesar da realocação de um hospedeiro [138].

Realizando alinhamentos genéticos de sequências de DNA viral, podemos realizar a identificação dos diferentes genótipos do JCV, encontrando-se já identificados diversos genótipos associados a distintas localizações geográficas [1].

#### 1.3.1. Classificação Genotípica do JCV

Diferentes genótipos do vírus JC são descritos em diferentes partes do mundo. Estes genótipos são classificados com base na sequenciação nucleotídica do genoma viral [139].

Esta análise pode ser feita a partir da região IG (intergénica): de 610 pb, que compreende as extremidades 3' dos genes VP1 e antígeno-T; a partir de uma região de 215 pb, próxima à extremidade 5' do gene VP1; ou com base na sequência de toda a região codificante do genoma de, aproximadamente, 4854 pb [139-142]. Na sequência genómica completa a região de 1800-2400 pb, que compreende a região IG é a mais polimórfica e é, potencialmente, a mais informativa filogeneticamente [139].

Baseados na sequência genómica, vários autores classificaram o JCV em tipos e em subtipos. Os tipos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 e os subtipos 1A, 1B, 2A, 2B, 2C, 3A e 3B são classificações realizadas por por Jobs e colaboradores, sendo a nomenclatura aplicada nesta dissertação (Tabela 2) [142].

**Tabela 2** – Lista de 22 tipos de JCV classificada de acordo com Jobs e colaboradores (1998) [142].

Genotype	Strain no.	Ethnic group	Sex/age (years)	Disease/sample	Place*	GenBank acc. no.	Reference
<b>Type 1</b>							
1A	Mad-1	Caucasian	M/38	Hodgkin's/PML brain	WI	J02227	Frisque <i>et al.</i> (1984)
1A	#124	Caucasian	M/52	MS/urine	CA	AF015526	Agostini <i>et al.</i> (1998b)
1B	#123	Caucasian	M/55	MS/urine	CA	AF015527	Agostini <i>et al.</i> (1998b)
<b>Type 2</b>							
2A	Tokyo-1	Japanese	M/70	TB/PML brain	Japan	AF030085	Agostini <i>et al.</i> (1998c)
2A	#224	Hispanic	M/72	MS/urine	CA	AF015529	Agostini <i>et al.</i> (1998c)
2A	#225	Native American	F/26	Unknown/urine	NM	AF015530	Agostini <i>et al.</i> (1998c)
2A	#226	Native American	F/78	Unknown/urine	NM	AF015531	Agostini <i>et al.</i> (1998c)
2B	GS/B	German	Unknown	Lymphoma/PML brain	Germany	M20322	Loeber & Dörries (1988)
2B	#223	African American	M/36	HIV/urine	CA	AF015532	Agostini <i>et al.</i> (1998c)
2B	#227	Caucasian	M/41	MS/urine	CA	AF015533	Agostini <i>et al.</i> (1998c)
2C	#228	Native American	M/63	Unknown/urine	NM	AF015534	Agostini <i>et al.</i> (1998c)
2C	#229	Caucasian	M/48	HIV/urine	CA	AF015535	Agostini <i>et al.</i> (1998c)
2C	#230	African American	M/44	MS/urine	CA	AF015536	Agostini <i>et al.</i> (1998c)
<b>Type 3</b>							
3A	#308	African	Unknown	Unknown/urine	Tanzania	U73500	Agostini <i>et al.</i> (1997a)
3A	#309	African	Unknown	Unknown/urine	Tanzania	U73500†	Agostini <i>et al.</i> (1997a)
3A	#310	African	Unknown	Unknown/urine	Tanzania	U73500†	Agostini <i>et al.</i> (1997a)
3A	#312	African American	M/41	MS/urine	CA	U73502	Agostini <i>et al.</i> (1997a)
3B	#311	African American	M/59	Control/urine	MD	U73501	Agostini <i>et al.</i> (1997a)
<b>Type 4</b>	#402	Caucasian	M/63	MS/urine	CA	AF015528	Agostini <i>et al.</i> (1996)
<b>Type 5</b>	#501‡	Caucasian	M/30	MS/urine	CA	AF015684	Agostini <i>et al.</i> (1998c)
<b>Type 6</b>	#601	African American	F/35	SLE/PML brain	NJ	AF015537	Unpublished data
<b>Type 7</b>	Tai-3	Chinese	Unknown	RA/urine	Taiwan	U61771	Ou <i>et al.</i> (1997)

PML, *progressive multifocal leukoencephalopathy*; TB, *tuberculosis*; MS, *multiple sclerosis*; HIV, *human immunodeficiency virus*; SLE, *systemic lupus erythematosus*; RA, *rheumatoid arthritis*

\* American state or country.

† Described in relation to strain 308 using the same accession number.

‡ Previously designated as strain gX01 by Agostini *et al.* (1998).

Sabe-se, também, que diferentes subtipos de JCV raramente infetam o mesmo hospedeiro humano e que, devido à cronicidade da infeção, a deteção e a identificação desses vírus podem servir como marcadores de migração humana e possível identificação da origem geográfica individual [143].

### 1.3.2. Epidemiologia Molecular do JCV

A sequenciação genómica do JCV indica a existência de oito principais genótipos (numerados de 1 a 8 em que o tipo 5 é um *minor member* do tipo 3) e numerosos subtipos, estando os genótipos principais associados a populações nas grandes massas continentais (Figura 7) [142, 144].

A presença de tipos distintos do poliomavírus humano JC nas diferentes populações humanas, com sequências que divergem em cerca de 1 a 3%, sugere que foi originado numa população ancestral, provavelmente em África (Tipo 6), diferenciando-se com o decorrer das gerações [145].

Os tipos 1 e 4 são encontrados geralmente em indivíduos europeus e europeus-americanos [3, 146, 147]. Os principais genótipos encontrados na Ásia são os tipos 2 e 7 [148, 149]. O tipo 2A é associado a asiáticos e populações nativas americanas, enquanto o tipo 2D e 7C são encontrados na Ásia e no sul asiático. O vírus JC tipo 3 difere dos dois outros genótipos (1 e 2) em 2,2% e 1,3% respetivamente, e pode ser encontrado em pessoas africanas e afro-americanas [141]. O tipo 5 aparece como uma combinação de sequências do tipo 6 e 2B [139]. O tipo 6 é representativo das populações africanas. Finalmente, um novo genótipo do vírus JC, o tipo 8, é identificado em populações ocidentais do Pacífico. Curiosamente, o tipo 8A é encontrado somente em populações da Papua Nova Guiné [144].



**Figura 7** – Distribuição mundial dos genótipos mais frequentes do JCV.

### 1.3.3. Origem Geográfica

Como o JCV co-evoluiu com os seres humanos, é possível identificar genótipos específicos do JCV associados a determinadas áreas geográficas. No entanto, hoje é comum as pessoas crescerem em regiões que não estão relacionadas com a área de nascimento, ou deslocarem-se com frequência por todo o mundo. Os genótipos JCV estão muito mais relacionados com a área em que o indivíduo cresceu do que aquela onde nasceu quando há deslocação do mesmo. O genótipo de uma determinada área é o que normalmente vai infetar os indivíduos daquela região.

Desta forma, a origem geográfica avaliada com este método não indica uma origem racial ou étnica, mas sim a área onde o indivíduo cresce, isto é, onde vive a primeira infância uma vez que a infeção primária ocorre aproximadamente aos seis anos.

Por exemplo, Okinawa, uma pequena ilha no Japão, foi ocupada por forças dos Estados Unidos há mais de 20 anos. Durante esse período, muitas crianças americano-japonesas nasceram de mães japonesas e pais americanos. No entanto, quase todos os indivíduos nascidos neste período são portadores do genótipo que está distribuído em Okinawa porque a maioria dessas crianças cresceram nesta comunidade japonesa [150]. Deste modo, em adição à informação racial obtida por outros métodos, incluindo a análise do DNA humano, a informação geográfica a partir da genotipagem viral permite fazer um perfil muito mais detalhado. Neste caso exemplificativo, o perfil seria um japonês-americano que cresceu numa área japonesa [2, 123].



## **2. Objetivos**





### 2.1. Objetivo Geral

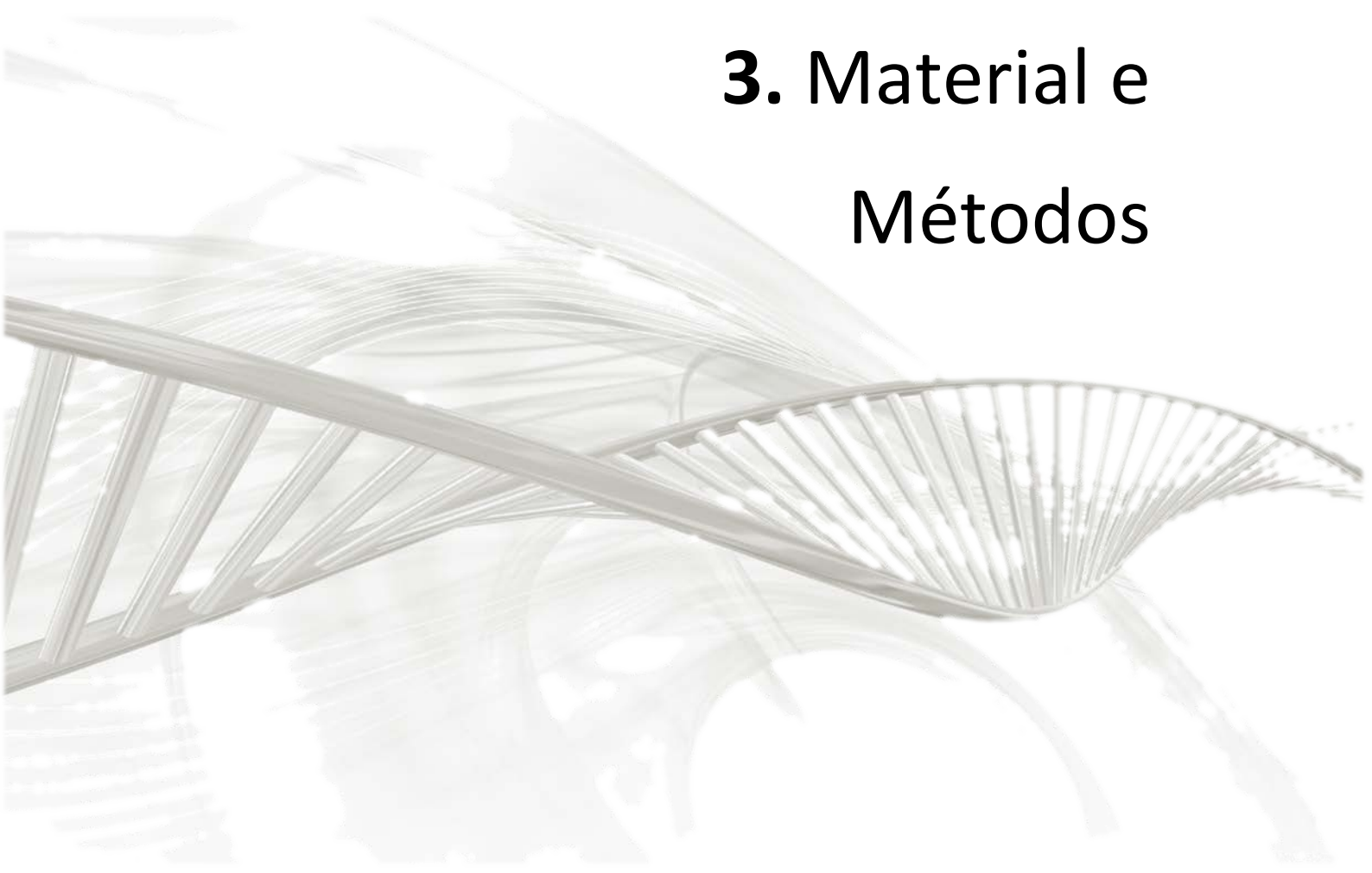
Caracterização genotípica do poliomavírus humano JC em Portugal e suas implicações médico-legais na determinação da origem geográfica.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Analisar a frequência do JCV em amostras de urina de indivíduos saudáveis da população portuguesa;
- Caracterizar molecularmente os genótipos do JCV isolados a partir das amostras biológicas selecionadas para o presente estudo;



# **3. Material e Métodos**





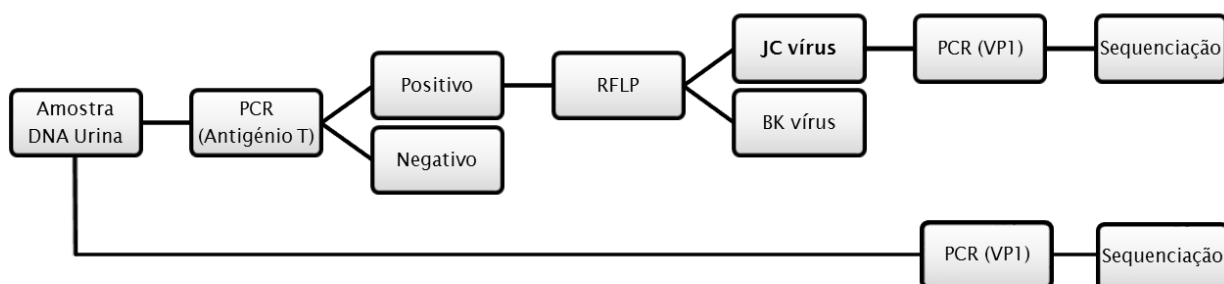
Este trabalho foi dividido em duas fases com os seguintes objetivos:

### Fase I

Detetar o poliomavírus humano JC recorrendo a técnicas de biologia molecular - *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) e PCR *semi-nested* - em amostras de urina de indivíduos saudáveis da população portuguesa de acordo com os procedimentos laboratoriais descritos por Arthur e colaboradores e Karalic e colaboradores (Figura 8) [151, 152].

### Fase II

Caracterizar os diferentes genótipos do JCV presentes nas amostras de urina dos indivíduos saudáveis da população portuguesa através da reação de amplificação da região codificante da proteína VP1 seguido de sequenciação nucleotídica dos produtos amplificados e caracterização genotípica através do alinhamento das sequências usando como referência sequências de JCV disponíveis em bases de dados (Figura 8).



**Figura 8** - Representação esquemática da metodologia aplicada no presente estudo.

## 3.1. Detecção do Poliomavírus Humano JC

### 3.1.1. População em Estudo

O estudo da frequência do JCV foi realizado com base num estudo que envolveu 88 indivíduos com uma média de idade de 44,6 anos (18,0 - 89,0 anos). Todos os indivíduos são provenientes de Portugal, tendo sido recolhida a cada um dos participantes uma amostra de urina, após seu conhecimento e consentimento prévio de acordo com a Declaração de Helsínquia.

### 3.1.2. Extração de DNA de Amostras Biológicas

Após recolha da amostra de urina, estas foram centrifugadas durante 20 minutos a 3000 rpm à temperatura ambiente. O *pellet* celular foi posteriormente lavado em PBS 1X (*Phosphate buffered saline*) e novamente centrifugado durante 15 minutos a 3000 rpm à temperatura ambiente. No final o *pellet* celular obtido foi estabilizado em reagente TripleXtractor® Isolation Reagent (#GB23.0100) e armazenado a -80°C até extração/isolamento do material genético.

Para o isolamento do DNA viral de todas as amostras de urina recorreu-se ao *kit* de extração de ácidos nucleicos por um sistema de colunas de centrifugação, FavorPrep™ Genomic DNA Mini Kit (Favorgen®), de acordo com as instruções do fabricante. Este procedimento laboratorial fundamenta-se na grande afinidade de ligação do DNA à sílica, que é utilizada no revestimento das colunas de centrifugação sob a forma de membranas. As colunas possuem, para além de sílica, resinas com partículas em suspensão alcoólica de elevadas concentrações de sais caotrópicos, capazes de desnaturar proteínas. No procedimento são executadas três etapas: adsorção, lavagem e eluição. Para que a adsorção ocorra, isto é, a ligação do DNA às partículas de sílica, é necessário um baixo valor de pH. Seguem-se diversas lavagens, com vários tampões com etanol, para remover proteínas, polissacarídeos e sais. No fim do procedimento, o DNA é eluído num tampão de eluição, de baixa concentração salina.

### 3.1.3. Avaliação da Qualidade de DNA

Todas as amostras de DNA obtidas foram avaliadas quanto à sua concentração e à sua pureza por meio da análise da densidade ótica a partir do espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000.

### 3.1.4. Detecção de DNA dos Poliomavírus Humanos JCV e BKV por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) com Amplificação do Fragmento de DNA Codificante do Antígeno T

Todas as amostras foram inicialmente selecionadas através da técnica de PCR conforme o protocolo descrito por Arthur *et al.*, 1989. A amostra é amplificada utilizando-se um par de *primers* complementares à região codificante do antígeno T, comum aos vírus JCV e BKV [151].

#### ▪ Protocolo de Amplificação

A mistura reação inclui um volume final de 50 µl, consistindo em 0.2µg de DNA, 1U de *Taq* DNA Polymerase (Thermo Scientific, #EP0702) e o respetivo tampão de reação 1x suplementar com MgCl<sub>2</sub> (Thermo Scientific), 0.2mM de dNTP mix (Ferramentas, #R0192) e 0.4 µM de cada *primer*:

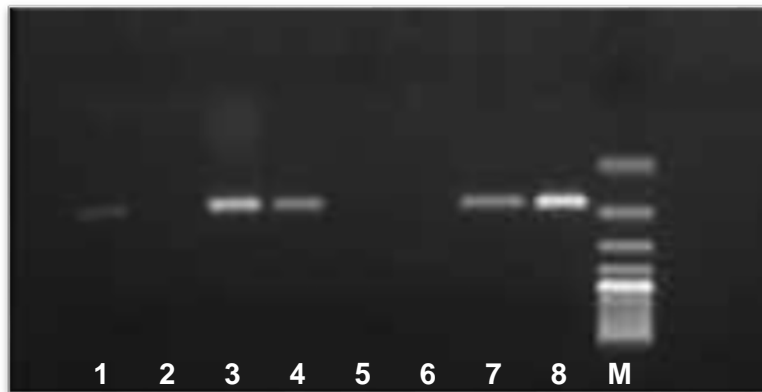
PEP-1 – F: 5' AGT CTT TAG GGT CTT CTA CC 3'

PEP-2 – R: 5' GGT GCC AAC CTA TGG AAC AG 3'

A reação foi efetuada num termociclador Biorad® e as condições de amplificação utilizadas foram as seguintes: pré-desnaturação de 10 minutos a 95°C para ativação da *Taq* DNA Polymerase, seguida de 45 ciclos de desnaturação a 95°C durante 10 segundos, *annealing* a 55°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 30 segundos, com um passo de extensão final de 7 minutos a 72°C. Na reação de PCR utilizou-se um controlo negativo e um controlo positivo para o poliomavírus BK [151].

▪ Eletroforese em Gel de Agarose - *Visualização do Fragmento Amplificado*

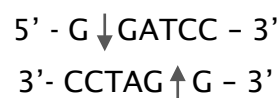
De forma a confirmar a amplificação do fragmento de DNA pretendido, foram analisados 12  $\mu\text{L}$  do produto de PCR por eletroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v) corado com brometo de etídeo (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). O corante tem a capacidade de se intercalar ao DNA e emite fluorescência quando iluminado com luz ultravioleta. Os géis foram preparados em tampão TBE 1X (Tris/Borate/EDTA), também utilizado como tampão de eletroforese. Foi utilizado um marcador molecular de 100 pb (Fermentas #SM0243). As sequências de DNA foram visualizadas na presença de luz ultravioleta recorrendo ao transiluminador Gel DocXR (Biorad®). Na presença de DNA do BKV e do JCV, o fragmento amplificado possui 176 e 173 pb, respetivamente (Figura 9).



**Figura 9** - Representação de um gel de agarose com as bandas correspondentes à região amplificada pelos *primers* PEP-1 e PEP-2 (1,3,4,7 e 8 – casos positivos para os poliomavírus; 2, 5 e 6 – casos negativos; M – marcador molecular de 100pb).

**3.1.5. Identificação Molecular do JCV e do BKV por *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP)**

Para identificação do BKV e JCV submeteu-se o produto amplificado à clivagem pela enzima de restrição *Bam*HI (Thermo Scientific, #FD0054). Esta enzima de restrição corta na presença da seguinte sequência nucleotídica:



Foram utilizadas 10  $\mu$ L de produto de PCR de cada amostra para restrição com 1U de enzima de restrição *Bam*HI (Thermo Scientific, #FD0054) e o respetivo tampão de reação 10X, num volume final de reação de 30  $\mu$ L. As amostras foram incubadas a 37°C, durante 10 minutos.

#### ▪ Eletroforese em Gel de Agarose

Os fragmentos obtidos por RFLP foram analisados em eletroforese em géis de agarose a 3% (p/v), corado com brometo de etídeo (10 $\mu$ g/mL). Os géis foram preparados em tampão TBE 1X (Tris/Borate/EDTA), também utilizado como tampão de eletroforese. Foi utilizado um marcador molecular de 50 pb (Fermentas #SM0373). As sequências de DNA foram visualizadas na presença de luz ultravioleta recorrendo ao transiluminador Gel DocXR (Biorad®).

A presença de uma banda de 176 pb significa que esta não foi cortada pela enzima e corresponde à presença do BKV, já que este não possui local de clivagem para esta enzima [151]. A existência de duas bandas, uma com 53 pb e outra com 120 pb, indica a presença do JCV na amostra. O produto de PCR que corresponde ao controlo positivo (BKV<sup>+</sup>) não foi digerido originando apenas uma banda, como previsto (Figura 10).



**Figura 10** - Representação de um gel de agarose com as bandas correspondentes à digestão pela enzima *Bam*HI (1 a 6 – casos positivos para JCV; 7 -controlo positivo para BKV; 8 - controlo negativo; M – marcador molecular de 50pb).

### 3.2. Genotipagem do Poliomavírus Humano JC

#### 3.2.1. Amplificação do Fragmento de DNA Viral Correspondente à Região VP1 do JCV por *Polymerase Chain Reaction Semi-nested* (PCR *Semi-nested*)

Todas as amostras do presente estudo foram submetidas à amplificação do fragmento de 495 pb correspondente à região VP1, através da técnica de PCR *semi-nested* descrita por Karalic e colaboradores 2014 [152]. Os *primers* P13 e M5 foram usados para o primeiro PCR e os *primers* JLP1 e M5 foram usados para o segundo PCR de acordo com a tabela (Tabela 3).

**Tabela 3** - *Primers* usados na amplificação da região VP1 [152].

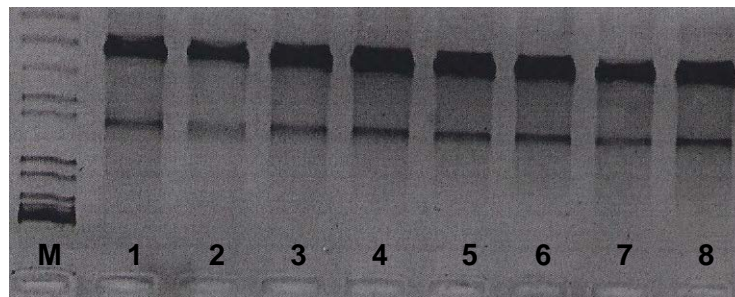
PCR semi-nested (VP1)			
<i>Primer</i>	Sequência (5'-3')	Posição Nucleotídica	Referências
P13	ttccactaccaatctaaatgagg	1.725 - 1.748	Lafon et al. (1998)
M5	gtttgtaaacaatgccacagacatc	2.263 - 2.240	Lafon et al. (1998)
JLP1	ctcatgtggaggctgtgacct	1.769 - 1.790	Agostini et al. (1996b)

A reação foi efetuada num termociclador Biorad®, com um volume final de 25µl, consistindo aproximadamente em 0.2µg de DNA, 1U de *MasterMix Taq Polymerase* (Qiagen®) e o respectivo tampão *Q Solution* (Qiagen®) de reação 1x e 0.4 µM de cada *primer* [152].

As condições de amplificação tanto para o primeiro *round* de PCR como para o segundo do PCR *semi-nested*, incluíam uma pré-desnaturação de 15 minutos a 95°C para ativação da *Taq DNA Polymerase*, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 30 segundos, *annealing* a 60°C durante 40 segundos e extensão a 72°C durante 60 segundos, com um passo de extensão final de 10 minutos a 72°C, de acordo com o protocolo originalmente estabelecido por Karalic e colaboradores [152].

#### ▪ Electroforese em Gel de Agarose

De forma a confirmar a amplificação do fragmento de DNA pretendido, foram analisados 10 µL do produto de PCR por eletroforese em gel de agarose a 2,0% (p/v) corado com 1x GelRed (*Biotium*®). Os géis foram preparados em tampão TBE 1X, também utilizado como tampão de eletroforese. Foi utilizado um marcador molecular de 100 pb *Plus DNA Ladder* (*Invitrogen*®). A voltagem e o tempo foram estabelecidos de modo a propiciar a separação ideal das amostras. As sequências de DNA foram visualizadas na presença de luz ultravioleta recorrendo ao transiluminador Gel DocXR (*Biorad*®) (Figura 11).

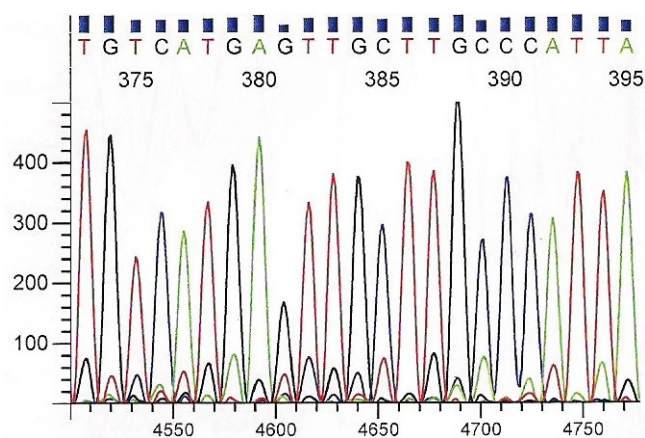


**Figura 11** - Representação de um gel de agarose com a banda correspondente à região amplificada de 495 pb correspondente à região VP1 (1 a 8 - casos positivos para JCV; M - marcador molecular de 100 pb).

#### 3.2.2. Sequenciação Automática

Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese através de um gel de agarose a 2%. O produto de amplificação específico de VP1 foi excisado e purificado recorrendo ao *kit* GRS PCR & Gel Band Purification (GRISP®), a partir do qual a purificação foi feita por meio do uso de colunas que contêm uma matriz de sílica, de acordo com o processo descrito pelos fabricantes. Este procedimento laboratorial fundamenta-se no uso de sais caotrópicos para dissolver o gel de agarose e desnaturar enzimas para posterior ligação do DNA à matriz de fibra de vida das colunas. Contaminantes tais como proteínas, nucleótidos não incorporados, ou inibidores da enzima são completamente removidos usando um tampão de lavagem. O DNA purificado é subsequentemente eluído com tampão de eluição com um baixo teor de sal.

A sequenciação dos produtos de amplificação de DNA foi realizada utilizando o *ABI Prism dye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems®)*. Para a reação de sequenciação, uma mistura de reação de 5 uL foi utilizada, contendo 3,0µl de *ABI Prism terminator ready reaction mix (Applied Biosystems®)*, 0,5ul do *primer M5 (2 pmol/mL)*, 0,5µl de água e 1ul de produto de PCR purificado. A mistura de reação foi colocada num termociclador Biorad®, em 25 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 55°C durante 15 segundos, e 60°C durante 3 minutos e uma extensão final de 60°C durante 10 minutos. As amostras foram analisadas num sequenciador automático de DNA ABI 3130 (*Applied Biosystems®*) (Figura 12).



**Figura 12** – Gráfico de sequenciação automática.

### 3.2.3. Alinhamento Genético

As seqüências foram analisadas usando o programa *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* através do *website* do *National Center for Biotechnology Information of the United States* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

O fragmento amplificado de 494 pb do gene VP1 continha 17 sítios que diferenciaram os principais tipos e subtipos JCV [3, 4] .

#### 3.3. Análise Estatística

A análise dos resultados foi realizada com recurso ao *software* estatístico *IBM®SPSS®Statistics for Windows (versão 22.0)*. A análise pelo teste do Qui-Quadrado ( $\chi^2$ ) foi utilizada para comparação das variáveis. O valor de  $p$  foi obtido pelo teste de  $\chi^2$  e foi considerado estatisticamente significativo quando inferior a 0.05.

Foram também analisados os parâmetros sensibilidade, especificidade e valores preditivos, a fim de avaliar a validade dos protocolos utilizados no presente estudo. A sensibilidade foi definida como a capacidade do protocolo para identificar corretamente os indivíduos que são portadores do vírus. A especificidade foi definida como a capacidade do protocolo para identificar corretamente os indivíduos que não são portadores do vírus. Relativamente aos valores preditivos, o valor preditivo positivo representou a proporção de indivíduos verdadeiros positivos (isto é, portadores do vírus), entre todos aqueles que tiveram resultados positivos no teste, enquanto que o valor preditivo negativo representou a proporção de indivíduos verdadeiros negativos (isto é, que não são portadores do vírus), entre todos aqueles que tiveram resultados negativos no teste.



## 4. Resultados





#### 4.1. População em Estudo

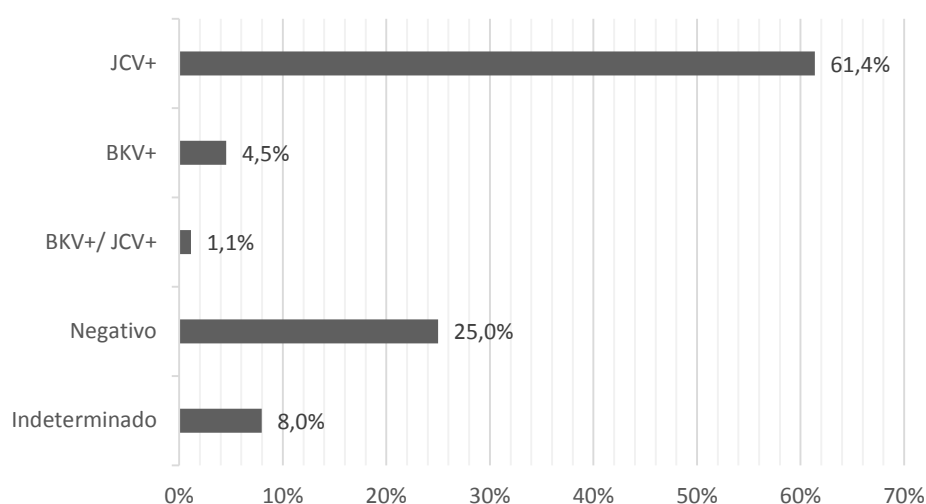
A população recrutada para o estudo consistiu em 88 indivíduos saudáveis recrutados da população portuguesa, nos quais foi analisada a presença de JCV em amostras de urina. Destes indivíduos, trinta e um são do género masculino (35%) e cinquenta e sete do género feminino (65%). A idade dos indivíduos variou entre os 18 e os 89 anos (média  $44,6 \pm 15,9$ ).

#### 4.2. Detecção do Poliomavírus Humano JC nas Amostras Biológicas

##### 4.2.1. Detecção do Poliomavírus JCV pela Técnica PCR-RFLP com Amplificação do Fragmento Correspondente ao Antígeno T

Das 88 amostras de DNA amplificadas, com recurso aos *primers* PEP-1 e PEP-2, não obtivemos amplificação do fragmento de interesse (negativo) em 25% das amostras (22 em 88 casos).

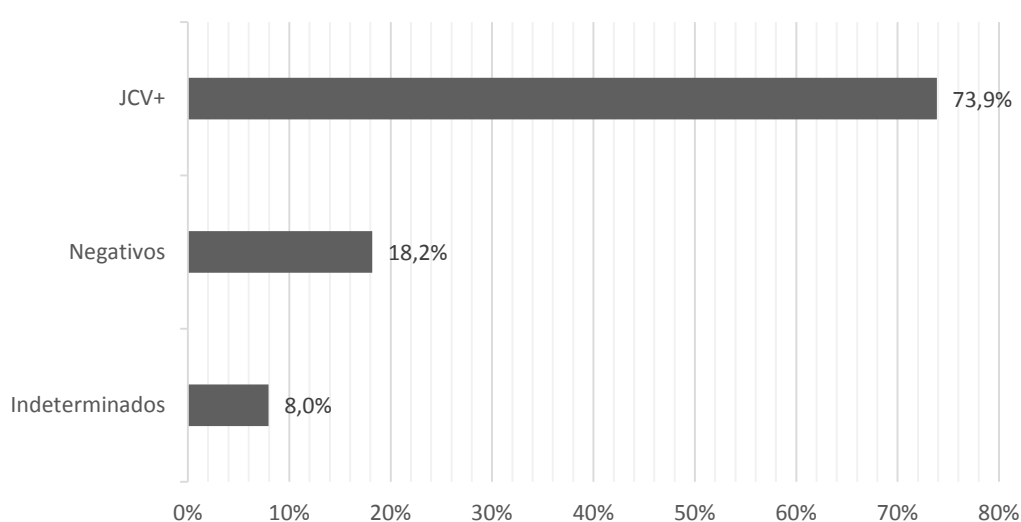
A presença de JCV foi detetada em 62,5% das amostras (55 em 88 casos) e o BKV foi detetado em apenas 5,6% das amostras (5 em 88 casos). Em apenas uma amostra foi detetada a presença simultânea de ambos os vírus analisados por esta técnica (Figura 13).



**Figura 13** – Detecção da presença de poliomavírus na população em estudo de acordo com a técnica de PCR-RFLP.

#### 4.2.2. Detecção do Poliomavírus JCV pela Técnica PCR *semi-nested* com Amplificação do Fragmento Correspondente a VP1

Através da técnica de PCR *semi-nested* com utilização dos *primers* P13, M5 e JLP1, anteriormente descritos, foi detetada a presença de DNA viral de JCV em sessenta e cinco amostras (73,9%) e dezasseis amostras mostraram-se negativas para JCV (18,2%). Foram ainda consideradas sete amostras indeterminadas (8,0%) (Figura 14).



**Figura 14** - Detecção da presença de JCV na população em estudo de acordo com a técnica de PCR *semi-nested*.

#### 4.3. Sensibilidade, Especificidade e Valores Preditivos

Para avaliar a sensibilidade e especificidade no diagnóstico da presença de JCV foi realizada uma análise comparativa das duas técnicas usadas: PCR-RFLP e PCR *semi-nested*. Observou-se que sessenta e cinco destas amostras foram positivas para JCV pela técnica PCR *semi-nested* enquanto apenas cinquenta e cinco amostras tinham sido positivas pela técnica PCR-RFLP (Tabela 4).

**Tabela 4** – Amostras positivas para JCV estratificadas por género para cada técnica utilizada neste estudo.

		Total	Homens	Mulheres
PCR-RFLP	JCV <sup>+</sup>	54	19	35
PCR <i>semi-nested</i>	JCV <sup>+</sup>	65	24	41

A sensibilidade de cada técnica foi calculada baseada no número de indivíduos com resultado positivo para JCV, usando como referência os indivíduos positivos cujo resultado foi confirmado por sequenciação automática. Relativamente à especificidade de cada técnica, trata-se da capacidade de identificar os indivíduos com resultado negativo na população em estudo e que não possuem o vírus JCV. Em ambos os parâmetros, os indivíduos portadores de JCV foram aqueles que demonstraram um resultado positivo para JCV quando realizada a sequenciação que foi considerada como método de referência. Desta forma, a percentagem de falsos negativos é o complemento da sensibilidade e a percentagem de falsos positivos é o complemento da especificidade (Tabela 5).

**Tabela 5** – Sensibilidade, Especificidade e Valores Preditivos.

	Sensibilidade	Especificidade	Valor Preditivo +	Valor Preditivo -
<i>PCR-RFLP</i>	85,0%	64,3%	91,1%	50,0%
<i>PCR semi-nested</i>	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Tendo em conta os resultados obtidos, a sensibilidade é menor para a técnica PCR-RFLP quando comparada com a técnica de PCR *semi-nested*. Cumulativamente a especificidade manteve-se sempre alta para a técnica PCR *semi-nested* (100%) sendo de apenas 64,3% para a técnica PCR-RFLP.

Perante estes dados, a técnica de PCR *semi-nested* revelou-se o teste mais sensível ao identificar corretamente os indivíduos que realmente eram portadores do vírus JCV, não produzindo falsos negativos; e destacou-se também como o teste mais específico ao determinar os indivíduos que realmente não estavam infetados com o JCV, não havendo portanto falsos positivos.

Foi ainda calculada a validade de cada técnica que diz respeito à extensão com que ela pode prever a ocorrência da infecção por JCV. Desta forma, foram avaliados os valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) de acordo com cada técnica. Em relação ao valor preditivo positivo, isto é, diante de uma resposta positiva para a presença de JCV, o indivíduo realmente estar infetado pelo JCV, foram encontrados valores de 100% para a técnica de PCR *semi-nested*. Assim, todos os indivíduos verdadeiramente positivos, ou seja, para os quais o JCV foi sequenciado, apresentaram um resultado positivo na fase de detecção.

Por outro lado, a técnica de PCR-RFLP revelou valores inferiores (91,1%), o que equivale a dizer que em cada 10 resultados positivos na detecção de JCV, somente 9 indivíduos seriam realmente positivos para o vírus.

Enquanto a sensibilidade e a especificidade de um teste são propriedades inerentes ao teste e não variam a não ser por condições externas (por exemplo devido a erro técnico), os valores preditivos dependem da prevalência do vírus na população em estudo. O VPP aumenta com a prevalência enquanto o VPN diminui. Assim, quando o vírus é raro o VPP é baixo, pois a maior parte dos testes positivos pertencem a indivíduos não infetados pelo vírus, representando resultados falso-positivos. Por outro lado, o VPN é alto em baixas prevalências.

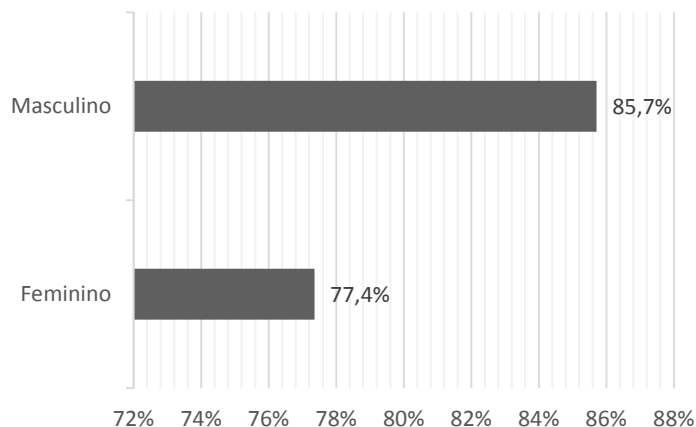
Relativamente à técnica PCR *semi-nested*, esta apresenta valores de 100%, o que significa que a cada 10 testes negativos para JCV, 10 seriam saudáveis, e que a cada 10 testes positivos, 10 seriam positivos para JCV.

Devido a estes dados, toda a restante análise estatística foi realizada a partir dos resultados obtidos pela técnica de PCR *semi-nested*.

#### 4.4. Análise da Frequência do JCV pela Técnica de PCR *semi-nested* – VP1

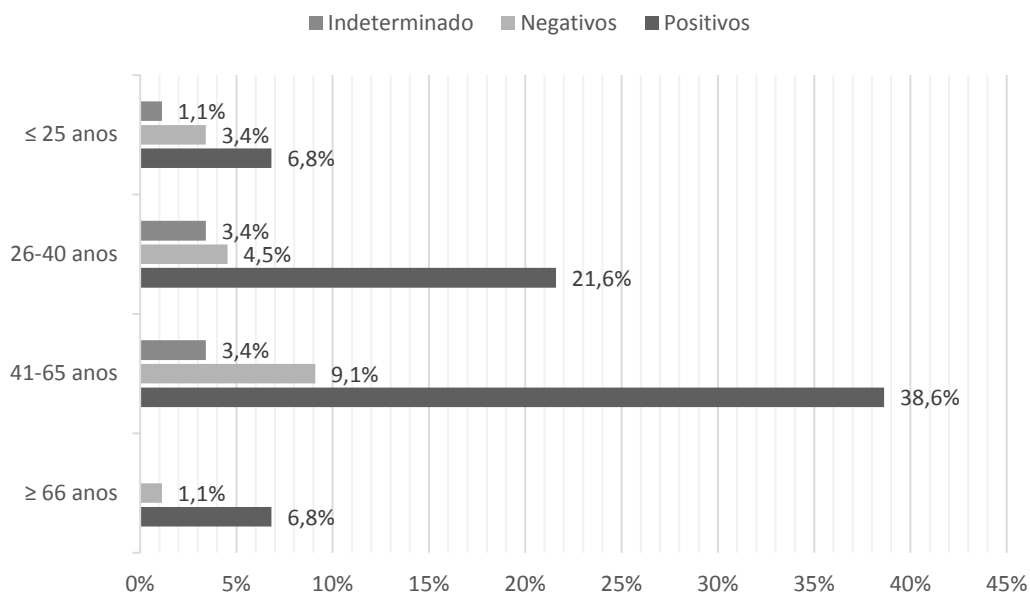
Como referido, a ausência de JCV na população em estudo ocorreu em 18,2% das amostras (16 em 88). O JCV foi detetado em 73,9% das amostras (65 em 88) e cerca de 8% das amostras (7 em 88 casos) foram consideradas indeterminadas.

Nos indivíduos do género masculino 85,7% (24 em 28 casos) são positivos para o JCV, enquanto no grupo dos indivíduos do género feminino 77,4% (41 em 53 casos) são positivos para JCV (Figura 15).



**Figura 15** - Distribuição de casos positivos para JCV de acordo com o gênero ( $p=0,369$ ).

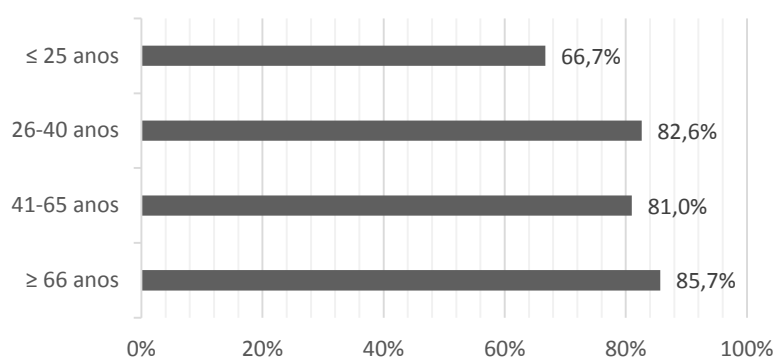
Estratificou-se a população em quatro subgrupos tendo em conta a variável idade, em que a idade mínima é 18 anos e a máxima 89 anos. O primeiro subgrupo abrange os indivíduos com idade menor ou igual a 25 anos (10 em 88 casos); o segundo subgrupo incluiu indivíduos entre os 26 e os 40 anos (26 em 88 casos); o terceiro subgrupo, indivíduos entre os 41 e os 65 anos (45 em 88 casos), e o último subgrupo, indivíduos com mais de 66 anos (7 em 88 casos). Analisaram-se os quatro subgrupos tendo em conta a frequência do poliomavírus JCV (Figura 16).



**Figura 16** - Distribuição dos casos positivos, negativos e indeterminados para o poliomavírus JCV por faixa etária.

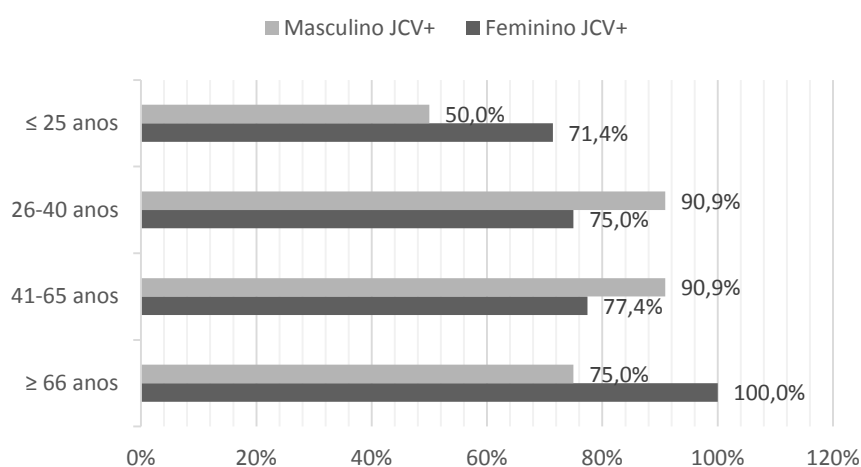
Para o primeiro subgrupo 6,8% das amostras foram positivas para o JCV, já no segundo subgrupo foram positivos 21,6% dos casos, no terceiro subgrupo 38,6% foram positivos e no último grupo apenas 6,8% dos indivíduos foram positivos (Figura 16).

Observou-se ainda a frequência de JCV dentro de cada faixa etária e verificou-se que há uma tendência para um aumento progressivo com a idade, sendo maior nos indivíduos com idades a partir dos 66 anos (85,7%) (Figura 17). No entanto, este resultado não é estatisticamente significativo ( $p=0,735$ ).



**Figura 17** - Distribuição dos casos positivos para JCV, dentro de cada faixa etária.

Foi ainda analisado a presença de JCV dentro de cada faixa etária por gênero. Dentro do gênero masculino verificou-se que existe maior prevalência de JCV entre os 26 e os 65 anos. Relativamente ao gênero feminino, os indivíduos com mais de 66 anos mostraram predomínio na presença de JCV (Figura 18). Contudo, estes dados não são estatisticamente significativos (subgrupo ≤25 anos:  $p=0,999$ ; subgrupo 26-40 anos:  $p=0,658$ ; subgrupo 41-65 anos:  $p=0,168$ ; ≥66 anos:  $p=0,999$ ).

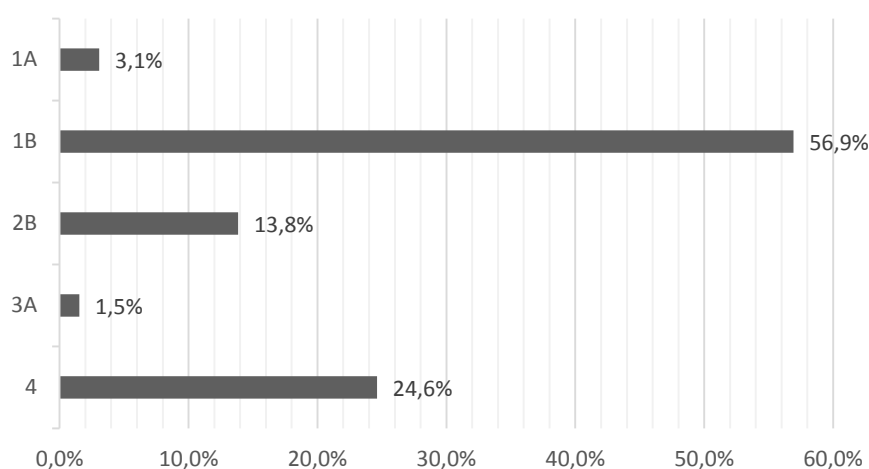


**Figura 18** - Distribuição de casos positivos para JCV dentro de cada faixa etária por gênero.

## 4.5. Genotipagem do Poliomavírus Humano JC

### 4.5.1. Sequenciação Automática e Alinhamento Genético

O genótipo JCV mais frequente, entre os indivíduos da população portuguesa analisada, foi o genótipo 1 (60,0%), seguido pelos genótipos 4 (24,6%) e 2 (13,9%). Foi ainda encontrado um indivíduo com genótipo 3 (1,5%) (figura 19).



**Figura 19** – Distribuição genotípica dos casos positivos para JCV.

As prevalências dos subtipos de JCV podem ser observadas na figura 19, em que o subtipo 1B foi o mais predominante, identificado em 56,9% da casuística. Dentro do genótipo 2, apenas foi encontrado o subtipo 2B cuja prevalência foi de 13,8% e dentro do genótipo 3 apenas um indivíduo apresentou o subtipo 3A (1,5%).

De acordo com a comparação da frequência dos genótipos do presente estudo, observou-se que esta é semelhante à distribuição genotípica descrita nas populações europeias.

## 4.6. Comparação de Estudos de Genotipagem do JCV

Tabela 6 - Estudos de genotipagem do JCV de indivíduos saudáveis.

País	Origem	Número de Indivíduos Saudáveis	Positivos para JCV													Referência	
			Indivíduos (n)	Frequência (%)	Genótipos							6	7				
					1A	1B	1C	2A	2B	2C	2D			3	4		
Portugal	Portugal	88	65	73,9%	31,1%	56,9%				13,8%				1,5%	24,6%		Presente Estudo
Alemanha	Friburgo <sup>a</sup>	103	32	31,1%	40,6%	46,9%				9,4%					9,4%		Agostini et al. (2001)
Espanha	Badelona	25	12	48,0%	75,0%										25,0%		Agostini et al. (2001)
	São Sebastião	25	13	52,0%	76,9%										23,1%		Agostini et al. (2001)
Frância	Bordéus	11	11	100,0%	54,5%				9,1%					9,1%	27,3%		Dubois et al. (2001)
Hungria	Budapeste	30	12	40,0%	75%	25%											Stoner et al. (1998)
Irlanda	Dublin	121	25	20,7%	48,0%	12,0%				12,0%				4,0%	16,0%		Schaffer et al. (2006)
	Continente e Ilhas (Sardenha e Sicília)	211	97	46,0%	24,7%	33,0%			1,0%	7,2%	5,2%			1,0%	27,8%		Pagnani et al. (2003)
Itália	Milão	17	8	47,1%	37,5%	25,0%				25,0%					12,5%		Rossi et al. (2007)
	Pavia e Milão	30	12	40,0%	25,0%	58,3%	8,3%				8,3%						Ferrante et al. (2001)
	Trieste, Ravena, Milão	123	27	22,0%	66,7%					22,2%					11,1%		Zanotta et al. (2013)
Polónia	Varsóvia	56	22	39,3%	50,0%	31,8%									18,2%		Agostini et al. (2001)
	Grande Polónia	113	52	46,0%	59,6%	25,0%				15,4%							Kmieciak et al. (2008)
Sérvia	Belgrado	107	34	31,8%	17,6%	23,5%			11,8%	11,8%	2,9%				32,4%		Karalic et al. (2014)
Portugal	Portalegre e Coimbra	171	55	32,2%	1,8%	54,5%				20,0%				1,8%	21,8%		Matos et al. (2010)
Tailândia	Taichung	75	10	13,3%												100,0%	Tsai et al. (1997)
USA	Africana e Hispânica	213	95	44,6%	57,9%					23,2%				3,2%	13,7%		Agostini et al. (1997)
Argentina	Guaraní, Jujuy	57	42	73,7%					100,0%								Fernandez-Cobo et al. (2002)
	Europeans <sup>b</sup>	9	6	66,7%	50,0%				16,7%	16,7%					16,7%		Fernandez-Cobo et al. (2002)
	Navajo <sup>c</sup>	64	45	70,3%	8,9%				91,1%								Agostini et al. (1997)
USA	Chamorro	29	20	69,0%	5,0%				85,0%	10,0%							Agostini et al. (1997)
	Fiathead	25	14	56,0%	28,6%				64,3%	7,1%	14,3%						Agostini et al. (1997)
	Salish <sup>d</sup>	25	14	56,0%	28,6%				64,3%	7,1%	14,3%						Fernandez-Cobo et al. (2002)
	Kunming	47	29	61,7%											3,4%		Cui et al. (2004)
	Chengdu	50	36	72,0%												100,0%	Cui et al. (2004)
China	Shenyang	50	40	80,0%												100,0%	Cui et al. (2004)
	Chifeng	31	22	71,0%									9,1%				Cui et al. (2004)
	Manzhouli	46	30	65,2%											10,0%		Cui et al. (2004)
India	Kerala (Hill)	49	20	40,8%											5,0%		Cui et al. (2004)
	Kerala (Coastal)	50	21	42,0%	4,8%												Cui et al. (2004)
Coreia	Gangwon	100	20	20,0%	15,0%				20,0%						65,0%		Jeong et al. (2004)
	Seoul	23	14	60,9%	7,1%				42,9%							50,0%	Cui et al. (2004)
Republica Centro-Africana	Blaka Pygmies	23	5	21,7%	20,0%									40,0%			Chima et al. (1998)
	Bantu	20	4	20,0%											100,0%		Chima et al. (1998)

<sup>a</sup> Dois indivíduos com co-infecção (Tipos 1A+2B e Tipos 1B+2B)<sup>b</sup> Indivíduos que nasceram na Argentina e que são filhos ou netos de imigrantes Europeus.<sup>c</sup> Um indivíduo com co-infecção.<sup>d</sup> Dois indivíduos com co-infecção.

## **5. Discussão**





## 5. Discussão

Com o evoluir da investigação relativa ao poliomavírus humano JCV, isolado e caracterizado pela primeira vez em 1953, revelou-se útil a utilização da sua variabilidade genética como um potencial marcador molecular utilizado para a identificação geográfica individual [21].

O primeiro contacto que o ser humano tem com este vírus é, geralmente, na primeira infância. Após infeção, o JCV tem a capacidade de permanecer latente no organismo, sendo produzidos anticorpos específicos pelos sistema imunológico do hospedeiro [34].

O JCV foi detetado e estudada a sua variabilidade genómica em amostras de urina numa população portuguesa aleatória. Com base nos resultados do presente estudo, O JCV foi caracterizado com o intuito de identificar o perfil genotípico em Portugal. Esta caracterização molecular é vista como uma ferramenta forense uma vez que poderá auxiliar no reconhecimento de cadáveres e restos cadavéricos.

De acordo com os resultados, a taxa de excreção urinária de JCV foi de 73,9% na presente população saudável em estudo, sendo esta frequência superior à encontrada em outros países europeus onde as taxas de deteção são aproximadamente de 21% na Irlanda, 31% na Alemanha, até 46% na Polónia, até 47% em Itália e até 52% em Espanha [147, 153-158]. No entanto, em outros países são detetadas taxas de excreção igualmente elevadas, como é o caso da França (100%), da China (até 80%), dos EUA (até 70%) e da Argentina (até 74%) [159-162].

A razão para esta variação reside provavelmente nas diferenças dos grupos de indivíduos incluídos nos diferentes estudos e nas técnicas de biologia molecular utilizadas. Em alguns estudos, as amostras de urina foram recolhidas de indivíduos internados ou em ambulatório com diferentes patologias. Já neste estudo foram incluídos indivíduos saudáveis aleatórios de Portugal.

Por outro lado, as técnicas utilizadas na deteção do vírus também podem explicar a baixa prevalência em estudos realizados anteriormente. Verificou-se neste estudo que a deteção por meio das técnicas de PCR-RFLP é menos sensível e específica que a PCR *semi-nested*. Isto pode ser comprovado pelos resultados obtidos uma vez que o número de casos JCV positivos aumenta com a sensibilidade inerente ao PCR *semi-nested* pelo que poderá justificar uma frequência superior ao estudo descrito por *Matos* e colaboradores também realizado numa população portuguesa [163].

Ao estratificar a nossa amostragem por género, observa-se que a taxa de excreção de JCV foi maior nos homens (85,7%) do que nas mulheres (77,4%). Esta análise está de acordo com a maioria dos estudos, nomeadamente com o estudo realizado por *Rossi* e colaboradores, onde um nível mais elevado de excreção JCV foi observado em homens [156].

Relativamente à faixa etária, analisou-se a prevalência de JCV dentro de cada grupo etário e verificou-se que há uma propensão para um aumento progressivo com a idade, sendo maior nos indivíduos com idades a partir dos 66 anos (85,7%). Esta tendência está provavelmente associada à perda de eficiência do sistema imunitário com o avanço da idade. Cumulativamente estratificou-se a faixa etária por género e apurou-se maior número de casos do género masculino positivos para JCV entre as idades 26 e 65 anos (90,9%) e maior número de amostras positivas para JCV do sexo feminino a partir dos 66 anos.

A distribuição ampla de JCV associado à transmissão dentro da família e coevolução com a população humana, fazem deste vírus um candidato adequado para a reconstrução das migrações humanas. A distribuição de genótipos do JCV pode refletir a divergência geográfica do seu hospedeiro ao longo de vários anos [2, 164].

O genótipo JCV dominante, entre os indivíduos saudáveis portugueses, foi o genótipo 1 (1A: 3,1% e 1B: 56,9%), seguido pelos genótipos 4 e 2, sendo estes diferentes um do outro em apenas 1% da sua sequência de DNA [148].

Este padrão de distribuição, com o genótipo 1 que é dominante, seguido pelo genótipo 4, também foi encontrado noutros países europeus [154, 155, 163]. Foi relatado anteriormente que o subtipo 1A é mais prevalente na Europa Oriental e 1B na Europa Ocidental, o que está de acordo com os nossos resultados [147, 154, 159].

À semelhança de outros países europeus, o genótipo 2 foi o terceiro mais prevalente em indivíduos saudáveis [147, 163]. O único subtipo encontrado no nosso estudo foi o 2B que é prevalente em indivíduos euroasiáticos. Os subtipos 2A e o 2C predominam no nordeste da Ásia e entre os nativos americanos [165], enquanto o subtipo 2D é uma estirpe indiana [161].

Em Itália, mostrou-se nítido o predomínio do genótipo 1 (58%), seguido do genótipo 4 (28%), em indivíduos saudáveis da população. O genótipo 2 foi menos frequente, ocorrendo em apenas 13% da amostragem [157]. Na Polónia, em 52

indivíduos saudáveis, o genótipo 1 foi encontrado em 84,6% dos casos, seguido do genótipo 2 (15,4%), não tendo sido encontrados outros genótipos de JCV [155].

Outro estudo, analisando os genótipos de JCV circulantes pela Europa central, este e sudeste, também mostrou predomínio do tipo 1, incluindo diferentes regiões de Espanha, Hungria, Polónia e Alemanha (Figura 20) [147].

Quanto ao genótipo 4, foi o segundo mais prevalente na nossa amostragem pelo que se encontra de acordo com a bibliografia [154, 155].

Outro aspecto interessante é a identificação do genótipo 3 na nossa população. Este genótipo foi descrito em populações africanas e raramente são encontrados em populações europeias [141].



**Figura 20** – Distribuição dos vários tipos e subtipos europeus de JCV.

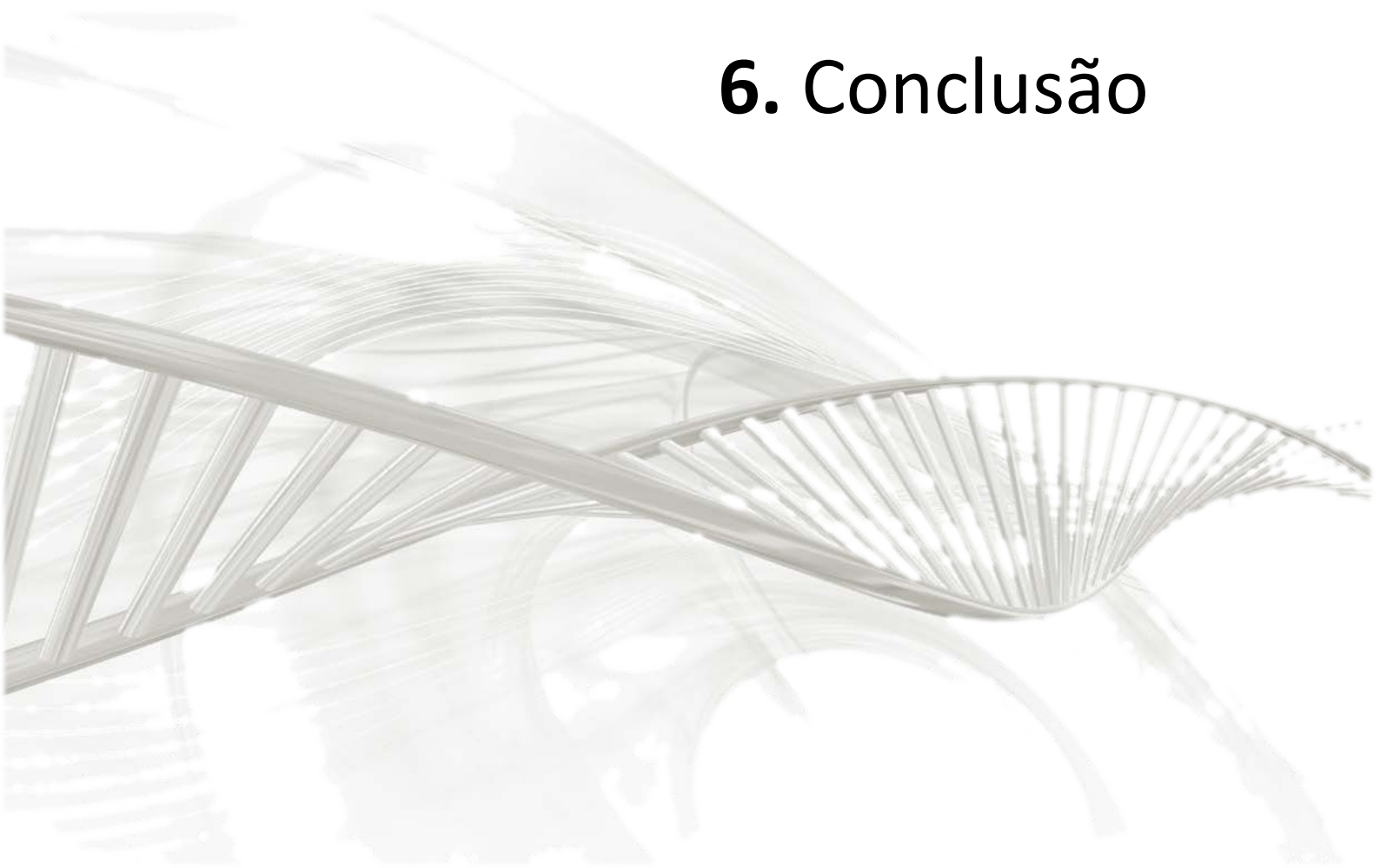
Em relação aos subtipos, observou-se predomínio absoluto do 1B dentro o genótipo 1, 2B dentro o genótipo 2 e apenas um subtipo 3A no genótipo 3.

Em resumo, os dados apresentados neste estudo são os primeiros dados sobre genótipos de JCV de indivíduos aleatórios provenientes de várias regiões de Portugal e não de uma região específica como o estudo de Matos e colaboradores [163]. A análise da sequência parcial do gene VP1 revelou que os genótipos 1, 2, 3 e 4 estão em circulação em Portugal. Levando-se em conta a origem da população

portuguesa e sabendo que a distribuição de genótipos JCV pode refletir padrões de migração humana antigas e recentes, não é de estranhar que os genótipos mais prevalentes em Portugal são tipos europeus (1 e 4). Contudo, a presença dos genótipos 2B e 3A, associados ao país africano e ao médio oriente respetivamente, pode ser indicativo do passado da população portuguesa dada a história do império colonial português.

Desta forma, este estudo poderá ser uma excelente ferramenta para a investigação forense, nomeadamente na pesquisa da origem geográfica individual, a qual poderá auxiliar a identificação de cadáveres, mesmo em situações extremas em que o corpo se encontra em elevados estados de putrefação. Cumulativamente, o tipo de amostra biológica assim como as técnicas de biologia molecular aplicadas no presente estudo também se revelaram acessíveis e com elevada sensibilidade e especificidade, tornando exequível a sua aplicação na investigação forense.

## 6. Conclusão





## 6. Conclusão

As tendências recentes de internacionalização e do aumento de atividade criminosa dificulta a identificação de pessoas desaparecidas. A genotipagem de vírus humanos é um processo simples, eficiente e exequível para inferir a origem geográfica dos indivíduos e, assim, auxiliar na delimitação da área geográfica de provável proveniência de cadáveres e restos cadavéricos.

De acordo com os resultados, foi detetada a presença de DNA viral de JCV em sessenta e cinco amostras (73,9%) pela técnica de PCR *semi-nested*, revelando-se esta técnica com elevada sensibilidade e especificidade comparativamente à técnica de PCR-RFLP também aplicada no presente estudo. Após sequenciação automática dos fragmentos de DNA viral de JCV, observou-se a presença dos genótipos 1, 2, 3 e 4 na população estudada, sendo os genótipos 1 (60,0%) e 4 (24,6%) os mais frequentes, seguidos dos genótipos 2 (13,9%) e 3 (1,5%). Relativamente aos subtipos, o 1B foi o mais frequente, identificado em 56,7%, dos casos, estando este resultado de acordo com a literatura.

A globalização mundial a par do crescente desenvolvimento dos sistemas de transporte e da elevada capacidade de migração humana atual, contribuem para uma maior divergência entre a informação genética étnica e a informação geográfica individual, o que pode dificultar a identificação da origem geográfica do indivíduo.

Deste modo, a caracterização molecular do JCV revela-se uma estratégia útil na definição de um perfil associado à origem geográfica individual, ajudando a complementar a informação individual ao adicionar dados relativos à potencial localização onde o indivíduo viveu ou cresceu.

No âmbito da medicina legal, a genotipagem do JCV pode auxiliar no estabelecimento da proveniência geográfica de cadáveres e restos cadavéricos, aliado ao facto de este agente ter a capacidade de permanecer nas células renais, sendo este um dos órgãos mais resistentes a condições extremas.

A genotipagem do JCV aliada à caracterização molecular étnica permite um incremento na definição de um perfil individual mais detalhado, permitindo uma identificação mais acurada.





## **7. Referências Bibliográficas**



## 7. Referências Bibliográficas

1. Yogo, Y., et al., *JC virus genotyping offers a new paradigm in the study of human populations*. Rev Med Virol, 2004. **14**(3): p. 179-91.
2. Ikegaya, H., *Geographical identification of cadavers by human parasites*. Forensic Sci Int Genet, 2008. **2**(2): p. 83-90.
3. Frisque, R.J., G.L. Bream, and M.T. Cannella, *Human polyomavirus JC virus genome*. J Virol, 1984. **51**(2): p. 458-69.
4. Agostini, H.T., C.F. Ryschkewitsch, and G.L. Stoner, *Genotype profile of human polyomavirus JC excreted in urine of immunocompetent individuals*. J Clin Microbiol, 1996. **34**(1): p. 159-64.
5. Javier, R.T. and J.S. Butel, *The history of tumor virology*. Cancer Res, 2008. **68**(19): p. 7693-706.
6. Gross, L., *Neck tumors, or leukemia, developing in adult C3H mice following inoculation, in early infancy, with filtered (Berkefeld N), or centrifugated (144,000 X g), Ak-leukemic extracts*. Cancer, 1953. **6**(5): p. 948-58.
7. Moens, U. and M. Johannessen, *Human polyomaviruses and cancer: expanding repertoire*. J Dtsch Dermatol Ges, 2008. **6**(9): p. 704-8.
8. Stoner, G.L. and R. Hübner, *The Human Polyomaviruses: Past, Present, and Future*, in *Human Polyomaviruses*. 2002, John Wiley & Sons, Inc. p. 611-663.
9. Johne, R., et al., *Taxonomical developments in the family Polyomaviridae*. Arch Virol, 2011. **156**(9): p. 1627-34.
10. zur Hausen, H., *Novel human polyomaviruses--re-emergence of a well known virus family as possible human carcinogens*. Int J Cancer, 2008. **123**(2): p. 247-50.
11. Allander, T., et al., *Identification of a third human polyomavirus*. J Virol, 2007. **81**(8): p. 4130-6.
12. Feng, H., et al., *Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma*. Science, 2008. **319**(5866): p. 1096-100.
13. Gaynor, A.M., et al., *Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections*. PLoS Pathog, 2007. **3**(5): p. e64.
14. Scuda, N., et al., *A novel human polyomavirus closely related to the african green monkey-derived lymphotropic polyomavirus*. J Virol, 2011. **85**(9): p. 4586-90.

15. Schowalter, R.M., et al., *Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin*. Cell Host Microbe, 2010. 7(6): p. 509-15.
16. van der Meijden, E., et al., *Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient*. PLoS Pathog, 2010. 6(7): p. e1001024.
17. Buck, C.B., et al., *Complete genome sequence of a tenth human polyomavirus*. J Virol, 2012. 86(19): p. 10887.
18. Berger, J.R., *Progressive multifocal leukoencephalopathy*. Curr Neurol Neurosci Rep, 2007. 7(6): p. 461-9.
19. Koralnik, I.J., *Progressive multifocal leukoencephalopathy revisited: Has the disease outgrown its name?* Ann Neurol, 2006. 60(2): p. 162-73.
20. De Gascun, C.F. and M.J. Carr, *Human polyomavirus reactivation: disease pathogenesis and treatment approaches*. Clin Dev Immunol, 2013. 2013: p. 373579.
21. Padgett, B.L., et al., *Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leukoencephalopathy*. Lancet, 1971. 1(7712): p. 1257-60.
22. Gardner, S.D., et al., *New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation*. Lancet, 1971. 1(7712): p. 1253-7.
23. White, M.K., M. Safak, and K. Khalili, *Regulation of gene expression in primate polyomaviruses*. J Virol, 2009. 83(21): p. 10846-56.
24. Goudsmit, J., et al., *Human papovavirus isolated from urine of a child with acute tonsillitis*. Br Med J (Clin Res Ed), 1981. 283(6303): p. 1363-4.
25. Goudsmit, J., et al., *The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils*. J Med Virol, 1982. 10(2): p. 91-9.
26. Johne, R. and H. Muller, *Polyomaviruses of birds: etiologic agents of inflammatory diseases in a tumor virus family*. J Virol, 2007. 81(21): p. 11554-9.
27. Johne, R. and H. Muller, *The genome of goose hemorrhagic polyomavirus, a new member of the proposed subgenus Avipolyomavirus*. Virology, 2003. 308(2): p. 291-302.
28. Johne, R., et al., *Characterization of two novel polyomaviruses of birds by using multiply primed rolling-circle amplification of their genomes*. J Virol, 2006. 80(7): p. 3523-31.

29. Padgett, B.L. and D.L. Walker, *Prevalence of antibodies in human sera against JC virus, an isolate from a case of progressive multifocal leukoencephalopathy*. J Infect Dis, 1973. **127**(4): p. 467-70.
30. Knowles, W.A., et al., *Population-based study of antibody to the human polyomaviruses BKV and JCV and the simian polyomavirus SV40*. J Med Virol, 2003. **71**(1): p. 115-23.
31. Taguchi, F., J. Kajioka, and T. Miyamura, *Prevalence rate and age of acquisition of antibodies against JC virus and BK virus in human sera*. Microbiol Immunol, 1982. **26**(11): p. 1057-64.
32. Major, E.O. and J.V. Neel, *The JC and BK human polyoma viruses appear to be recent introductions to some South American Indian tribes: there is no serological evidence of cross-reactivity with the simian polyoma virus SV40*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(26): p. 15525-30.
33. Major, E.O., *Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients on immunomodulatory therapies*. Annu Rev Med, 2010. **61**: p. 35-47.
34. Hirsch, H.H., et al., *The human JC polyomavirus (JCPyV): virological background and clinical implications*. Apmis, 2013. **121**(8): p. 685-727.
35. Osborn, J.E., et al., *Comparison of JC and BK human papovaviruses with simian virus 40: restriction endonuclease digestion and gel electrophoresis of resultant fragments*. J Virol, 1974. **13**(3): p. 614-22.
36. Ambrose, C., et al., *Location of nucleosomes in simian virus 40 chromatin*. J Mol Biol, 1990. **214**(4): p. 875-84.
37. Ahsan, N. and K.V. Shah, *Polyomaviruses and human diseases*. Adv Exp Med Biol, 2006. **577**: p. 1-18.
38. Liddington, R.C., et al., *Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution*. Nature, 1991. **354**(6351): p. 278-84.
39. Stehle, T., et al., *Structure of murine polyomavirus complexed with an oligosaccharide receptor fragment*. Nature, 1994. **369**(6476): p. 160-3.
40. Ahsan, N., *Polyomaviruses and Human Diseases*. 2006: U.S.A. p. 63-65.
41. Imperiale, M.J., *The Human Polyomaviruses: An Overview*, in *Human Polyomaviruses*. 2002, John Wiley & Sons, Inc. p. 53-71.
42. Ferenczy, M.W., et al., *Molecular biology, epidemiology, and pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain*. Clin Microbiol Rev, 2012. **25**(3): p. 471-506.

43. Frisque, R.J., *Structure and function of JC virus T' proteins*. J Neurovirol, 2001. 7(4): p. 293-7.
44. Imperiale, M.J., Major, E. O., *Polyomaviruses*, in *Fields Virology*, 5th ed. 2007. p. 2263 - 2298.
45. Goetz, G.S., et al., *The unwinding of duplex regions in DNA by the simian virus 40 large tumor antigen-associated DNA helicase activity*. J Biol Chem, 1988. 263(1): p. 383-92.
46. Moens, U., M. Ludvigsen, and M. Van Ghelue, *Human polyomaviruses in skin diseases*. Patholog Res Int, 2011. 2011: p. 123491.
47. Collins, K.L. and T.J. Kelly, *Effects of T antigen and replication protein A on the initiation of DNA synthesis by DNA polymerase alpha-primase*. Mol Cell Biol, 1991. 11(4): p. 2108-15.
48. Melendy, T. and B. Stillman, *An interaction between replication protein A and SV40 T antigen appears essential for primosome assembly during SV40 DNA replication*. J Biol Chem, 1993. 268(5): p. 3389-95.
49. Dornreiter, I., et al., *Interaction of DNA polymerase alpha-primase with cellular replication protein A and SV40 T antigen*. Embo j, 1992. 11(2): p. 769-76.
50. Kierstead, T.D. and M.J. Tevethia, *Association of p53 binding and immortalization of primary C57BL/6 mouse embryo fibroblasts by using simian virus 40 T-antigen mutants bearing internal overlapping deletion mutations*. J Virol, 1993. 67(4): p. 1817-29.
51. Schmieg, F.I. and D.T. Simmons, *Characterization of the in vitro interaction between SV40 T antigen and p53: mapping the p53 binding site*. Virology, 1988. 164(1): p. 132-40.
52. DiMaio, D. and D. Nathans, *Regulatory mutants of simian virus 40. Effect of mutations at a T antigen binding site on DNA replication and expression of viral genes*. J Mol Biol, 1982. 156(3): p. 531-48.
53. Nesper, J., et al., *A cell-free replication system for human polyomavirus JC DNA*. J Virol, 1997. 71(10): p. 7421-8.
54. Yang, S.I., et al., *Control of protein phosphatase 2A by simian virus 40 small-t antigen*. Mol Cell Biol, 1991. 11(4): p. 1988-95.
55. Sablina, A.A. and W.C. Hahn, *SV40 small T antigen and PP2A phosphatase in cell transformation*. Cancer Metastasis Rev, 2008. 27(2): p. 137-46.

56. White, M.K. and K. Khalili, *Polyomaviruses and human cancer: molecular mechanisms underlying patterns of tumorigenesis*. Virology, 2004. **324**(1): p. 1-16.
57. Neu, U., T. Stehle, and W.J. Atwood, *The Polyomaviridae: Contributions of virus structure to our understanding of virus receptors and infectious entry*. Virology, 2009. **384**(2): p. 389-99.
58. Sapp, M. and P.M. Day, *Structure, attachment and entry of polyoma- and papillomaviruses*. Virology, 2009. **384**(2): p. 400-9.
59. Shishido-Hara, Y., Nagashima, K. , *Synthesis and assembly of polyomavirus virions*, in *Human polyomaviruses*, K. Khalili, Stoner, G.L, Editor. 2002. p. 149-177.
60. Chang, D., et al., *Identification of a nuclear localization sequence in the polyomavirus capsid protein VP2*. Virology, 1992. **191**(2): p. 978-83.
61. Barouch, D.H. and S.C. Harrison, *Interactions among the major and minor coat proteins of polyomavirus*. J Virol, 1994. **68**(6): p. 3982-9.
62. Khalili, K., et al., *The agnoprotein of polyomaviruses: a multifunctional auxiliary protein*. J Cell Physiol, 2005. **204**(1): p. 1-7.
63. Johannessen, M., et al., *Phosphorylation of human polyomavirus BK agnoprotein at Ser-11 is mediated by PKC and has an important regulative function*. Virology, 2008. **379**(1): p. 97-109.
64. Sariyer, I.K., et al., *Phosphorylation mutants of JC virus agnoprotein are unable to sustain the viral infection cycle*. J Virol, 2006. **80**(8): p. 3893-903.
65. Carswell, S. and J.C. Alwine, *Simian virus 40 agnoprotein facilitates perinuclear-nuclear localization of VP1, the major capsid protein*. J Virol, 1986. **60**(3): p. 1055-61.
66. Darbinyan, A., et al., *Evidence for dysregulation of cell cycle by human polyomavirus, JCV, late auxiliary protein*. Oncogene, 2002. **21**(36): p. 5574-81.
67. Safak, M., et al., *Interaction of JC virus agno protein with T antigen modulates transcription and replication of the viral genome in glial cells*. J Virol, 2001. **75**(3): p. 1476-86.
68. Johnson, E.M., *Structural evaluation of new human polyomaviruses provides clues to pathobiology*. Trends Microbiol, 2010. **18**(5): p. 215-23.
69. Frisque, R.J., *Nucleotide sequence of the region encompassing the JC virus origin of DNA replication*. J Virol, 1983. **46**(1): p. 170-6.

70. Seif, I., G. Khoury, and R. Dhar, *The genome of human papovavirus BKV*. Cell, 1979. **18**(4): p. 963-77.
71. Sugimoto, C., et al., *Regulatory DNA sequence conserved in the course of BK virus evolution*. J Mol Evol, 1990. **31**(6): p. 485-92.
72. Flaegstad, T., et al., *Amplification and sequencing of the control regions of BK and JC virus from human urine by polymerase chain reaction*. Virology, 1991. **180**(2): p. 553-60.
73. Moens, U., et al., *Simian virus 40 large T-antigen, but not small T-antigen, trans-activates the human cytomegalovirus major immediate early promoter*. Virus Genes, 2001. **23**(2): p. 215-26.
74. Moens, U., et al., *Noncoding control region of naturally occurring BK virus variants: sequence comparison and functional analysis*. Virus Genes, 1995. **10**(3): p. 261-75.
75. Johnsen, J.I., et al., *Subpopulations of non-coding control region variants within a cell culture-passaged stock of BK virus: sequence comparisons and biological characteristics*. J Gen Virol, 1995. **76** ( Pt 7): p. 1571-81.
76. Tan, C.S. and I.J. Koralnik, *Progressive multifocal leukoencephalopathy and other disorders caused by JC virus: clinical features and pathogenesis*. Lancet Neurol, 2010. **9**(4): p. 425-37.
77. Yogo, Y., et al., *Isolation of a possible archetypal JC virus DNA sequence from nonimmunocompromised individuals*. J Virol, 1990. **64**(6): p. 3139-43.
78. Markowitz, R.B., et al., *BK virus and JC virus shed during pregnancy have predominantly archetypal regulatory regions*. J Virol, 1991. **65**(8): p. 4515-9.
79. Tominaga, T., et al., *Persistence of archetypal JC virus DNA in normal renal tissue derived from tumor-bearing patients*. Virology, 1992. **186**(2): p. 736-41.
80. Ault, G.S. and G.L. Stoner, *Human polyomavirus JC promoter/enhancer rearrangement patterns from progressive multifocal leukoencephalopathy brain are unique derivatives of a single archetypal structure*. J Gen Virol, 1993. **74** ( Pt 8): p. 1499-507.
81. Newman, J.T. and R.J. Frisque, *Detection of archetype and rearranged variants of JC virus in multiple tissues from a pediatric PML patient*. J Med Virol, 1997. **52**(3): p. 243-52.
82. Major, E.O., et al., *Glial cells of the human developing brain and B cells of the immune system share a common DNA binding factor for recognition of*

- the regulatory sequences of the human polyomavirus, JCV.* J Neurosci Res, 1990. 27(4): p. 461-71.
83. Atwood, W.J., et al., *Interaction of the human polyomavirus, JCV, with human B-lymphocytes.* Virology, 1992. 190(2): p. 716-23.
84. Houff, S.A., et al., *Involvement of JC virus-infected mononuclear cells from the bone marrow and spleen in the pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy.* N Engl J Med, 1988. 318(5): p. 301-5.
85. Monaco, M.C., et al., *JC virus infection of hematopoietic progenitor cells, primary B lymphocytes, and tonsillar stromal cells: implications for viral latency.* J Virol, 1996. 70(10): p. 7004-12.
86. Monaco, M.C., et al., *Detection of JC virus DNA in human tonsil tissue: evidence for site of initial viral infection.* J Virol, 1998. 72(12): p. 9918-23.
87. Tornatore, C., et al., *Detection of JC virus DNA in peripheral lymphocytes from patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy.* Ann Neurol, 1992. 31(4): p. 454-62.
88. Major, E.O. and R.G. Traub, *JC virus T protein during productive infection in human fetal brain and kidney cells.* Virology, 1986. 148(1): p. 221-5.
89. Feigenbaum, L., et al., *Regulation of the host range of human papovavirus JCV.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. 84(11): p. 3695-8.
90. Lynch, K.J. and R.J. Frisque, *Factors contributing to the restricted DNA replicating activity of JC virus.* Virology, 1991. 180(1): p. 306-17.
91. Tada, H., et al., *Cell type-specific expression of JC virus early promoter is determined by positive and negative regulation.* J Virol, 1989. 63(1): p. 463-6.
92. Cahan, L.D., R. Singh, and J.C. Paulson, *Sialyloligosaccharide receptors of binding variants of polyoma virus.* Virology, 1983. 130(2): p. 281-9.
93. Elphick, G.F., et al., *The human polyomavirus, JCV, uses serotonin receptors to infect cells.* Science, 2004. 306(5700): p. 1380-3.
94. Pho, M.T., A. Ashok, and W.J. Atwood, *JC virus enters human glial cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis.* J Virol, 2000. 74(5): p. 2288-92.
95. Tsai, B. and M. Qian, *Cellular entry of polyomaviruses.* Curr Top Microbiol Immunol, 2010. 343: p. 177-94.
96. Querbes, W., et al., *A JC virus-induced signal is required for infection of glial cells by a clathrin- and eps15-dependent pathway.* J Virol, 2004. 78(1): p. 250-6.

97. Querbes, W., et al., *Invasion of host cells by JC virus identifies a novel role for caveolae in endosomal sorting of noncaveolar ligands*. J Virol, 2006. **80**(19): p. 9402-13.
98. Lilley, B.N., et al., *Murine polyomavirus requires the endoplasmic reticulum protein Derlin-2 to initiate infection*. J Virol, 2006. **80**(17): p. 8739-44.
99. Schelhaas, M., et al., *Simian Virus 40 depends on ER protein folding and quality control factors for entry into host cells*. Cell, 2007. **131**(3): p. 516-29.
100. Ishii, N., et al., *Analysis of a nuclear localization signal of simian virus 40 major capsid protein Vp1*. J Virol, 1996. **70**(2): p. 1317-22.
101. Kasamatsu, H. and A. Nakanishi, *How do animal DNA viruses get to the nucleus?* Annu Rev Microbiol, 1998. **52**: p. 627-86.
102. Nakanishi, A., et al., *Association with capsid proteins promotes nuclear targeting of simian virus 40 DNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(1): p. 96-100.
103. Yamada, M. and H. Kasamatsu, *Role of nuclear pore complex in simian virus 40 nuclear targeting*. J Virol, 1993. **67**(1): p. 119-30.
104. Trowbridge, P.W. and R.J. Frisque, *Identification of three new JC virus proteins generated by alternative splicing of the early viral mRNA*. J Neurovirol, 1995. **1**(2): p. 195-206.
105. Prins, C. and R.J. Frisque, *JC virus T' proteins encoded by alternatively spliced early mRNAs enhance T antigen-mediated viral DNA replication in human cells*. J Neurovirol, 2001. **7**(3): p. 250-64.
106. Shishido-Hara, Y., et al., *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. **74**(4): p. 1840-53.
107. Brady, J., et al., *Stimulation of simian virus 40 late gene expression by simian virus 40 tumor antigen*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(7): p. 2040-4.
108. Keller, J.M. and J.C. Alwine, *Activation of the SV40 late promoter: direct effects of T antigen in the absence of viral DNA replication*. Cell, 1984. **36**(2): p. 381-9.
109. Bollag, B., et al., *JC virus small T antigen binds phosphatase PP2A and Rb family proteins and is required for efficient viral DNA replication activity*. PLoS One, 2010. **5**(5): p. e10606.

110. Major, E.O., et al., *Establishment of a line of human fetal glial cells that supports JC virus multiplication*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(4): p. 1257-61.
111. Caracciolo, V., et al., *Role of the interaction between large T antigen and Rb family members in the oncogenicity of JC virus*. Oncogene, 2006. **25**(38): p. 5294-301.
112. Dickmanns, A., et al., *The kinetics of simian virus 40-induced progression of quiescent cells into S phase depend on four independent functions of large T antigen*. J Virol, 1994. **68**(9): p. 5496-508.
113. Khalili, K., I.K. Sariyer, and M. Safak, *Small tumor antigen of polyomaviruses: role in viral life cycle and cell transformation*. J Cell Physiol, 2008. **215**(2): p. 309-19.
114. Sariyer, I.K., K. Khalili, and M. Safak, *Dephosphorylation of JC virus agnoprotein by protein phosphatase 2A: inhibition by small t antigen*. Virology, 2008. **375**(2): p. 464-79.
115. Blasquez, V., et al., *Simian virus 40 protein VP1 is involved in spacing nucleosomes in minichromosomes*. J Mol Biol, 1986. **191**(1): p. 97-106.
116. Mengeritsky, G. and E.N. Trifonov, *Nucleotide sequence-directed mapping of the nucleosomes of SV40 chromatin*. Cell Biophys, 1984. **6**(1): p. 1-8.
117. Vogel, T. and M. Singer, *The interaction of histones with simian virus 40 supercoiled circular deoxyribonucleic acid in vitro*. J Biol Chem, 1975. **250**(2): p. 796-8.
118. Wegner, M., D.W. Drolet, and M.G. Rosenfeld, *Regulation of JC virus by the POU-domain transcription factor Tst-1: implications for progressive multifocal leukoencephalopathy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(10): p. 4743-7.
119. Renner, K., H. Leger, and M. Wegner, *The POU domain protein Tst-1 and papovaviral large tumor antigen function synergistically to stimulate glia-specific gene expression of JC virus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(14): p. 6433-7.
120. Bofill-Mas, S. and R. Girones, *Excretion and transmission of JCV in human populations*. J Neurovirol, 2001. **7**(4): p. 345-9.
121. Sabath, B.F. and E.O. Major, *Traffic of JC virus from sites of initial infection to the brain: the path to progressive multifocal leukoencephalopathy*. J Infect Dis, 2002. **186 Suppl 2**: p. S180-6.

122. Kunitake, T., et al., *Parent-to-child transmission is relatively common in the spread of the human polyomavirus JC virus*. J Clin Microbiol, 1995. **33**(6): p. 1448-51.
123. Suzuki, M., et al., *Asian genotypes of JC virus in Japanese-Americans suggest familial transmission*. J Virol, 2002. **76**(19): p. 10074-8.
124. Boldorini, R., et al., *Latent human polyomavirus infection in pregnancy: investigation of possible transplacental transmission*. Pathology, 2008. **40**(1): p. 72-7.
125. Ahmed, W., et al., *Evaluating sewage-associated JCV and BKV polyomaviruses for sourcing human fecal pollution in a coastal river in Southeast Queensland, Australia*. J Environ Qual, 2010. **39**(5): p. 1743-50.
126. McQuaig, S.M., et al., *Quantification of human polyomaviruses JC Virus and BK Virus by TaqMan quantitative PCR and comparison to other water quality indicators in water and fecal samples*. Appl Environ Microbiol, 2009. **75**(11): p. 3379-88.
127. Major, E.O., et al., *Pathogenesis and molecular biology of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain*. Clin Microbiol Rev, 1992. **5**(1): p. 49-73.
128. Rieckmann, P., U. Michel, and J.H. Kehrl, *Regulation of JC virus expression in B lymphocytes*. J Virol, 1994. **68**(1): p. 217-22.
129. Monaco, M.C., J. Shin, and E.O. Major, *JC virus infection in cells from lymphoid tissue*. Dev Biol Stand, 1998. **94**: p. 115-22.
130. Berger, J.R., et al., *JC virus detection in bodily fluids: clues to transmission*. Clin Infect Dis, 2006. **43**(1): p. e9-12.
131. Degener, A.M., et al., *Detection of JC and BK viral genome in specimens of HIV-1 infected subjects*. New Microbiol, 1997. **20**(2): p. 115-22.
132. Bayliss, J., et al., *Immunosuppression increases latent infection of brain by JC polyomavirus*. Pathology, 2011. **43**(4): p. 362-7.
133. Delbue, S., et al., *Presence and expression of JCV early gene large T Antigen in the brains of immunocompromised and immunocompetent individuals*. J Med Virol, 2008. **80**(12): p. 2147-52.
134. Perez-Liz, G., et al., *Detection of JC virus DNA fragments but not proteins in normal brain tissue*. Ann Neurol, 2008. **64**(4): p. 379-87.
135. Tan, C.S., et al., *JC virus latency in the brain and extraneural organs of patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy*. J Virol, 2010. **84**(18): p. 9200-9.

136. Kedar, S. and J.R. Berger, *The changing landscape of progressive multifocal leukoencephalopathy*. Curr Infect Dis Rep, 2011. **13**(4): p. 380-6.
137. Rudick, R.A., et al., *Assessment of JC virus DNA in blood and urine from natalizumab-treated patients*. Ann Neurol, 2010. **68**(3): p. 304-10.
138. Kitamura, T., et al., *Persistent JC virus (JCV) infection is demonstrated by continuous shedding of the same JCV strains*. J Clin Microbiol, 1997. **35**(5): p. 1255-7.
139. Hatwell, J.N. and P.M. Sharp, *Evolution of human polyomavirus JC*. J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 5): p. 1191-200.
140. Ault, G.S. and G.L. Stoner, *Two major types of JC virus defined in progressive multifocal leukoencephalopathy brain by early and late coding region DNA sequences*. J Gen Virol, 1992. **73** ( Pt 10): p. 2669-78.
141. Agostini, H.T., et al., *Five complete genomes of JC virus type 3 from Africans and African Americans*. Arch Virol, 1997. **142**(4): p. 637-55.
142. Jobes, D.V., et al., *Phylogenetic analysis of 22 complete genomes of the human polyomavirus JC virus*. J Gen Virol, 1998. **79** ( Pt 10): p. 2491-8.
143. Sugimoto, C., et al., *Typing of urinary JC virus DNA offers a novel means of tracing human migrations*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(17): p. 9191-6.
144. Jobe, D.V., et al., *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): p. 2097-113.
145. Fernandez-Cobo, M., et al., *Reconstructing population history using JC virus: Amerinds, Spanish, and Africans in the ancestry of modern Puerto Ricans*. Hum Biol, 2001. **73**(3): p. 385-402.
146. Agostini, H.T., C.F. Ryschkewitsch, and G.L. Stoner, *JC virus Type 1 has multiple subtypes: three new complete genomes*. J Gen Virol, 1998. **79** ( Pt 4): p. 801-5.
147. Agostini, H.T., et al., *Genotypes of JC virus in East, Central and Southwest Europe*. J Gen Virol, 2001. **82**(Pt 5): p. 1221-331.
148. Agostini, H.T., et al., *JC virus Type 2: definition of subtypes based on DNA sequence analysis of ten complete genomes*. J Gen Virol, 1998. **79** ( Pt 5): p. 1143-51.
149. Guo, J., et al., *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. **79** ( Pt 10): p. 2499-505.

150. Kato, A., et al., *Lack of evidence for the transmission of JC polyomavirus between human populations*. Arch Virol, 1997. **142**(5): p. 875-82.
151. Arthur, R.R., S. Dagostin, and K.V. Shah, *Detection of BK virus and JC virus in urine and brain tissue by the polymerase chain reaction*. J Clin Microbiol, 1989. **27**(6): p. 1174-9.
152. Karalic, D., et al., *Distribution of JC virus genotypes among Serbian patients infected with HIV and in healthy donors*. J Med Virol, 2014. **86**(3): p. 411-8.
153. Polo, C., et al., *Prevalence and patterns of polyomavirus urinary excretion in immunocompetent adults and children*. Clin Microbiol Infect, 2004. **10**(7): p. 640-4.
154. Schaffer, K., et al., *JC virus in the Irish population: significant increase of genotype 2 in immunocompromised individuals*. J Neurovirol, 2006. **12**(1): p. 39-46.
155. Kmiecik, D., S. Debicki, and W.H. Trzeciak, *Occurrence rate and genotype distribution of the JC virus (JCV) in a sample from the Polish population*. J Med Virol, 2008. **80**(6): p. 1079-83.
156. Rossi, A., et al., *Presence, quantitation and characterization of JC virus in the urine of Italian immunocompetent subjects*. J Med Virol, 2007. **79**(4): p. 408-12.
157. Pagani, E., et al., *Molecular analysis of JC virus genotypes circulating among the Italian healthy population*. J Neurovirol, 2003. **9**(5): p. 559-66.
158. Ferrante, P., et al., *Increased frequency of JC virus type 2 and of dual infection with JC virus type 1 and 2 in Italian progressive multifocal leukoencephalopathy patients*. J Neurovirol, 2001. **7**(1): p. 35-42.
159. Dubois, V., et al., *JC virus genotypes in France: molecular epidemiology and potential significance for progressive multifocal leukoencephalopathy*. J Infect Dis, 2001. **183**(2): p. 213-217.
160. Agostini, H.T., et al., *Asian genotypes of JC virus in Native Americans and in a Pacific Island population: markers of viral evolution and human migration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(26): p. 14542-6.
161. Cui, X., et al., *Chinese strains (Type 7) of JC virus are afro-asiatic in origin but are phylogenetically distinct from the Mongolian and Indian strains (Type 2D) and the Korean and Japanese strains (Type 2A)*. J Mol Evol, 2004. **58**(5): p. 568-83.
162. Fernandez-Cobo, M., et al., *Strains of JC virus in Amerind-speakers of North America (Salish) and South America (Guarani), Na-Dene-speakers of New*

- Mexico (Navajo), and modern Japanese suggest links through an ancestral Asian population. Am J Phys Anthropol, 2002. 118(2): p. 154-68.*
163. Matos, A., et al., *Characterization of JC human polyomavirus infection in a Portuguese population. J Med Virol, 2010. 82(3): p. 494-504.*
164. Stoner, G.L., et al., *JC virus as a marker of human migration to the Americas. Microbes Infect, 2000. 2(15): p. 1905-11.*
165. Agostini, H.T., et al., *JC virus (JCV) genotypes in brain tissue from patients with progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) and in urine from controls without PML: increased frequency of JCV type 2 in PML. J Infect Dis, 1997. 176(1): p. 1-8.*