

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

REATIVAÇÕES DAS INFECÇÕES POR VÍRUS JC E BK EM DOENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS

Trabalho submetido por
Duarte Filipe Antão Fernandes
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

outubro de 2023

INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

REATIVAÇÕES DAS INFECÇÕES POR VÍRUS JC E BK EM DOENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS

Trabalho submetido por
Duarte Filipe Antão Fernandes
para a obtenção do grau de **Mestre** em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Perpétua Gomes

outubro de 2023

Agradecimentos

À Prof. Doutora Perpétua Gomes, por ter aceite o meu convite para orientação da tese, assim como a ajuda prestada no decorrer desta.

Aos meus pais, por me darem a oportunidade desta formação e pelo apoio e paciência nestes 5 anos.

À minha irmã, por ser a minha guia e sempre poder contar com ela desde que me consigo lembrar.

Às pessoas que pude conhecer durante o curso, que me apoiaram e que fizeram esta jornada melhor.

Ao Instituto Universitário Egas Moniz, e os seus professores, por transmitirem os conhecimentos necessários à minha formação.

Ao Centro Hospitalar Barreiro Montijo e à Farmácia São Lourenço, os meus locais de estágio, e seus funcionários, pela recepção e oportunidade de aprender com eles.

Resumo

Os vírus John Cunningham (JC) e BK são poliomavírus geneticamente similares, que se encontram presentes em grande parte da população, embora latentes em diversos tecidos. Em situações de imunodepressão, como é o caso dos transplantados renais, estes vírus podem reativar e causar inúmeras complicações no paciente, especialmente a nível dos rins. Uma dessas complicações é a Nefropatia Crónica do Enxerto Associada a Poliomavírus (NAPV), que consiste num grave comprometimento em transplantes renais, já que poderá provocar uma reação imunológica exacerbada e subsequente rejeição e perda da funcionalidade do rim transplantado.

Uma vez que um dos focos destes vírus são os rins, “ponte” entre o sistema circulatório e o urinário, os vírus JC e BK podem ser detetados e quantificados em amostras de sangue e urina. Como o risco que estes vírus representam para os transplantes se correlaciona com a sua carga viral, é de grande importância o conhecimento do valor a partir do qual o risco de comprometimento a nível do órgão transplantado é iminente, assim como a sua deteção precoce.

Outro fator a ter em conta é que estes vírus possuem variantes genéticas, com diferentes impactos a nível imunológico, pelo que é pertinente o conhecimento destas diferenças e a possibilidade de diferentes abordagens aquando de infeção por elas.

Desde a descoberta destes vírus, os métodos de deteção e quantificação têm sido alvo de grande desenvolvimento, em que se destacam a genotipagem, o PCR e o qPCR, tornando possível determinar quais as variantes que infetam os pacientes, monitorizar a replicação viral e criar medidas de prevenção e combate às possíveis complicações que comprometem o sucesso dos transplantes.

Palavras-chave: Vírus JC; vírus BK; transplantes renais; NAPV; quantificação

Abstract

John Cunningham (JC) and BK virus are genetically similar polyomaviruses, which are present in most population, although in a latent state in many tissues. In situations of immunodepression, like it is the case for kidney transplants, these viruses can reactivate and cause many complications to the patient, especially at kidney level. One of these complications is Polyomavirus- Associated Nephropathy (PVAN), which is a serious compromise in kidney transplants, since it may lead to a exacerbated immune reaction and subsequent rejection and loss of function of the transplanted kidney.

Given that one of the focuses of this virus are the kidneys, “bridge” between the circulatory system and the urinary system, JC and BK virus can be detected and quantified in blood and urine samples. Since the risk that these viruses present for the transplants has correlation with his viral load, it is of great importance to know the value at which the risk of commitment in the transplanted organ is imminent, as well as its early detection.

Another factor to have in mind is that these viruses possess genetic variations, with different immunological behaviors, so is important the knowledge of this differences and the possibility of different approaches when infection occurs.

Since the discovery of these viruses, the methods of detection and quantification have been subject of great development, with emphasis on genotyping, PCR and qPCR. This makes it possible to determine which variants are infecting the patients, monitor the viral replication and create prevention and combating strategies against possible complications that put at risk the success of transplants.

Keywords: JC virus; BK virus; kidney transplants; PVAN; quantification

Índice

Resumo	1
Abstract.....	3
Índice de figuras	7
Lista de abreviaturas	9
1. Introdução.....	11
2. Vírus	15
3. Poliomavírus.....	17
3.1. Estrutura viral	17
3.2. Infecção e Replicação	19
3.3. Classificação	20
3.4. Poliomavírus Humanos.....	21
4. Vírus BKPyV	25
4.1. Infecção	25
4.2. Manifestações clínicas	26
4.3. Variabilidade genética	26
5. Vírus JCPyV.....	29
5.1. Infecção	29
5.2. Manifestações clínicas	29
5.3. Variabilidade genética	30
6. Transplantes renais.....	33
6.1. Estatísticas: EUA vs Europa	35
6.2. Orientações clínicas	36
7. Métodos de detecção/quantificação	39
7.1. Citologia na urina.....	39
7.2. Biopsia	40
7.3. PCR.....	41
7.3.1. qPCR.....	42
7.4. Genotipagem.....	43
8. Conclusão	47
9. Referências	49

Índice de figuras

Figura 1 - Estrutura típica de poliomavírus (adaptado de Viral Zone)

Figura 2 - Regiões do genoma dos poliomavirus (Decaprio & Garcea, 2013)

Figura 3 - Transplantes renais nos EUA entre 2000 e 2022. Adaptado de GODT
(<https://www.transplant-observatory.org/data-charts-and-tables/chart/>)

Figura 4 - Transplantes renais na Europa entre 2000 e 2022. Adaptado de GODT
(<https://www.transplant-observatory.org/data-charts-and-tables/chart/>)

Lista de abreviaturas

ADN - Ácido desoxirribonucleico

ARN - Ácido ribonucleico

BHE – Barreira hemato-encefálica

BKPyV – Poliomavírus BK

EUA – Estados Unidos da América

HPyV - Poliomavírus humano

IARC - *International Agency for Research on Cancer*

ICTV - *International Committee on Taxonomy of Virus*

JCPyV – Poliomavírus John Cunningham

LCR – Líquido Cefalo-Raquidiano

LIPyV - Poliomavírus Lyon IARC

LMP - Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva

LT - *Large Tumor*

MCPyV - Poliomavírus das Células Merkel

NAPV - Nefropatia Crónica do Enxerto Associada a Poliomavírus

NCCR - *Non-Coding Control Region*

NGS - Next Generation Sequencing

NJPyV-2013 - Poliomavírus New Jersey 2013

PCR - Reação de Polimerização em Cadeia

qPCR - PCR quantitativo em tempo real

QPyV - Poliomavírus Quebec

SNC – Sistema Nervoso Central

ST - *Small Tumor*

TSPyV - Poliomavírus Associado à Trichodysplasia Spinulosa

1. Introdução

Os Poliomavírus são uma família de vírus que infetam uma variedade de espécies animais, incluindo os humanos. Geralmente as infecções por estes vírus mantêm-se latentes, sem causar manifestações clínicas, passando despercebidos em muitos indivíduos. No entanto, quando a imunidade está comprometida, estes vírus podem ser reativados, causando uma variedade de condições nocivas (Buck et al., 2016; Imlay & Limaye, 2022; Prezioso, Van Ghelue, Moens, et al., 2021).

Os vírus JC (John Cunningham) e BK, atualmente referidos como BKPyV e JCPyV, são os principais envolvidos nos casos de reativações virais pós transplante renal (Borriello et al., 2022)

O BKPyV está habitualmente associado ao desenvolvimento de nefropatias, isto é, comprometimento grave da funcionalidade dos rins, a NAPV. Após reativação viral, a perda de funcionalidade do rim, ou mesmo completa rejeição do mesmo, são perigos iminentes, o que põe em risco a qualidade de, e a vida do paciente (Ajit & Daniel, 2022; Comoli et al., 2006; Vigil et al., 2016).

Com JCPyV surge como comorbilidade principal a Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva (LMP), já que este vírus tem tropismo para a massa branca do cérebro. Consequentemente esta leva à desmielinização nestas regiões, desencadeando diversos problemas associados a cognição e motricidade nos pacientes afetados, levando à morte (Koralnik, 2023; Pinto & Dobson, 2014).

A reativação associada a transplantes deve-se sobretudo a uma das fases do seu processo, a imunossupressão. Esta consiste em diminuir a capacidade do sistema imunitário do paciente, seja antes, durante ou após o transplante através de terapêutica farmacológica. Este processo é efetuado pois, dado que o rim transplantado consiste numa estrutura estranha ao corpo do paciente, consequentemente o sistema imunitário do mesmo reagirá contra esta ameaça. Assim, o sistema imunitário desencadeará respostas que levam à rejeição do órgão e, com isso, eventual perda de funcionalidade do mesmo. Como tal, esta situação poderia pôr em risco a qualidade de vida, ou até mesmo causar a morte do paciente. Desta forma, utiliza-se a terapêutica imunossupressora para retardar a resposta imune e permitir que o rim transplantado não seja rejeitado e exerça a sua função corretamente (Allison, 2016; Hardinger, 2021; Oh & Connor, 2015). No entanto, da

mesma forma que esta supressão do sistema imunitário confere o benefício de assegurar que o transplante seja bem-sucedido, também deixa o organismo suscetível a infecções e reativações, como acontece no caso destes poliomavírus (Chandraker, 2023; McDonald, 2022).

Dado os riscos associados, a eficaz e precoce detecção dos vírus JC e BK é da máxima importância, de forma a permitir prevenir ou potencialmente combater as infecções emergentes associadas aos transplantes renais (Chandraker, 2023; Hardinger, 2021).

Como os principais órgãos afetados são os rins, é de esperar que estes vírus se manifestem em fluidos biológicos que contatem com estes órgãos, nomeadamente sangue e urina. Para determinar se a reativação ocorreu, são analisadas amostras destes dois fluidos, seja por pesquisa de material genético, que será devidamente amplificado e quantificado (Hirsch & Randhawa, 2019), seja por presença de células *decoy*, células peculiares que denunciam a ocorrência de infeção e replicação viral nelas (Bromberg et al., 2009; De Assis & Da Glória Da Costa Carvalho, 2017). Estudo direto de células dos rins e túbulos renais, através de biopsias são também um meio de determinar a presença de replicação viral (Whittier & Korbet, 2023; Wiegley et al., 2021).

Dado que JCPyV também possui uma forte presença a nível do cérebro, em caso de detecção de valores elevados deste vírus nas outras amostras, estudo de amostras de Líquido Cefalo-Raquidiano (LCR) são uma possibilidade (Bromberg et al., 2009; Hirsch & Randhawa, 2019).

Devido à carga viral ser um indicativo de reativação do vírus, também é importante determinar eficazmente a carga viral. Por esta razão, é imperativo a existência de estudos focados em determinar qual o valor limite a partir do qual a carga viral representa um risco de comprometimento renal, e que os dados estejam disponíveis para consulta pelos profissionais que deles necessitam.

Com o aumento da esperança média de vida e o constante desenvolvimento científico, é esperado um aumento do número de transplantes de órgãos sólidos e consequente eventuais complicações. É de extrema importância a atualização científica por forma a oferecer a estes doentes os melhores cuidados e a alcançar as maiores taxas de sucesso.

É objetivo desta revisão da literatura reunir a informação mais recente no que concerne à reativação viral dos poliomavírus, em doentes transplantados renais, e focando as metodologias laboratoriais de monitorização destas infeções que contribuem para o sucesso do enxerto. Por esta razão considero que uma revisão da literatura sobre este assunto é extremamente pertinente para a elaboração da minha tese de obtenção de Grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

2. Vírus

Vírus, do latim “veneno”, são formas patogénicas cuja replicação é feita obrigatoriamente por parasitismo intracelular, já que não possuem metabolismo próprio. Estes aproveitam-se assim dessa capacidade possuída pelas células hospedeiras para obter as proteínas e outras moléculas que necessitam para sua sobrevivência. Todos os organismos são infetados por vírus, sendo uma parte integrante do ecossistema (Pellet et al., 2020).

Vírus são compostos por genoma de ADN (ácido desoxirribonucleico) ou ARN (ácido ribonucleico), envolvido numa camada de base proteica, denominada capsíde. Existem ainda vírus que possuem uma camada lipídica a envolver a capsíde, denominados vírus com invólucro, sendo esta derivada das células hospedeiras em que ocorreu a replicação. Estas estruturas formam o chamado virião, que tem potencial de infeção. (Pellet et al., 2020).

No entanto, como qualquer organismo, nenhum vírus é exatamente igual a outro, surgindo a necessidade de os classificar e agrupar conforme as características que têm em comum e que os distinguem dos demais. Por esta razão taxonomia foi criada. Aplicado a vírus, esta classificação é feita com base em dois esquemas: Classificação de Baltimore e ICTV (*International Committee on Taxonomy of Virus*) (Pellet et al., 2020; Simmonds & Aiewsakun, 2018).

A Classificação de Baltimore, proposta pelo virologista David Baltimore em 1971, baseia-se nas diferenças a nível genético. Estas são: possui ADN ou ARN, se a cadeia é simples (ss, *single stranded*) ou dupla (ds, *double stranded*), no caso de ARN de cadeia simples, se a polaridade é positiva ou negativa, como a replicação é efetuada e sobre a produção de ARN mensageiro (mRNA). Com base nestas caraterísticas criaram-se 7 grupos distintos, numerados de I a VII (Baltimore, 1971).

O ICTV divide os vírus baseando-se nas suas caraterísticas, que incluem: se tem genoma de ARN ou ADN e a forma que este assume, o tamanho e forma da capsíde, se o vírus tem invólucro, as formas de replicação, resistência a condições adversas e comportamento durante infeção. Desta forma é possível agrupar os vírus em Espécie, que então serão agrupadas em Géneros, seguido de Sub-Famílias, Famílias e por fim Ordens (Pellet et al., 2020; Relich & Loeffelholz, 2023).

Desde 2022, existem 65 ordens virais reconhecidas pelo ICTV, totalizando em 10 434 espécies (Moens et al., 2017; Relich & Loeffelholz, 2023).

3. Poliomavírus

Os Poliomavírus pertencem à família *Polyomaviridae*, durante muitos anos referida como parte do subgrupo Papovavírus. Consiste numa família de vírus com grande variedade de hospedeiros, estendendo-se de aves a mamíferos, em que se inclui a espécie humana, tendo-se já identificado, até 2021, 15 espécies que infetam os humanos (Buck et al., 2016; Imlay & Limaye, 2022; Prezioso, Van Ghelue, Moens, et al., 2021).

O poliomavirus murino (MPyV) foi a primeira espécie isolada de poliomavírus, por Ludwig Gross, em 1953, em ratos recém-nascidos, em que notou que os túbulos renais dos animais adquiriam adenocarcinomas, descoberta que viria a dar o nome ao grupo (Dalianis & Hirsch, 2013).

O nome destes vírus deve-se à sua capacidade de gerar tumores, sendo composto pelas palavras gregas para “muito” (“*poly*”) e “tumor” (“*oma*”) (Dalianis & Hirsch, 2013; De Gascun & Carr, 2013; Schowalter et al., 2010).

3.1. Estrutura viral

Os membros desta família possuem como características comuns as que podem ser observadas na Fig.1: não possuem invólucro, possuem capsíde de simetria icosaédrica ($T=7$) com diâmetro entre 40 e 45 nm e ADN circular de dupla cadeia, cujo genoma é composto por aproximadamente 5000 pares de bases (Dalianis & Hirsch, 2013; De Gascun & Carr, 2013; Decaprio & Garcea, 2013; Imlay & Limaye, 2022; Pinto & Dobson, 2014).

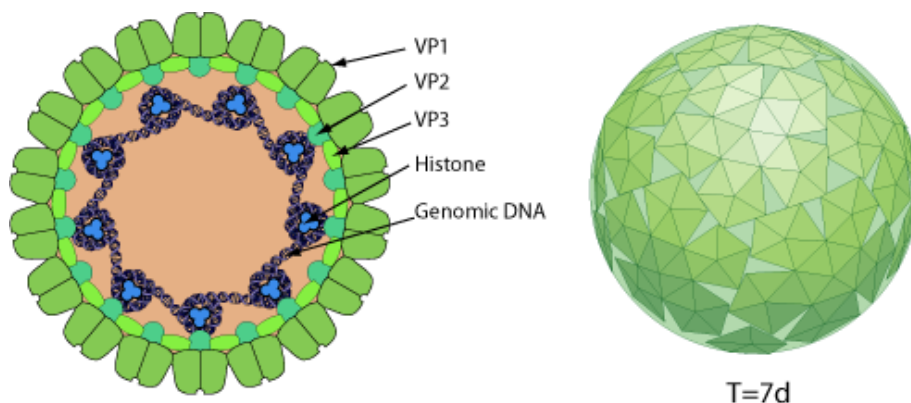


Figura 1 - Estrutura típica de poliomavírus (adaptado de Viral Zone)

Neste genoma estão constituídas 3 regiões funcionais: *Non-Coding Control Region* (NCCR), *early coding region* e *late coding region*, representadas na Fig.2. Na *early coding region* são codificados os antígenos *Large Tumor* (LT) e *Small Tumor* (ST), sendo os seus genes virais os primeiros a serem expressos, até mesmo antes da replicação do ADN. LT promove a síntese de ADN, tendo uma importância significativa no ciclo de replicação viral, e ST é responsável por despoletar a replicação celular, atribuindo consequentemente o risco oncogénico atribuído aos poliomavírus (Dalianis & Hirsch, 2013; De Gascun & Carr, 2013; Decaprio & Garcea, 2013; Imlay & Limaye, 2022; Pinto & Dobson, 2014).

Na *late coding region* são codificados, após replicação do ADN, os genes das 3 proteínas principais que formam a capsíde: VP1, VP2 e VP3, sendo a VP1 a de maior presença (*major*) e por isso a principal aquando da infeção (Dalianis & Hirsch, 2013; De Gascun & Carr, 2013; Decaprio & Garcea, 2013; Imlay & Limaye, 2022; Pinto & Dobson, 2014). Nesta região também é codificada a agnoproteína, que possui uma variedade de funções essenciais à infeção viral, em que se incluem transcrição viral, reparação de ADN, constituição da capsíde, libertação dos vírus das células hospedeiras e inibição da reparação do ADN do hospedeiro (De Gascun & Carr, 2013; Randhawa & Brennan, 2006).

Entre estas duas regiões localiza-se a NCCR, onde se encontram fatores de transcrição, tanto para genes da *early coding region* como da *late coding region* (Dalianis & Hirsch, 2013; De Gascun & Carr, 2013; Decaprio & Garcea, 2013; Imlay & Limaye, 2022; Pinto & Dobson, 2014).

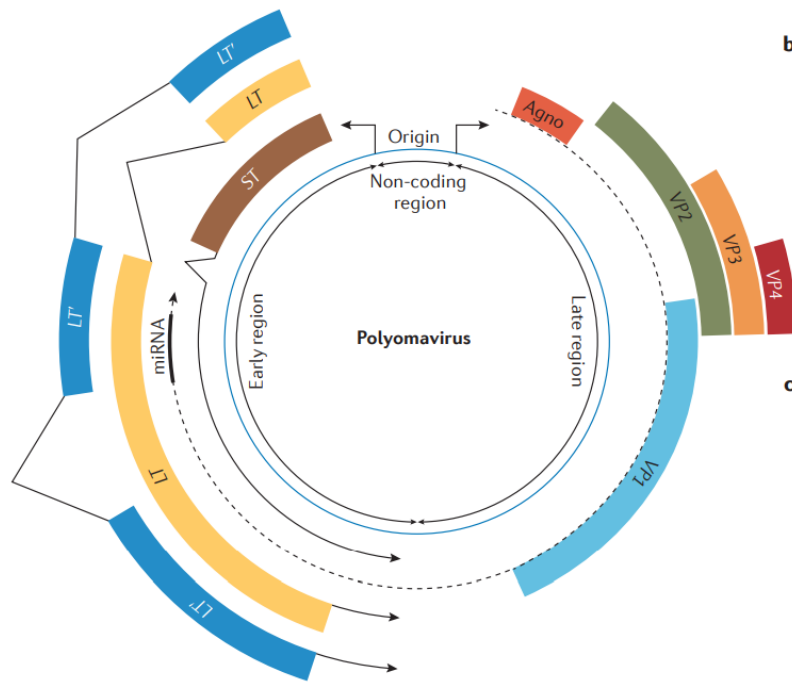


Figura 2 - Regiões do genoma dos poliomavírus (Decaprio & Garcea, 2013)

3.2. Infecção e Replicação

A replicação dos poliomavírus ocorre por um ciclo de eventos específicos. Conhecer o ciclo de replicação, um tão importante processo no começo de infecção dos seus hospedeiros, é bastante pertinente. Com esta informação, além de se ficar a conhecer melhor estes vírus, permite potencialmente formular estratégias para retardar ou mesmo evitar que o ciclo seja iniciado, juntamente com o risco que acarretam para os seus hospedeiros.

O ciclo inicia-se com a ligação dos vírus à superfície da célula hospedeira. A superfície da maioria das células é composta por gangliosídios, longas cadeias de glicolípidos ligados por hidratos de carbono, que funcionam como recetores de membrana. É a estes gangliosídios que os vírus se irão ligar, através das proteínas VP1. O método pode variar em alguns poliomavírus, mas o mais comum de acontecer após ligação é o virião executar endocitose (entrada na célula) através de estruturas lipídicas que invaginam a membrana das células (Bhattacharjee & Chattaraj, 2016; Moens et al., 2021).

Dentro da célula, o virião irá entrar no retículo endoplasmático, uma capacidade ainda não descoberta em mais nenhum vírus. Aqui, devido a enzimas isomerase-dissulfito, a capsíde desintegra-se, altura que o ácido nucleico é libertado no citoplasma.

No citoplasma, ocorre a perda da proteína VP1, pensa-se que é devido à baixa concentração de cálcio no citoplasma. O material genético viral fica então liberto e entra no núcleo da célula hospedeira (Bhattacharjee & Chattaraj, 2016; Moens et al., 2021).

No núcleo, usando os mecanismos naturais de replicação da célula, esta será forçada a fazer a transcrição dos componentes virais. Os primeiros são os antigénios LT e ST, da *early coding region*, que, com o seu papel em despoletar replicação celular, irão ser essenciais para que a replicação de ADN viral ocorra no núcleo por parte da NCCR. Tendo esta ocorrido, segue-se a produção das proteínas da capsíde, VP1, VP2 e VP3, da *late coding region*, formando por fim os novos viriões. Esta transcrição de ambas as regiões, ocorre de uma única cadeia de mRNA (ARN mensageiro), diretamente do ADN de dupla cadeia do vírus original (Bhattacharjee & Chattaraj, 2016; Moens et al., 2021).

Por fim, os viriões libertam-se da célula por lise, estando prontos para repetir o processo (Bhattacharjee & Chattaraj, 2016; Moens et al., 2021).

As células lisadas, então chamadas células *decoy*, tendo sido forçadas a uma replicação descontrolada, apresentam núcleos aumentados, semelhante ao que se veria em carcinomas, sendo bastante característico de poliomavírus e um indicativo da sua infeção (De Assis & Da Glória Da Costa Carvalho, 2017; Gai et al., 2005; Geetha et al., 2012; Tummididi et al., 2020).

3.3. Classificação

Baseado nas características já faladas, os poliomavírus são classificados, segundo o sistema de classificação de Baltimore, no grupo I, já que possuem ADN de dupla cadeia e a sua produção de ARN mensageiro ser diretamente deste ADN, sem necessidade de conversão em ARN num processo intermédio, como seria o caso do grupo VII.

Segundo o ICTV, cuja a última revisão foi feita por Moens et al em 2021, existem 6 géneros de poliomavírus de prefixos: alpha-, beta-, gamma-, delta-, epsilon- e zeta- (Moens et al., 2021).

3.4. Poliomavírus Humanos

Os representantes da família dos poliomavírus humanos (HPyV), vírus John Cunningham (JCyV) e vírus BK (BKyV), foram descobertos na década de 70 a partir de amostras de doentes e receberam os seus nomes das iniciais dos nomes destes doentes (Assetta & Atwood, 2017; Dalianis & Hirsch, 2013; Decaprio & Garcea, 2013; Imlay & Limaye, 2022; Pinto & Dobson, 2014; Prezioso, Van Ghelue, Moens, et al., 2021).

Apenas em 2007 foram descobertos novos poliomavirus humanos e, ao longo de aproximadamente uma década, foram reconhecidos os restantes 13 vírus deste grupo, que se conhecem até à data (Prezioso, Van Ghelue, Moens, et al., 2021).

Os 2 primeiros vírus descobertos em 2007, que receberam o nome do local onde ocorreu a descoberta, foram: KIPyV (Karolinska Institute), isolado de aspirações nasofaríngeas guardadas de 2004 (Allander et al., 2007), e WUPyV (Washington University), isolado de lavagem broncoalveolar de uma criança australiana com sintomas de pneumonia (Gaynor et al., 2007). Ambos aparentam ter correlação com doenças respiratórias, mas ainda não foi definitivamente comprovado.

Seguiu-se, em 2008, a descoberta do Poliomavírus das Células Merkel (MCPyV) em tumores das células da pele que lhe deram nome, sendo o vírus a possível causa deste raro mas agressivo tipo de cancro (Feng et al., 2008; Schowalter et al., 2010).

Em 2010, mais 3 vírus foram descobertos e identificados como poliomavírus humanos, todos encontrados na pele: HPyV6, HPyV7 e TSPyV. HPyV6 e HPyV7 fazem parte da flora normal da pele, assim como MCPyV, não tendo sido identificada qualquer correlação com algum tipo de doença de pele (Schowalter et al., 2010). No entanto, mais tarde descobriu-se que estariam associados a dermatoses pruriginosas e com disqueratose, uma condição muito rara de pele, em indivíduos imunocomprometidos (Nguyen et al., 2017). HPyV6 também pode estar envolvida na Doença de Kimura, uma doença inflamatória rara que causa hiperplasia angiolinfoide acompanhada de eosinofilia (Hashida et al., 2020; Rascovan et al., 2016). Outro vírus encontrado é o poliomavírus associado à Trichodysplasia Spinulosa (TSPyV) ou HPyV8, que está associado à doença que lhe dá o nome, uma doença de pele rara, típica de indivíduos imunocomprometidos, caracterizada pelo aparecimento de pápulas foliculares, engrossamento da pele e perda de cabelo nas sobrancelhas, pestanas e escalpe (van der Meijden et al., 2010).

Em 2011 outro vírus da flora da pele foi isolado: HPyV9, também sem associações conhecidas com algum tipo de patologia (Scuda et al., 2011; Trusch et al., 2012).

Em 2012, são identificados três novos vírus, no entanto, sem evidências definitivas de causarem doenças: MWPyV, STLPyV e HPyV12. Isolado em fezes de uma criança em Malawi, na África Oriental, o vírus MWPyV foi descoberto pela primeira vez e nomeado, tendo por base o local onde ocorreu a descoberta (Siebrasse et al., 2012). Consecutivamente, no mesmo ano, um estudo paralelo e independente isolou o mesmo vírus na verruga de um paciente com imunodeficiência congénita, nomeando-o HPyV10 e atribuindo esta segunda designação (Buck et al., 2012). Mais tarde, o poliomavírus Saint Louis (STLPyV) foi isolado, também numa amostra de fezes de uma criança de Malawi. Ao ser comparada com amostras, também fecais, provenientes de Gambia, na África Ocidental, e de Saint Louis, nos EUA (este último local deu o nome ao vírus), descobriu-se tratar-se do mesmo vírus e verificou-se ter grande similaridade com HPyV10 (Lim et al., 2013). Seguiu-se a descoberta de HPyV12, isolado de tecido hepático (Korup et al., 2013). Este vírus apresenta uma proximidade com um poliomavírus que infeta musaranhos, indicando uma possível infecção cruzada (Gedvilaite et al., 2017).

Em 2013, em New Jersey, nos EUA, o poliomavírus New Jersey 2013 (NJPyV-2013) ou HPyV13, foi isolado de uma biopsia muscular de uma paciente adulta que recebeu um transplante de pâncreas e estava a sofrer de cegueira, fraqueza associada a miopatia (falha nas filhas musculares), dermatose e vasculite (destruição de vasos sanguíneos). A correlação com estes ou outros sintomas não foi identificada (Mishra et al., 2014).

Em 2017, na *International Agency for Research on Cancer* (IARC), em Lyon, França, é identificado, em amostras de pele, o poliomavírus Lyon IARC (LIPyV). Este vírus possui grande similaridade com um poliomavírus que causa tumores cerebrais em guaxinins, captando assim a atenção da IARC, contudo, não foram descobertas evidências de causar esta ou outras patologias (Gheit et al., 2017). f

Por fim, mais recentemente, em 2019, em Quebec, no Canadá, o poliomavírus Quebec (QPyV), foi isolado a partir de fezes de uma paciente hospitalizada, com 85 anos (Ondov et al., 2019). Este vírus possui uma grande similaridade com HPyV6 e HPyV7, mas não há relatos que a infecção cause qualquer sintomatologia (Ondov et al., 2019; Prezioso, Van Ghelue, Pietropaolo, et al., 2021).

Na classificação, segundo o ICTV, os poliomavirus foram agrupados entre os géneros Alphapolyomavirus, Betapolyomavirus e Deltapolyomavirus. No género Alphapolyomavirus encontram-se MCPyV, TSPyV, HPyV9, HPyV12, NJPyV e LIPyV. Os pertencentes ao género Betapolyomavirus são BKPyV, JCPyV, KIPyV e WUPyV. Agrupados no género Deltapolyomavirus estão HPyV6, HPyV7, MWPyV e STLPyV (Moens et al., 2017). O QPyV não se encontra mencionado qual o género.

Como se pode ver, JCPyV e BKPyV foram os primeiros poliomavírus descobertos como capazes de infetar humanos (HPyV) e, durante mais de 30 anos, foram as espécies sobre o qual se tinha maior conhecimento. São inclusivé as mais prevalentes ainda hoje, tendo-se constatado que cerca de 80% da população atual em que se efetuaram análises possui anticorpos que denunciam a sua presença. Tal gera interesse no seu estudo dado que, embora se mantenham num estado latente na maioria da população saudável, em situações que o sistema imune seja comprometido, como ocorre em transplantes, estes vírus poderão reativar, representando um risco elevado para a rejeição do órgão (Assetta & Atwood, 2017; Borriello et al., 2022; Costigliolo et al., 2020; Decaprio & Garcea, 2013; Dehcheshmeh et al., 2020; Divers et al., 2022; Imlay & Limaye, 2022; Pinto & Dobson, 2014; Safaei, 2021).

Ao longo dos anos, desde a sua descoberta, com o aumento da compreensão destes vírus, assim como a evolução inerente das técnicas de deteção em amostras de sangue e urina, tornou-se possível detetar e assim melhor prevenir situações de reativação em transplantados renais, reduzindo o risco de rejeição do órgão e desenvolvimento de condições como a NAPV.

4. Vírus BKPyV

O vírus BKPyV foi isolado pela primeira vez em 1971 por parte de Sylvia Gardner, Anne Field e Dulcie Coleman, na urina de um paciente que tinha recebido um transplante renal, que acabou com a rejeição do mesmo. Devido a ser o primeiro poliomavírus humano isolado, tem também a designação de HPyV1 (Gardner et al., 1971).

4.1. Infecção

A infecção por BKPyV pensa-se ocorrer maioritariamente durante a infância, com 50% das crianças entre 3 e 4 anos com anticorpos para este vírus e 90% da população adulta tendo já sido exposta. A sua transmissão pode ocorrer por diversas vias pessoa-pessoa, acreditando-se que a via respiratória é a mais frequente, já que os sintomas de infecção primários, quando não assintomática, estão associados a sintomas do trato respiratório superior, podendo-se encontrar ADN viral vestigial em tecidos da amígdala. Outros meios de infecção propostos são a via oral-fecal e placentária, através transfusões de sangue ou transplantes e contato com urina infetada (De Gascun & Carr, 2013; Jiang et al., 2009; Pinto & Dobson, 2014).

É proposto que, após infecção do trato respiratório, o vírus conseguirá entrar na corrente sanguínea através das amígdalas e infetar as células mononucleadas, como os linfócitos e os monócitos. Desta forma consegue então alcançar os rins, onde se infiltrará nas células do epitélio de transição do trato urinário e nos túbulos renais, permanecendo de forma latente (Vigil et al., 2016).

O seu ciclo de replicação é igual ao já referido dos poliomavírus, mas com a diferença que na entrada das células é utilizado um recetor formado por uma glicoproteína *N-Linked* α -2,6 (Bhattacharjee & Chattaraj, 2016; Dugan et al., 2005; Pinto & Dobson, 2014).

Análises de urina evidenciaram que entre 80% dos pacientes transplantados renais possuem presença deste poliomavírus (Pinto & Dobson, 2014), indicando a sua reativação. Quando reativado, multiplica-se nas células epiteliais do túbulo renal, eventualmente levando à lise celular e excreção na urina. As células infetadas apresentam núcleos irregulares distintos e podem ser encontradas na urina. Estas células são chamadas células “*decoy*”, e resultam da reativação viral (De Assis & Da Glória Da Costa Carvalho, 2017; Gai et al., 2005; Geetha et al., 2012; Tummididi et al., 2020).

4.2. Manifestações clínicas

As consequências mais comuns são infecções do trato urinário, com a maioria dos casos a evoluir para cistite hemorrágica e NAPV. Outros sintomas observados, mas menos comuns, são retinites, doenças hepáticas, meningoencefalite e os pulmonares associados a infecção primária, sendo os mais frequentes pneumonites (Ajit & Daniel, 2022; Pinto & Dobson, 2014).

NAPV é uma condição, por vezes assintomática, que ocorre em 5-10% dos pacientes transplantados. Os sintomas, quando ocorrem, são caracterizados por um ou mais dos seguintes: baixo volume urinário, excesso de creatina na urina, inflamação e lesão dos túbulos urinários, com possível libertação das respetivas células, e urina com presença hematuria e piúria. Esta condição tem uma taxa de 50-80% de induzir rejeição do órgão transplantado, uma estatística alarmante para pacientes em necessidade de transplantes (Ajit & Daniel, 2022; Comoli et al., 2006; Vigil et al., 2016).

4.3. Variabilidade genética

O genoma completo de BKPyV foi sequenciado e publicado em 1979 por Isabelle Seif, George Khoury e Ravi Dhar.(Seif et al., 1979), podendo-se notar que possui uma similaridade genética de aproximadamente 75% para com o vírus JCPyV. Posteriormente também foi descoberto que possuem um ciclo de replicação semelhante (Frisque et al., 1984; Pinto & Dobson, 2014).

Como descoberto em 1993 por Jin et al, (Jin et al., 1993) existem 4 variantes principais de genótipos deste vírus, identificadas como I, II, III e IV, a diferença entre elas encontra-se no gene que codifica para a proteína VP1, localizado entre os nucleótidos 1744 a 1812.

A variante I tem uma prevalência de aproximadamente 80% e a variante IV de aproximadamente 15%, as restantes variantes têm a menor prevalência, de aproximadamente 5%. As variantes I e IV dividem-se ainda em subtipos, com a variante I possuindo Ia, Ib-1, Ib-2 e Ic e a variante IV possuindo IVa-1, IVa-2, IVb-1, IVb-2, IVc-1 e IVc-2 (Krumbholz et al., 2008; Morel et al., 2017).

Alguns estudos parecem demonstrar que cada subtipo é típico de uma região geográfica específica, permitindo formular uma hipótese da origem da infecção pelo vírus quando identificada a sua presença. Ia é mais comum em África, Ib-1 no sudeste asiático, Ib-2 na Europa e Ic no nordeste asiático (Ikegaya et al., 2006, 2007; Morel et al., 2017).

Os subtipos IV não foram associados a regiões específicas, parecendo no seu todo ser mais prevalentes no este asiático, excluindo o Japão. O subtipo IVc-2 é a exceção, surgindo principalmente na Europa e Nordeste Asiático (Chen et al., 2006; Ikegaya et al., 2007; Nishimoto et al., 2007).

Outra característica a salientar sobre os subtipos são as diferentes interações que demonstram aquando da infecção. Um estudo feito em 2013 por Diana Pastrana e restante equipa indica que, devido aos polimorfismos da VP1 que caracterizam as variantes, os locais de ligação dos anticorpos são diferentes. Os polimorfismos causam diferenças na capsíde, onde se encontram os locais de ligação, pelo que, devido a estas diferenças, anticorpos que seriam capazes de se ligar à superfície de certos subtipos do vírus e causar a sua neutralização, já não serão efetivos. Por esta razão, as variantes demonstram capacidade de evitar a neutralização, a menos que anticorpos específicos sejam envolvidos. Da mesma forma a sua capacidade de entrada nas células e início de replicação indica variar entre os subtipos, como demonstrado neste estudo (Pastrana et al., 2013).

Tal situação parece ser confirmada com o estudo de Rafael Varella e al. em 2018, em que foi demonstrado que o subtipo Ib apresenta menos carga viral na urina que Ia, podendo dever-se às diferenças, não só na capacidade de infecção das células e consequente multiplicação, como na sua capacidade variável de evasão à neutralização (Varella et al., 2018).

5. Vírus JCPyV

O vírus JCPyV foi isolado pela primeira vez, em 1971 por Billie Padgett, Duard Walker, Gabrielle ZuRhein e Robert Eckroade, no tecido cerebral de um paciente com Leucoencefalopatia Multifocal Progressiva (LMP), após este morrer. O paciente chamava-se John Cunningham, cujas iniciais deram o nome ao vírus (Pietropaolo et al., 2018). Devido a ter sido o segundo poliomavírus humano a ser descoberto, recebe também a designação HPyV2.

5.1. Infecção

Tal como no BKPyV, a infecção ocorre assintomaticamente na infância, com cerca de 50% dos indivíduos em idades entre 10 e 15 anos possuindo anticorpos que indicam a sua presença (Pinto & Dobson, 2014), atingindo a percentagem de 86% em adultos (Koralnik, 2023).

A sua transmissão aparenta ocorrer da mesma forma que o vírus BKPyV, com mais incidência sobre o trato gastrointestinal, onde pode estabelecer latência. A partir daqui consegue também alcançar os rins e órgãos do sistema linfático, e neles adquirir latência, sofrendo reativação após imunossupressão do seu hospedeiro (Assetta & Atwood, 2017; Imlay & Limaye, 2022; Pinto & Dobson, 2014).

O seu ciclo de replicação é igual ao já referido dos poliomavírus, com a particularidade de que necessita de interagir com o recetor 5HT2A. Este é um recetor de serotonina presente na superfície das células, maioritariamente no sistema nervoso. É através desta ligação que o vírus consegue executar endocitose, sendo esta característica que o faz capaz de infetar o sistema nervoso central (SNC) (Bhattacharjee & Chattaraj, 2016).

5.2. Manifestações clínicas

O JCPyV está associado, assim como o BKPyV, a complicações renais, no entanto a percentagem de causar NAPV encontra-se aproximadamente em 1-5% (Costa, 2012; Pinto & Dobson, 2014).

Quando reativado, irá principalmente causar doenças de foco no SNC, com a LMP a ser a mais frequente (Assetta & Atwood, 2017; Divers et al., 2022; Imlay & Limaye, 2022; Pinto & Dobson, 2014). Esta doença causa a desmielinização de várias regiões cerebrais, principalmente na massa branca subcortical e no cortex, levando a um começo de perda de coordenação, hemiparesia, afasia, disartria, hemianopsia, alteração da personalidade e morte (Koralnik, 2023; Pinto & Dobson, 2014).

O vírus tem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, que é o que lhe permite alcançar as zonas cerebrais mencionadas. Por esta razão, pode também ser encontrado em amostras de líquido cefalorraquidiano e tecido cerebral (Koralnik, 2023).

Foi descoberto que a seroprevalência de JCV ocorre mais tarde e com um aumento inferior ao de BKV. A presença na urina, indicador de reativação, aparenta ser mais comum que em BKV, assim como em maior concentração, quando ocorre assintomaticamente. No entanto, em situações de imunocomprometimento, apresenta menor aumento da carga viral urinária, indicando que sofre uma reativação menos severa nestas condições. Estas estatísticas são coincidentes com a menor frequência de nefropatia associada a JCPyV (Dalianis & Hirsch, 2013; Dehcheshmeh et al., 2020; Wiegley et al., 2021).

Também foi descoberto que causa diversos tipos de cancro a nível gastrointestinal e cerebral (Dehcheshmeh et al., 2020; Maginnis & Atwood, 2009; Pietropaolo et al., 2018; Pinto & Dobson, 2014).

5.3. Variabilidade genética

O genoma completo deste poliomavírus foi sequenciado por Richard Frisque, Gary Bream e Maria Cannella em 1984, em que se notou uma similaridade de 75% com BKPyV. O genoma é composto de 5130 pares de nucleótidos (Frisque et al., 1984; Pinto & Dobson, 2014).

JCPyV possui 7 variantes principais, das quais existem cerca de 14 subtipos, baseados em diferenças de 0,56 a 1% na região codificante da proteína VP1 (Agostini et al., 2001; Shackelton et al., 2006; Zanotta et al., 2013).

O tipo I tem maior frequência na Europa, II e VII são mais frequentes na Ásia, III é

mais encontrado no este africano e VI no oeste e África Central, e IV é mais prevalente nos EUA e na Europa (Agostini et al., 2001; Dehcheshmeh et al., 2020; Shackelton et al., 2006; Zanotta et al., 2013).

Quanto aos subtipos I e IV, num estudo, Ia apresentou mais prevalência em Polacos e Húngaros, enquanto Ib foi descoberto como a única variante localizada nos grupos provindos dos Bascos e de Espanha, enquanto os provindos da Alemanha apresentaram igual prevalência de Ia e Ib. O tipo 4 não foi encontrado nos grupos húngaros (Agostini et al., 2001; Shackelton et al., 2006; Zanotta et al., 2013).

A informação relativa às diferenças significativas entre estes tipos, assim como às características específicas dos seus subtipos, é escassa.

6. Transplantes renais

Para melhor compreensão do JCPyV e do BKPyV, além do estudo das suas características e processo de infecção, é fundamental também conhecer as circunstâncias em que se destacam, nomeadamente em situação de transplante.

Transplantes são procedimentos em que a colheita de células, tecidos ou órgãos de um indivíduo é efetuada e implantada no mesmo ou outro indivíduo. Estes procedimentos podem ser muito importantes para preservar a qualidade de vida de um paciente, ou mesmo garantir a sua sobrevivência, nomeadamente quando o funcionamento do órgão original é insuficiente ou existe algum tipo de anomalia que o torna nocivo para o paciente (Chandraker, 2023).

O primeiro transplante bem-sucedido, um rim, foi efetuado em 1954 e desde aí cada vez mais indivíduos têm necessidade desde procedimento (Nordham & Ninokawa, 2022).

Transplantes renais oferecem mais benefícios, em termos de qualidade de vida e taxa de sobrevivência, para um paciente em falência renal do que a diálise, consequentemente é a abordagem preferida tanto em adultos, como em crianças (Bromberg et al., 2009; Chandraker, 2023; McDonald, 2022).

Há diversos fatores que afetam o sucesso de transplantes renais, sendo os mais frequentes: a etnia e idade do paciente e do doador, compatibilidade entre o paciente e o doador, se o órgão deriva de um doador vivo ou morto, doenças prévias e adesão ao regime alimentar e farmacológico exigente (Chandraker, 2023; McDonald, 2022; Vella, 2023).

No entanto, o fator imediato mais preocupante dos transplantes, é a sua rejeição. Devido à introdução de um órgão não pertencente ao paciente, composto de células e proteínas diferentes, é esperado que o sistema imunitário assuma como uma possível ameaça, desencadeando uma resposta imune que leva, na maioria dos casos, à sua destruição. Se esta resposta imune progride, seguem-se falhas no funcionamento do órgão transplantado, com possível morte do paciente (Calne, 2005; Oh & Connor, 2015).

Para evitar a rejeição pelo sistema imune, que comprometerá o seu funcionamento, e consequentemente a saúde do paciente, os pacientes sujeitos a estes procedimentos têm

de realizar terapêutica imunossupressora. Desta forma é possível retardar a resposta imune e o órgão introduzido integrar o corpo e fazer a sua ação corretamente. Subsequentemente faz-se a redução gradual da terapêutica imunossupressora ao verificar-se a integração do novo órgão (Allison, 2016; Calne, 2005; Hardinger, 2021).

No entanto, com a imunossupressão podem surgir novos desafios, como doenças cardiovasculares, desenvolvimento de cancro e infeções ou reativações virais. Relativamente a este último, como o sistema imune se encontra enfraquecido, mais dificilmente o organismo consegue combater infeções. Desta forma surge o risco de desenvolvimento de infeções oportunistas, sendo exemplo a reativação dos poliomavírus como referido anteriormente, o que representa outro fator pertinente para o sucesso ou não do transplante (Chandraker, 2023; Fishman, 2022; Hardinger, 2021; McDonald, 2022).

Por esta razão, é essencial uma monitorização regular e atenta do paciente para determinar o estado de integração do órgão, para assim se decidir reduzir em segurança a terapêutica imunossupressora. O quanto se reduz, e quando, é fundamental na minimização do risco de reativação dos poliomavírus, sem comprometer a não rejeição do rim transplantado (Bromberg et al., 2009; Chandraker, 2023; Hardinger, 2021).

Da mesma forma, é essencial um planeamento correto da terapêutica imunossupressora adequada. Isto é, quais as combinações mais apropriadas de medicação para obter o sucesso desejado (Bromberg et al., 2009).

Desde o primeiro transplante, muitas foram as melhorias efetuadas no procedimento de transplantação, no controlo da medicação imunossupressora adequada e na gestão pós transplante dos pacientes, permitindo o seu sucesso, tanto em adultos, como em crianças. Desta forma a qualidade de vida dos pacientes é melhorada e a taxa de mortalidade reduzida (Calne, 2005; Chandraker, 2023; McDonald, 2022; Nordham & Ninokawa, 2022; Vella, 2023).

6.1. Estatísticas: EUA vs Europa

Nos EUA, como consta na WHO-ONT *Global Observatory on Donation and Transplantation*, e se pode ver no gráfico da Fig.3, os números de transplantes renais efetuados aumentaram de 13 621 transplantes, em 2000, para 24 273 transplantes, em 2019, o aumento não sendo, no entanto, linear nem acentuado. De 2019 para 2020 ocorreu uma descida, para 23 644 transplantes renais, que talvez se possa dever à Pandemia COVID-19, embora descidas semelhantes já tivessem ocorrido anteriormente. Nos anos subsequentes voltou a aumentar, com 25 490 transplantes em 2021 e finalmente atingindo 26 310 transplantes em 2022.

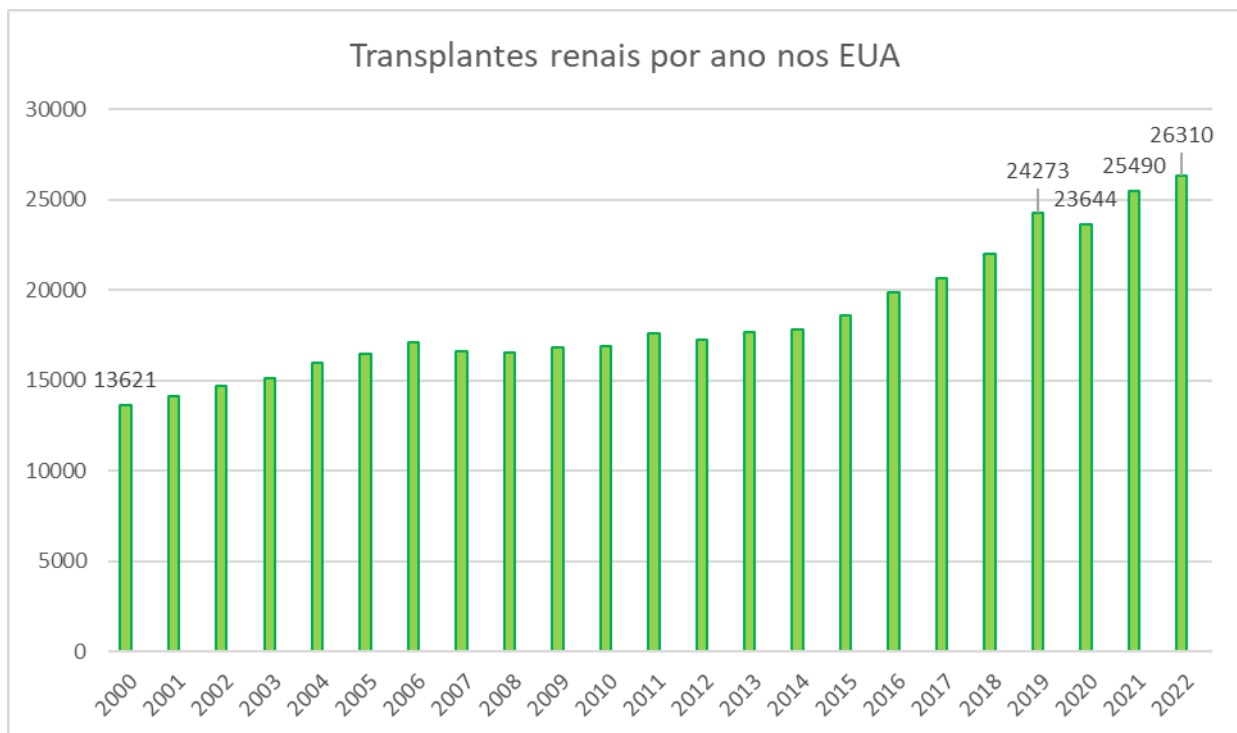


Figura 3 - Tranplantes renais no EUA entre 2000 e 2022. Adaptado de GODT (<https://www.transplant-observatory.org/data-charts-and-tables/chart/>)

Por sua vez na Europa, também referido na WHO-ONT *Global Observatory on Donation and Transplantation*, e como se pode ver no gráfico da Fig.4, entre 2000 e 2019, com exceção de 2002 e 2008, houve um aumento consistente de transplantes renais efetuados, de 7 754 para 28 189. Em 2020, houve uma diminuição acentuada de transplantes, para 22 006, que se pode dever à imersão da pandemia COVID-19. No entanto voltou a sofrer um aumento até 2021, com 23 593 transplantes, e em 2022, em que atingiu o valor de 25 361 transplantes.

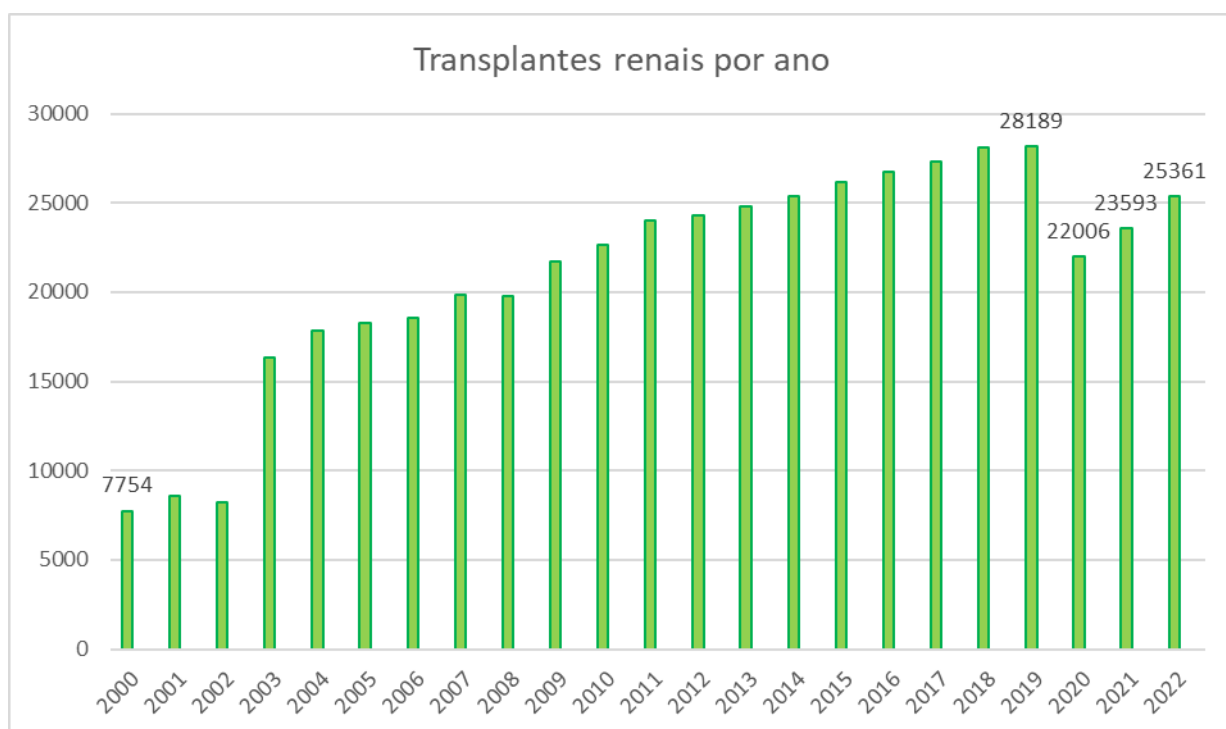


Figura 4 - Transplantes renais na Europa entre 2000 e 2022. Adaptado de GODT (<https://www.transplant-observatory.org/data-charts-and-tables/chart/>)

Comparando os valores entre Europa e EUA, na Europa o aumento ao longo destes 22 anos é mais acentuado, atingindo inclusive maior número de transplantes efetuados, com 28 189 transplantes em 2019. Obteve, no entanto, valores menores em relação aos EUA nos anos 2021 e 2022.

6.2. Orientações clínicas

Analisando as orientações clínicas (*guidelines*) americanas, da *American Society of Transplantation* e da *American Society of Transplant Surgeon* (Bromberg et al., 2009; Hirsch & Randhawa, 2019), e europeias, da *European Association of Urology* (Breda et al., 2023) e *Consensus on Managing Modifiable Risk in Transplantation Group* (Neuberger et al., 2017), a monitorização de infeção por vírus BK é relatada como essencial, de forma a melhor efetuar um planeamento das precauções necessárias à não rejeição do rim transplantado. Nestas *guidelines* também se expressa um melhor sucesso em fazer terapêutica de combinação imunossupressora antes ou aquando do transplante (Bromberg et al., 2009; Neuberger et al., 2017).

É previsível que, 3 meses após transplante, 50% dos pacientes irá desenvolver

virémia, com subsequente nefropatia associada numa média de 8 meses. Assim sendo, nas *guidelines* americanas há uma sugestão para deteção da presença de BKV em plasma, por métodos de deteção e quantificação de ácidos nucleicos, em que se incluem o PCR e qPCR. O regime sugerido de seguimento é mensal, durante 3 meses após transplante renal, passando a ser trimestral até aos 12 meses, altura que a monitorização deixa de ser requerida (Bromberg et al., 2009). Nas publicações mais recentes, há sugestão do *follow-up* inicial continuar mensal, mas estendido até aos 9 meses, subsequentemente passando a ser trimestral até aos 2 anos após o transplante. Há também a sugestão de, em caso de pacientes pediátricos, poder ser estendido após os 2 anos (Hirsch & Randhawa, 2019).

Perante um aumento persistente de carga viral de BKPyV superior a 10 000 cópias/mL ou que se mantenha superior a 1 000 cópias/ml durante 3 meses, é aconselhado a redução da terapêutica imunossupressora, já que o risco de nefropatia é de 93%. Perante a possibilidade de não execução da testagem de ácido nucleico, a citologia renal é o método considerado para despiste de infeção ou reativação de BKPyV, com confirmação a partir de biopsia (Bromberg et al., 2009; Hirsch & Randhawa, 2019).

Nas *guidelines* europeias há sugestão para deteção durante os 2 primeiros anos após transplante, pelo menos a cada 3 meses. Os valores de carga viral de BKPyV em que é sugerida a redução da terapêutica imunossupressora são quando superiores a 10 000 cópias/mL de forma persistente (Heemann et al., 2011).

Quanto à possibilidade de infeção por JCPyV, em ambas as *guidelines* americanas e europeias, não há indicação de prioridade da sua monitorização, que parece dever-se à menor incidência de complicações renais associadas a este vírus.

7. Métodos de detecção/quantificação

Devido ao elevado risco que estes vírus representam em situações em que a imunidade é comprometida, como é o caso dos transplantes, surge a necessidade de atempadamente se tomarem as necessárias precauções quanto à sua reativação. Assim, é essencial a existência de métodos de detecção destes vírus, assim como determinar se se encontram em concentrações que possam pôr em risco os pacientes infectados.

Dado que os rins são o principal local de latência destes vírus, os métodos de detecção são aplicados nestes órgãos e nos seus meios de contato, nomeadamente sangue e urina já que, perante reativação, estas amostras apresentam carga viral. No caso do JCPyV, como tem uma incidência significativa no SNC, amostras de LCR ou de tecido cerebral também podem ser usadas para monitorização.

Dado que o BKPyV tem mais incidência em complicações renais, existem mais estudos a indicar os seus métodos de detecção, quando aplicado a transplantes renais, do que para o JCPyV.

Os métodos mais usados são: Citologia da urina, Biopsia, PCR, qPCR e Genotipagem.

7.1. Citologia na urina

A citologia na urina consiste num teste nesta amostra biológica, a partir da qual se faz uma preparação que será visualizada ao microscópio com o objetivo de detetar a presença de células irregulares. Aplicado à detecção dos vírus JC e BK, procuram-se células epiteliais de forma irregular e núcleos maiores do que o normal, características da infeção por estes vírus (De Assis & Da Glória Da Costa Carvalho, 2017; Singh et al., 2006).

Estas células foram observadas pela primeira vez pelo especialista em citotecnologia Andrew Ricci quando, nos anos 50, analisava urina de pacientes de alto risco de cancro da bexiga. Devido às suas características, são facilmente confundidas com células cancerígenas. Só em 1971 foi descoberto que tinham origem na infeção por poliomavírus e foram denominadas células “decoy” (De Assis & Da Glória Da Costa Carvalho, 2017).

Embora este método seja fácil de realizar e de baixo custo para monitorização da infeção, não permite distinguir se a infeção viral é por JCPyV ou por BKPyV. Também pode surgir por reativações passageiras, sem evolução para situações graves, por isso não é conclusivo para determinação inicial de uma infeção que ponha o paciente em risco. Outra desvantagem deste método prende-se com o facto de estar sujeito a erros de interpretação da citologia. Por esta razão surge a necessidade de métodos mais específicos e sensíveis (Bromberg et al., 2009; Gai et al., 2005; Lamarche et al., 2016; Parmjeet Randhawa et al., 2005; Tummidi et al., 2020; Vigil et al., 2016).

7.2. Biopsia

A biopsia é um procedimento cirúrgico em que se efetua a colheita de células ou amostras de tecido para observação ao microscópio. É o método que confere uma determinação mais eficaz da infeção pelos poliomavírus e permite uma monitorização das condições do rim, possibilitando perceber se o transplante foi bem-sucedido e detetar potenciais anomalias (Vigil et al., 2016; Whittier & Korbet, 2023).

Biopsia de rim por meio percutâneo é o método usado normalmente, isto é, inserção de uma agulha designada para esta função através da pele até chegar aos rins, recolhendo assim uma amostra (Whittier & Korbet, 2023).

Segundo as recomendações da European Society of Urology, é prática essencial efetuar biopsias, não só em regime pós-operatório, monitorizando assim o estado do rim transplantado e se há progressão de infeção, como em pré-operatório, tanto ao rim doado como ao paciente transplantado. Desta forma consegue-se um despiste mais fidedigno da infeção por BKPyV (Breda et al., 2023). As recomendações da American Society of Transplantation e da American Society of Transplant Surgeon, não fazem referência a biopsia pré-operatória ao rim transplantado, mas expressam também a grande importância deste teste (Bromberg et al., 2009).

Já foi determinada efetividade de biopsia no despiste de NAPV causada por JCPyV (Wiegley et al., 2021), mas, devido à menor prevalência desta condição quando comparada com NAPV causada por BKPyV, mais foco é dado a esta última em estudos e guidelines disponíveis.

Devido a tratar-se de um processo mais invasivo para o paciente do que os demais disponíveis, a biópsia tende a ser usada apenas como confirmação destes, maioritariamente quando já se determinou um risco considerável de reativação.

7.3. PCR

Reação de Polimerização em Cadeia ou PCR (do inglês, “Polymerase Chain Reaction”) é uma técnica desenvolvida em 1983 por Kary Mullis, que permite amplificar segmentos específicos de ADN de uma amostra, ainda que presentes em baixas quantidades (Gibbs, 1990; Raby, 2023; Samreen & Nagi, 2020).

Este processo é tornado possível pela utilização de um par de primers, oligonucleótidos capazes de se ligar complementarmente ao ADN em zonas definidas, ADN polimerase, uma enzima responsável pela polimerização das regiões a serem amplificadas, e contínuas mudanças de temperatura num meio que consiga providenciar as condições necessárias à amplificação (Bell, 1989; Gibbs, 1990; Lo & Chan, 2006; Samreen & Nagi, 2020).

O PCR é composto de 3 fases, que se vão repetindo até obtenção da quantidade desejada. A replicação ocorre de forma exponencial, isto é, à medida que cada cópia vai sendo criada, esta é usada também como modelo da replicação, obtendo-se cada vez mais cópias no mesmo espaço de tempo (Bell, 1989; Gibbs, 1990; Lo & Chan, 2006).

Posteriormente, de forma a determinar se o PCR foi bem-sucedido, seria tipicamente efetuada eletroforese em gel de agarose, para separação dos produtos por tamanho, juntamente de ADN ladder, um marcador de peso molecular com fragmentos de ADN de tamanhos conhecidos, fazendo-se a comparação (Bell, 1989; Gibbs, 1990; Lo & Chan, 2006).

Graças a esta técnica é possível analisar mais detalhadamente segmentos do ADN a estudar, cuja quantidade inicial não tornaria tal possível, tendo diversas utilizações, tais como: testes de paternidade, deteção de genes específicos num indivíduo, identificação forense de suspeitos e determinação de agentes patogénicos, em que se incluem estes poliomavírus (Gibbs, 1990; Samreen & Nagi, 2020).

As vantagens deste método são a sua simplicidade e rapidez de execução e a deteção

ocorre diretamente nas amostras, onde o risco de mutações é mínima. Quando feito em culturas, este risco seria mais elevado. Além do já referido, este método consegue amplificar quantidades reduzidas de ADN, o que permite detetar os vírus em fases precoces de infeção. Desta forma cria a oportunidade de uma intervenção atempada. Outra vantagem encontra-se também que é menos invasivo para o paciente, já que as amostras usadas são de origem sanguínea e urinária (Bell, 1989; Gibbs, 1990; Raby, 2023).

No entanto tem a desvantagem de ser demorado e, dado que necessita de posteriormente ser efetuada uma eletroforese, há uma maior probabilidade de erros de processo ou contaminações, afetando a veracidade do procedimento (Bell, 1989; Gibbs, 1990).

Em amostra de urina, não só é detetável mil vezes mais carga viral do que em plasma sanguíneo, como, quando apresenta valor negativo, possui probabilidade aproximada de 100% de ser indicativo da ausência de BKPyV (valor preditivo negativo). Por esta razão, testes urinários tendem a ser preferidos (Bromberg et al., 2009; Pinto & Dobson, 2014).

É de salientar que este método, em prática clínica, tem sido substituído pelo qPCR.

7.3.1. qPCR

PCR quantitativo em tempo real ou qPCR é um procedimento semelhante ao PCR convencional, mas em vez de se quantificar o produto da amplificação no final do procedimento, ocorre uma monitorização ao longo do processo (Ding & Suthanthiran, 2003; Gibbs, 1990).

Para que tal ocorra, métodos de deteção do ADN amplificado precisam de ser implementados. Os métodos mais usados para esse efeito são sondas ou corantes que se ligam de forma específica a sequências de ADN e emitem fluorescência. A quantificação é feita por comparação com uma curva padrão da relação entre fluorescência e quantidade replicada.

O qPCR, para além das vantagens já enumeradas no PCR convencional, apresenta outras, nomeadamente, é menos dispendioso em tempo que este, já que não requer o uso da eletroforese após amplificação, e permite não só diagnosticar a presença dos vírus,

como também a evolução da sua infecção, um ponto importante na monitorização de doentes com risco potencial de NAPV, segundo as guidelines (Bromberg et al., 2009; Heemann et al., 2011; Hirsch & Randhawa, 2019; Mbianda et al., 2015).

Foi já determinado que o valor de carga viral de BKPyV a partir do qual o comprometimento renal é eminente é de aproximadamente 10 000 cópias/mL, estando já descrito nas guidelines relativas a transplantes renais (Bromberg et al., 2009; Dall & Hariharan, 2008; Heemann et al., 2011; Hirsch & Randhawa, 2019). Sabendo este valor, e tendo um método de monitorização da carga viral, como o qPCR, torna-se possível manter um controlo sobre a progressão da infecção de BKPyV e evitar comprometimento renal.

Este valor não se encontra, no entanto, relatado para JCPyV, seja em guidelines ou em estudos, que se pode dever à prevalência menor de comprometimento renal causada por este vírus.

7.4. Genotipagem

Genótipagem consiste no estudo do genótipo, sequências de ADN, que compõem um organismo e que são responsáveis pelas suas características.

Identificação genotípica dos vírus ocupa um papel muito importante, ao permitir melhor compreender o seu funcionamento, identificar variantes que possam ocorrer e a sua localização demográfica e geográfica. Estas variantes merecem atenção pois, como já falado anteriormente, nem sempre os polimorfismos manifestam alterações não sinónimas no funcionamento dos vírus, isto é, possuem funcionamento diferenciado das demais, podendo necessitar de diferentes abordagens quando se depara com elas (Kohlmann & Slavotinek, 2022).

Por exemplo, alguns polimorfismos atribuírem a capacidade de evitar neutralização por parte dos anticorpos que normalmente seriam efetivos contra outros subtipos, o que gera a necessidade de anticorpos específicos (McIlroy et al., 2020; Pastrana et al., 2013).

Através da informação de quais variantes possuem determinados polimorfismos, é possível melhorar o diagnóstico dos vírus em questão, melhor conhecer como cada variante reage durante as infeções e a subsequente resposta imunitária, essencial para formular métodos de prevenção e combate apropriados. Estas variantes e as suas

caraterísticas genéticas então descobertas ficarão disponíveis em plataformas de acesso aos profissionais, como o NCBI ou ENSEMBL. A partir destas pode-se fazer uma comparação direta com variantes mundialmente conhecidas, sem necessitar de amostras referenciais, tornando o processo de identificação mais eficiente.

O método mais utilizado é a sequenciação. Este método tem tido um extenso desenvolvimento, especialmente em Next Generation Sequencing (NGS). NGS consiste numa tecnologia que permite obter uma sequenciação completa através dos fragmentos de ADN que o compõem, obtidos de forma paralela. Este método providencia uma velocidade de sequenciação aumentada e custo diminuído (Hulick, 2022).

O que faz deste método uma mais-valia, é que proporciona uma informação mais precisa da população viral do paciente (Hulick, 2022).

NGS pode ser usado na deteção e análise de mutações no controlo da transcrição viral, como foi primeiramente feito em 2020, assim como em análise metagenómica, isto é, caraterizar genomicamente uma comunidade (Liimatainen et al., 2020). Esta última é particularmente pertinente no contexto de transplantes pois permite analisar os poliomavírus e determinar a abundância de infeções pós-transplante (Carpenter et al., 2019; Hulick, 2022).

Outro método usado é Sanger sequencing. Este método de sequenciação, desenvolvido por Frederick Sanger em 1977, consiste em causar uma interrupção na replicação do ADN em zonas específicas, levando a que fragmentos se formem. Estes fragmentos são então usados para obter a sequência desejada, até aproximadamente 500 a 900 bases. Este método possui a desvantagem de, para se manter rentável economicamente e em tempo, não permitir obter informações sobre múltiplos genes, devido ao limite de pares de bases imposto. No entanto, dado que a classificação em subtipos não requer uma sequência maior que 900 bases, este método é eficaz para esta função (Hulick, 2022).

Como atualmente, polimorfismos na região codificante da proteína VP1 do vírus BK já foram alvo de vários estudos, as variações que caraterizam os diferentes subtipos já são conhecidos. Por esta razão, genotipagem maioritariamente baseia-se em identificar os polimorfismos desta região. Estudos de forma a identificar polimorfismos nas regiões que codificam para o antígeno LT (Pastrana et al., 2013) e NCCR (Morel et al., 2017), com

os quais classificar BKPyV, também são realizados.

Também já foram descobertas variações na NCCR do JCPyV, cujo estudo indica que estão relacionadas com maior tropismo para o cérebro e assim maior probabilidade de causar LMP (L'Honneur et al., 2022).

8. Conclusão

Os vírus JC e BK encontram-se disseminados na população, o que se pode perceber pela sua elevada prevalência.

Apesar de se manterem latentes na maioria da população, com infeção primária a ser, geralmente, assintomática ou de sintomas respiratórios ligeiros, quando o indivíduo infetado se encontra numa situação de imunossupressão, estes vírus podem reativar, causando complicações graves.

Entre as doenças conhecidas e associadas à reativação destes poliomavírus, a mais frequente é Nefropatia Associada a Poliomavírus, caracterizada por complicações a nível dos rins. Esta condição é especialmente preocupante em indivíduos que receberam um transplante renal, pois pode levar à destruição do rim transplantado, comprometendo a qualidade de vida ou mesmo sobrevivência do paciente. Tal situação ganha especial pertinência dado o aumento de transplantes renais, evidenciado nos últimos 20 anos.

Já que, como parte do processo de não rejeição do órgão transplantado, dá-se uso à terapêutica imunossupressora, é desta forma criada a oportunidade para reativação dos vírus. Por esta razão existe uma associação e preocupação associadas a transplantes renais e reativação destes vírus, especialmente BKPyV, devido a ser o mais associado a complicações renais, enquanto JCPyV afeta mais o SNC.

Sendo assim, um planeamento da terapêutica imunossupressora, de forma a evitar rejeição do órgão, mas que também mantenha sob controlo a reativação de BKPyV e JCPyV, é parte integrante do sucesso de transplantes renais. Relacionado a isto, é também importante ter noção da carga viral a partir da qual os poliomavírus representam um perigo de comprometimento renal, valor que se encontra aproximadamente nas 10 000 cópias/mL para BKPyV e ainda não determinado para JCPyV. Tendo conhecimento deste valor, aquando da monitorização da carga viral, torna-se possível ajustar a terapêutica imunossupressora e reduzir o risco de complicações no órgão transplantado.

Desde a década de 70, em que foram isolados pela primeira vez, vários desenvolvimentos foram feitos para a compreensão destes vírus, bem como dos

métodos para os detetar e monitorizar e das respetivas abordagens aquando dos transplantes. Desta forma, é providenciado mais oportunidade de sucesso para pacientes com necessidade de transplantes renais.

Mas ainda não se conhece por completo o BKPyV e JCPyV, por isso é de grande importância continuar o estudo dos mesmos, reduzindo assim mais um fator de risco para o sucesso dos transplantes.

9. Referências

- Agostini, H. T., Deckhut, A., Jobes, D. V., Girones, R., Schlunck, G., Prost, M. G., Frias, C., Pérez-Trallero, E., Ryschkewitsch, C. F., & Stoner, G. L. (2001). Genotypes of JC virus in East, Central and Southwest Europe. *Journal of General Virology*, 82(5), 1221–1331. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-5-1221>
- Ajit, P. L., & Daniel, C. B. (2022). *Kidney transplantation in adults: BK polyomavirus-associated nephropathy*. UpToDate. <https://www.uptodate.com/contents/kidney-transplantation-in-adults-bk-polyomavirus-associated-nephropathy?csi=b102213fdca0-4921-bc3c-4ff67f44b185&source=contentShare>
- Allander, T., Andreasson, K., Gupta, S., Bjerkner, A., Bogdanovic, G., Persson, M. A. A., Dalianis, T., Ramqvist, T., & Andersson, B. (2007). Identification of a Third Human Polyomavirus. *Journal of Virology*, 81(8), 4130–4136. <https://doi.org/10.1128/jvi.00028-07>
- Allison, T. L. (2016). Immunosuppressive Therapy in Transplantation. *Nursing Clinics of North America*, 51(1), 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.cnur.2015.10.008>
- Assetta, B., & Atwood, W. J. (2017). The biology of JC polyomavirus. *Biological Chemistry*, 398(8), 839–855. <https://doi.org/10.1515/hsz-2016-0345>
- Baltimore, D. (1971). Expression of animal virus genomes. *Bacteriological Reviews*, 35(3), 235–241. <https://doi.org/10.1128/mmbr.35.3.235-241.1971>
- Bhattacharjee, S., & Chattaraj, S. (2016). Entry, infection, replication and egress of human Polyomaviruses: an update. *Canadian Journal of Microbiology*, 63(3), 193–211. <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0519>
- Borriello, M., Ingrosso, D., Perna, A. F., Lombardi, A., Maggi, P., Altucci, L., & Caraglia, M. (2022). BK Virus Infection and BK-Virus-Associated Nephropathy in Renal Transplant Recipients. *Genes*, 13(7), 1290. <https://doi.org/10.3390/genes13071290>
- Breda, A., Budde, K., Figueiredo, A., García, E. L., Vice-chair, J. O., Regele, H., Boissier, G. A. R., Hevia, V., & Smith, G. O. E. J. (2023). *EAU Guidelines on Renal Transplantation*.

- Bromberg, J. S., Fairchild, R. L., Feng, S., Kaplan, B., Barr, M. L., Grady, J. O., Hughes, G., Bradley, J. A., Brennan, D., Briscoe, D. M., Bumgardner, G. L., Eason, J. D., Gill, J., Gill, R. G., Hadley, G., Keshavjee, S., Klintmalm, G. B., Ross, H., Salomon, D. R., ... Jevnikar, A. M. (2009). *American Journal of Transplantation*. 9.
- Buck, C. B., Phan, G. Q., Raiji, M. T., Murphy, P. M., McDermott, D. H., & McBride, A. A. (2012). Complete Genome Sequence of a Tenth Human Polyomavirus. *Journal of Virology*, 86(19), 10887–10887. <https://doi.org/10.1128/jvi.01690-12>
- Buck, C. B., Van Doorslaer, K., Peretti, A., Geoghegan, E. M., Tisza, M. J., An, P., Katz, J. P., Pipas, J. M., McBride, A. A., Camus, A. C., McDermott, A. J., Dill, J. A., Delwart, E., Ng, T. F. F., Farkas, K., Austin, C., Krabberger, S., Davison, W., Pastrana, D. V., & Varsani, A. (2016). The Ancient Evolutionary History of Polyomaviruses. *PLoS Pathogens*, 12(4), 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005574>
- Calne, R. (2005). Challenges of organ transplantation. In *Transplantation Proceedings* (Vol. 37, Issue 5, pp. 1979–1983). <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2005.03.066>
- Chandraker, A. M. Y. Y. (2023). *Kidney transplantation in adults: Overview of care of the adult kidney transplant recipient*. UpToDate. <https://www.uptodate.com/contents/kidney-transplantation-in-adults-overview-of-care-of-the-adult-kidney-transplant-recipient?csi=4bde6f20-6c2e-4ddc-95d1-0f9b7db7f3ca&source=contentShare>
- Chen, Q., Zheng, H. Y., Zhong, S., Ikegaya, H., He, H. X., Wei, W., He, Y. Y., Kobayashi, N., Honjo, T., Takasaka, T., Takahashi, S., Kitamura, T., & Yogo, Y. (2006). Subtype IV of the BK polyomavirus is prevalent in East Asia. *Archives of Virology*, 151(12), 2419–2429. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0814-z>
- Comoli, P., Binggeli, S., Ginevri, F., & Hirsch, H. H. (2006). Polyomavirus-associated nephropathy: Update on BK virus-specific immunity. *Transplant Infectious Disease*, 8(2), 86–94. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3062.2006.00167.x>
- Costa, C. (2012). Polyomavirus-associated nephropathy. *World Journal of Transplantation*, 2(6), 84. <https://doi.org/10.5500/wjt.v2.i6.84>

- Costigliolo, F., Lombardo, K., Arend, L. J., Rosenberg, A. Z., Carter-monroe, N., & Bagnasco, S. M. (2020). *BK Virus RNA in Renal Allograft Biopsies*. 68(5). <https://doi.org/10.1369/0022155420922604>
- Dalianis, T., & Hirsch, H. H. (2013). Human polyomaviruses in disease and cancer. *Virology*, 437(2), 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.12.015>
- De Assis, P. G., & Da Glória Da Costa Carvalho, M. (2017). Human polyomavirus infection: Cytological and molecular diagnosis. *Revista Da Associacao Medica Brasileira*, 63(11), 943–945. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.63.11.943>
- De Gascun, C. F., & Carr, M. J. (2013). Human polyomavirus reactivation: Disease pathogenesis and treatment approaches. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013, 373579. <https://doi.org/10.1155/2013/373579>
- Decaprio, J. A., & Garcea, R. L. (2013). REVIEWS A cornucopia of human polyomaviruses. *Nature Publishing Group*, 11(4), 264–276. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2992>
- Dehcheshmeh, L. K., Makvandi, M., & Timori, A. (2020). *Prevalence of Human Polyomavirus JC and BK in Normal Population*. 21, 2877–2882. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2020.21.10.2877>
- Divers, J., Langefeld, C. D., Lyles, D. S., Ma, L., & Freedman, B. I. (2022). *Protective association between JC polyoma viruria and kidney disease*. 28(1), 65–69. <https://doi.org/10.1097/MNH.0000000000000464>.Protective
- Dugan, A. S., Eash, S., & Atwood, W. J. (2005). An N-Linked Glycoprotein with $\alpha(2,3)$ -Linked Sialic Acid Is a Receptor for BK Virus. *Journal of Virology*, 79(22), 14442–14445. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.22.14442-14445.2005>
- Feng, H., Shuda, M., Chang, Y., & Moore, P. S. (2008). Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science*, 319(5866), 1096–1100. <https://doi.org/10.1126/science.1152586>
- Fishman, J. A. (2022). *Infection in the solid organ transplant recipient*. UpToDate. <https://www.uptodate.com/contents/infection-in-the-solid-organ-transplant->

recipient?csi=c06b8208-2942-4289-9bf0-2f646a0e9b54&source=contentShare

- Frisque, R. J., Bream, G. L., & Cannella, M. T. (1984). Human polyomavirus JC virus genome. *Journal of Virology*, 51(2), 458–469. <https://doi.org/10.1128/jvi.51.2.458-469.1984>
- Gai, M., Lanfranco, G., & Segoloni, G. P. (2005). “Decoy cells” in urine. *Transplantation Proceedings*, 37(10), 4309–4310. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2005.11.045>
- Gardner, S. D., Field, A. M., Coleman, D. V., & Hulme, B. (1971). New Human Papovavirus (B.K.) Isolated From Urine After Renal Transplantation. *The Lancet*, 297(7712), 1253–1257. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(71\)91776-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(71)91776-4)
- Gaynor, A. M., Nissen, M. D., Whiley, D. M., Mackay, I. M., Lambert, S. B., Wu, G., Brennan, D. C., Storch, G. A., Sloots, T. P., & Wang, D. (2007). Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathogens*, 3(5), 0595–0604. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030064>
- Gedvilaite, A., Tryland, M., Ulrich, R. G., Schneider, J., Kurmauskaite, V., Moens, U., Preugschas, H., Calvignac-Spencer, S., & Ehlers, B. (2017). Novel polyomaviruses in shrews (Soricidae) with close similarity to human polyomavirus 12. *Journal of General Virology*, 98(12), 3060–3067. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000948>
- Geetha, V., Rao, L., Monappa, V., Susmitha, M. S., & Prabhu, R. (2012). Decoy cells in urine cytology: A useful clue to post-transplant polyoma virus infection. *Journal of Cytology*, 29(2), 133–134. <https://doi.org/10.4103/0970-9371.97157>
- Gheit, T., Dutta, S., Oliver, J., Robitaille, A., Hampras, S., Combes, J. D., McKay-Chopin, S., Le Calvez-Kelm, F., Fenske, N., Cherpelis, B., Giuliano, A. R., Franceschi, S., McKay, J., Rollison, D. E., & Tommasino, M. (2017). Isolation and characterization of a novel putative human polyomavirus. *Virology*, 506(March), 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.03.007>
- Hardinger, K. D. C. B. (2021). *Kidney transplantation in adults: Maintenance immunosuppressive therapy*. UpToDate. <https://www.uptodate.com/contents/kidney-transplantation-in-adults-maintenance->

immunosuppressive-therapy?topicRef=14039&source=see_link

- Hashida, Y., Higuchi, T., Nakajima, K., Ujihara, T., Murakami, I., Fujieda, M., Sano, S., & Daibata, M. (2020). Human Polyomavirus 6 with the Asian–Japanese Genotype in Cases of Kimura Disease and Angiolymphoid Hyperplasia with Eosinophilia. *Journal of Investigative Dermatology*, 140(8), 1650-1653.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.12.027>
- Heemann, U., Abramowicz, D., Spasovski, G., & Vanholder, R. (2011). Endorsement of the Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) guidelines on kidney transplantation: A European Renal Best Practice (ERBP) position statement. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 26(7), 2099–2106. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfr169>
- Hirsch, H. H., & Randhawa, P. S. (2019). BK polyomavirus in solid organ transplantation—Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clinical Transplantation*, 33(9), 1–19. <https://doi.org/10.1111/ctr.13528>
- Ikegaya, H., Motani, H., Saukko, P., Sato, K., Akutsu, T., & Sakurada, K. (2007). BK virus genotype distribution offers information of tracing the geographical origins of unidentified cadaver. *Forensic Science International*, 173(1), 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2007.01.022>
- Ikegaya, H., Saukko, P. J., Terti, R., Metsärinne, K. P., Carr, M. J., Crowley, B., Sakurada, K., Zheng, H. Y., Kitamura, T., & Yogo, Y. (2006). Identification of a genomic subgroup of BK polyomavirus spread in European populations. *Journal of General Virology*, 87(11), 3201–3208. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82266-0>
- Imlay, H., & Limaye, A. P. (2022). *Overview and virology of JC polyomavirus, BK polyomavirus, and other polyomavirus infections*. UpToDate.
- Jiang, M., Abend, J. R., Johnson, S. F., & Imperiale, M. J. (2009). The role of polyomaviruses in human disease. *Virology*, 384(2), 266–273. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.09.027>
- Jin, L., Gibson, P. E., Booth, J. C., & Clewley, J. P. (1993). Genomic typing of BK virus

- in clinical specimens by direct sequencing of polymerase chain reaction products. *Journal of Medical Virology*, 41(1), 11–17. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890410104>
- Koralnik, I. J. (2023). *Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML): Epidemiology, clinical manifestations, and diagnosis*. UpToDate. <https://www.uptodate.com/contents/progressive-multifocal-leukoencephalopathy-pml-epidemiology-clinical-manifestations-and-diagnosis?csi=2c4720d9-b714-43e7-9a96-a0d4eb3ffd40&source=contentShare>
- Korup, S., Rietscher, J., Calvignac-Spencer, S., Trusch, F., Hofmann, J., Moens, U., Sauer, I., Voigt, S., Schmuck, R., & Ehlers, B. (2013). Identification of a Novel Human Polyomavirus in Organs of the Gastrointestinal Tract. *PLoS ONE*, 8(3), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058021>
- Krumbholz, A., Bininda-Emonds, O. R. P., Wutzler, P., & Zell, R. (2008). Evolution of four BK virus subtypes. *Infection, Genetics and Evolution*, 8(5), 632–643. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.05.006>
- Lim, E. S., Reyes, A., Antonio, M., Saha, D., Ikumapayi, U. N., Adeyemi, M., Stine, O. C., Skelton, R., Brennan, D. C., Mkakosya, R. S., Manary, M. J., Gordon, J. I., & Wang, D. (2013). Discovery of STL polyomavirus, a polyomavirus of ancestral recombinant origin that encodes a unique T antigen by alternative splicing. *Virology*, 436(2), 295–303. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.12.005>
- Maginnis, M. S., & Atwood, W. J. (2009). JC virus: an oncogenic virus in animals and humans? *Seminars in Cancer Biology*, 19(4), 261–269. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2009.02.013>
- McDonald, R. A. (2022). *Kidney transplantation in children: Outcomes*. UpToDate. <https://www.uptodate.com/contents/kidney-transplantation-in-children-outcomes?csi=29a2163f-0781-4371-a317-e51df0d41ab6&source=contentShare>
- Mishra, N., Pereira, M., Rhodes, R. H., An, P., Pipas, J. M., Jain, K., Kapoor, A., Briese, T., Faust, P. L., & Ian Lipkin, W. (2014). Identification of a novel Polyomavirus in a pancreatic transplant recipient with retinal blindness and Vasculitic Myopathy. *Journal of Infectious Diseases*, 210(10), 1595–1599.

<https://doi.org/10.1093/infdis/jiu250>

- Moens, U., Calvignac-Spencer, S., Lauber, C., Ramqvist, T., Feltkamp, M. C. W., Daugherty, M. D., Verschoor, E. J., & Ehlers, B. (2017). *Species List: Polyomaviridae*. ICTV Report. <https://ictv.global/report/chapter/polyomaviridae/taxonomy/polyomaviridae>
- Moens, U., Calvignac-Spencer, S., Lauber, C., Ramqvist, T., Feltkamp, M. C. W., Daugherty, M. D., Verschoor, E. J., & Ehlers, B. (2021). *Family: Polyomaviridae*. ICTV Report. <https://ictv.global/report/chapter/polyomaviridae/polyomaviridae>
- Morel, V., Martin, E., François, C., Helle, F., Faucher, J., Mourez, T., Choukroun, G., Duverlie, G., Castelain, S., & Brochot, E. (2017). A simple and reliable strategy for BK virus subtyping and subgrouping. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(4), 1177–1185. <https://doi.org/10.1128/JCM.01180-16>
- Neuberger, J. M., Bechstein, W. O., Kuypers, D. R. J., Burra, P., Citterio, F., De Geest, S., Duvoux, C., Jardine, A. G., Kamar, N., Krämer, B. K., Metselaar, H. J., Nevens, F., Pirenne, J., Rodríguez-Perálvarez, M. L., Samuel, D., Schneeberger, S., Serón, D., Trunečka, P., Tisone, G., & Van Gelder, T. (2017). Practical recommendations for long-term management of modifiable risks in kidney and liver transplant recipients: A guidance report and clinical checklist by the consensus on managing modifiable risk in transplantation (COMMIT) group. In *Transplantation* (Vol. 101, Issue 4). <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001651>
- Nguyen, K. D., Lee, E. E., Yue, Y., Stork, J., Pock, L., North, J. P., Vandergriff, T., Cockerell, C., Hosler, G. A., Pastrana, D. V., Buck, C. B., & Wang, R. C. (2017). Human Polyomavirus 6 and 7 Are Associated with a Pruritic and Dyskeratotic Dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 76(5), 932–940. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2016.11.035>
- Nishimoto, Y., Zheng, H. Y., Zhong, S., Ikegaya, H., Chen, Q., Sugimoto, C., Kitamura, T., & Yogo, Y. (2007). An Asian origin for subtype IV BK virus based on phylogenetic analysis. *Journal of Molecular Evolution*, 65(1), 103–111. <https://doi.org/10.1007/s00239-006-0269-6>
- Nordham, K. D., & Ninokawa, S. (2022). The history of organ transplantation. *Baylor*

- University Medical Center Proceedings*, 35(1), 124–128.
<https://doi.org/10.1080/08998280.2021.1985889>
- Oh, J., & Connor, P. W. O. (2015). Mechanisms and Treatment. *Nature Publishing Group*, 11(2), 76–78. <http://dx.doi.org/10.1038/nrneurol.2014.259>
- Ondov, B. D., Starrett, G. J., Sappington, A., Kostic, A., Koren, S., Buck, C. B., & Phillippy, A. M. (2019). Mash Screen: High-throughput sequence containment estimation for genome discovery. *Genome Biology*, 20(1), 1–13.
<https://doi.org/10.1186/s13059-019-1841-x>
- Pastrana, D. V., Ray, U., Magaldi, T. G., Schowalter, R. M., Çuburu, N., & Buck, C. B. (2013). BK Polyomavirus Genotypes Represent Distinct Serotypes with Distinct Entry Tropism. *Journal of Virology*, 87(18), 10105–10113.
<https://doi.org/10.1128/jvi.01189-13>
- Pellet, P. E., Mitra, S., & Holland, T. C. (2020). Basics of virology. *Handbook of Clinical Neurology*, 123(January), 45–66.
- Pietropaolo, V., Prezioso, C., Bagnato, F., & Antonelli, G. (2018). John Cunningham virus: An overview on biology and disease of the etiological agent of the progressive multifocal leukoencephalopathy. *New Microbiologica*, 41(3), 179–186.
- Pinto, M., & Dobson, S. (2014). BK and JC virus: a review. *The Journal of infection*, 68 Suppl 1, S2–S8. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2013.09.009>
- Prezioso, C., Van Ghelue, M., Moens, U., & Pietropaolo, V. (2021). HPyV6 and HPyV7 in urine from immunocompromised patients. *Virology Journal*, 18(1), 1–7.
<https://doi.org/10.1186/s12985-021-01496-1>
- Prezioso, C., Van Ghelue, M., Pietropaolo, V., & Moens, U. (2021). Detection of quebec polyomavirus dna in samples from different patient groups. *Microorganisms*, 9(5), 1–9. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051082>
- Randhawa, P., & Brennan, D. C. (2006). BK virus infection in transplant recipients: An overview and update. *American Journal of Transplantation*, 6(9), 2000–2005.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2006.01403.x>

- Rascovan, N., Monteil Bouchard, S., Grob, J. J., Collet-Villette, A. M., Gaudy-Marqueste, C., Penicaud, M., Lepidi, H., Raoult, D., & Desnues, C. (2016). Human polyomavirus-6 infecting lymph nodes of a patient with an angiolymphoid hyperplasia with eosinophilia or kimura disease. *Clinical Infectious Diseases*, 62(11), 1419–1421. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw135>
- Relich, R. F., & Loeffelholz, M. J. (2023). Taxonomic Changes for Human Viruses, 2020 to 2022. *Journal of Clinical Microbiology*, 61(1). <https://doi.org/10.1128/jcm.00337-22>
- Safaei, F. (2021). *Viruria of Human BK Virus and John Cunningham Virus among Renal Transplant Recipients and Healthy Control in Southeast of Caspian Sea*. 4934174515, 111–118. <https://doi.org/10.1159/000513369>
- Schowalter, R. M., Pastrana, D. V, Pumphrey, K. A., Moyer, A. L., & Buck, C. B. (2010). Short Article Merkel Cell Polyomavirus and Two Previously Unknown Polyomaviruses Are Chronically Shed from Human Skin. *Cell Host and Microbe*, 7(6), 509–515. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.05.006>
- Scuda, N., Hofmann, J., Calvignac-Spencer, S., Ruprecht, K., Liman, P., Kühn, J., Hengel, H., & Ehlers, B. (2011). A Novel Human Polyomavirus Closely Related to the African Green Monkey-Derived Lymphotropic Polyomavirus. *Journal of Virology*, 85(9), 4586–4590. <https://doi.org/10.1128/jvi.02602-10>
- Seif, I., Khoury, G., & Dhar, R. (1979). The genome of human papovavirus BKV. *Cell*, 18(4), 963–977. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(79\)90209-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(79)90209-5)
- Shackelton, L. A., Rambaut, A., Pybus, O. G., & Holmes, E. C. (2006). JC Virus Evolution and Its Association with Human Populations. *Journal of Virology*, 80(20), 9928–9933. <https://doi.org/10.1128/jvi.00441-06>
- Siebrasse, E. A., Reyes, A., Lim, E. S., Zhao, G., Mkakosya, R. S., Manary, M. J., Gordon, J. I., & Wang, D. (2012). Identification of MW Polyomavirus, a Novel Polyomavirus in Human Stool. *Journal of Virology*, 86(19), 10321–10326. <https://doi.org/10.1128/jvi.01210-12>
- Simmonds, P., & Aiewsakun, P. (2018). Virus classification – where do you draw the

- line? *Archives of Virology*, 163(8), 2037–2046. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3938-z>
- Trusch, F., Klein, M., Finsterbusch, T., Kühn, J., Hofmann, J., & Ehlers, B. (2012). Seroprevalence of human polyomavirus 9 and cross-reactivity to African green monkey-derived lymphotropic polyomavirus. *Journal of General Virology*, 93(4), 698–705. <https://doi.org/10.1099/vir.0.039156-0>
- Tummidi, S., Kothari, K., Agnihotri, M., Naik, L., & Rojekar, A. (2020). Diagnostic utility of urine cytology in detection of decoy cells in renal transplant patients: Report of five cases and review of literature. *Diagnostic Cytopathology*, 48(3), 222–227. <https://doi.org/10.1002/dc.24337>
- van der Meijden, E., Janssens, R. W. A., Lauber, C., Bavinck, J. N. B., Gorbalenya, A. E., & Feltkamp, M. C. W. (2010). Discovery of a new human polyomavirus associated with Trichodysplasia Spinulosa in an immunocompromized patient. *PLoS Pathogens*, 6(7), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001024>
- Varella, R. B., Zalona, A. C. J., Diaz, N. C., Zalis, M. G., & Santoro-Lopes, G. (2018). BK polyomavirus genotypes Ia and Ib1 exhibit different biological properties in renal transplant recipients. *Virus Research*, 243, 65–68. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.10.018>
- Vella, J. (2023). *Kidney transplantation in adults: Patient survival after kidney transplantation*. UpToDate. https://www.uptodate.com/contents/kidney-transplantation-in-adults-patient-survival-after-kidney-transplantation?topicRef=14039&source=see_link
- Vigil, D., Konstantinov, N. K., Barry, M., Harford, A. M., Servilla, K. S., Kim, Y. H., Sun, Y., Ganta, K., & Tzamaloukas, A. H. (2016). BK nephropathy in the native kidneys of patients with organ transplants: Clinical spectrum of BK infection. *World Journal of Transplantation*, 6(3), 472. <https://doi.org/10.5500/wjt.v6.i3.472>
- Wiegley, N., Walavalkar, V., Aujla, H., Chen, L.-X., Huang, Y., Lee, B. K., & Jen, K.-Y. (2021). Clinicopathologic Characteristics of JC Virus Nephropathy in Kidney Transplant Recipients. *Transplantation*, 105(5), 1069–1076. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000003363>

Zanotta, N., Delbue, S., Rossi, T., Pelos, G., D'Agaro, P., Monasta, L., Ferrante, P., & Comar, M. (2013). Molecular epidemiology of JCV genotypes in patients and healthy subjects from Northern Italy. *Journal of Medical Virology*, 85(7), 1286–1292. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jmv.23585>