

JOSÉ MARCOS PEREIRA COSTA

**Padronização e emprego de métodos de amplificação molecular  
para pesquisa de seqüências genômicas dos vírus linfotrópicos  
de células T humanas dos tipos I e II (HTLV-I/II) em indivíduos  
com sorologia indeterminada**

Dissertação apresentada ao Departamento de  
Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de  
Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção  
do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Doenças Infecciosas e  
Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Aluísio Augusto Cotrim Segurado

São Paulo

2004

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

JOSÉ MARCOS PEREIRA COSTA

**Padronização e emprego de métodos de amplificação molecular  
para pesquisa de seqüências genômicas dos vírus linfotrópicos  
de células T humanas dos tipos I e II (HTLV-I/II) em indivíduos  
com sorologia indeterminada**

Dissertação apresentada ao Departamento de  
Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de  
Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção  
do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Doenças Infecciosas e  
Parasitárias

Orientador: Prof. Dr. Aluísio Augusto Cotrim Segurado

São Paulo

2004

Dedico este trabalho  
aos meus pais Zezico e Teresinha  
e a Deus.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Aluísio Augusto Cotrim Segurado, meu orientador, por despertar em mim o entusiasmo pela investigação científica dos retrovírus e pelo exemplo de dedicação ao trabalho.

Ao Dr. Claudio Sergio Pannuti, chefe do Laboratório de Virologia (LIM-52) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), por gentilmente ter me acolhido em seu Laboratório onde pude realizar esta investigação científica.

À Sra. Laura Massami Sumita, bióloga do LIM-52 do HC-FMUSP, pela imensurável colaboração para o progresso desta pesquisa.

À Mestra Lucy Santos Vilas Boas, ao Sr. Wilton Santos Freire e à Srta. Silvia Helena Lima, pelo importante auxílio que me deram desde os primeiros passos nesta caminhada pela área da biologia molecular.

A todos os colegas do Laboratório de Virologia, pelo convívio gratificante e pelos incentivos.

À Prof. Dra. Maria Mitzi Brentani e ao Prof. Dr. Roger Chammas, pela oportunidade de realizar parte da fase experimental desta pesquisa dentro do Laboratório de Oncologia Experimental (LIM-24) do HC-FMUSP.

À Mestra Maria Lúcia Hirata Katayama, pela indispensável colaboração nas pesquisas realizadas no LIM-24 do HC-FMUSP.

À Dra. Adele Caterino de Araújo, pesquisadora do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, que contribuiu imensamente com valiosas sugestões na fase

de qualificação deste estudo e com os testes adicionais realizados em alguns pacientes desta pesquisa.

Ao Dr. José Eduardo Levi e ao Dr. Paulo César Cotrim, pelo comprometimento com o qual participaram da banca de qualificação, contribuindo com suas sábias avaliações e sugestões na fase final desta pesquisa.

À Dra. Ester Cerdeira Sabino e Sra. Nanci Alves Salles, da Divisão de Sorologia da Fundação Pró-Sangue – Hemocentro de São Paulo (FPSHSP), que gentilmente forneceram dados de seu banco de informações e amostras para controles negativos das reações.

À dra. Maria José Andrada Serpa que gentilmente cedeu amostra de linhagem celular MT-2.

A todos os colegas do Ambulatório da Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HC-FMUSP, pela agradável convivência e auxílio mútuos.

Às funcionárias Rose e Roseli da Secretaria da Pós-Graduação da Área de Concentração em Doenças Infecciosas e Parasitárias do Curso de Pós-Graduação “senso estrito” da FMUSP.

À Nilde e a todos os demais amigos com os quais convivi nesta fase da vida e que a tornaram mais prazerosa.

Ao meus irmãos e demais familiares pelo apoio.

## SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas	
Lista de tabelas	
Lista de quadros	
Lista de figuras	
Resumo	
Summary	
1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Histórico.....	02
1.2 Características biológicas dos vírus HTLV-I/II.....	04
1.3 Epidemiologia.....	08
1.4 Diagnóstico.....	11
1.5. Justificativa.....	17
2 ASPECTOS ÉTICOS.....	21
3 OBJETIVOS.....	23
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 Casuística.....	26
4.2 Cepa padrão de HTLV-I (MT-2) em cultura de linfócitos.....	27
4.3 Testes sorológicos para o diagnóstico de infecção pelo HTLV-I/II.....	31
4.4. Diagnóstico molecular da infecção pelo HTLV-I/II.....	32
5 RESULTADOS.....	40

5.1 Caracterização da casuística estudada de pacientes com teste sorológico de <i>Western blot</i> indeterminado para HTLV-I/II.....	41
5.2 Avaliação da cepa padrão de HTLV-I (MT-2) para determinar a sensibilidade das reações de PCR e <i>nested</i> PCR para amplificação das seqüências <i>tax</i> e <i>pol</i> do genoma proviral seguidas por diferentes métodos de revelação.....	44
5.3 Amplificação de seqüências genômicas provirais de HTLV a partir de células mononucleares de sangue periférico de pacientes com sorologia indeterminada.....	52
6 DISCUSSÃO.....	62
7 CONCLUSÕES.....	83
8 ANEXOS.....	86
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
Apêndice	

## ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

$^{32}\text{P}$	isótopo radioativo do elemento fósforo
AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida (do inglês <i>acquired immune deficiency syndrome</i> )
AlkPhos	fosfatase alcalina
ATL	leucemia de células T do adulto (do inglês <i>adult T-cell leukemia</i> )
ATLL	leucemia/linfoma de células T do adulto (do inglês <i>adult T-cell leukemia/lymphoma</i> )
bp	pares de bases
EtBr	brometo de etídio
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HC-FMUSP
CD25	molécula diferenciadora de grupo (do inglês <i>cluster of differentiation</i> )
CDC	Centro para Controle de Doenças dos EUA (do inglês <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> )
cm <sup>2</sup>	centímetro quadrado
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
CONEP	Comissão Nacional de Pesquisa do Ministério da Saúde do Brasil
Corp	<i>Corporation</i>

cpm	contagens por minuto
dATP	deoxiadenina-trifosfato (do ingles <i>deoxyadenine triphosphate</i> )
dCTP	deoxicitidina-trifosfato (do ingles <i>deoxycytidine triphosphate</i> )
dGTP	deoxiguanina-trifosfato (do ingles <i>deoxyguanine triphosphate</i> )
DMSO	dimetil-sulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico (do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	deoxinucleosídeo-trifosfato (do ingles <i>deoxynucleoside triphosphate</i> )
dTTP	deoxitimidina-trifosfato (do ingles <i>deoxythymidine triphosphate</i> )
EDTA	ácido etilenodiamino-tetracético
EIA	ensaio imunoenzimático (do inglês <i>enzyme immunoassay</i> )
ELISA	ensaio imunoenzimático (do inglês <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
<i>et al.</i>	e colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
FMUSP	Faculdade de Medicina da USP
GM-CSF	fator de crescimento de granulócitos e monócitos (do inglês <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> )
gp	glicoproteína
H <sub>2</sub> O	água com grau de pureza do tipo I
HAM/TSP	mielopatia associada ao HTLV-I ou paraparesia espástica tropical (do inglês <i>HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis</i> )
HBV	vírus da hepatite B (do inglês <i>hepatitis B virus</i> )

HC	Hospital das Clínicas
HCl	ácido clorídrico
HCV	vírus da hepatite C (do inglês <i>hepatitis C virus</i> )
HIV 1 e 2	vírus da imunodeficiência humana dos tipos 1 e 2 (do inglês <i>human immunodeficiency vírus</i> )
HTLV-I/II	vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos I e II (do inglês <i>human T-cell lymphotropic virus types I/II</i> )
ICAM-1	molécula de adesão intercelular (do inglês <i>intercellular adhesion molecule</i> )
Inc.	<i>Incorporation</i>
LAV	vírus associado à linfadenopatia (do inglês <i>lymphadenopathy-associated virus</i> )
LIM	Laboratório de Investigação Médica
LTR	segmentos longos repetitivos (do inglês <i>long terminal repeats</i> )
M	molar
MgCl <sub>2</sub>	cloreto de magnésio
ml	mililitro
N	normal
NaCl	cloreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
ng	nanograma
nm	nanômetro
nm	nanômetro
nM	nanomoles

nt	nucleotídio
°C	graus Celsius
ORFs	regiões abertas de leitura (do inglês <i>open reading frames</i> )
p52	proteína 52
PCR	reação em cadeia por polimerase (do inglês <i>polymerase chain reaction</i> )
pg	picograma
q.s.p.	quantidade suficiente para
RFLP	análise de polimorfismo de fragmentos de restrição (do inglês <i>restriction fragment length polymorphism</i> )
RIPA	ensaio de radioimunoprecipitação (do inglês <i>radioimmunoprecipitation assay</i> )
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotações por minuto
RPMI	meio de cultura
s	segundos
SBF	soro fetal bovino
SDS	sódio duodecil-sulfato
SSC	cloreto de sódio e citrato de sódio
ssDNA	esperma de salmão
TAE	tris-ácido acético e EDTA
TBE	tris-ácido bórico e EDTA
TE	tris-EDTA
UDEV	usuário de drogas endovenosas

UI	unidade internacional
USP	Universidade de São Paulo
v/v	volume/volume
$\mu\text{Ci}$	microcurie
$\mu\text{g}$	micrograma
$\mu\text{l}$	microlitro

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição por faixa etária dos pacientes com teste imunológico de <i>Western blot</i> indeterminado para HTLV, HC-FMUSP, São Paulo, 2004.....	41
Tabela 2 – Infecções pregressas ou atuais por agentes passíveis de transmissão sangüínea nos pacientes com teste imunológico de <i>Western blot</i> indeterminado para HTLV, HC-FMUSP, São Paulo, 2004.....	42
Tabela 3 – Sororreatividade anti-HTLV apresentada ao teste imunológico de <i>Western blot</i> dos pacientes estudados, HC-FMUSP, São Paulo, 2004.....	43

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Critérios de interpretação da imunorreatividade anti-HTLV ao teste <i>Western blot</i> .....	27
Quadro 2 – Resultados da PCR para amplificação das regiões <i>tax</i> e <i>pol</i> do genoma proviral de cepa padrão de HTLV-I (MT-2)...	51
Quadro 3 – Caracterização dos 6 pacientes com teste sorológico de <i>Western blot</i> Indeterminado para HTLV-I/II e PCR positiva para seqüência <i>tax</i> do genoma proviral desses retrovírus, HC-FMUSP, São Paulo, 2004.....	54
Quadro 4 – Resultados da PCR para seqüência <i>pol</i> e <i>tax</i> do genoma proviral de HTLV-I/II dos 6 pacientes com sorologia indeterminada e PCR positiva para seqüência <i>tax</i> desses retrovírus, HC-FMUSP, São Paulo, 2004.....	61

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho esquemático de vírion HTLV-I/II.....	5
Figura 2 – Representação esquemática do genoma proviral de HTLV-I/II e seus produtos, com destaque para antígenos que fazem parte do substrato antigênico do teste de <i>Western blot</i> .....	5
Figura 3 – Fotografia de tiras de <i>Western blot</i> anti-HTLV-I/II.....	14
Figura 4 – Fluxograma de estudo das amostras dos 65 pacientes que compõem a casuística desta dissertação.....	29
Figura 5 – Fluxograma de estudo da cepa padrão de HTLV-I (MT2).....	30
Figura 6 – Representação esquemática do genoma proviral de HTLV-I/II e os segmentos genômicos amplificados com seus respectivos <i>primers</i> .....	34
FIGURA 7 – Foto de gel de agarose 1,5% corado com EtBr com produto da PCR primária para amplificação do gene <i>tax</i> de cepa padrão de HTLV-I (MT-2) em diluições seriadas.....	47
Figura 8 – Foto de gel de agarose 1,5% corado com EtBr com produto da <i>Nested PCR</i> para amplificação do gene <i>tax</i> de cepa padrão de HTLV-I (MT-2) em diluições seriadas.....	47
Figura 9 – Foto de gel de agarose 1,5% corado com EtBr com produto da PCR primária para amplificação do gene <i>pol</i> de cepa padrão de HTLV-I (MT2) em diluições seriadas.....	48

Figura 10 – Foto de gel de agarose 1,5% corado com EtBr com produto da <i>Nested PCR</i> para amplificação do gene <i>pol</i> de cepa padrão de HTLV-I (MT2) em diluições seriadas.....	48
Figura 11 – Autorradiografia com produto da PCR primária para amplificação do gene <i>pol</i> de cepa padrão de HTLV-I (MT-2) em diluições seriadas – <i>Southern-blot</i> e hibridação com sonda radioativa ( <sup>32</sup> P).....	49
Figura 12 – Autorradiografia com produto da <i>nested PCR</i> para amplificação do gene <i>pol</i> de cepa padrão de HTLV-I (MT2) em diluições seriadas – <i>Southern-blot</i> e hibridação com sonda radioativa ( <sup>32</sup> P).....	49
Figura 13 – Autorradiografia com produto da PCR primária para amplificação do gene <i>pol</i> de cepa padrão de HTLV-I (MT2) em diluições seriadas – <i>Southern-blot</i> e hibridação com sonda não radioativa (Fosfatase alcalina).....	50
Figura 14 – Autorradiografia com produto da <i>Nested PCR</i> para amplificação do gene <i>pol</i> de cepa padrão de HTLV-I (MT2) em diluições seriadas – <i>Southern-blot</i> e hibridação com sonda não radioativa (Fosfatase alcalina).....	50
Figura 15 – Foto de gel de agarose 1,5% corado com EtBr de produto de <i>nested PCR</i> para amplificação do gene <i>tax</i> antes( ) e após (‘) digestão com a enzima de restrição <i>Taq-1</i> .....	53
FIGURA 16 – Foto de gel de agarose 1,5% corado com EtBr de produto de <i>nested PCR</i> para amplificação do gene <i>tax</i>	

antes( ) e após (‘) digestão com a enzima de restrição <i>Taq-1</i> .....	53
Figura 17 – Foto de gel de agarose 1,5% corado com EtBr com produto da PCR para amplificação do gene <i>pol</i> de cepa padrão de HTLV-I (MT2) e de Controle Negativo, empregando-se gradiente de temperaturas de pareamento dos <i>primers</i> que variavam de 45,1°C a 65,1°C.....	56
Figura 18 – Foto de gel de agarose 1,5% corado com EtBr com produto da <i>nested</i> PCR para amplificação do gene <i>pol</i> de cepa padrão de HTLV-I (MT2) e de Controle Negativo, empregando-se gradiente de temperaturas de pareamento dos <i>primers</i> que variavam de 45,1°C a 65,1°C.....	57
Figura 19 – Autorradiografia com produto da PCR e <i>nested</i> PCR para amplificação do gene <i>pol</i> , após <i>Southern-blot</i> e hibridação com sonda não radioativa (Fosfatase alcalina) específica para HTLV-I, dos 6 pacientes com sorologia indeterminada para HTLV-I/II e PCR positiva para seqüência <i>tax</i> desses retrovírus.....	59
Figura 20 – Autorradiografia com produto da PCR e <i>nested</i> PCR para amplificação do gene <i>pol</i> , após <i>Southern-blot</i> e hibridação com sonda não radioativa (Fosfatase alcalina) específica para HTLV-II, dos 6 pacientes com sorologia indeterminada para HTLV-I/II e PCR positiva para seqüência <i>tax</i> desses retrovírus.....	60

COSTA JMP. *Padronização e emprego de métodos de amplificação molecular para pesquisa de seqüências genômicas dos vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos I e II (HTLV-I/II) em indivíduos com sorologia indeterminada* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004. 115p.

O vírus linfotrópico de células T humanas do tipo I (HTLV-I) está etiológicamente associado à leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL) e à mielopatia associada ao HTLV-I/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP), enquanto o do tipo II (HTLV-II) esporadicamente é relacionado a doenças neurológicas. Tais retrovírus transmitem-se pelo contato sexual ou com sangue e pelo aleitamento materno. Em nosso país, são encontrados em aproximadamente 0,45% dos doadores de sangue e em até 35% dos usuários de drogas endovenosas. O diagnóstico da infecção baseia-se na pesquisa de anticorpos séricos por meio dos testes de ELISA e Western-blot, que resultam indeterminados em número significativo de casos. O presente estudo teve como objetivo principal avaliar, entre os indivíduos com sorologia indeterminada para o HTLV, qual a frequência daqueles verdadeiramente infectados, por meio da amplificação molecular de duas seqüências provirais distintas a partir de células mononucleares do sangue periférico. Preliminarmente, avaliou-se a sensibilidade da PCR e *nested* PCR para amplificação de seqüências provirais *tax* e *pol* de cepa padrão de HTLV-I (linhagem celular MT-2), comparando-se ainda os métodos de detecção dos produtos de amplificação do gene *pol* por meio da hibridação com sonda marcada com <sup>32</sup>P e com fosfatase alcalina. O DNA extraído das células MT-2 foi quantificado e submetido a diluições seriadas para amplificação dos genes provirais de interesse. A técnica de *nested* PCR para o gene *tax* mostrou-se mais sensível (positiva até 12 pg de DNA), com detecção dos produtos amplificados de 138 bp após eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio. Em relação ao gene *pol*, a hibridação com as sondas radioativa e não radioativa foi igualmente sensível, detectando o produto amplificado em até 120 pg de DNA. Para avaliação do desempenho dessas técnicas em amostras biológicas *ex vivo*, analisamos amostras de DNA de 65 indivíduos, com idades de 19 a 60 anos, cuja sorologia resultou em ELISA positivo e Western-blot indeterminado, na grande maioria dos casos por ocasião da doação de sangue. Os padrões de sororreatividade anti-HTLV ao *Western-blot* eram predominantemente (43%) voltados a antígenos da região *gag*, na ausência de anticorpos anti-p24. A amplificação da região *tax* revelou-se positiva em 6 (9,2%) amostras. Segundo o padrão de digestão dos produtos da *nested* PCR pela endonuclease de restrição *Taq-1*, verificamos a presença de seqüências provirais de HTLV-I em 4 amostras, de HTLV-II em uma e ambos os vírus em outra. A *nested* PCR para a região *pol* mostrou-se positiva em apenas 3 (4,6%) amostras, todas elas positivas também para o segmento *tax* desses retrovírus. A hibridação com sonda marcada com fosfatase alcalina confirmou a presença de HTLV-I em duas amostras (3,1%) e HTLV-II em uma (1,5%). Adotando como critério de infecção pelo HTLV a presença de duas regiões gênicas provirais, não foi confirmada a dupla infecção sugerida pela amplificação *tax*. A detecção isolada de um segmento proviral em células mononucleares periféricas pode representar infecção por provírus defectivo, embora seu significado clínico permaneça ainda indefinido. Na casuística estudada não foi possível identificar perfil de sororreatividade ao Western blot que fosse preditivo da presença ou ausência do HTLV, apresentando um dos pacientes infectados com HTLV-I reatividade isolada a proteínas do gene *gag* (HGIP). Ressaltamos a importância do seguimento clínico e laboratorial dos pacientes com sorologia indeterminada em nosso meio de modo a propiciar-lhes o correto aconselhamento.

Descritores: Vírus 1 linfotrópico T humano/imunologia. Vírus 2 linfotrópico T humano/imunologia. Reação em cadeia por polimerase/métodos. Sorologia/métodos. Western blotting/métodos.

COSTA JMP. *Standardization and use of molecular methods for the amplification of genomic sequences of human T-cell lymphotropic virus types I and II (HTLV-I/II) in individuals with indeterminate serology* [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004. 115p.

Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) is etiologically linked to adult T cell leukemia/lymphoma (ATLL) and to HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP), whereas HTLV-II has been occasionally associated with neurological disorders. Both these retroviruses are transmitted by sexual intercourse, through contact with contaminated blood or by breast feeding. In Brazil HTLV infection is reported in about 0.45% of blood donors and in up to 35% of intravenous drug users. Based on the detection of circulating antibodies, using enzyme immunoassays and Western-blot tests, HTLV serodiagnosis yields indeterminate results in a significant number of cases. In this study we aimed at evaluating the proportion of retroviral infection among HTLV-seroindeterminate individuals, by means of the amplification of two different sequences of proviral DNA from peripheral blood mononuclear cells (PBMC). At first, we evaluated PCR and *nested* PCR sensitivities in the detection of *tax* and *pol* proviral sequences, using a standard HTLV-I isolate (MT-2 cell line). Two different detection systems for *pol* PCR products were also compared, using hybridization with either <sup>32</sup>P- or alkaline phosphatase-labeled probes. DNA extracted from MT-2 cells was quantified and submitted to serial dilution for the amplification of proviral genes. *Nested tax* PCR was shown to be more sensitive (12 pg of DNA), detecting 138 bp PCR products after electrophoresis in ethidium bromide-stained gels. As for the *pol* gene, hybridization with radioactive or non radioactive probes was equally sensitive, detecting PCR products in 120 pg of DNA. To evaluate the performance of these techniques using *ex vivo* biological specimens, we studied DNA samples from 65 individuals, whose ages ranged from 19 to 60 years old and who presented anti-HTLV positive EIAs and indeterminate Western-blots, mostly after screening for blood donation. Anti-HTLV seroreactivity patterns on Western blots exhibited predominantly (43%) antibodies to *gag*-coded antigens in the absence of anti-p24. *Tax* proviral sequences were detected in 6 (9.2%) samples. According to restricted fragment length polymorphism analysis of *nested* PCR products, using *Taq-1* endonuclease, we identified HTLV-I proviral DNA in 4 samples, HTLV-II in one and sequences from both viruses in another. *Nested* PCR for the *pol* region yielded positive in only 3 (4,6%) specimens, which were also positive for *tax* sequences. Hybridization of PCR products with alkaline phosphatase-labeled probes confirmed HTLV-I detection in 2 samples (3.1%) and HTLV-II in another (1.5%). Using the detection of two different HTLV proviral sequences as definition of HTLV infection, we were not able to confirm dual infection as suggested by *tax* amplification. Detection of a single HTLV DNA sequence in PBMC may be due to infection by a defective provirus, however its clinical significance remains undefined. In the studied patients, no Western blot seroreactivity pattern was shown to be predictive of HTLV proviral DNA detection and HTLV-I infection was demonstrated in an individual who presented reactivity to *gag*-coded antigens only (HGIP). We emphasize the importance of clinical and laboratory follow-up of HTLV seroindeterminate individuals to provide them with adequate counseling.

Keywords: Human T-cell lymphotropic virus type 1/immunology. Human T-cell lymphotropic virus type 2/immunology. Polymerase chain reaction/methods. Serology/methods. Western blotting/methods.

# **INTRODUÇÃO**

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. HISTÓRICO

Os retrovírus, apesar de serem agentes virais descobertos há pouco tempo, apresentam uma grande importância como agentes causadores de doenças em humanos. Desde o início, esses vírus foram reconhecidos como potenciais agentes causais de neoplasias em animais (KAPLAN, 1989).

Em 1977, foi descrita no Japão uma síndrome neoplásica de células T, atingindo pessoas nascidas nas ilhas do sudoeste daquele país, que recebeu a denominação de leucemia de células T do adulto (*adult T-cell leukemia* - ATL) (UCHIYAMA *et al*, 1977). Três anos depois, POIESZ e colaboradores (1980) descreveram o primeiro retrovírus humano, o vírus linfotrópico de células T humanas do tipo I (*human T-cell lymphotropic virus type I* ou HTLV-I). Na ocasião, partículas com características morfológicas dos retrovírus tipo C foram isoladas a partir de linfócitos de um paciente negro de 28 anos de idade, com diagnóstico de linfoma cutâneo de células T com características pouco comuns e que, retrospectivamente, pôde-se relacionar à ATL. Em 1982, YOSHIDA e colaboradores descreveram o isolamento de partículas virais do tipo C a partir de linhagens celulares de pacientes com ATL e denominaram esse agente de vírus da leucemia de células T do adulto (*adult T-cell leukemia virus* – ATLV). Estudos seqüenciais confirmaram que o HTLV-I e o ATLV eram idênticos e que o

HTLV-I, nome que vem sendo utilizado internacionalmente desde então, era o agente etiológico da ATL. Posteriormente, foi também comprovada a associação desse agente com uma doença neurodegenerativa, conhecida como mielopatia associada ao HTLV-I ou paraparesia espástica tropical (*HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis – HAM/TSP*) (GESSAIN *et al*, 1985). A infecção pelo HTLV-I também está associada a uma série de doenças imunológicas como poliomiosites, artrites e uveítes (MURPHY *et al*, 1997).

Em 1982, outro retrovírus humano, relacionado ao anterior, foi identificado por KALYANARAMAN e colaboradores, a partir de células T de um homem branco de 37 anos de idade com uma variante não habitual de tricoleucemia (*hairy cell leukemia*) de linfócitos T. Esse vírus passou a ser chamado vírus linfotrópico de células T humanas do tipo II (*human T-cell lymphotropic virus type II* ou HTLV-II) e está descrito como apenas esporadicamente relacionado a doenças neurológicas em humanos. Também pode estar relacionado a um estado de leve imunodeficiência, caracterizada por incidência aumentada de infecções bacterianas e fúngicas (MURPHY *et al*, 1997).

Esses vírus, HTLV-I e II, são vírus RNA e pertencem à família *Retroviridae* e à subfamília *Oncovirinae* (COFFIN, 1992). Outro retrovírus humano foi identificado em 1983 e denominado inicialmente de vírus associado à linfadenopatia (LAV) e de HTLV-III, mas posteriormente designado vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (HIV-1) (BARRE-SINOUSSE *et al*, 1983). Mais tarde, um segundo tipo geneticamente distinto,

o HIV-2, foi identificado (CLAVEL *et al*, 1996), sendo ambos pertencentes à subfamília *Lentivirinae* (COFFIN, 1992). Os vírus dessa última subfamília despertaram grande interesse da comunidade científica mundial por serem os agentes etiológicos da síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS), doença com alta morbidade e letalidade, identificada no final da década de 70 e que logo se transformou em uma grande epidemia mundial.

## 1.2. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DOS VÍRUS HTLV-I/II

Os vírus HTLV-I e II apresentam-se como partículas esféricas de 100 nm de diâmetro, com uma porção central (*core*) composta pelo nucleocapsídeo, contendo duas cópias de ácido ribonucléico (RNA) de fita única com 8,8 e 9 kilobases, a enzima transcriptase reversa e as proteínas da matriz, além de um envelope parcialmente originado da membrana da célula hospedeira, que contém as glicoproteínas transmembrana e de superfície (SCHUPBACH, 1989) (Figura 1).

Os genomas provirais do HTLV-I e II apresentam similaridade de 65% entre si, que resulta na tradução de várias proteínas semelhantes, levando a altas taxas de reações cruzadas nos testes sorológicos (SODROSKI *et al*, 1984). Seus principais genes são (SEIKI *et al*, 1983): (Figura 2)

- ❖ *gag*, que codifica as proteínas do *core* viral (antígeno grupo-específico), a precursora p52 e suas derivadas p15, p19 e p24;

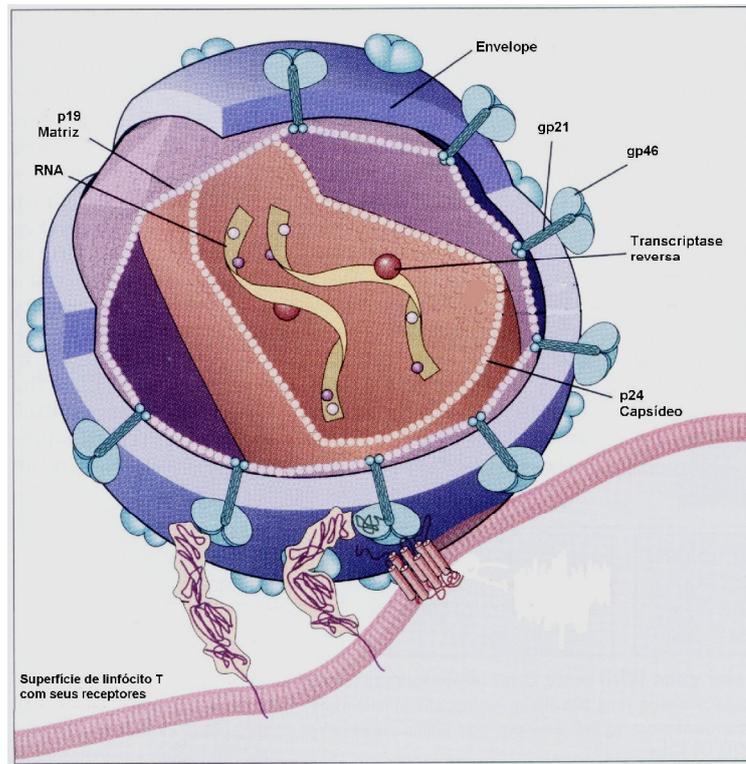


Figura 1 – Desenho esquemático de vírion HTLV-I/II  
 FONTE: modificado a partir de Abbas (2000)

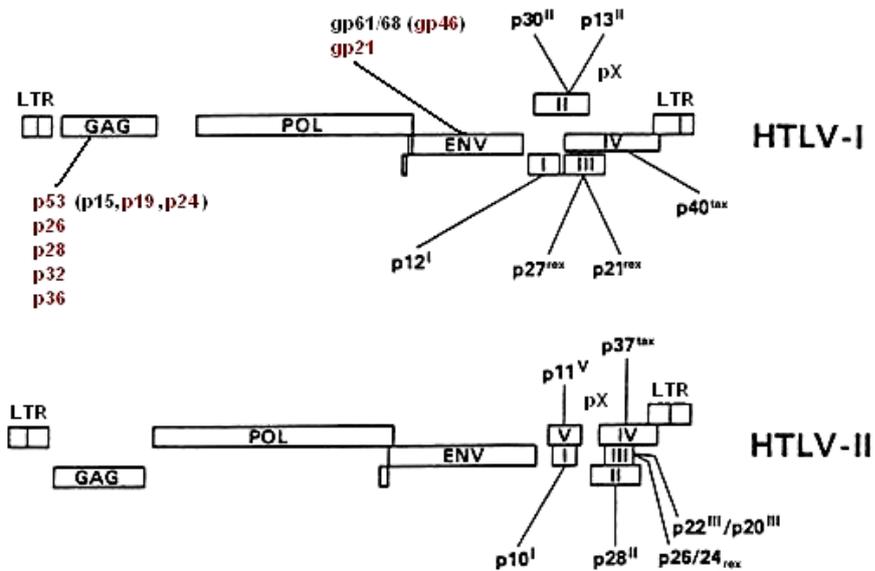


Figura 2 – Representação esquemática do genoma proviral de HTLV-I/II e seus produtos, com destaque para antígenos que fazem parte do substrato antigênico do teste de *Western blot*  
 FONTE: modificado a partir de Franchini (1995)

- ❖ *pol*, que origina as enzimas transcriptase reversa (uma polimerase) (p99), RNase, endonuclease e protease;
- ❖ *env*, responsável pela síntese das glicoproteínas externas do envelope, a precursora gp61/68 e sua derivada gp46, e da glicoproteína transmembrana gp21;
- ❖ *região pX*, que apresenta, no HTLV-I, quatro (cinco no HTLV-II) pequenas regiões abertas de leitura (*open reading frames – ORFs*):
  - *pX-I*: codifica a proteína p12, considerada um oncogene fraco;
  - *pX-II*: codifica a proteína p30<sup>II</sup> /p13<sup>II</sup> (no HTLV-II, a proteína p28<sup>II</sup>);
  - *pX-III*: apresenta o gene *rex*, que codifica a proteína p27<sup>rex</sup>/p21<sup>rex</sup> (no HTLV-II, p26/24<sup>rex</sup>) responsável pela regulação pós-transcricional da síntese de proteínas estruturais do vírus (GREENE *et al*, 1990);
  - *pX-IV*: contém o gene *tax*, que codifica a proteína p40<sup>tax</sup> (no HTLV-II, p37<sup>tax</sup>), transativadora do segmento LTR do genoma viral e de genes da célula eucariótica infectada, como os que codificam a interleucina-2 e a cadeia  $\alpha$  de seu próprio receptor (CD25), o fator de crescimento de granulócitos e monócitos (GM-CSF), a molécula de adesão intercelular (ICAM-1) e outros. Tem uma ação inibidora sobre o gene da  $\beta$ -polimerase (enzima de reparação do DNA hospedeiro) (GREENE *et al*, 1990);
  - *pX-V* (apenas no HTLV-II): codifica a proteína p11<sup>V</sup>.
- ❖ *segmento LTR* (do inglês *long terminal repeat*), segmentos longos repetitivos presentes nas duas extremidades do genoma viral, que

embora representem regiões não codificantes, contêm elementos reguladores da transcrição viral.

### 1.2.1. TIPOS E SUBTIPOS VIRAIS

Os vírus HTLV-I e II apresentam grande conservação na seqüência de nucleotídeos, em comparação a outros retrovírus, como o HIV. Foram descritas variantes genômicas tanto do HTLV-I como do HTLV-II, porém, geralmente tais diferenças genéticas são pontuais, não apresentando correlação com a história natural da infecção, embora possam refletir a área geográfica de procedência do isolado viral (KOMURIAN *et al*, 1991).

#### Subtipos do HTLV-I:

Para HTLV-I, observou-se, em média, semelhança de aproximadamente 97% entre as várias cepas mundiais, sendo a variante mais divergente a da Melanésia, que apresenta 92% de semelhança às cepas do Japão (KOMURIAN *et al*, 1991). A análise filogenética dos diferentes isolados levou a classificação de 5 subtipos virais:

1. Cosmopolita (C);
2. Japonês (J);
3. Africano ocidental(WA);
4. Centro-Africano (CA);
5. Melanesiano (M).

Subtipos do HTLV-II:

A classificação dos subtipos de HTLV-II tem sido proposta com base na diferença de seqüências de nucleotídeos dos segmentos *env* (4,3%), *gag* (3,8%) e *LTR* (5,7%) do genoma proviral. Assim, tomando-se como paradigma a variabilidade genética observada no segmento *env*, podem ser identificados três subtipos:

1. Subtipo a: predominante em usuários de drogas endovenosas (UDEV) urbanos nos Estados Unidos e na Europa (SWITZER *et al*, 1995);
2. Subtipo b: predominante em populações nativas indígenas em todo continente americano. Apresenta *tax* mais potente e com 25 aminoácidos a mais (HALL *et al*, 1994).
3. Subtipo c: encontrado em população urbana e indígena brasileira. Apresenta *env* e *LTR* semelhantes ao do subtipo "a" e *tax*, ao subtipo "b". (EIRAKU *et al*, 1996).

### **1.3. EPIDEMIOLOGIA**

#### **1.3.1. VIAS DE TRANSMISSÃO**

A transmissão do HTLV de pessoa a pessoa é semelhante à do HIV, porém com menor infectividade, pelo fato de não existirem habitualmente partículas virais livres no plasma ou fluidos biológicos, havendo, portanto a necessidade de veiculação de células infectadas (GEBRETSADIK *et al*, 1993). A transmissão inter-humana do HTLV se dá, basicamente, 1) pelo

contato sexual, sendo mais eficaz do homem infectado para a mulher susceptível; 2) através de transmissão vertical, que depende fundamentalmente do aleitamento materno prolongado; e 3) pela transmissão sanguínea por meio de hemocomponentes celulares ou compartilhamento de agulhas e/ou seringas contaminadas.

### 1.3.2. HTLV NO MUNDO

O vírus HTLV-I tem uma ampla distribuição mundial, com maior prevalência em determinadas regiões como o sudoeste do Japão, onde aproximadamente 20% dos adultos apresentam sorologia positiva (HINUMA *et al*, 1982); bacia do Caribe, incluindo o sudeste dos Estados Unidos da América e América Central, além do norte da América do Sul, onde 2 a 5% dos adultos negros apresentam anticorpos circulantes (KOENIG *et al*, 1992); América do Sul, África Central e Ocidental; Melanésia; Oriente Médio e Índia. Estima-se que exista 15 a 20 milhões de pessoas infectadas por HTLV-I no mundo e que 1 a 5% destes indivíduos eventualmente desenvolverão doenças relacionadas (ZANINOVIC, 1996 *apud* MONTEIRO-DE-CASTRO *et al*, 2001).

O vírus HTLV-II é mais prevalente entre usuários de drogas endovenosas nos Estados Unidos da América e Europa e entre certas populações indígenas nativas das Américas (HALL *et al*, 1994).

### 1.3.3. HTLV NO BRASIL

As principais fontes de informação sobre a prevalência de infecção por HTLV-I/II no Brasil provêm dos testes de triagem de doadores de sangue e estudos conduzidos em grupos populacionais específicos, como gestantes, usuários de drogas endovenosas (UDEV), populações indígenas, etc.

A soroprevalência média do HTLV-I entre candidatos a doador de sangue neste país é de aproximadamente 0,45–0,54% (ARAÚJO & SERRA, 1996; CARNEIRO-PROIETTI *et al*, 2002), sendo mais elevada nos Estados da Bahia (1,35-1,80%) (GALVÃO-CASTRO *et al*, 1997; CARNEIRO-PROIETTI *et al*, 2002), Pernambuco (0,35-0,82%) e Pará (HTLV-I/II: 1,61%) (CARNEIRO-PROIETTI *et al*, 2002). Em usuários de drogas endovenosas de Salvador, DOURADO e colaboradores (1999) encontraram prevalência de 35,2% para HTLV-I/II, sendo a maioria (72,4%) infectada por HTLV-I, ao contrário do que se observa em outras regiões do mundo. Entre portadores do HIV, foram encontradas taxas de co-infecção com HTLV-I/II de até 28% (BRITES *et al*, 1994; CATERINO-DE-ARAUJO *et al.*; 1998; ETZEL *et al.*, 2001). Em homossexuais e prostitutas no estado do Rio de Janeiro foram encontrados índices de soropositividade de 4 e 9%, respectivamente (CORTES *et al*, 1989). Outro grupo de alta prevalência da infecção por HTLV-I no Brasil é o de imigrantes japoneses e seus descendentes, existindo relato de 10% de soropositividade em pessoas procedentes de Okinawa em Campo Grande, estado do Mato Grosso do Sul (KITAGAWA *et al*, 1986). As estimativas indicam que o Brasil possui o maior número

absoluto (aproximadamente 2,5 milhões) de indivíduos infectados pelo HTLV-I no mundo (CARNEIRO-PROIETTI *et al*, 2002).

Em relação ao HTLV-II, a soroprevalência encontrada em doadores de sangue no estado de São Paulo foi de 0,03% (FERREIRA *et al*, 1995), em usuários de drogas endovenosas de Salvador-Bahia 10,8% (DOURADO *et al*, 1999) e em populações indígenas da Amazônia: 37,8% dos índios Kayapós, 24,3% dos Krahôs e 7,8% de outras tribos (MALONEY *et al*, 1992; ISHAK *et al.*, 1995). Outros estudos realizados em vários Estados do Brasil apresentam prevalência de infecção pelos vírus HTLV-I/II por volta de 0,58%, enquanto que a prevalência do HTLV-I isoladamente é de 0,54% (CARNEIRO-PROIETTI *et al*, 2002).

#### **1.4. DIAGNÓSTICO**

Considerando-se não haver clareamento viral e que, portanto, a soropositividade indica persistência do vírus, o diagnóstico da infecção por HTLV-I/II baseia-se na detecção sérica de anticorpos contra antígenos do *core* e do envelope virais. O algoritmo para diagnóstico laboratorial de infecção pelo HTLV, recomendado pelo Ministério da Saúde, preconiza a realização de teste de triagem com os métodos imunoenzimáticos (EIA ou ELISA) ou reação de aglutinação e, para as amostras positivas ou com resultados duvidosos, teste confirmatório com *Western blot* (WB); se ainda assim persistirem dúvidas ou para os casos em que a investigação

sorológica não permite distinguir o tipo de HTLV responsável pela infecção, indica-se a realização da reação em cadeia por polimerase (PCR) com o objetivo de verificar a presença de seqüências provirais de HTLV em células mononucleares periféricas. Com base nesse teste pode-se confirmar a infecção e/ou distinguir o vírus responsável pela infecção, HTLV-I ou HTLV-II (BRASIL, 2003).

Em substituição ao Wb para confirmação de infecção por HTLV-I/II, pode-se empregar o teste de Imunoblot, que apresenta semelhante princípio metodológico (BRASIL, 2003). Em alguns outros centros, com esse mesmo objetivo de confirmação de infecção, são usados testes de imunofluorescência indireta (IFI) ou de radioimunoprecipitação (RIPA) (HARTLEY *et al*, 1990).

#### 1.4.1. Interpretação do *Western blot*

O Wb, teste confirmatório mais empregado para confirmação de infecção por HTLV em nosso meio, se baseia na reação de anticorpos da amostra do paciente com antígenos virais nativos (Figura 2), peptídeos recombinantes ou derivados sintéticos, que se encontram fixados separadamente em membrana de nitrocelulose (Figura 3).

O Centro para Controle de Doenças dos Estados Unidos da América (CDC) (*Center for Disease Control and Prevention*, 1989) propôs como critério de soropositividade para infecção pelo HTLV-I/II por meio do método de *Western blot*, a presença de anticorpos contra antígeno do *core* (p24) e contra as glicoproteínas gp21 ou gp46 do envelope viral ou suas

correspondentes sintéticas (r21-e, gD21 e rgp46-I ou rgp46-II, sendo estas duas últimas específicas para os vírus HTLV-I e HTLV-II respectivamente). Existem controvérsias sobre os critérios mais adequados para interpretação de Wb (ZAAIJER *et al*, 1994; ROUET *et al.*, 2001), porém os mais aceitos mundialmente são aqueles recomendados pelos fabricantes dos *kits* comercialmente disponíveis. Assim são considerados (Figura 3):

- Soropositivos: os indivíduos nos quais se evidencia a presença de anticorpos contra antígeno do *core* (p19 ou p24) e contra glicoproteínas do envelope (gp21 mais gp46, ou suas derivadas gD21, rgp46-I ou rgp46-II);
- Indeterminados: na presença de anticorpos que reagem com antígenos específicos de HTLV-I/II, com perfil diferente daqueles acima descritos para os soropositivos;
- Soronegativos: na ausência de reatividade contra antígenos de HTLV.

Para diagnóstico diferencial entre infecção por HTLV-I e II, além do *Western blot*, que incorpora, em sua base antigênica, peptídeos recombinantes correspondentes a epítomos não compartilhados (rgp46<sup>I</sup> e rgp46<sup>II</sup>), podem-se utilizar os ensaios imunoenzimáticos, contendo antígenos recombinantes ou peptídeos sintéticos específicos para HTLV-I (p19<sup>gag</sup>) e para HTLV-II (gp52<sup>env</sup>) (LIPKA *et al*, 1992).

O algoritmo de diagnóstico sorológico, atualmente utilizado, embora empregue testes de elevada sensibilidade e especificidade, ainda apresenta importantes limitações:

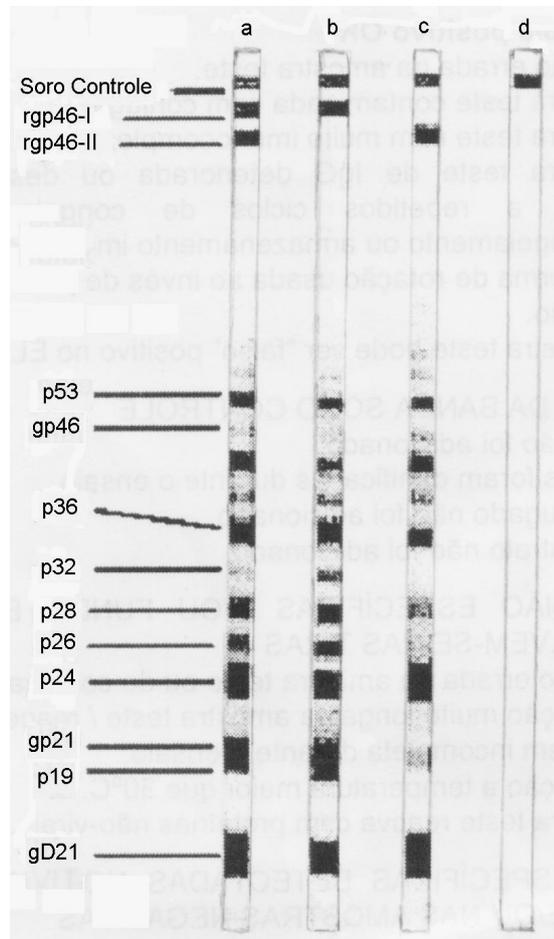


Figura 3 – Fotografia de tiras de *Western blot* anti-HTLV-I/II  
 a) Resultado positivo para infecção por HTLV-I e II (infecção dupla), b) resultado positivo para infecção por HTLV-I, c) resultado positivo para infecção por HTLV-II, d) resultado negativo.

FONTE: Instruções de uso do kit HTLV Blot 2.4, ABBOT Murex, 2002

- A impossibilidade de se estabelecer o diagnóstico durante a fase precoce da infecção, que precede a soroconversão (“período da janela imunológica”) (OKAYAMA *et al*, 2001);
- A ocorrência de testes *Western blot* positivos, porém que não exibem sororreatividade aos antígenos específicos, impedindo a identificação do tipo de HTLV envolvido na infecção;
- A freqüente apresentação de testes *Western blot* indeterminados;
- A impossibilidade de estabelecer precocemente o diagnóstico da transmissão vertical, uma vez que a sorologia positiva no recém-nascido pode ser conseqüente à transferência passiva de anticorpos maternos, através da placenta.

Nesse contexto, vêm sendo utilizados, em centros de maior capacitação técnica na área laboratorial, os testes diagnósticos baseados em métodos de biologia molecular aplicados a amostras biológicas.

Para a investigação de infecção por HTLV, tais técnicas de biologia molecular baseiam-se na amplificação de seqüências genômicas do provírus, a partir de células mononucleares periféricas, por meio da reação em cadeia por polimerase (PCR). Essa reação emprega moléculas iniciadoras (*primers*), que se pareiam a uma seqüência complementar do DNA e, a partir de muitos ciclos de temperaturas diferentes promovem a amplificação exponencial desse segmento de DNA alvo. Rotineiramente, emprega-se um par de *primers* consensuais para um segmento do DNA em uma única etapa, reação conhecida simplesmente como PCR ou “PCR primária” para se diferenciar da variante da metodologia que realiza uma

segunda etapa de amplificação utilizando, como molde, os produtos amplificados de DNA da primeira etapa, junto a *primers* que fazem o pareamento em posição interna desses segmentos de DNA, reação conhecida como “*nested PCR*” (nPCR). Esta variante metodológica tem sido mais utilizada por aumentar a sensibilidade analítica da reação.

As diferenças existentes nos genomas dos vírus HTLV-I e II permitem que se determine o tipo de vírus responsável pela infecção por meio da utilização de *primers* específicos na PCR ou pela hibridação dos produtos amplificados com sondas tipo-específicas ou, ainda, pela análise de polimorfismo de fragmentos de restrição decorrente da ação de enzimas endonucleases (*restriction fragment length polymorphism - RFLP*) (KWOK *et al*, 1988; KOMURIAN-PRADEL, 1992). Porém, as técnicas já padronizadas de hibridação, que apresentam vantagens em termos de sensibilidade e especificidade, são de difícil realização em nosso meio porque envolvem o emprego de material radioativo, o fósforo-32 (<sup>32</sup>P).

A título de exemplo, OKAYAMA e colaboradores (2001) em estudo de seguimento de pessoas soronegativas por um período de 11 anos em área endêmica do Japão observaram o caso de um indivíduo com teste positivo para HTLV-I por técnica de biologia molecular para DNA proviral antes da viragem sorológica de anticorpos, confirmando assim a existência de um período de janela imunológica na infecção adquirida na comunidade.

## 1.5. JUSTIFICATIVA

Para a prevenção da transmissão de HTLV é fundamental a identificação dos portadores assintomáticos, que representam a grande maioria dos infectados, com vista à adoção de medidas profiláticas relacionadas à transmissão sexual e vertical, como também para a triagem de candidatos a doação de sangue. A partir de dezembro de 1993, a triagem sorológica de infecção por HTLV-I/II em bancos de sangue passou a ser obrigatória no Brasil (BRASIL, 1993).

No entanto, o resultado dessa triagem sorológica revela um grande contingente de amostras repetidamente reagentes pelo método de ELISA, até 1,61% na Fundação Pró-Sangue-Hemocentro de São Paulo (FPSHSP), das quais somente 33% são confirmadas como positivas pelos métodos de *Western blot*. Após esse teste confirmatório, 6% das amostras revelam-se negativas, permanecendo ainda um grande número (1,0% do total de doadores de sangue) com resultados soroindeeterminados (SABINO et al., 1999). Resultado semelhante já havia sido demonstrado em outro momento por SEGURADO e colaboradores (1997), segundo os quais 0,6% do total de doadores de sangue dessa mesma instituição persistiram como soroindeeterminados após teste de *Western blot*, ou seja, aproximadamente 60 a 70% das amostras reagentes ao teste ELISA. Nesses, os testes de amplificação molecular para identificação de genoma viral por meio da PCR mostraram-se negativos. Pesquisadores do Hemocentro do Ceará em Fortaleza, Brasil, demonstraram que de 191 doadores de sangue com teste

de ELISA positivo para HTLV-I/II, ao teste de *Western blot*, 73 (38,2%) eram positivos e 118 (61,8%) eram indeterminados. Em 41 indivíduos deste último grupo, a realização da PCR, para amplificação de regiões *tax/rex* identificou 22% de positivos para HTLV-I/II (SANTOS *et al*, 2003).

Na literatura, existem varias teorias que tentam justificar a presença de anticorpos que reagem a antígenos naturais ou sintéticos referentes a esses vírus em pacientes sem evidência de infecção por meio de pesquisa de segmentos gênicos com os métodos atualmente disponíveis, como discutiremos a seguir:

- a) Infecção por HTLV em período de soroconversão. CÉSAIRE e colaboradores (1999) apresentam estudo no qual, de 49 doadores de sangue da Martinica com padrão de Wb indeterminado para HTLV, três revelaram-se infectados, demonstrando após seguimento laboratorial viragem sorológica. Existem vários estudos na literatura, ao contrário, que não detectaram viragem sorológica no seguimento de seus pacientes (LAL *et al.*, 1992; MAHIEUX *et al.*, 2001; ROUET *et al.*, 2001);
- b) Infecção por vírus HTLV defectivo (HALL *et al.*, 1991; DAENKE *et al.*, 1994);
- c) Infecção por vírus HTLV com mutação na região de protease, impedindo a formação de partículas maduras com a expressão de proteínas da região *env* e diminuindo a habilidade replicativa do vírus, determinando uma baixa carga proviral sanguínea (WAZIRI *et al.*, 2000);
- d) Reação de anticorpos dirigidos a produtos de retrovírus endógeno. LAL e colaboradores (1992) observaram que peptídeo correspondente a

seqüências de retrovírus endógenos com homologia a proteínas do gene *gag* de HTLV reagem com soro de grande parte de pacientes comprovadamente portadores de HTLV e também com uma parcela de pacientes com sorologia indeterminada para esse vírus ou pacientes soronegativos;

- e) Reação cruzada de anticorpos decorrentes da infecção por vírus T-linfotrófico símio do tipo 1 (STLV-1) (VANDAMME et al., 1997) ou por outros vírus, como o vírus varicela-zoster (SATO et al., 1992) ou o vírus da dengue (CARVALHO et al., 1999);
- f) Reação de anticorpos direcionados a epítomos de protozoários. PORTER e colaboradores (1994) apresentaram estudo, no qual soros de pacientes reagentes para *Plasmodium falciparum* à imunofluorescência, apresentavam perfil indeterminado de *Western blot* para HTLV-1. Após adsorção do soro desses indivíduos com proteínas de *Plasmodium*, verificou-se redução ou mesmo negatificação da sororreatividade anti-HTLV, o que não ocorria com o soro de paciente com infecção comprovada por esses retrovírus.

Alguns estudos demonstraram que, no período de soroconversão, os primeiros anticorpos a surgirem são aqueles voltados contra antígenos do *core*, seguidos por aqueles que reagem com peptídeo recombinante r21-e ou gD21 (correspondente à proteína transmembrana do envelope) e por último, aqueles contra as glicoproteínas nativas do envelope viral (MANNIS et al, 1991).

Diante desse cenário, é de extrema importância entender o que representa esse grande número de pacientes com sorologia indeterminada, em nosso meio, bem como a padronização de técnicas laboratoriais mais sensíveis, que não apresentem riscos para os profissionais envolvidos ou para o meio ambiente, e que possam ser aplicadas para a elucidação diagnóstica em laboratórios de referência.

# **ASPECTOS ÉTICOS**

## 2. ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo está baseado na realização de novos testes de biologia molecular em amostras de DNA de sangue periférico, que se encontram armazenadas no Laboratório de Virologia, (LIM-52) do Hospital das Clínicas da FMUSP, localizado no Instituto de Medicina Tropical, colhidas para fins diagnósticos como parte dos cuidados assistenciais aos pacientes com sorologia indeterminada para HTLV, atendidos em ambulatório especializado da Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias. Do ponto de vista ético, a utilização do material respeita a integridade do indivíduo, ao preservar rigorosamente o anonimato dos sujeitos. A investigação visa obter novas informações e conhecimentos acerca dessas retrovíroses humanas, que possam trazer tanto benefícios individuais a esses pacientes como coletivos, ao permitirem o desenvolvimento de novas estratégias de intervenção diagnóstica e de aconselhamento. Pelo exposto, julgamos que a presente pesquisa encontra-se respaldada eticamente, conforme parecer da Comissão Nacional de Pesquisa do Ministério da Saúde (CONEP) publicado nos Cadernos de Ética em Pesquisa, n. 3, páginas 14 e 15, em julho de 1999. O protocolo desta pesquisa, no. 239/02, foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina-USP em 27.06.2002. (Apêndice).

# **OBJETIVOS**

### 3. OBJETIVOS

#### OBJETIVO GERAL:

- ❖ Avaliar, entre os indivíduos com sorologia indeterminada para os vírus HTLV-I/II, qual a frequência daqueles verdadeiramente infectados, por meio de técnicas moleculares baseadas na amplificação de duas seqüências diferentes do genoma proviral.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Avaliar, entre os candidatos a doador de sangue com sorologia indeterminada para os vírus HTLV-I/II pelo *Western blot*, a frequência de indivíduos com reação de PCR positiva para as seqüências *tax* e *pol* do genoma proviral.
2. Avaliar a sensibilidade da reação de PCR e PCR aninhada (“*nested PCR*”) para amplificação das seqüências *tax* e *pol* do genoma proviral seguidas por diferentes métodos de revelação, empregando concentrações conhecidas de DNA proviral de HTLV-I.
3. Padronizar método não radioativo de detecção de seqüência *pol* do genoma proviral amplificado por protocolo de PCR “*nested*”.

# **MATERIAL E MÉTODOS**

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. CASUÍSTICA

A casuística deste estudo é constituída por 65 amostras de concentrado de leucócitos armazenadas em bioteca do LIM-52 do Hospital das Clínicas – FMUSP (ver protocolo de preparo e conservação das amostras no Anexo A). Tais amostras vêm sendo obtidas desde janeiro de 1992, a partir de sangue periférico de pacientes atendidos no Ambulatório de Assistência a Portadores de HTLV da Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas do HC-FMUSP. Esse serviço assistencial de referência atende a portadores dessas retrovíroses, recebendo prioritariamente pacientes triados em serviços de hemoterapia do município de São Paulo, após teste sorológico anti-HTLV reagente ou inconclusivo quando da triagem compulsória de candidatos a doador de sangue.

Todas as amostras estudadas provêm de indivíduos que apresentaram resultados indeterminados aos testes de *Western blot* para pesquisa de anticorpos anti-HTLV-I/II. Para a realização deste trabalho, adotamos como critério de interpretação da imunorreatividade anti-HTLV ao teste de *Western blot* aquele recomendado pelo fabricante do kits, sendo o mesmo adotado pela Divisão de Imunologia Fundação Pró-sangue Hemocentro de São Paulo (Quadro 1). Foram selecionadas as amostras disponíveis em volumes suficientes para a execução do protocolo

experimental proposto (ver fluxograma de estudo das amostras dos pacientes que compõem a casuística desta pesquisa na Figura 4).

Quadro 1 – Critérios de interpretação da imunorreatividade anti-HTLV ao teste *Western blot*

<b>INTERPRETAÇÃO</b>	<b>PERFIL MÍNIMO DE BANDAS</b>
Positivo para HTLV-I	(p19 com ou sem a p24) + (gD21) + (rgp46-I)
Positivo para HTLV-II	(p24 com ou sem a p19) + (gD21) + (rgp46-II)
Positivo para HTLV-I/II (não tipado)	(p24) + (p19) + (gD21) + (gp46)
	(p24) + (p19) + (gD21)
Indeterminado	Presença de bandas com perfil diferente do descrito acima para “positivo”
Negativo	Nenhuma reatividade com as proteínas do HTLV

FONTE: Instruções de uso do *kit* WB 2.4 (*Diagnostic Biotechnology Ltd.*, Cingapura)

#### **4.2. CEPA PADRÃO DE HTLV-I (MT-2) EM CULTURA DE LINFÓCITOS**

Como cepa padrão de HTLV-I, empregamos material obtido de linhagem celular MT-2, infectada por esse retrovírus e já bem caracterizada na literatura (MIYOSHI et al., 1981; KOBAYASHI et al., 1984). Alíquota desta linhagem celular foi-nos gentilmente cedida pela Profa. Dra. Maria José Andrada-Serpa da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, e deste então

conservada no laboratório de virologia LIM-52. (ver fluxograma de estudo da cepa padrão de HTLV-I na Figura 5).

#### 4.2.1. Cultura de linfócitos

A cepa MT2 de HTLV-I em cultura de linfócitos fora criopreservada a  $-180^{\circ}\text{C}$  em nitrogênio líquido, em solução contendo meio RPMI 1640 (v/v 40%), SFB (v/v 50%) e DMSO (v/v 10%). Após descongelamento, esses linfócitos infectados foram lavados com SFB e incubados em meio de crescimento RPMI 1640, contendo 20% (v/v) de SFB, 100 ng/ml de estreptomicina e 100UI/mL de penicilina, a  $37^{\circ}\text{C}$  em estufa com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . Eventuais contaminações fúngicas foram eliminadas com adição de anfotericina B na concentração de 2  $\mu\text{g/ml}$ .

#### 4.2.2. Extração do DNA

Foi separado para extração volume do cultivo que correspondia a aproximadamente  $2,5 \times 10^7$  células viáveis, através do controle com corante azul Tripan, contagem em câmara e hemocitômetro. Procedeu-se à extração do DNA, utilizando-se o kit *GFX<sup>TM</sup> Genomic - Blood DNA Purification* (Amersham Pharmacia Biotech Inc.), conforme orientações do fabricante. O DNA extraído foi quantificado, utilizando-se o método de fotometria com filtros de comprimento de ondas de 260, 280 e 320 nm do equipamento Ultrospec 3000 (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) para determinar a concentração de DNA e seu grau de pureza.

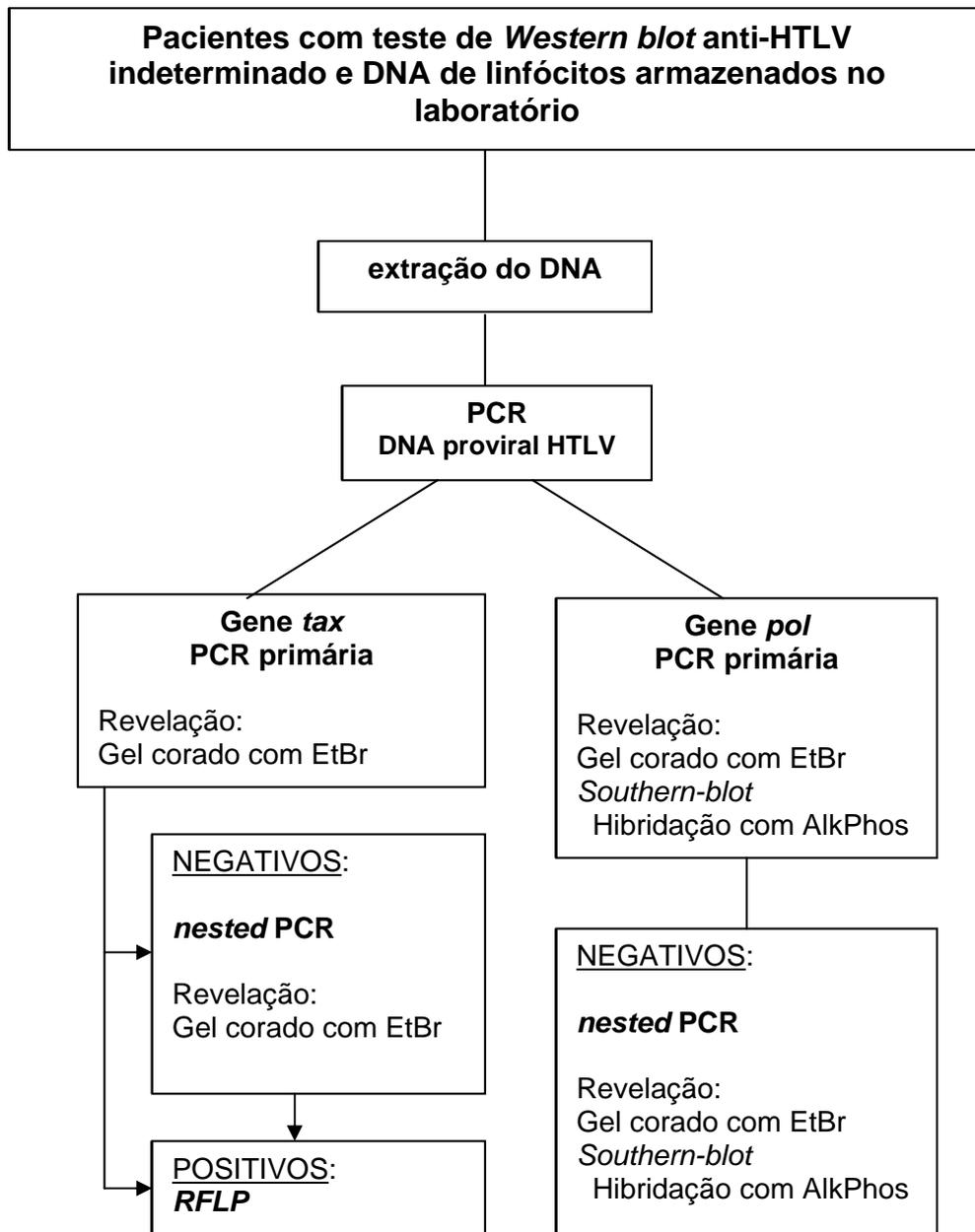


Figura 4 – Fluxograma de estudo das amostras dos 65 pacientes que compõem a casuística desta dissertação

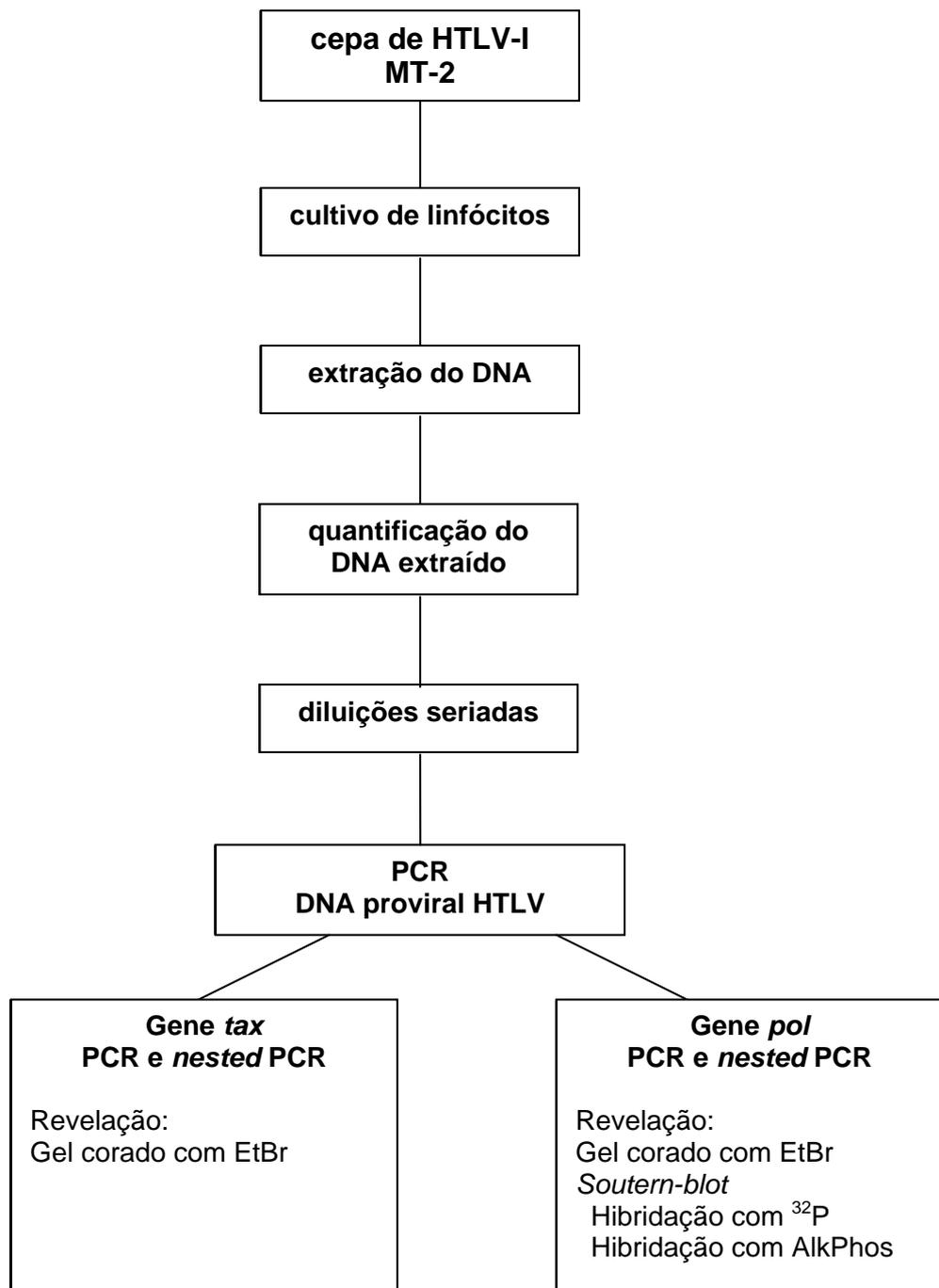


Figura 5 – Fluxograma de estudo da cepa padrão de HTLV-I (MT2).

#### 4.2.3. Diluições seriadas do DNA para amplificação

A partir de concentração conhecida de DNA extraído (180 µg/ml), utilizou-se 1,2 µg de DNA, considerando-se esta a primeira diluição de uma série até  $1,2 \times 10^{-7}$  µg, para amplificação de segmentos dos genes *tax* e *pol* do HTLV-I, com o intuito de permitir a avaliação de sensibilidade da reação de PCR e PCR aninhada (“*nested PCR*”) seguidas por diferentes métodos de revelação.

### 4.3. TESTES SOROLÓGICOS PARA O DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO PELO HTLV-I/II

Os 65 casos selecionados para este estudo tiveram seu sangue testado previamente por ensaio imunoenzimático (ELISA) com *kits* comerciais (*Organon Teknika Corp.*, Durham, NC, no período de janeiro de 1992 a junho de 1993, e Embrabio, São Paulo, SP, a partir de julho de 1993), cujos resultados, após avaliação em duplicata, mostraram-se reagentes ou inconclusivos. Em seguida, essas amostras foram testadas pelo método de *Western blot*, utilizando-se, até 1996, o *kit* comercial WB2.3 e, a partir de 1997, o WB2.4 (*Diagnostic Biotechnology Ltd.*, Cingapura), apresentando resultados indeterminados, de acordo com os critérios de interpretação recomendada pelo fabricante (Quadro 1). Todos os testes sorológicos da casuística estudada foram realizados na Divisão de Imunologia da Fundação Pró-sangue Hemocentro de São Paulo.

#### **4.4. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA INFECÇÃO PELO HTLV-I/II**

As diluições seriadas do cultivo da cepa padrão MT2 foram avaliadas para determinar a sensibilidade da detecção de seqüências genômicas provirais de HTLV-I/II, por meio da amplificação dos segmentos *tax* e *pol*, pela técnica de PCR (HENEINE *et al*, 1992). Inicialmente, foi realizada a quantificação de DNA do material extraído, para padronização do montante de material genômico a ser amplificado, visando a comparação da sensibilidade e especificidade da amplificação dos genes *tax* versus *pol*, e dos diferentes métodos de revelação do produto de amplificação do gene *pol*, a saber: transferência para membrana de náilon e hibridização com sondas específicas marcadas com material radioativo (<sup>32</sup>P) e não-radioativo (fosfatase alcalina).

As amostras de células mononucleares periféricas de pacientes incluídas no estudo foram avaliadas quanto à presença de seqüências genômicas provirais de HTLV-I/II, por meio da amplificação dos segmentos *tax* e *pol*, pela técnica de PCR (HENEINE *et al*, 1992).

##### **4.4.1. Processamento das amostras**

As amostras de sangue colhidas com anticoagulante ácido etileno-diamino-tetracético (EDTA) sofreram processamento de lise dos glóbulos vermelhos, por reação com solução de saponina a 0,4% em solução salina a 0,5%. Os glóbulos brancos remanescentes foram lavados três vezes com

solução salina 0,9%, sendo a suspensão de leucócitos, então, submetida à extração de seu DNA ou armazenada à temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ .

A extração genômica a partir da suspensão de leucócitos foi feita na maioria das amostras com *kit* comercial GFX<sup>TM</sup> Genomic – *Blood DNA Purification* 27-9603-01 (Amersham Pharmacia Biotech Inc.), algumas através da digestão com enzima proteolítica proteinase K (INNIS *et al*, 1990) e precipitação com acetato de sódio e etanol (MANIATIS *et al*, 1989), e algumas com *kit* de extração DNAzol<sup>TM</sup> (Gibco), conforme instruções do fabricante.

#### **4.4.2. Amplificação do segmento *tax* do DNA proviral**

A amplificação do segmento *tax* do DNA proviral foi executada pelo método de PCR convencional. As amostras negativas ou as que apresentaram fraca positividade foram submetidas a uma segunda reação (*nested* PCR) (Figura 6). Empregaram-se *primers* consensuais para os vírus HTLV-I e II; na primeira corrida, SK 43 (*tax*, HTLV-I, nt 7359-7378) (5' CGG ATA CCC AGT CTA CGT GT 3') e SK 44 (*tax*, HTLV-I, nt 7517-7497) (5' GAG CCG ATA ACG CGT CCA TCG 3'), e na segunda corrida, TAX1 (*tax*, HTLV-I, nt 7375-7394) (5' GTG TTT GGC GAT TGT GTA CA 3') e TAX2 (*tax*, HTLV-I, nt 7502-7486) (5' CCA TCG ATG GGG TCC CA 3'). Foram realizados 35 ciclos em temperaturas de 94, 55 e 72°C para a desnaturação do DNA, pareamento dos *primers* e extensão das cadeias, em ciclador térmico automático (Perkin Elmer Corp., Emeryville, EUA). (ver protocolo das reações nos Anexos B e C)

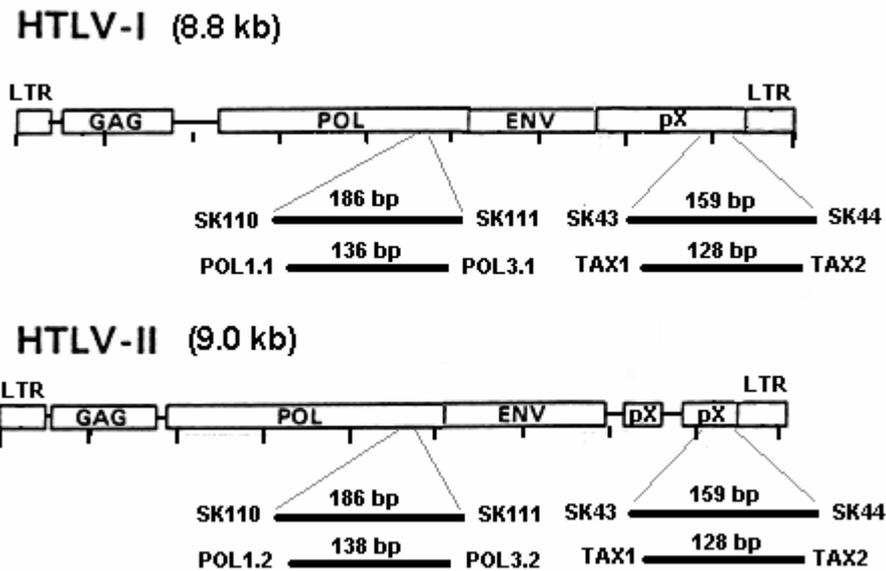


Figura 6 – Representação esquemática do genoma proviral de HTLV-I/II e os segmentos genômicos amplificados com seus respectivos *primers*

Em todas as reações, foram empregados controles externos positivos (cepa MT-2 e/ou amostras comprovadamente positivas) e negativos (amostras comprovadamente negativas e alíquota da solução de reagente sem amostra).

As amostras que se revelaram positivas para região *tax*, apresentando produto amplificado da PCR primária com 159 bp na eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio (BrEt) e um produto de 128 bp na *nested* PCR, seguiram nova etapa para distinção entre HTLV-I e II pela análise de polimorfismo de fragmentos de restrição (*restriction fragment length polymorphism – RFLP*) da *nested* PCR, usando-se a enzima de restrição *Taq-I* (*Promega Corp., Madison, EUA*), conforme descrito por TUKE e colaboradores (1992). Os produtos da digestão foram visualizados em nova corrida eletroforética em gel de agarose, com coloração pelo

brometo de etídio (MANIATIS *et al*, 1989) para identificação dos segmentos de 122 e 69/53 bp dos vírus HTLV-I e II, respectivamente (ver protocolo das reações nos Anexos B e C).

#### **4.4.3. Amplificação do segmento *pol* do DNA proviral**

A amplificação do segmento *pol* do DNA proviral também foi executada pela técnica de PCR, empregando-se os *primers* complementares SK 110 (*pol*, HTLV-I, nt 4758-4779) (5' CCC TAC AAT CCA ACC AGC TCA G 3') e SK 111 (*pol*, HTLV-I, nt 4943-4920) (5' GTG GTG AAG CTG CCA TCG GGT TTT 3'), correspondentes àquela região genômica (Figura 6) (ver protocolo da reação no Anexo D).

Inicialmente, na etapa de avaliação da cepa padrão de HTLV-I (MT-2) para a determinação da sensibilidade das reações de PCR, na amplificação da região *pol* foram realizados 35 ciclos em temperaturas de 94, 55 e 72°C para a desnaturação do DNA, pareamento dos *primers* e extensão das cadeias, em ciclador térmico automático (*Perkin Elmer Corp., Emeryville, EUA*); e na etapa de avaliação das amostras dos pacientes que compõem a casuística foi empregada a temperatura de 62°C para o pareamento dos *primers*, em vez de 55°C, após otimização da reação como descrito no subitem 4.4.3.1.

Em seguida, foram identificados os produtos de amplificação com tamanho esperado de 186 bp, por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio. As amostras cuja amplificação resultou negativa, seguindo as técnicas acima descritas, foram submetidas à *nested*

PCR, usando o produto da PCR primária e *primers* internos àqueles usados anteriormente, que são específicos para cada vírus, a saber: POL 1.1 (*pol*, *HTLV-I*, nt 4783-4806) (5' TTG TAG AAC GCT CTA ATG GCA TTC 3') e POL 3.1 (*pol*, *HTLV-I*, nt 4918-4895) (5' TGG CAG TTG GTT AAC ACA TTC AGG 3') para o vírus HTLV-I, e POL 1.2 (*pol*, *HTLV-II*, nt 4759-4781) (5' CCT GGT CGA GAG AAC CAA TGG TG 3') e POL 3.2 (*pol*, *HTLV-II*, nt 4896-4873) (5' CCA CTG GGG TTC ATG ACA TTT AGC 3') para o HTLV-II. Na *nested* PCR, seguiu-se um protocolo semelhante ao anterior, empregando-se controles internos positivos e negativos já usados na PCR primária, visando o rigoroso controle de eventual contaminação cruzada (ver protocolo da reação no Anexo D).

Após nova corrida eletroforética em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio, buscou-se identificar produtos de amplificação com tamanho esperado de 136 e 138 bp nas amostras positivas para HTLV-I e HTLV-II respectivamente. Em seguida, foi realizada transferência dos produtos da PCR para membrana de náilon e processada a revelação por meio da hibridização com sondas marcadas com material radioativo (<sup>32</sup>P) e não radiativo (fosfatase alcalina) para as diluições da cepa padrão, e somente com a sonda não radioativa para as amostras obtidas dos pacientes. As sondas utilizadas também são tipo-específicas: SK 112 (*pol*, *HTLV-I*, nt 4826-4851) (5' GTA CTT TAC TGA CAA ACC CGA CCT AC 3') para o HTLV-I e POL 2.2 (*pol*, *HTLV-II*, nt 4807-4830) (5' TCT ACT AGA CTG TCC TAA CCT TCC 3') para o HTLV-II.

As seqüências genômicas dos *primers* e sondas utilizados neste trabalho podem ser acessadas no banco de genes pelos seguintes códigos: HTLV-I: *GenBank accession no.* J02029; e HTLV-II: *GenBank accession no.* M10060) (HENEINE *et al*, 1992).

#### 4.4.3.1. Padronização de temperatura de pareamento dos *primers* da PCR da região *pol* do HTLV

Para otimização da temperatura de pareamento dos *primers* da PCR da região *pol* do HTLV foram realizadas em paralelo ampliações com uma amostra positiva (material genômico extraído de cultura da cepa padrão de HTLV-I – MT-2) e uma amostra negativa, proveniente de paciente comprovadamente não infectado por HTLV. As duas amostras foram analisadas em onze replicatas, empregando-se um gradiente de onze diferentes temperaturas de pareamento dos *primers* (45,1°C; 45,8°C; 47,3°C; 49,3°C; 51,7°C; 54,4°C; 57,1°C; 59,7°C; 62,1°C; 63,9°C; 65,1°C) nos 35 ciclos, cujas temperaturas para a desnaturação do DNA e extensão das cadeias, respectivamente 94 e 72°C, foram as mesmas, em ciclador térmico automático (Eppendorf, Perkin-Elmer). Em seguida, os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio para visualização da reação cuja temperatura de pareamento dos *primers* apresentou melhor performance, ou seja, a positividade na amostra positiva e ausência de banda inespecífica na amostra negativa. O mesmo procedimento foi feito na execução da *nested* PCR.

#### 4.4.3.2. Transferência do DNA

O DNA amplificado foi transferido por *Southern blot* para membrana de náilon (*Hybond-N*, *Amersham Corp.*, *Arlington Heights*, EUA), empregando-se o Sistema de Transferência *Vacu gene XL* (*Pharmacia Biotech*), que utiliza o vácuo para otimizar a transferência, seguindo-se as recomendações do fabricante (ver protocolo da reação no Anexo E).

#### 4.4.3.3. Hibridização com sonda radioativa

Realizou-se a marcação da porção 5'-terminal da sonda SK112 com 5  $\mu$ l de alfa  $^{32}\text{P}$ -dCTP (10  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ ) (*Amersham Biosciences*, EUA) e a enzima Klenow (kit comercial de marcação *Rediprime II – random prime labelling system*, *Amersham Pharmacia Biotech*). Após hibridação com a sonda radioativa, foi feita a auto-radiografia a  $-70^{\circ}\text{C}$  da membrana de náilon. (ver protocolo da reação no Anexo F).

#### 4.4.3.4. Hibridação com sonda não radioativa

O protocolo dessa hibridação seguiu as recomendações do fabricante, que sucintamente, envolvem as etapas de marcação da sonda, hibridização e revelação (ver protocolo da reação no Anexo G). Foram empregados os Sistemas *AlkPhos Direct* e *CDP-Star detection module* (*Amersham Biosciences*), que realizam a marcação das sondas com fosfatase alcalina para posterior revelação. Nessa fase, as membranas foram expostas ao filme "*Hyperfilm ECL*" em temperatura ambiente por 1 hora, após a adição do

substrato para houvesse a desfosforilação com a emissão de luz que é detectada pelo filme.

#### **4.4.4. Amplificação do gene da $\beta$ -globina**

As amostras com resultados negativos à amplificação do genoma proviral foram submetidas à reação de PCR para controle da presença de DNA em quantidade suficiente após a sua extração e ausência de inibidores da reação, empregando-se um par de *primers* da região do gene da  $\beta$ -globina (PC04: 5' CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3' e GH20: 5' GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC 3') (SAIKI et al,1985). Esse fragmento de DNA está presente em todas as células humanas. Após a amplificação e eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio, as amostras com boa qualidade de DNA apresentavam uma banda equivalente a 268 pb e aquelas que não apresentavam tal banda não eram consideradas adequadas para reação de PCR, portanto tiveram seus resultados negativos desconsiderados e foram excluídas da casuística. (Ver protocolo da reação no Anexo H).

# **RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS

### 5.1. CARACTERIZAÇÃO DA CASUÍSTICA ESTUDADA DE PACIENTES COM TESTE SOROLÓGICO DE *WESTERN BLOT* INDETERMINADO PARA HTLV-I/II

O grupo de pacientes avaliados, que apresentou Wb indeterminado para HTLV-I/II era composto por 65 indivíduos, sendo 39 (60%) do sexo masculino e 26 (40%) do sexo feminino, com idades variando de 19 a 60 anos. A faixa etária de 21 a 40 anos concentrou 66% (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição por faixa etária dos pacientes com teste imunológico de *Western blot* indeterminado para HTLV, HC-FMUSP, São Paulo, 2004

FAXA ETÁRIA	FREQUÊNCIA	
	n	%
= 10 anos	0	0,0
11 – 20 anos	5	7,7
21 – 30 anos	23	35,3
31 – 40 anos	20	30,8
41 – 50 anos	7	10,8
51 – 60 anos	8	12,3
> 60 anos	0	0,0
Ignorado	2	3,1
TOTAL	65	100,0

Legenda: HTLV –vírus linfotrópico de células T humanas, HC-FMUSP – Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo

Alguns pacientes apresentavam diagnóstico e infecção pregressa ou atual por outros agentes passíveis de transmissão sangüínea (Tabela 2).

Tabela 2 – Infecções pregressas ou atuais por agentes passíveis de transmissão sangüínea nos pacientes com teste imunológico de *Western blot* indeterminado para HTLV, HC-FMUSP, São Paulo, 2004

INFECÇÕES DIAGNOSTICADAS	FREQÜÊNCIA	
	n	%
HBV	2	3,1
HCV	3	4,6
HBV e HCV	1	1,5
HIV	1	1,5
<i>Trypanosoma cruzi</i>	2	3,1
Sem infecção	54	83,1
Ignorado	2	3,1
<b>TOTAL</b>	<b>65</b>	<b>100,0</b>

Legenda: HTLV –vírus linfotrópico de células T humanas, HC-FMUSP – Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, HBV - vírus da hepatite B, HCV - vírus da hepatite C, HIV - vírus da imunodeficiência humana

O padrão de reatividade anti-HTLV ao *Western blot* da casuística apresentou grande variabilidade, oscilando a apresentação de 1 a 7 bandas. Os perfis observados eram constituídos de muitas combinações de anticorpos reagentes às proteínas virais. A Tabela 3 resume os padrões encontrados, levando-se em conta a presença de reatividade a antígenos virais mais importantes do ponto de vista de critério de sorodiagnóstico. Vale ressaltar que entre as 28 amostras com padrão de reatividade a antígenos

codificados pela região *gag* na ausência de reatividade à proteína p24 e às proteínas do envelope, encontramos 6 (9,2% do total de amostras) com anticorpos anti-p19, p26, p28, p32, p36 e p53.

Tabela 3 – Sororreatividade anti-HTLV apresentada ao teste imunológico de *Western blot* dos pacientes estudados, HC-FMUSP, São Paulo, 2004

SORORREATIVIDADE ANTI-HTLV NO <i>WESTERN BLOT</i>	FREQUÊNCIA	
	n	%
p19 (± bandas inespecíficas)	28	43,1
p19 + gD21 (± bandas inespecíficas)	15	23,1
p19 + p24 + bandas inespecíficas	3	4,6
p19 + gp46 + bandas inespecíficas	2	3,1
gD21	3	4,6
gD21 + p24 (± bandas inespecíficas)	4	6,2
gD21 + rgp46-I	1	1,5
p24	6	9,2
p24 + bandas inespecíficas	1	1,5
Outros	2	3,1
<b>TOTAL</b>	<b>65</b>	<b>100,0</b>

Legenda: HTLV –vírus linfotrópico de células T humanas, HC-FMUSP – Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, HBV - vírus da hepatite B, HCV - vírus da hepatite C, HIV - vírus da imunodeficiência humana

## **5.2. AVALIAÇÃO DA CEPA PADRÃO DE HTLV-I (MT-2) PARA DETERMINAR A SENSIBILIDADE DAS REAÇÕES DE PCR E *NESTED* PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DAS SEQÜÊNCIAS *tax* E *pol* DO GENOMA PROVIRAL SEGUIDAS POR DIFERENTES MÉTODOS DE REVELAÇÃO**

Com a finalidade de avaliar a sensibilidade das reações de PCR primária e *nested* PCR para amplificação das regiões *tax* e *pol* do genoma proviral seguidas por diferentes métodos de revelação, utilizou-se DNA extraído da linhagem celular MT-2, infectada por cepa padrão de HTLV-I. Para tanto, uma série de diluições consecutivas de concentrações conhecidas do material genômico foram submetidas às reações de PCR primária e *nested* PCR e, em seguida, aos métodos de detecção por eletroforese em gel de agarose corado pelo brometo de etídio e *Southern-blot*, seguido de hibridação com sonda radioativa (marcada com  $^{32}\text{P}$ ) e com sonda não radioativa (marcada com fosfatase alcalina).

### **5.2.1. Amplificação por meio da PCR primária e *nested* PCR do gene *tax***

A amplificação por meio da PCR primária do gene *tax* apresentou positividade fraca, ou seja, a presença de uma banda de 159 bp no gel corado com brometo de etídio até a 5ª diluição, que corresponde a 120 pg de DNA ou 20 células. Procedendo-se à técnica de *nested* PCR, observou-se positividade forte até a 6ª diluição, 12 pg de DNA ou 2 células (Figuras 7 e 8).

### **5.2.2. Amplificação por meio da PCR primária e *nested* PCR do gene *pol* com revelação por meio da visualização dos produtos amplificados em gel de agarose corado com brometo de etídio**

A amplificação do segmento *pol* do genoma do HTLV-I pela PCR primária apresentou positividade fraca pela visualização do gel de agarose corado com brometo de etídio (presença de banda com 186 bp) até a 5ª diluição (120 pg de DNA ou 20 células); e até a mesma diluição, porém com reatividade forte, em segunda amplificação (*nested* PCR) com o mesmo método de detecção (Figuras 9 e 10).

### **5.2.3. Amplificação por meio da PCR primária e *nested* PCR do gene *pol* com revelação por meio da hibridação com sonda marcada com <sup>32</sup>P**

A amplificação do segmento *pol* do genoma do HTLV-I pela PCR primária também apresentou positividade fraca por meio da visualização dos produtos amplificados após hibridação com sonda marcada com <sup>32</sup>P até a 5ª diluição (120 pg de DNA ou 20 células); e até a mesma diluição, porém com reatividade forte após na *nested* PCR (Figuras 11 e 12).

### **5.2.4. Amplificação por meio da PCR primária e *nested* PCR do gene *pol* com revelação por meio da hibridação com sonda marcada com fosfatase alcalina**

A amplificação do segmento *pol* do genoma do HTLV-I pela PCR primária e pela *nested* PCR apresentou forte positividade por meio da visualização dos produtos amplificados após hibridação com sonda marcada

com fosfatase alcalina até a 5ª diluição (120 pg de DNA ou 20 células) (Figuras 13 e 14).

Os resultados dessa avaliação encontram-se resumidos no Quadro 2.

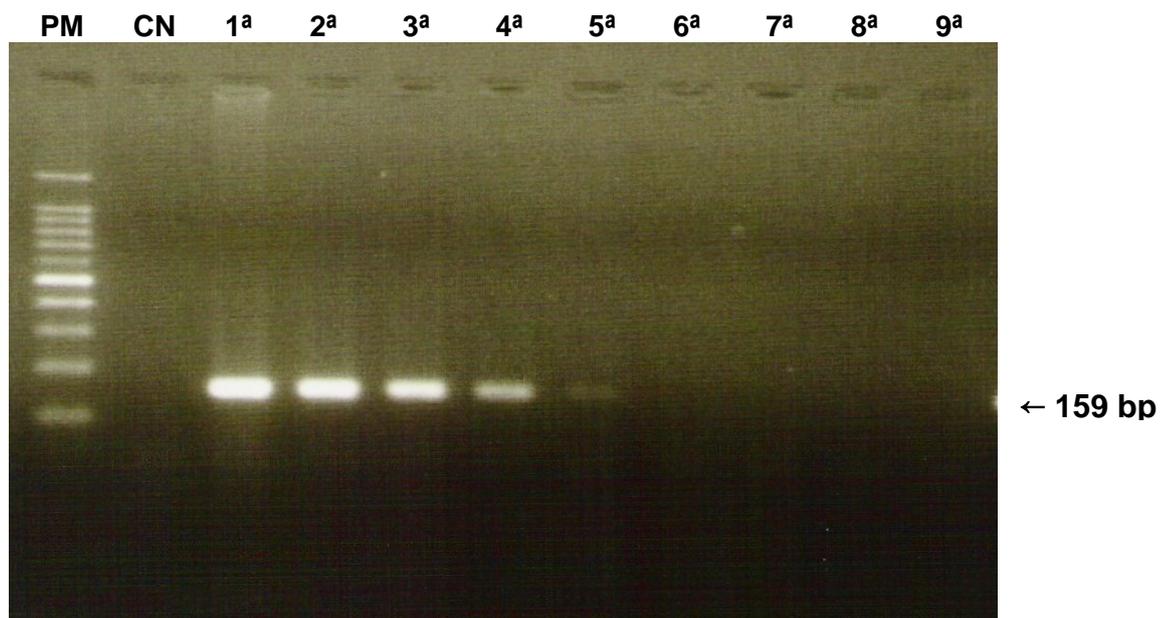


Figura 7 – Foto de gel de agarose 1,5% corado com EtBr com produto da PCR primária para amplificação do gene *tax* de cepa padrão de HTLV-I (MT-2) em diluições seriadas. (PM) Marcador de peso molecular de 100 pb. (CN) Controle negativo. 1<sup>a</sup> a 9<sup>a</sup> diluições da cepa padrão.

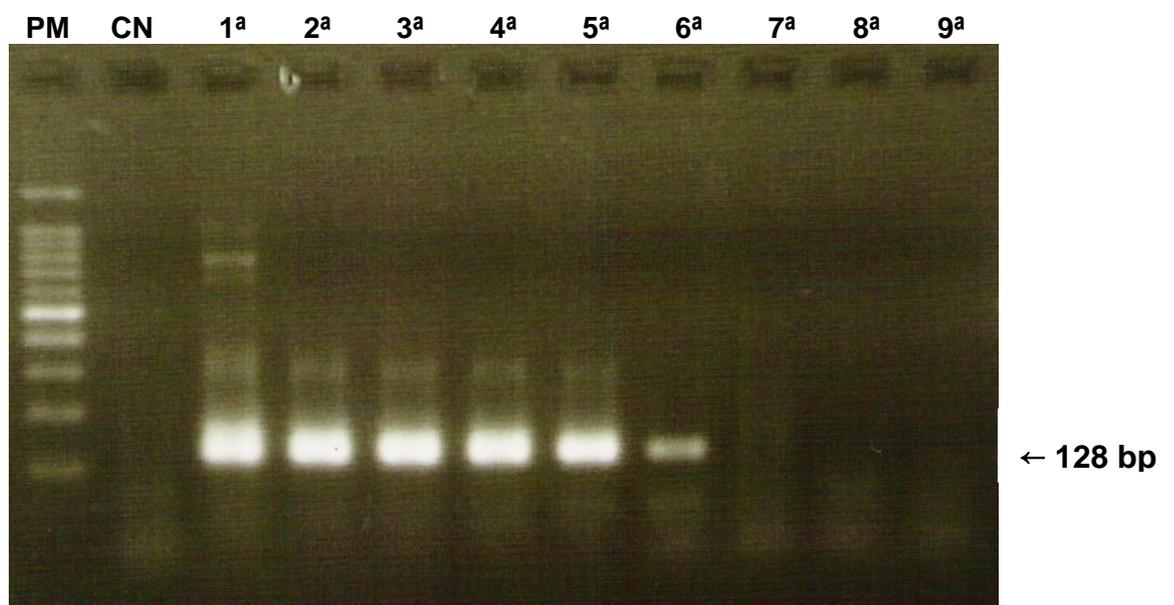


Figura 8 – Foto de gel de agarose 1,5% corado com EtBr com produto da *Nested PCR* para amplificação do gene *tax* de cepa padrão de HTLV-I (MT-2) em diluições seriadas. (PM) Marcador de peso molecular de 100 pb. (CN) Controle negativo. 1<sup>a</sup> a 9<sup>a</sup> diluições da cepa padrão.

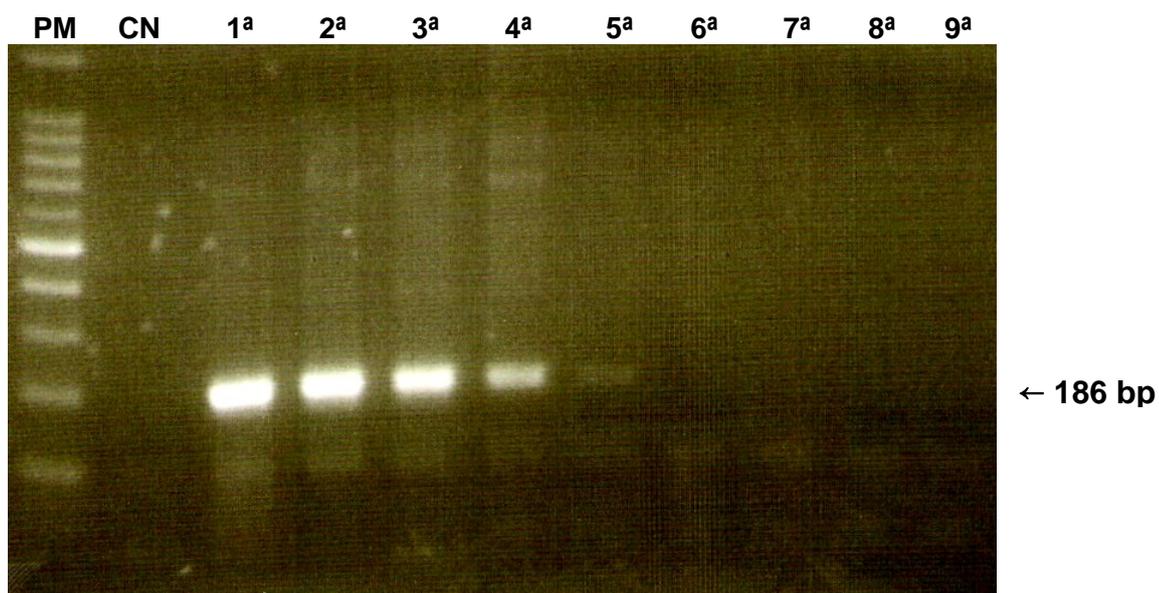


Figura 9 – Foto de gel de agarose 1,5% corado com EtBr com produto da PCR primária para amplificação do gene *pol* de cepa padrão de HTLV-I (MT2) em diluições seriadas. (PM) Marcador de peso molecular de 100 pb. (CN) Controle negativo. 1ª a 9ª diluições da cepa padrão.

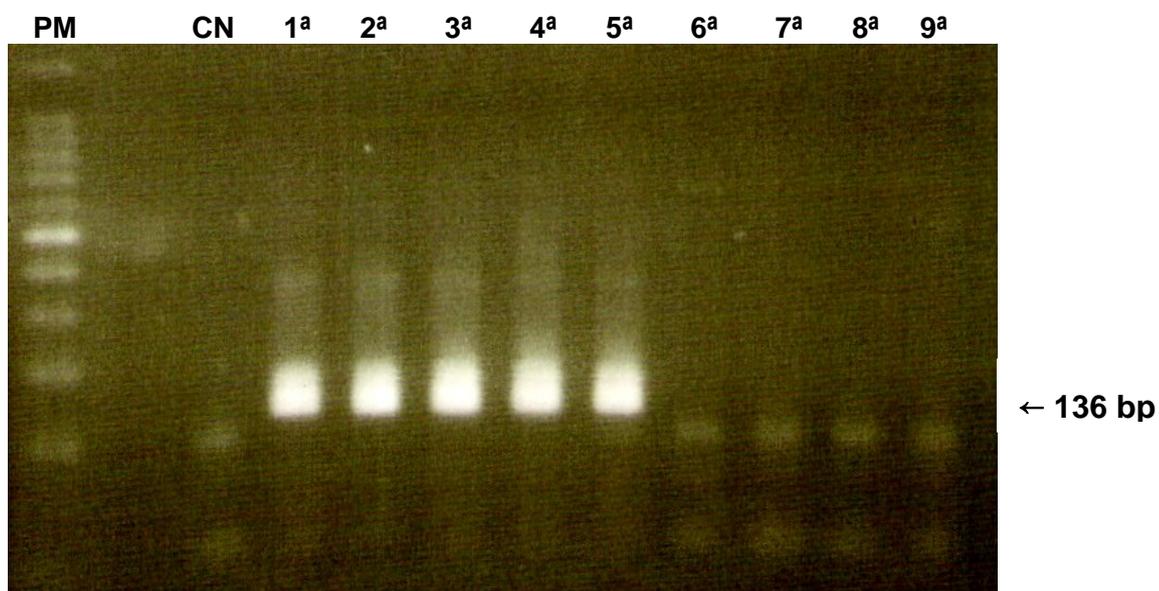


Figura 10 – Foto de gel de agarose 1,5% corado com EtBr com produto da *Nested PCR* para amplificação do gene *pol* de cepa padrão de HTLV-I (MT2) em diluições seriadas. (PM) Marcador de peso molecular de 100 pb. (CN) Controle negativo. 1ª a 9ª diluições da cepa padrão.

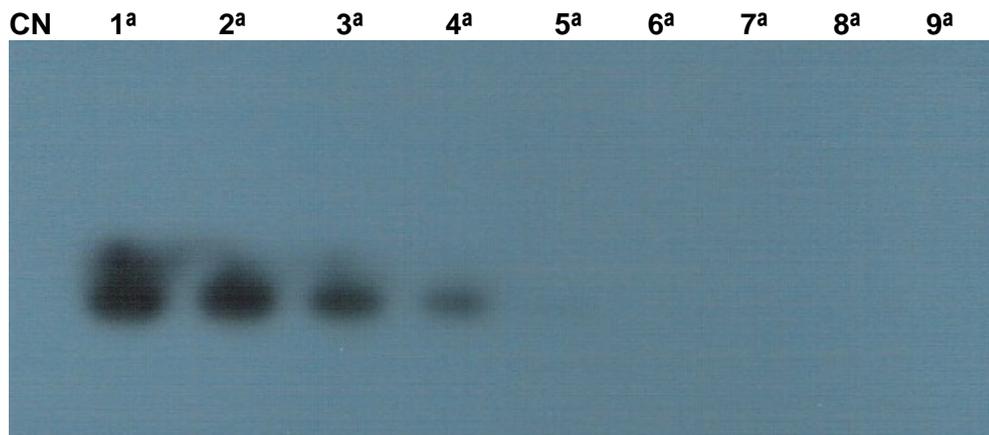


Figura 11 – Autorradiografia com produto da PCR primária para amplificação do gene *pol* de cepa padrão de HTLV-I (MT-2) em diluições seriadas – *Southern-blot* e hibridação com sonda radioativa (<sup>32</sup>P). (CN) Controle negativo. 1<sup>a</sup> a 9<sup>a</sup> diluições da cepa padrão.

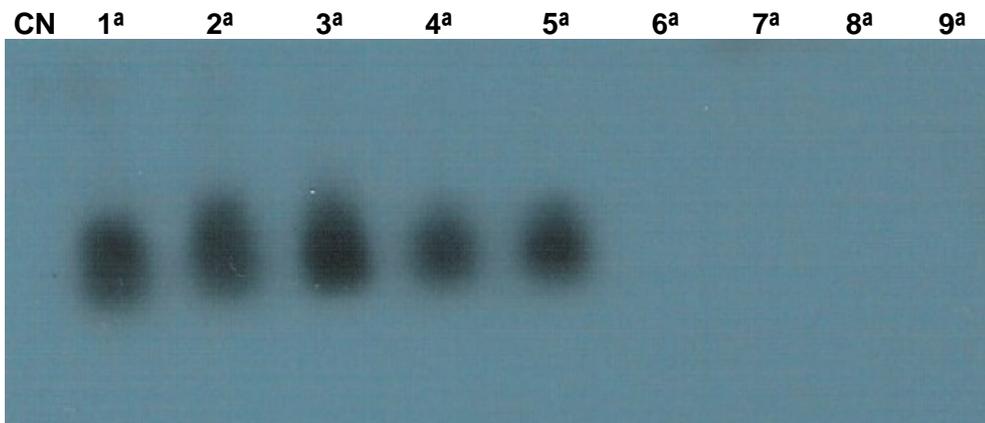


Figura 12 – Autorradiografia com produto da *nested PCR* para amplificação do gene *pol* de cepa padrão de HTLV-I (MT2) em diluições seriadas – *Southern-blot* e hibridação com sonda radioativa (<sup>32</sup>P). (CN) Controle negativo. 1<sup>a</sup> a 9<sup>a</sup> diluições da cepa padrão.

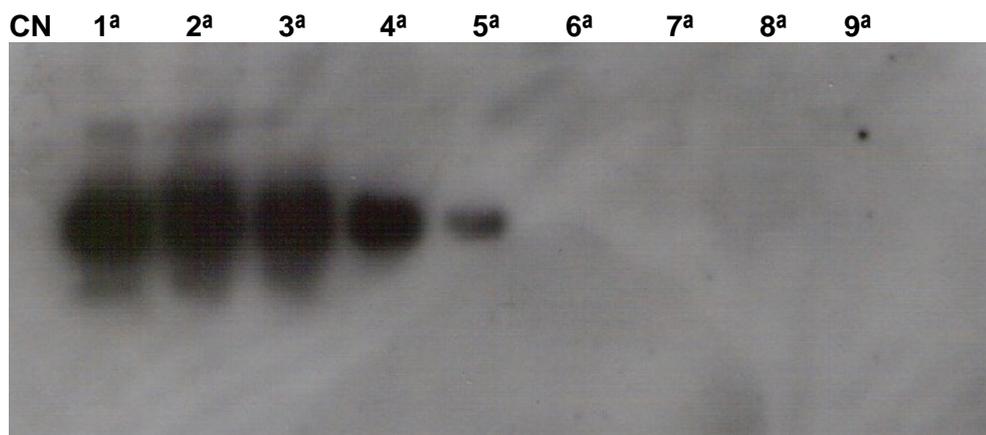


Figura 13 – Autorradiografia com produto da PCR primária para amplificação do gene *pol* de cepa padrão de HTLV-I (MT2) em diluições seriadas – *Southern-blot* e hibridação com sonda não radioativa (Fosfatase alcalina).

(CN) Controle negativo. 1<sup>a</sup> a 9<sup>a</sup> diluições da cepa padrão.

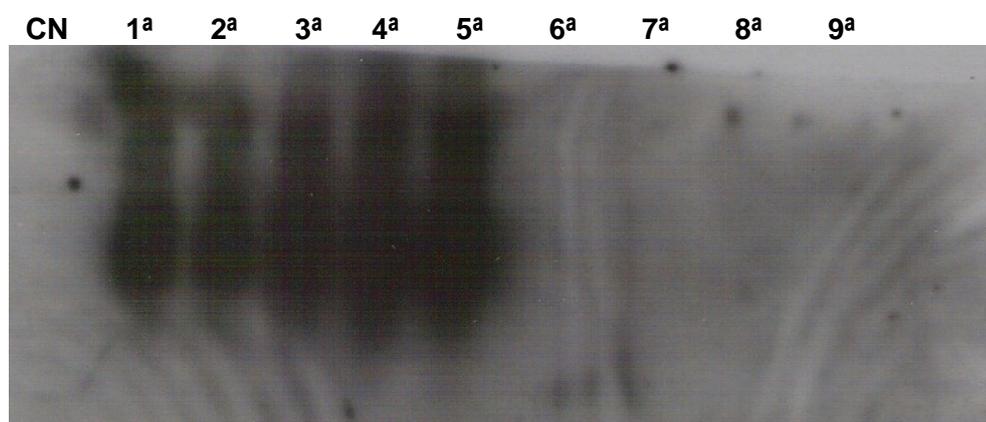


Figura 14 – Autorradiografia com produto da *Nested PCR* para amplificação do gene *pol* de cepa padrão de HTLV-I (MT2) em diluições seriadas – *Southern-blot* e hibridação com sonda não radioativa (Fosfatase alcalina).

(CN) Controle negativo. 1<sup>a</sup> a 9<sup>a</sup> diluições da cepa padrão.

Quadro 2 – Resultados da PCR para amplificação das regiões *tax* e *pol* do genoma proviral de cepa padrão de HTLV-I (MT-2)

Região ampli- ficada	Fases da PCR	Métodos de revelação	Diluições								
			1a.	2a.	3a.	4a.	5a.	6a.	7a.	8a.	9a.
			1,2 x10 <sup>6</sup> pg	1,2 x10 <sup>5</sup> pg	1,2 x10 <sup>4</sup> pg	1,2 x10 <sup>3</sup> pg	120 pg	12 pg	1,2 pg	0,12 pg	0,012 pg
gene <i>tax</i>	PCR	Et Br	+	+	+	+	+fr	-	-	-	-
	PCR <i>nested</i>	EtBr	+	+	+	+	+	+	-	-	-
gene <i>pol</i>	PCR	EtBr	+	+	+	+	+fr	-	-	-	-
		Sonda <sup>32</sup> p	+	+	+	+	+fr	-	-	-	-
		Sonda AlkPhos	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	PCR <i>nested</i>	EtBr	+	+	+	+	+	-	-	-	-
		Sonda <sup>32</sup> p	+	+	+	+	+	-	-	-	-
		Sonda AlkPhos	+	+	+	+	+	-	-	-	-

(+) - Positivo, (+fr) - Positivo fraco, (-) - Negativo.

### **5.3. AMPLIFICAÇÃO DE SEQÜÊNCIAS GENÔMICAS PROVIRAIS DE HTLV A PARTIR DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM SOROLOGIA INDETERMINADA**

#### **5.3.1. Amplificação da região *tax***

Do total de 65 pacientes avaliados, a pesquisa de genoma proviral de HTLV, por meio da reação em cadeia da polimerase para o segmento *tax* mostrou-se positiva em seis (9,2%) amostras, sendo que duas delas apresentaram positividade na PCR primária, enquanto as demais somente o fizeram na *nested* PCR. A digestão dos segmentos amplificados pela enzima de restrição *Taq-I*, para identificação dos tipos virais cujos segmentos *tax* foram amplificados, demonstrou a presença de segmento *tax* HTLV-I em quatro amostras (6,2%), de HTLV-II em uma (1,5%) e de ambos os vírus em outra (1,5%), conforme ilustram as Figuras 15 e 16. Todos esses indivíduos eram assintomáticos e referenciados ao Ambulatório de Assistência a Portadores de HTLV a partir de triagem para doação de sangue. É interessante acrescentar que o paciente número 30, que apresenta segmento *tax* de HTLV-II e marcadores do vírus da hepatite C e do vírus da hepatite B relata ter sido usuário de drogas injetáveis, enquanto o paciente número 11, positivo à *nested* PCR para os genes *tax* de HTLV-I e II relata ter recebido transfusão sangüínea no passado. Os dados demográficos, clínicos e os padrões de reatividade sorológica ao *Western blot* anti-HTLV relativo a

esses pacientes são apresentados por estes pacientes são apresentados no Quadro 3.

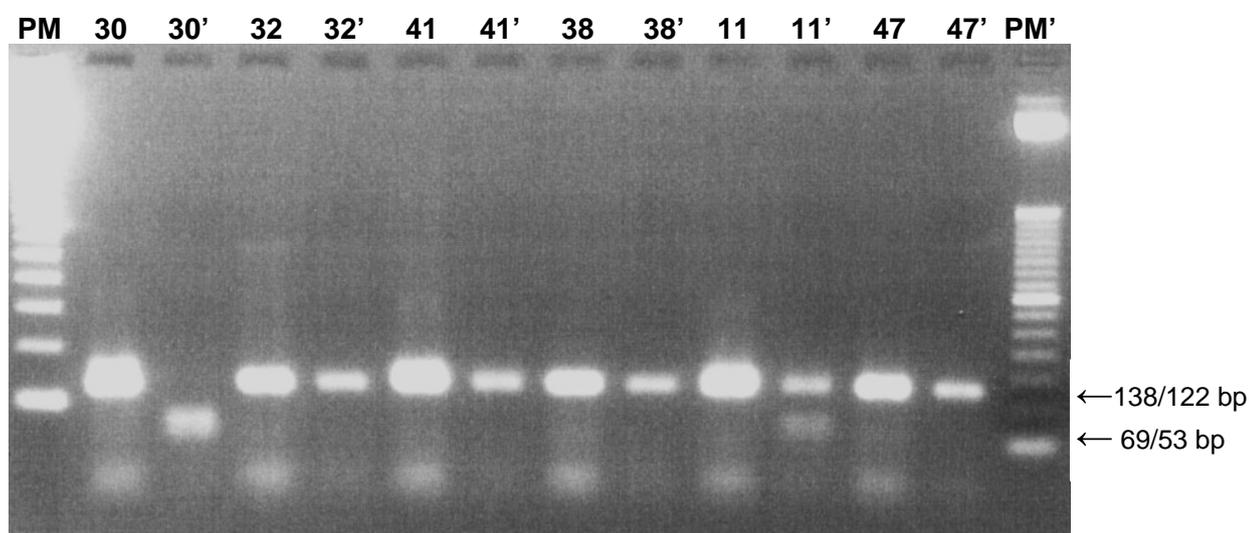


Figura 15 – Foto de gel de agarose 1,5% corado com EtBr de produto de *nested PCR* para amplificação do gene *tax* antes ( ) e após (') digestão com a enzima de restrição *Taq-1*.

PM - Marcador de peso molecular de 100 pb, PM' - Marcador de peso molecular de 50 pb.

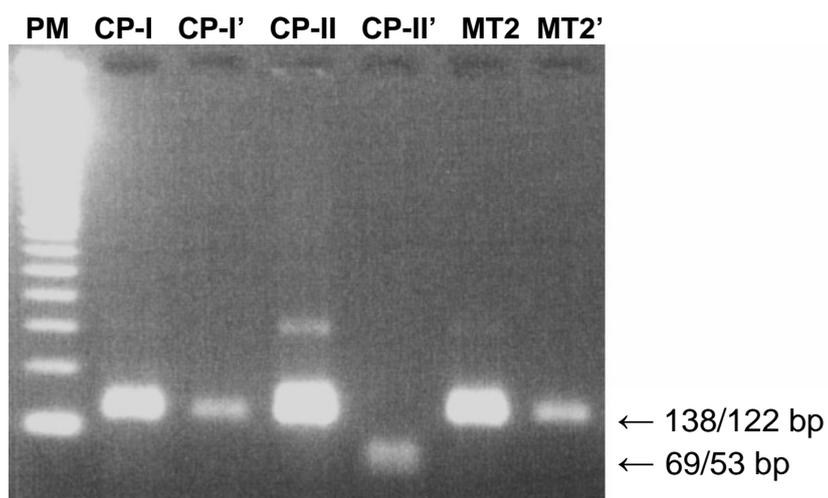


FIGURA 16 – Foto de gel de agarose 1,5% corado com EtBr de produto de *nested PCR* para amplificação do gene *tax* antes ( ) e após (') digestão com a enzima de restrição *Taq-1*.

PM - Marcador de peso molecular de 100 pb, CP-I - Controle positivo de HTLV-I, CP-II - Controle positivo de HTLV-II, MT2 - Cepa padrão de HTLV-I

Quadro 3 – Caracterização dos 6 pacientes com teste sorológico de *Western blot* Indeterminado para HTLV-I/II e PCR positiva para seqüência *tax* do genoma proviral desses retrovírus, HC-FMUSP, São Paulo, 2004

<b>Paciente No.</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Outra infecção</b>	<b>PCR gene <i>tax</i></b>	<b>Perfil de reatividade ao <i>Western blot</i> anti-HTLV</b>
11	F	49	Não	HTLV-I e HTLV-II	p19, p26, p28, p32, p36 e p53.
30	M	29	HBV HCV	HTLV-II	gD21.
32	M	25	Não	HTLV-I	gD21 e p24.
38	M	19	Não	HTLV-I	gD21.
41	M	24	Não	HTLV-I	p24.
47	F	40	Não	HTLV-I	p19 e p26.

F - Feminino, M – Masculino, A - Ausente., HBV - Vírus da hepatite B, HCV - Vírus da hepatite C.

### 5.3.2. Padronização de temperatura de pareamento dos primers da PCR da região *pol* do HTLV

Por ocasião das primeiras reações de PCR para amplificação da região *pol* do HTLV com amostras da casuística deste estudo, observou-se, no gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio depois de corrida eletroforética, a presença de um fragmento de DNA com aproximadamente o mesmo tamanho do produto esperado para a amplificação do gene *pol* com os primers utilizados, ou seja 186 bp, em todas as amostras e controles. Então se realizou reação de PCR com gradiente de temperaturas de pareamento dos *primers* que variavam de 45,1°C a 65,1°C. Na primeira fase da *nested* PCR, observou-se que o controle positivo (material genômico extraído de cultura da cepa padrão de HTLV-I – MT-2) apresentava amplificação da região esperada nas reações com todas as temperaturas de pareamento empregadas e que a amostra negativa para HTLV não apresentava amplificação com as temperaturas de pareamento de 59,7°C a 65,1°C (Figura 17). Seguindo-se à realização da *nested* PCR, não foi observada amplificação de fragmentos de DNA com o mesmo tamanho da reação positiva em todas as temperaturas empregadas na amostra negativa (Figura 18).

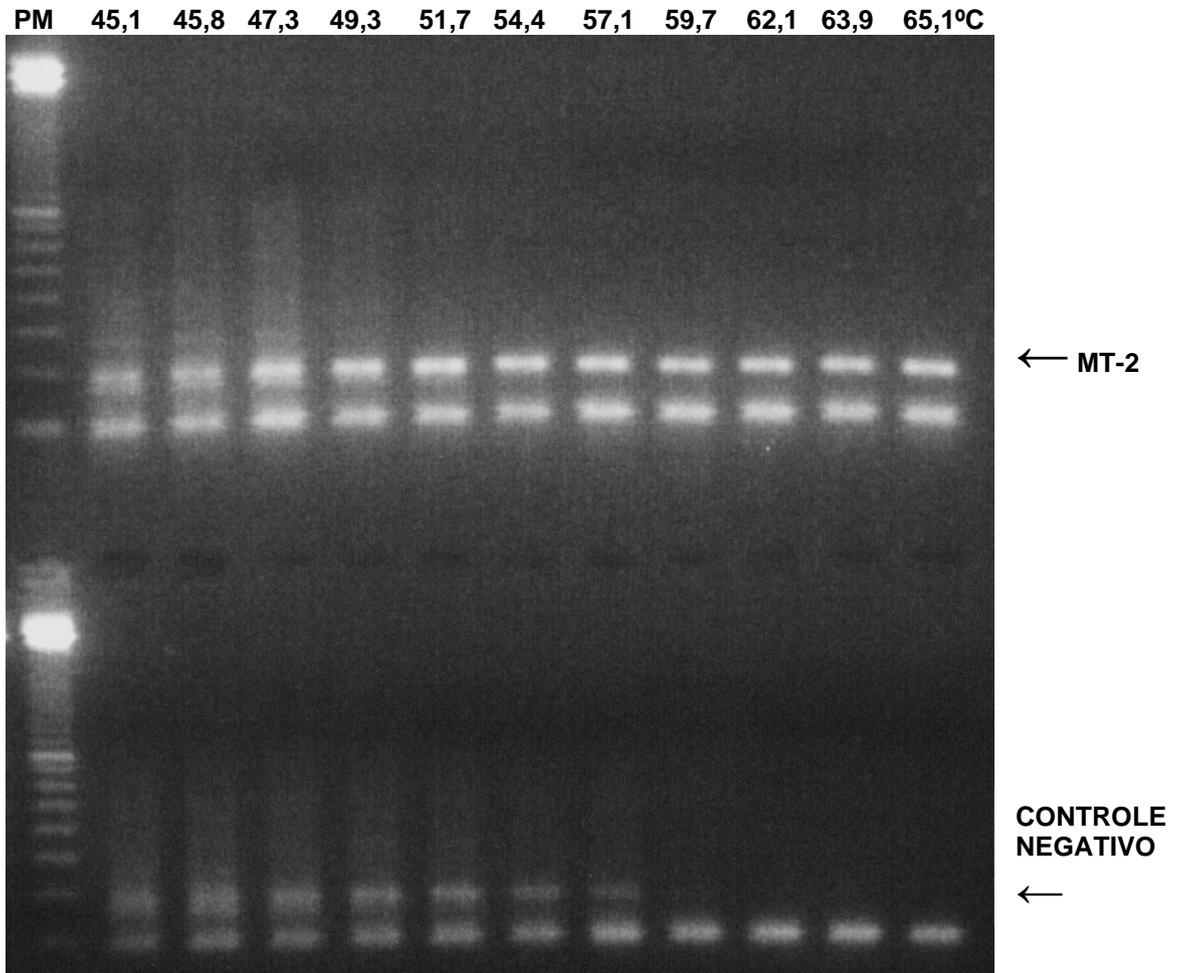


Figura 17 – Foto de gel de agarose 1,5% corado com EtBr com produto da PCR para amplificação do gene *pol* de cepa padrão de HTLV-I (MT2) e de Controle Negativo, empregando-se gradiente de temperaturas de pareamento dos *primers* que variavam de 45,1°C a 65,1°C.

PM - Marcador de peso molecular de 100 pb.

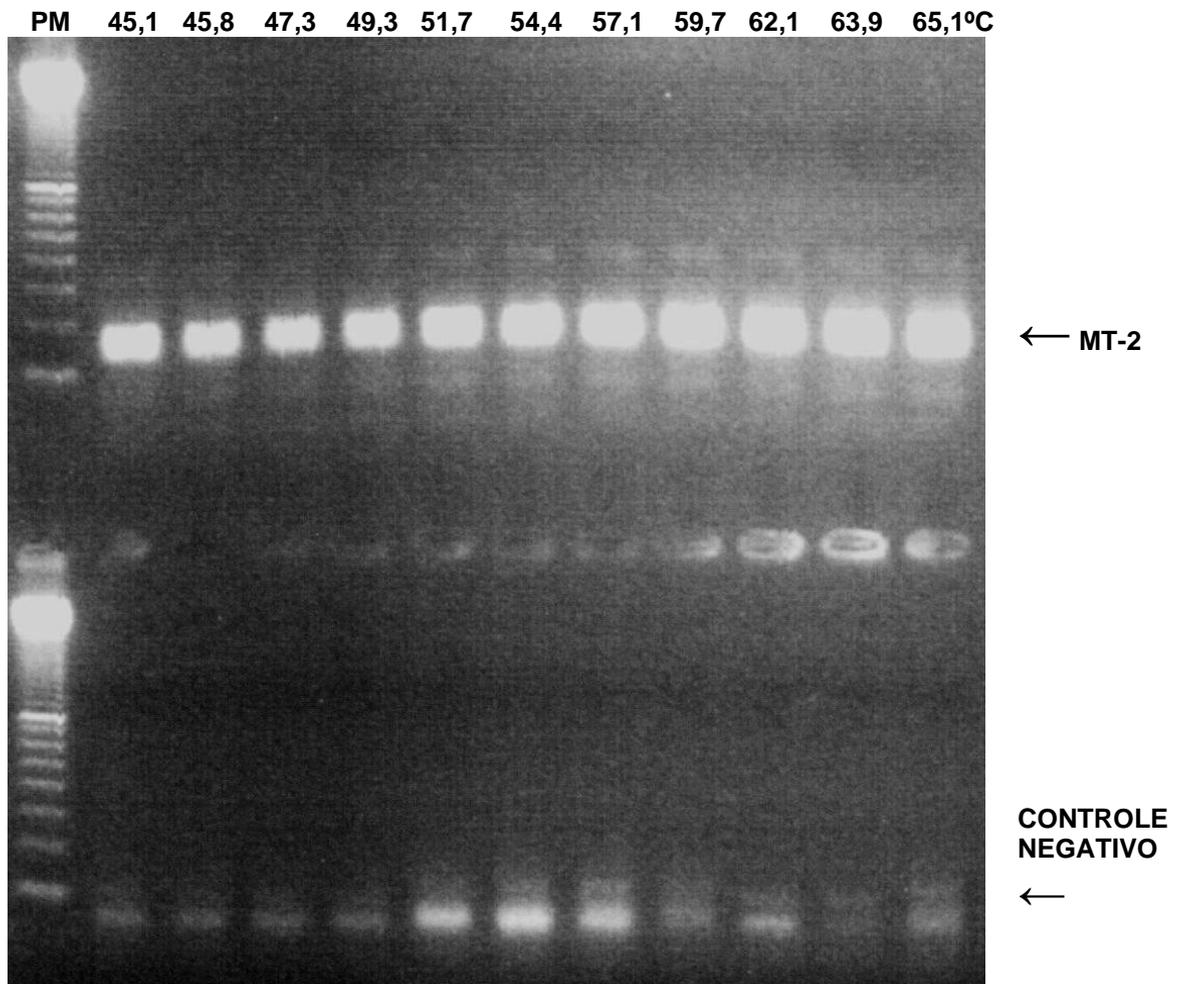


Figura 18 – Foto de gel de agarose 1,5% corado com EtBr com produto da *nested* PCR para amplificação do gene *pol* de cepa padrão de HTLV-I (MT2) e de Controle Negativo, empregando-se gradiente de temperaturas de pareamento dos *primers* que variavam de 45,1°C a 65,1°C.

PM - Marcador de peso molecular de 100 pb.

### **5.3.3. Amplificação da região *pol***

Nas mesmas 65 amostras dos pacientes, a pesquisa de genoma proviral de HTLV através da reação em cadeia da polimerase para o segmento *pol* mostrou-se positiva em apenas 3 (4,6%) amostras, sendo que todos os três já tinham apresentado resultado positivo para a pesquisa do segmento *tax* desses retrovirus. A hibridação com sonda marcada com enzima fosfatase alcalina demonstrou a presença de HTLV-I em duas amostras (3,1%) e HTLV-II em uma amostra (1,5%). As duas amostras reagentes para HTLV-I apresentaram positividade já na PCR primária, sendo que uma delas apresentou uma banda muito fraca, enquanto que a amostra reagente ao HTLV-II, apenas após segunda fase da reação (*nested PCR*), conforme ilustram as Figuras 19 e 20. Os dados epidemiológicos e os padrões de reatividade sorológica ao *Western blot* apresentados por estes pacientes são apresentados no Quadro 4.

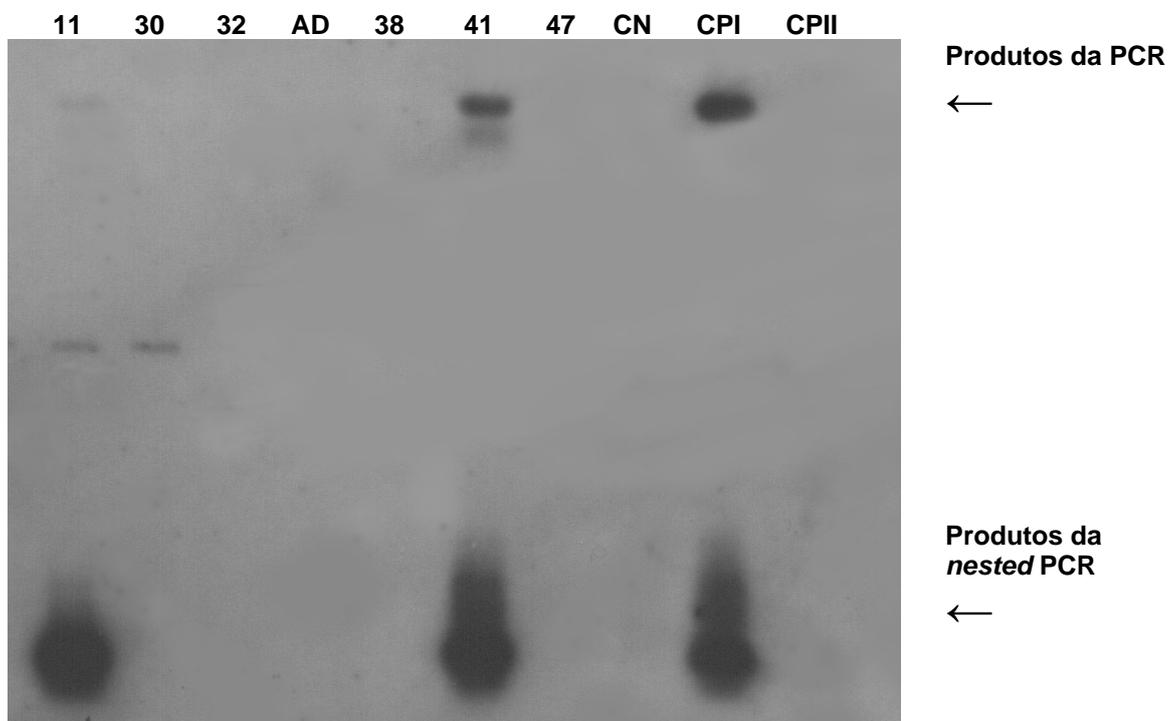


Figura 19 – Autorradiografia com produto da PCR e *nested* PCR para amplificação do gene *pol*, após *Southern-blot* e hibridação com sonda não radioativa (Fosfatase alcalina) específica para HTLV-I, dos 6 pacientes com sorologia indeterminada para HTLV-I/II e PCR positiva para seqüência *tax* desses retrovírus.

AD - Água deionizada, CN - Controle negativo, CPI - Controle positivo de HTLV-I, CPII - Controle positivo de HTLV-II.

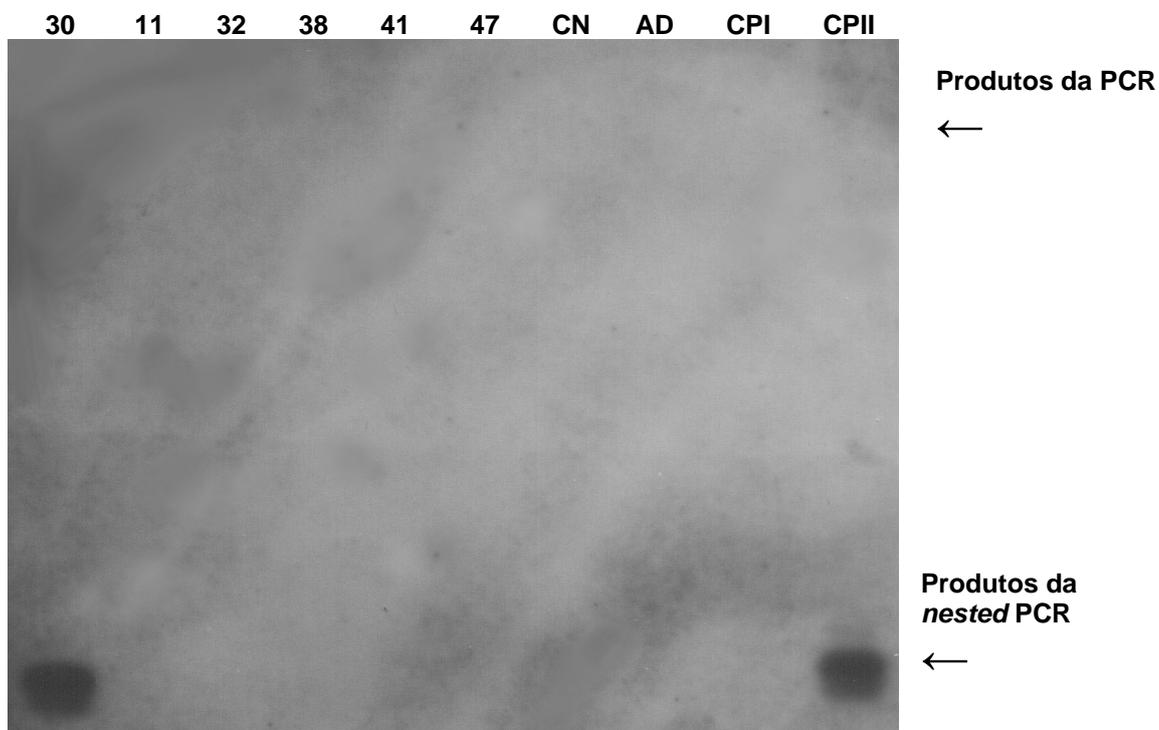


Figura 20 – Autorradiografia com produto da PCR e *nested* PCR para amplificação do gene *pol*, após *Southern-blot* e hibridação com sonda não radioativa (Fosfatase alcalina) específica para HTLV-II, dos 6 pacientes com sorologia indeterminada para HTLV-I/II e PCR positiva para seqüência *tax* desses retrovírus.

CN - Controle negativo, AD - Água deionizada, CPI - Controle positivo de HTLV-I, CII - Controle positivo de HTLV-II.

Quadro 4 – Resultados da PCR para seqüência *pol* e *tax* do genoma proviral de HTLV-I/II dos 6 pacientes com sorologia indeterminada e PCR positiva para seqüência *tax* desses retrovírus, HC-FMUSP, São Paulo, 2004

Paciente No.	Sexo	Idade	Outra infecção	PCR <i>tax</i>	PCR <i>pol</i>	Perfil de reatividade ao <i>Western blot</i>
11	F	49 a	Não	HTLV-I e HTLV-II **	HTLV-I *	p19, p26, p28, p32, p36 e p53.
30	M	29 a	HBV HCV	HTLV-II **	HTLV-II **	gD21.
32	M	25 a	Não	HTLV-I **	NEG	gD21 e p24
38	M	19 a	Não	HTLV-I **	NEG	gD21
41	M	24 a	Não	HTLV-I	HTLV-I	p24
47	F	40 a	Não	HTLV-I **	NEG	p19 e p26

F – Feminino, M – Masculino, a – anos, HBV - Vírus da hepatite B, HCV - Vírus da hepatite C, NEG – Negativo, (\*) - Resultado positivo fraco na PCR primária, (\*\*) - Resultado positivo apenas na *nested* PCR.

# **DISCUSSÃO**

## 6. DISCUSSÃO

No Brasil, país da América do Sul em que as infecções causadas por HTLV-I/II são consideradas endêmicas, as soroprevalências dessas infecções retrovirais têm sido descritas variando de 0,08% a 1,80% em candidatos a doadores de sangue de diversas regiões (GALVÃO-CASTRO *et al.*, 1997; CARNEIRO-PROIETTI *et al.*, 2002). Além disso, taxas bem mais altas foram relatadas em determinados grupos populacionais como usuários de drogas endovenosas (35,2%) (DOURADO *et al.*, 1999), portadores do HIV (4,3% a 28%) (BRITES *et al.*, 1994; CATERINO-DE-ARAÚJO *et al.*; 1998; ETZEL *et al.*, 2001) e certos grupos indígenas (7,8% a 37,8%) (MALONEY *et al.*, 1992; ISHAK *et al.*, 1995).

Em nosso país, a realização de triagem sorológica de infecção por HTLV em candidatos a doador de sangue tornou-se compulsória a partir de dezembro de 1993 (BRASIL, 1993). O algoritmo para diagnóstico laboratorial de infecção pelo HTLV, recomendado pelo Ministério da Saúde, preconiza a realização de teste de triagem com EIA ou reação de aglutinação e, para as amostras positivas ou com resultados duvidosos, teste confirmatório com *Western blot*, se ainda assim persistirem dúvidas ou para os casos em que a investigação sorológica não permite distinguir o tipo de HTLV responsável pela infecção, indica-se a realização da PCR com o intuito de verificar a presença de seqüências provirais de HTLV em células mononucleares periféricas (BRASIL, 2003). Deve-se entretanto ressaltar que a freqüência de

resultados indeterminados após a realização dos testes sorológicos de triagem e confirmação é elevada, acarretando sério problema para o aconselhamento dos indivíduos testados.

Resultados indeterminados de testes de *Western blot* são encontrados à triagem de candidatos a doadores de sangue em todo o mundo, chegando a ser mais freqüentes do que os resultados comprovadamente positivos, tanto em países localizados em regiões não endêmicas, como os EUA (0,027% soropositivos e 0,14% soroindeterminados) (LAL *et al.*, 1992), como também em regiões consideradas endêmicas, tais como o Brasil (0,3% soropositivos e 0,6% soroindeterminados) (SEGURADO *et al.*, 1997) e outros países do Caribe, Guadalupe (0,2% soropositivos e 0,4% soroindeterminados) (ROUET *et al.*, 2001) e Martinica (0,4% soropositivos e 0,5% soroindeterminados) (CÉSAIRE *et al.*, 1999). Na África, estudos conduzidos na República dos Camarões já mostraram taxas populacionais de sororreatividade indeterminada iguais ou superiores a 11% (MAUCLÈRE *et al.*, 1997; MAHIEUX *et al.*, 2000).

Na Fundação Pró-Sangue-Hemocentro de São Paulo (FPSHSP), de onde provem a grande maioria dos pacientes deste estudo, a avaliação sorológica de candidatos a doador de sangue revelou 1,6% de reatividade a HTLV à triagem inicial com base em EIA de lisado viral. Ao teste de *Western blot*, 0,5% dos indivíduos testados foram confirmados como positivos, enquanto 1,0% apresentou sororreatividade indeterminada (SABINO *et al.*, 1999). Essa elevada freqüência de resultados indeterminados acarreta

dificuldades, do ponto de vista epidemiológico, em se estabelecer a real prevalência de HTLV na população e, do ponto de vista de assistência e aconselhamento, em definir o real *status* dos indivíduos testados.

Com a finalidade de contribuir para o esclarecimento do significado da sororreatividade anti-HTLV-I/II indeterminada ao teste de *Western blot*, conduzimos o presente estudo, baseado na pesquisa de seqüências do DNA proviral desses retrovírus em células mononucleares periféricas de indivíduos com esse padrão de reatividade sorológica.

A casuística deste estudo é composta por amostras de concentrado de leucócitos de pacientes atendidos no Ambulatório de Assistência a Portadores de HTLV da Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HC-FMUSP a partir de janeiro de 1992. Esse serviço atende, em sua grande maioria (aproximadamente 90%), candidatos a doador de sangue da FPSHSP e de outros bancos de sangue da cidade de São Paulo com resultados positivos e indeterminados para HTLV, assim como seus familiares e alguns raros casos de pacientes encaminhados com sintomas de TSP/HAM. Os testes sorológicos de todos os pacientes foram realizados ou refeitos na Divisão de Sorologia da FPSHSP. Até 1996, para o diagnóstico de infecção por HTLV, o teste confirmatório usado era o *Western blot* versão 2.3 (*Diagnostic Biotechnology Ltd.*, Cingapura), que emprega como substrato antigênico lisado viral total, enriquecido de peptídeo recombinante (r21-e) derivado da proteína transmembrana viral. A partir de 1997, passou a ser usado o *Western blot* versão 2.4 (*Diagnostic Biotechnology Ltd.*, Cingapura), que utiliza o peptídeo recombinante gD21,

derivado dessa mesma proteína (gp21), porém que apresenta maior especificidade para identificação de anticorpos anti-HTLV (VARMA *et al.*, 1995). Entretanto, apesar dessas particularidades, há evidências de que o emprego de qualquer um desses *kits* de sorodiagnóstico não determina diferenças significativas na prevalência observada de resultados soroindeviduados, assim como no perfil de reatividade detectado nos testes, uma vez que, na maioria dos casos, as bandas reveladas na detecção de anticorpos decorrem da reatividade a proteínas codificadas pelo gene *gag* viral e não à proteína do envelope gp21 (ROUET *et al.*, 2001; MANGANO *et al.*, 2004).

Somente foram incluídos neste estudo pacientes soroindeviduados ao teste de WB anti-HTLV, cujas células mononucleares periféricas encontravam-se armazenadas no LIM-52 do HC-FMUSP. Destes, ainda foram excluídas sete amostras por não apresentarem DNA em quantidades suficientes, conforme evidenciado pela ausência de amplificação do gene da  $\beta$ -globina à PCR.

Dessa forma, estudou-se um grupo de 65 pacientes com sorologia indeterminada para HTLV-I/II, composto por 39 (60%) indivíduos do sexo masculino e 26 (40%) do sexo feminino. Em estudo de doadores de sangue de Guadalupe, ROUET e colaboradores (2001) observaram que entre os indivíduos com sorologia positiva para HTLV havia predomínio do sexo feminino, e entre os indivíduos com sorologia indeterminada, a distribuição entre homens e mulheres era indiferente; quanto à faixa etária, no primeiro grupo, a prevalência de infecção por esses retrovírus era diretamente

proporcional ao avançar da idade, enquanto que o grupo dos soroindeterminados era constituído por indivíduos mais jovens. Essas características epidemiológicas do grupo de baixo risco com sorologia indeterminada mostravam-se semelhantes às aquelas observadas entre candidatos a doador de sangue soronegativos para HTLV. Isto reflete o perfil epidemiológico da infecção pelo HTLV, cuja transmissão sexual é mais eficiente do homem para a mulher e a taxa de infecção em regiões endêmicas aumenta com a progressão da idade (SANTOS *et al.*, 2002; MANGANO *et al.*, 2004). Na nossa casuística de soroindeterminados, a idade variou de 19 a 60 anos, estando a maioria (66,1%) na faixa etária de 21 a 40 anos (Tabela 1).

Como a maioria de nossos pacientes era procedente da triagem de bancos de sangue, pudemos avaliar nesses indivíduos a presença simultânea de marcadores sorológicos de infecção pregressa ou atual por agentes de transmissão sangüínea. De 63 pacientes com essa informação disponível, três pacientes (4,8%) apresentavam marcador sorológico de infecção por HBV e quatro (6,3%) de HCV, sendo um deles soropositivo para ambos; um (1,6%) de HIV; dois (3,2%) de *Trypanossoma cruzi* e nenhum de *Treponema pallidum*.

Na literatura, existem vários estudos conduzidos no Brasil sobre a prevalência de marcadores sorológicos para esses agentes em candidatos a doador de sangue. Foram encontradas taxas de 5,35% a 9,2% de indivíduos com anti-HBc (ROSSINI, 2003; TREITINGER, 2000; respectivamente), de 0,34% a 2,89% com anti-HCV (ROSSINI, 2003; PATINO-SARCINELLI,

1994), e de 1,4% a 1,9% com anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi* (REICHE, 1996; SOBREIRA,2001). A taxa desses marcadores sorológicos pode apresentar variações de acordo com a região do país e o período avaliados, ocasionado restrições para essa comparação.

Assim como observado em outros trabalhos, encontramos uma grande variabilidade no perfil de bandas à análise dos testes de Wb de nossa casuística, com apresentação de desde uma banda isolada até 7 bandas de anticorpos numa mesma amostra de soro. Verificamos predomínio [em 28 indivíduos (43,1%)], do padrão de reatividade a antígenos codificados pela região *gag* exceto à proteína p24, sendo seis indivíduos (9,2% do total da casuística) com presença dos anticorpos anti p19, p26, p28, p32, p36 e p53, padrão este conhecido como HGIP (do inglês *HTLV gag indeterminate profile*) (LAL *et al.*, 1992; MAUCLÈRE *et al.*, 1997; VANDAMME *et al.*, 1997; CÉSAIRE *et al.*, 1999; MAHIEUX *et al.*, 2000; ROUET *et al.*, 2001; MANGANO *et al.*, 2004).

Tendo como objetivo a padronização de um teste molecular para amplificação de seqüências genômicas provirais de HTLV a ser empregado na nossa casuística, que pudesse ser comparado com aqueles empregados em trabalhos existentes na literatura, buscamos avaliar a sensibilidade da PCR primária e *nested* PCR para as regiões *tax* e *pol* de HTLV-I, bem como comparar a sensibilidade de diferentes técnicas de revelação do produto de amplificação da região *pol*: a visualização de produtos da PCR em gel de agarose corado com EtBr, a hibridação com sondas nucleotídicas

específicas marcadas com isótopos radioativos e com materiais não radioativos.

Na determinação da sensibilidade da PCR com o emprego de diluições seriadas de linhagem celular que contém HTLV-I (MT-2), como já apresentado por outros autores (KOBAYASHI *et al.*, 1984; HENEINE *et al.*, 1992), a nPCR se mostrou mais sensível que a pPCR. Neste estudo, em até 10 a 100 vezes, se deixarmos de considerar as reações que de muito fracas poderiam passar despercebidas.

A sensibilidade da PCR foi 10 vezes maior quando utilizados *primers* para o gene *tax* do que para o gene *pol*, detectando a presença de provírus em amostra com até 12 pg e 120 pg respectivamente, quantidades de material genômico correspondentes a aproximadamente 2 e 20 células diplóides humanas, com a detecção dos produtos amplificados na corrida eletroforética em gel de agarose corado com brometo de etídio (Quadro 2). Esse achado pode ser justificado em parte porque a célula da linhagem MT-2 contém uma partícula proviral completa e sete provírus defectivos, sendo que o segmento *pX (tax)* está presente em seis deles e o segmento *pol* em apenas dois (KOBAYASHI *et al.*, 1984). Resultados semelhantes em termos de sensibilidade foram apresentados por MATSUMOTO e colaboradores (1990), que detectaram gene *tax/rex*, segmento genômico mais amplo que engloba o deste estudo, em até 1,6 pg de DNA de linhagem celular infectada diluída com 1 µg de DNA de linhagem não infectada, porém utilizando a linhagem celular HUT 102, que contém 8 a 10 cópias de segmentos *pX* provirais de HTLV-I em cada célula. Nesse mesmo estudo, o autor apresenta

uma estimativa do número de cópias de provírus de HTLV-I presente nas células mononucleares periféricas (PBMC) de 57 pacientes, sendo que 84% dos pacientes apresentavam mais de 200 provírus de HTLV-I em  $1,5 \times 10^5$  PBMC; 12% dos pacientes, de 20 a 70 cópias de HTLV-I em  $1,5 \times 10^5$  PBMC; e 4% com menos de 10 provírus  $1,5 \times 10^5$  PBMC. Tais dados reforçam o conceito de que esses métodos não são infalíveis na detecção de segmentos provirais em amostras de pacientes com baixa carga proviral.

Em estudo com linhagem MT-2 na Argentina, GALLEGO e colaboradores (2004) encontraram sensibilidade analítica da *nested* PCR da região *tax*, com os mesmos *primers* usados neste estudo, correspondente a 1 célula infectada (6 pg de DNA) diluída em  $1 \times 10^6$  células não infectadas da linhagem HT.

A comparação dos métodos de detecção do produto de amplificação da nPCR do gene *pol* mostrou que a sonda marcada com AlkPhos é tão sensível quanto a sonda radioativa  $^{32}\text{P}$ , apresentando banda visível até 120 pg de DNA. Quando se comparam os resultados da pPCR, observa-se que a sonda não radioativa apresentou melhor desempenho que a radioativa, considerando a banda muito fraca da diluição com 120 pg de DNA desta última. A visualização de fragmentos de DNA amplificados no gel de agarose corado com brometo de etídio apresentou desempenho igual àquele com uso da sonda marcada com  $^{32}\text{P}$ , porém sem a vantagem de garantir a especificidade da reação para HTLV com hibridação com sonda específica.

Com base nessa avaliação de sensibilidade das diferentes técnicas de revelação, optamos por conduzir a detecção de produtos de amplificação

da PCR para região *pol* do genoma proviral em amostras dos pacientes com Wb indeterminado para HTLV, apenas por meio da sonda marcada com fosfatase alcalina, possibilitando a comparação com trabalhos publicados na literatura que utilizam a detecção dos fragmentos amplificados por meio da hibridação com sonda marcada com isótopo radioativo ( $^{32}\text{P}$ ) (BARUN & SRINIVASAN, 1989; HENEINE *et al.*, 1992; GALLEGO *et al.*, 2004). Destacamos ainda a grande vantagem da sonda não radioativa, tendo em vista que a manipulação de material emissor de radiação ionizante acarreta sérios riscos para a saúde dos profissionais envolvidos e para o meio ambiente, além de exigir instalações especiais para sua manipulação, condição esta muitas vezes não disponível nos laboratórios em nosso meio.

A PCR primária com os *primers* utilizados neste estudo para a região *pol* do genoma proviral do HTLV leva à amplificação de segmento de 186 bp. Porém, o emprego da temperatura de 55 °C para pareamento dos *primers*, conforme previamente descrito na literatura (HENEINE *et al.*, 1992), determinou em nossa pesquisa a detecção no gel de agarose de banda com tamanho semelhante ao esperado para os produtos de amplificação do gene *pol* mesmo nos controles negativos da reação. Embora o método de hibridação com sondas específicas para os vírus HTLV-I e II pudesse garantir a especificidade dos produtos amplificados, optamos por conduzir uma etapa prévia de otimização da reação de PCR. Verificamos que, empregando temperaturas de pareamento dos *primers* de 59,7°C a 65,1°C, a banda acima descrita não era detectada em amostra sabidamente negativa, mas que a amostra de DNA com genes de HTLV-I (MT-2) continuava

apresentado a banda de 186 bp, de forma bem nítida (Figura 17). De modo análogo, a nPCR continuou detectando banda bem definida de 136 bp na amostra positiva com essas temperaturas e ausência desta na amostra negativa (Figura 18). A partir desses resultados, optamos por adaptar o protocolo da reação *pol*, utilizando 62°C para pareamento dos *primers* e mantendo os demais parâmetros.

Adotando como critério da confirmação de infecção pelos vírus HTLV-I e/ou II a presença de segmentos amplificados pela PCR referente a duas regiões diferentes do genoma proviral, de um total de 65 pacientes com EIA positivo e *Western blot* indeterminado, o presente estudo encontrou três (4,6%) infectados pelo HTLV-I/II, sendo dois (3,1%) com HTLV-I e um (1,5%) com HTLV-II. A metodologia empregada foi a PCR e *nested* PCR para as regiões *tax* e *pol*, por se tratar de regiões indispensáveis para a replicação viral *in vivo* (MATSUMOTO *et al.*, 1990). Encontramos ainda a presença isolada da região gênica *tax* de HTLV-I em três (4,6%) pacientes.

MANGANO e colaboradores (2004) apresentaram resultados semelhantes no estudo de doadores de banco de sangue de Buenos Aires, Argentina, empregando nPCR para as regiões *pol*, *env* e *tax*. Encontraram um indivíduo (2,9%) com HTLV-I (regiões *pol*, *env* e *tax*), outro (2,9%) com HTLV-II (*pol* e *tax*) e outros três (8,8%) com amplificação apenas do segmento *tax*. SANTOS e colaboradores (2003), em amostras de 41 doadores de sangue de Fortaleza-Ceará com Wb indeterminado, realizaram a pesquisa de uma única seqüência gênica, *tax/rex*, obtendo resultado positivo em nove (22%). Na nossa casuística, os pacientes que

apresentaram amplificação do gene *tax*, com ou sem a amplificação de gene *pol*, totalizam seis (9,2%).

Diante da experiência obtida nas etapas de determinação da sensibilidade dos métodos de PCR para HTLV-I com a linhagem MT-2 e de análise das amostras da casuística deste estudo, concordamos com a sugestão de outros autores de que os *primers tax* sejam mais sensíveis para detectar seqüências provirais de HTLV (SOLDAN *et al.*, 1999).

Entretanto, é importante ressaltar que as prevalências de infecção retroviral evidenciadas entres indivíduos com sororreatividade indeterminada pode variar de acordo com o grupo populacional avaliado. MORIMOTO (2003), em estudo de pacientes portadores do HIV no Estado do Paraná, Brasil, que apresentavam sorologia indeterminada para HTLV (1,6% do total), encontrou HTLV em 14 (87%), sendo todos do tipo II. O grupo total estudado era composto em grande parte por usuários de drogas endovenosas, sendo a soroprevalência de infecção por HTLV nessa população de 5,8% (0,8% de HTLV-I e 4,9% de HTLV-II). Esses dados vêm confirmar que o significado da sorologia indeterminada para HTLV depende da população estudada, além da prevalência da infecção na região geográfica em questão, que determinam o padrão de circulação desses retrovírus na comunidade.

Em nosso estudo, os três pacientes infectados não apresentaram diferenças significativas nas suas características sócio-demográficas em relação aos demais indivíduos soroindeterminados, cuja infecção não foi confirmada pela PCR (Quadro 3). Todos os três pacientes haviam realizado

exames por ocasião da doação de sangue, dois deles eram do sexo masculino com idades de 24 e 29 anos e uma do sexo feminino com 49 anos de idade. Em relação a fatores de risco apresentados, o paciente com infecção por HTLV-II era ex-usuário de drogas endovenosas e entre os dois infectados por HTLV-I, um deles era do sexo feminino, tinha recebido transfusão sanguínea e feito acupuntura, e o outro não apresentava os fatores de risco já relacionados com a transmissão desses vírus. No paciente com infecção por HTLV-II, foi detectada ainda a presença de anticorpos anti-HBc e anti-HCV; os outros dois pacientes não apresentavam marcadores sorológicos de infecção causada por agentes de transmissão sanguínea.

Deve-se, entretanto, ter em conta que a baixa prevalência de infecção por HTLV na nossa casuística de indivíduos com sororreatividade anti-HTLV indeterminada ao Wb prejudica a análise de fatores preditivos de infecção retroviral nessa amostra.

De forma contrastante aos nossos resultados, vários autores, ao compararem pacientes com infecção pelo HTLV-I/II comprovada por sorologia e PCR, e aqueles com sorologia indeterminada e PCR negativa, mostraram diferenças significativas nas características desses grupos (ROUET *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2002; MANGANO *et al.*, 2004). Em regiões endêmicas, a prevalência de infecção por HTLV vai aumentando com a evolução da idade, portanto o grupo de pacientes infectados tendia a apresentar faixas etárias mais elevadas do que aqueles com sorologia indeterminada. Em investigação conduzida no Caribe, os pacientes

infectados por HTLV eram predominantemente do sexo feminino, havia associação dessa infecção retroviral com a presença de anticorpos anti-HBc e verificou-se que tais indivíduos procediam de determinadas micro-regiões geográficas; enquanto os sorodeterminados, assim como os indivíduos soronegativos para HTLV não apresentavam diferenças em relação ao sexo, não estavam associados à sororreatividade anti-HBc e apresentavam a sua distribuição territorial mais homogênea (ROUET *et al.*, 2001). Esses estudos refletem a idéia de que outros fatores, que não a infecção pelo HTLV, possam determinar a sororreatividade cruzada nos testes, resultando em padrão indeterminado ao Wb. Entretanto, GASTALDELLO e colaboradores (2001) observaram que os doadores com teste WB indeterminado e sem fatores de risco para transmissão de HTLV apresentavam resultados negativos ao teste de imunofluorescência indireta (IFI), enquanto que aqueles com fatores de risco apresentavam altas taxas de positividade ao teste de imunofluorescência indireta.

Achamos ainda interessante avaliar se o padrão de sororreatividade anti-HTLV exibido ao Wb poderia ser preditivo da presença de seqüências genômicas provirais detectadas nos testes moleculares. Assim verificamos que dos três pacientes com infecção pelo HTLV confirmada neste estudo, um paciente infectado por HTLV-I apresentava reatividade exclusivamente anti-gag na ausência de anticorpos anti-p24 (HGIP), enquanto outro infectado por HTLV-I reagiu somente contra a p24 e um indivíduo com infecção por HTLV-II apresentava apenas anticorpos anti-gD21. É importante

destacar que mesmo o padrão de reatividade HGIP pode ocorrer em portador do HTLV-I.

Em seu estudo na Argentina, MANGANO e colaboradores (2004) observaram que os dois pacientes de sua casuística com Wb indeterminado e infectados por HTLV apresentavam reatividade apenas contra antígenos do envelope viral (um paciente com HTLV-I, anti-gD21 reagente; e o outro com HTLV-II, anti-gD21 e anti-p24 reagente), enquanto que de um total de 23 pacientes com padrão de reatividade exclusivamente anti-*gag*, apenas em um foi identificado o gene *tax* do HTLV-I. Todos os demais mostraram-se negativos à *nested* PCR para amplificação de seqüências *pol*, *env* e *tax* do genoma proviral.

Existem na literatura outros estudos avaliando pacientes que apresentaram sorologia indeterminada ao Wb, com reatividade apenas às proteínas do gene *gag*, nos quais não se detectou nenhuma seqüência proviral (LAL *et al.*, 1992 – estudo envolvendo membros das forças armadas norte-americanas) ou apenas a seqüência *tax* (SABINO *et al.*, 1999 – entre candidatos a doador de sangue no Brasil). Alguns desses estudos, entretanto, não foram baseados em *nested* PCR, mas somente em PCR primária (MAHIEUX *et al.*, 2000 – cidadãos de Camarões), o que dificulta a comparação direta dos resultados encontrados. Por outro lado, ROUET e colaboradores (2001), por meio da PCR de única fase para os genes *pol*, *gag* e *tax* em amostras de 18 pacientes com WB indeterminado em Guadalupe, no Caribe, encontraram seqüências provirais *gag* e *tax* em apenas um caso. WAZIRI e colaboradores (2000) apresentam um caso de

uma paciente americana com esclerose múltipla e sorologia para HTLV com EIA positivo e WB indeterminado com sororreatividade exclusivamente para a p19, cuja PCR foi negativa e *nested* PCR foi positiva para as regiões provirais *pol*, *env* e *tax*. De forma semelhante, em nosso estudo, observamos que a detecção das seqüências provirais *tax* e *pol* na amostra obtida do paciente que apresentou diagnóstico de infecção por HTLV-II, só foi obtida após a realização da segunda fase da PCR (nPCR).

Apesar da variação de metodologias empregadas em diversos estudos, podemos observar que taxa de confirmação de infecção pelos vírus HTLV-I e II entre indivíduos com Wb anti-HTLV indeterminado, ou mesmo a identificação de uma seqüência proviral isolada, cujo significado não está ainda bem definido, depende muito da prevalência dessa retrovirose na região em questão, bem como da presença de fatores de risco na amostra populacional estudada, independentemente do padrão de sororreatividade apresentado ao teste *Western blot*.

Em nossa casuística, os três pacientes nos quais se logrou apenas a amplificação do gene *tax* de HTLV-I exibiram os seguintes padrões de reatividade ao WB: anti-p19 e anti-p26; anti-gD21 e anti-p24; e anti-gD21 isolada. Portanto podemos enfatizar que não observamos diferenças significativas no perfil nem no número de bandas apresentados no Wb, entre os subgrupos de pacientes com sorologia indeterminada (com infecção confirmada; com ausência ou presença de apenas um segmento proviral identificado), que pudessem ser tomadas como preditivas do real *status* de infecção.

Com o intuito de aprofundar a investigação acerca das três amostras de células mononucleares periféricas nas quais identificamos a presença de seqüências *tax* de HTLV-I e, em uma amostra, de seqüência *tax* de HTLV-II, porém não de seqüências *pol* do DNA proviral, julgamos importante tentar ainda a amplificação de outras seqüências provirais. Com a gentil colaboração da Dra. Adele Caterino de Araújo do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo foi possível realizar a análise da região *env*. Seguindo protocolo de *nested* PCR rotineiramente executado em seu laboratório (MORIMOTO, 2003), que emprega, para o segmento *env* de HTLV-I, os *primers* externos D498 (nt 5202-5219): d ATG GGT AAG TTT CTG GCC e D500 (nt 6668-6651): d TTA CAG GGA TGA CTG AGG; e os *primers* internos TS1 (nt 5229-5247): TTA TTC TTC CAG TTC TGC C e TS2 (nt 6649-6632): d GTT TAT AAG AGA GTA ATG G; e para o segmento *env* de HTLV-II, os *primers* internos *envA* (nt 5180-5197): d ATG GGT AAT GTT TTC TTC e *envB* (nt 6642-6625):d TATTAT AGC ATG GTT TCT; e os *primers* externos Lui7 (nt 5547-5567): d CCG TCT CCA GTC CAT CCT GGA e Lui8 (nt 6309-6289): d CCT CGT CTA TTT TGG GCT GCA, não foram encontradas seqüências provirais *env* de HTLV nas amostras desses quatro pacientes de nossa casuística, confirmando os resultados negativos anteriormente obtidos com a região *pol* (Quadro 4).

Acreditamos que a presença de único segmento *tax* do HTLV-II em paciente com HTLV-I, tenha o mesmo significado da presença isolada do gene *tax* proviral nas outras três amostras de paciente sem nenhum outro retrovírus identificado.

Qual seria o significado da identificação de um segmento isolado do genoma proviral de HTLV-I ou HTLV-II? Questionamos a possibilidade de inserção de vírus defectivo, como já observado em paralelo a partículas provirais completas (YOSHIDA *et al.*, 1984), a integração de um pequeno número de partículas virais completas que devido à baixa atividade de replicação resultaria em uma baixa carga proviral não detectada pelos métodos empregados ou mesmo a possibilidade da existência de mutações genômicas provirais, comprometendo o pareamento dos *primers* na identificação desses isolados geneticamente divergentes. Assim como outros autores (MANGANO *et al.*, 2004), consideramos que o indivíduo no qual tal evidência é demonstrada continua com *status* indefinido em relação à infecção por HTLV.

Situação semelhante à essa, observada em três dos nossos pacientes com apenas segmento *tax* de HTLV-I, todos assintomáticos, já foi relatada em indivíduos com manifestações clínicas compatíveis com as doenças causadas por esse retrovírus.

RAMIREZ e colaboradores (2003), por exemplo, realizaram a pesquisa por PCR de seqüências *5'LTR*, *tax*, *env/tax*, *pX*, *pol* e *env* de DNA proviral de HTLV-I em 72 crianças com sintomatologia de HAM/TSP; sendo que 32 exibiam sorologia positiva para HTLV-I e em todas elas foram encontrados todos os segmentos gênicos pesquisados; contrariamente, em 40 crianças que apresentavam sorologia negativa, 13 apresentaram PCR positiva exclusivamente para a seqüência *tax*, uma para a *env/tax* e três apenas para essas duas regiões. Esse autor, assim como KIRA e

colaboradores (1994), questionam a potencial patogenicidade de provírus incompletos para o tecido neural, uma vez que se sabe que produtos gênicos codificados pela região *pX* de HTLV são capazes de promover a transativação de vários genes celulares.

Neste estudo, encontramos que 90,8% das amostras de indivíduos com *Western blot* indeterminado para HTLV-I/II não apresentaram amplificação de segmentos provirais à PCR para as regiões *tax* e *pol*, ainda que os *primers tax* sejam os mais sensíveis para detectar seqüências do provírus de HTLV. A causa desse padrão de reatividade sorológica tem sido um enigma há mais de uma década, desde que foi iniciada a triagem em doadores de banco de sangue.

Na literatura, existem várias teorias que tentam justificar a presença de anticorpos que reagem a proteínas nativas, peptídeos recombinantes ou sintéticos derivados desses vírus, em pacientes sem evidência de infecção por meio de pesquisa de DNA proviral pelos métodos atualmente disponíveis. Dentre as possíveis justificativas, podem ser destacadas a infecção por HTLV em período de soroconversão; a infecção por partículas defectivas de HTLV, a infecção por variantes de vírus HTLV que contenham mutações genômicas em regiões de DNA proviral codificadoras de proteínas imunogênicas, além da possibilidade de sororreatividade a produtos codificados por seqüências retrovirais endógenas ou a antígenos de vírus geneticamente relacionados, como o vírus T-linfotrófico símio do tipo 1 (STLV-1) ou de outros agentes infecciosos, como o *Plasmodium falciparum*.

Essas teorias, contudo, não se aplicam para um grande número de pacientes que se encontram nas mais diversas regiões do mundo com características epidemiológicas próprias. Sem dúvida, um aspecto importante a ser considerado diante de um paciente com padrão de Wb indeterminado para HTLV é a possibilidade de que ele se encontre em período de viragem sorológica. Apesar de existirem vários estudos na literatura que não detectaram esse fenômeno no seguimento de seus pacientes (LAL *et al.*, 1992; WITT *et al.*, 2000; MAHIEUX *et al.*, 2001; ROUET *et al.*, 2001), CÉSAIRE e colaboradores (1999) apresentam estudo em que, a partir de um grupo de 49 doadores de sangue da Martinica com padrão de Western blot indeterminado para HTLV, três apresentaram, posteriormente, conversão sorológica para esse retrovírus. Portanto, embora se saiba que a probabilidade de identificação de pacientes em fase de soroconversão seja remota em regiões não endêmicas para infecção por HTLV (LAL *et al.*, 1992), tal condição deve ser considerada em áreas endêmicas, incluindo nosso país. Ressaltamos, portanto a grande importância de seguimento clínico e laboratorial desses pacientes em nosso meio.

Finalmente, pela experiência acumulada durante a realização deste estudo e pelos dados apresentados na literatura (MATSUMOTO *et al.*, 1990; LIU *et al.*, 1999; ROUET *et al.*, 2001, MORIMOTO, 2003; RAMIREZ *et al.*, 2003), sugerimos que os testes de biologia molecular não sejam usados como testes preliminares na triagem de candidatos a doador de sangue. Em regiões endêmicas, essa triagem deveria ser feita com a realização inicial de dois testes de EIA com composições antigênicas diferentes. Nas situações

em que os testes sorológicos pelo método de Western blot resultam indeterminados, demonstramos o valor dos testes moleculares para pesquisa de seqüências do DNA proviral de HTLV em células mononucleares do sangue periférico. A implementação dessas técnicas em laboratórios de referência viria contribuir significativamente para a definição do *status* de infecção retroviral nesses indivíduos, permitindo assim que seja efetuado o correto aconselhamento clínico e epidemiológico nos serviços de saúde.

## **CONCLUSÕES**

## 7. CONCLUSÕES

➤ Adotando como critério de confirmação de infecção pelos vírus HTLV-I e/ou II a detecção pela PCR de seqüências nucleotídicas referentes a duas regiões diferentes do genoma proviral em células mononucleares do sangue periférico, foi possível confirmar que, entre 65 indivíduos com EIA positivo e *Western blot* indeterminado anti-HTLV, 4,6% encontravam-se infectados por esses retrovírus, sendo 3,1% por HTLV-I e 1,5% por HTLV-II. Ressaltamos a grande importância de seguimento clínico e laboratorial desses pacientes em nosso meio.

➤ A amplificação de pelo menos uma das seqüências genômicas *tax* ou *pol* do DNA proviral de HTLV-I/II por meio da nPCR se mostrou positiva em 9,2% das amostras de indivíduos com teste sorológico de *Western blot* indeterminado, sendo que em 4,6% se observou amplificação dos dois genes e em 4,6% apenas do gene *tax*.

➤ Com o emprego da *nested* PCR, detectou-se, em alguns casos, a amplificação de seqüências provirais *tax* e *pol* de HTLV-I/II que se mostrara negativa à PCR primária.

➤ A sensibilidade da nPCR foi 10 vezes maior quando utilizados *primers* para amplificação do gene *tax* do que para a do gene *pol*,

detectando-se a presença de provírus em amostras de DNA extraído de linhagem celular (MT-2) infectada por HTLV-I com até 12 pg e 120 pg de DNA, respectivamente.

➤ A padronização de método de detecção de seqüências provirais *pol* de HTLV amplificadas pela PCR, empregando hibridação com sonda nucleotídica marcada com fosfatase alcalina possibilitou o emprego, em nosso meio, de técnica que prescinde da manipulação de material radioativo. Comparada ao método que utiliza sonda marcada com  $^{32}\text{P}$ , a técnica demonstrou sensibilidade equivalente.

➤ O padrão de sororreatividade anti-HTLV indeterminado ao *Western-blot* mostrou grande variabilidade, com predomínio do padrão de reatividade a antígenos codificados pela região *gag*, na ausência de anticorpos anti-p24. Em um paciente com presença dos anticorpos anti-p19, p26, p28, p32, p36 e p53, padrão conhecido como HGIP (do inglês *HTLV gag indeterminate profile*), foi confirmada infecção pelo HTLV-I. Na casuística estudada não foi identificado padrão de Wb indeterminado que fosse indicativo de presença ou ausência de infecção pelo HTLV.

**ANEXOS**

## 8. ANEXOS

### ANEXO A - PREPARO DAS AMOSTRAS DE SANGUE PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA INFECÇÃO PELO HTLV-I/II

Colher o sangue em tubo com EDTA. Em um tubo tipo *Eppendorf*, colocar 1000 µl de sangue total e 1000 µl de saponina 0,4% em solução salina 0,5%. Agitar em vórtex, centrifugar a 325g por 20 minutos e desprezar o sobrenadante. Repetir o procedimento. Lavar o sedimento com solução salina 0,9% por 3 vezes, por último retirar o sobrenadante de forma a deixar o botão de células com o mínimo de diluente. Proceder a extração do DNA ou conservar este material a -20°C.

**ANEXO B - REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA IDENTIFICAÇÃO DA REGIÃO *tax* DO HTLV-I/II:**

(HENEINE et al,1992)

**a) Soluções de amplificação:**

Reagentes	Volume para uma amostra (µl)	Concentração final
MgCl <sub>2</sub> 50mM	2,5	1,25 mM
Tampão Tris-EDTA 10 x	5,0	1 x
Sol. de dNTP 2,5 mM de cada	2,0	100 µM de cada
<i>Primer</i> (1) 20 pM/µL	1,0	20 pM
<i>Primer</i> (2) 20 pM/µL	1,0	20 pM
Taq DNA pol 5 UI/µL	0,3	1,5 UI
Amostra	2,0*	0,8 a 1,6 µg de DNA
H <sub>2</sub> O q.s.p. 50 µl	q.s.p. 50 µl	

\* Volume da amostra depende da concentração de DNA extraído. Na *nested* PCR, usar 5 µl de produto de amplificação da PCR primária.

Primers da PCR primária:

(1) SK 43 (*tax*, HTLV-I, nt7359-7378) (5' CGG ATA CCC AGT CTA CGT GT 3')

(2) SK 44 (*tax*, HTLV-I, nt7517-7497) (5' GAG CCG ATA ACG CGT CCA TCG 3')

Primers da *nested* PCR:

(1) nt 7375-7394 (5' GTG TTT GGC GAT TGT GTA CA 3')

(2) nt 7502-7486 (5' CCA TCG ATG GGG TCC CA 3')

**b) Ciclos de amplificação:**

No. de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
1	94	5 min
35	94	30 s
	55	30 s
	72	30 s
1	72	7 min
	4	indeterminado

**c) Produto amplificado:** da PCR primária: banda de 159 bp.

da *nested* PCR: banda de 128 bp.

**ANEXO C – RFLP DO PRODUTO DE AMPLIFICAÇÃO DO GENE *tax* SOB  
AÇÃO DA ENZIMA DE RESTRIÇÃO *Taq I* (TUKE et al.,1992)**

**a) Soluções de reação:**

Reagentes	Volume para uma amostra (µl)	Concentração final
Tampão específico OPA (Gibco) 20x	2,0	1 x
Enzima <i>Taq I</i> 15UI/µl	1,0	15 UI
Amostra	5,0	
H <sub>2</sub> O q.s.p. 20 µl	12,0	

**b) Programa no termociclador:**

No. de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
1	65	5 horas
	85	30 min
1	4	indeterminado

**c) Produtos da digestão enzimática:**

- banda de 128 bp: produto não digerido do *nested* PCR.
- banda de 122 bp: banda referente ao HTLV-I.
- banda de 69/53 bp: banda referente ao HTLV-II.

**ANEXO D - REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA IDENTIFICAÇÃO DA REGIÃO *pol* DO HTLV-I/II (HENEINE et al,1992)**

**a) Soluções de amplificação:**

Reagentes	Volume para uma amostra (µl)	Concentração final
MgCl 50mM	2,5	1,25 mM
Tampão Tris-EDTA 10 x	5,0	1 x
Sol. de dNTP 2,5 mM de cada	2,0	100 µM de cada
<i>Primer</i> (1) 20 pM/µL	1,0	20 pM
<i>Primer</i> (2) 20 pM/µL	1,0	20 pM
Taq DNA pol 5 UI/µl	0,3	1,5 UI
Amostra	2,0*	0,8 a 1,6 µg de DNA
H <sub>2</sub> O q.s.p. 50 µl	q.s.p. 50 µl	

\* Volume da amostra depende da concentração de DNA extraído. Na *nested* PCRa usar 5 µl de produto de amplificação da PCR primária.

Primers da PCR primária:

(1) SK 110 (*pol*, HTLV-I, nt 4758-4779) (5' CCC TAC AAT CCA ACC AGC TCA G 3')

(2) SK 111 (*pol*, HTLV-I, nt 4943-4920) (5' GTG GTG AAG CTG CCA TCG GGT TTT 3')

Primers da *nested* PCR:

(1) POL 1.1 (*pol*, HTLV-I, nt 4783-4806) (5' TTG TAG AAC GCT CTA ATG GCA TTC 3') e POL 3.1 (*pol*, HTLV-I, nt 4918-4895) (5' TGG CAG TTG GTT AAC ACA TTC AGG 3') para o vírus HTLV-I.

(2) POL 1.2 (*pol*, HTLV-II, nt 4759-4781) (5' CCT GGT CGA GAG AAC CAA TGG TG 3') e POL 3.2 (*pol*, HTLV-II, nt 4896-4873) (5' CCA CTG GGG TTC ATG ACA TTT AGC 3') para o HTLV-II.

**b) Ciclos de amplificação:**

No. de ciclos	Temperatura (°C)	Tempo
1	94	5 min
35	94	30 s
	62	30 s
	72	30 s
1	72	7 min
	4	indeterminado

**d) Produto amplificado:** da PCR primária: banda de 186 bp.

da *nested* PCR: banda de 136 bp referente ao HTLV-I e 138 bp ao HTLV-II.

**ANEXO E – TRANSFERÊNCIA DOS PRODUTOS DA PCR DO GENE *pol*  
A PARTIR DO GEL DE AGAROSE PARA A MEMBRANA DE  
NÁILON (*Southern blot*)**

Sistema de transferência *Vacu gene XL* (Pharmacia Biotech).

Após eletroforese dos fragmentos de DNA ampliciados em gel de agarose 1,5% em TBE 1x, corado com brometo de etídio e sua visualização sob luz ultravioleta, procedeu-se aos seguintes passos:

- imersão do gel em HCl 0,25 N sob agitação por 15 minutos;
- preparo da membrana de náilon (*Hybond-M*), mergulhando-a em H<sub>2</sub>O e depois deixando-a em solução SSC 20x por 20 minutos;
- montagem da membrana de náilon no sistema de transferência, colocando o gel sobre a mesma e ligando a bomba de vácuo;
- não deixar secar o gel, adicionando solução I (NaCl 1,5 M e NaOH 0,5 M) por 15 minutos. Em seguida, adicionar solução II (Tris-HCl pH7,5 1M e NaCl 1,5 M) durante 15 minutos. Depois, adicionar SSC 20x durante mais 30 minutos;
- recolher a membrana e imergir-la em SSC 20x. Deixar secar à temperatura ambiente e fixar em luz ultravioleta.

## ANEXO F – REAÇÃO DE HIBRIDAÇÃO DO PRODUTO DA PCR DO GENE *pol* COM SONDA RADIOATIVA (<sup>32</sup>P)

### MARCAÇÃO DA SONDA:

Diluir 50 ng da sonda em 45 µl de tampão Tris-EDTA (TE). Ferver em banho-maria por 10 minutos. Transferir para um tubo do kit de marcação *rediprime II random prime labelling system* (Amersham Pharmacia biotech), que contem dATP, dGTP, dTTP, enzima Klenow livre de exonuclease e *primers* de hexanucleotídeos randomizados sob a forma liofilizada. Acrescentar 5 µl de <sup>32</sup>P-dCTP (10 µCi/µl) (Amersham Biosciences) e incubar a 37°C por 30 minutos. Adicionar 5 µl da solução bloqueadora (EDTA 0,2 M). Diluir essa solução (50µl) em 100 µl de TE e passar em coluna de Sephadex G50% hidratada com TE, centrifugando a 2000 rpm por 1 minuto e recolhendo o filtrado (aproximadamente 150 µl). Retirar uma alíquota de 2 µl da sonda marcada para realizar controle de qualidade da marcação, procedendo à leitura em contador de radioatividade beta. São aceitáveis valores superiores a 200.000 cpm.

### HIBRIDAÇÃO DA MEMBRANA DE NÁILON:

Em forno de hibridação, colocar a membrana em 10 ml de solução de hibridação (SSPE 5x, Denhardt's 5x, SDS 1%, ssDNA 200 µg, dextran 5x e formamida 50%) e incubar a 42°C por no mínimo 30 minutos. Acrescentar a sonda marcada, de modo a obter 1 a 2 x 10<sup>6</sup> cpm/ml. Incubar a 42°C *overnight*. Desprezar a solução de hibridação, proceder a duas lavagens da

membrana com solução de SSC 2x e SDS 0,01% a 25°C por 15 minutos cada e depois realizar mais duas lavagens com a mesma solução na temperatura de 60°C. Montar a membrana em saco plástico vedado, montar a mesma em cassete com filme de Rx e deixá-la em incubação a – 70°C *overnight*. Depois proceder à revelação do filme.

## **ANEXO G – REAÇÃO DE HIBRIDAÇÃO DO PRODUTO DA PCR DO GENE *pol* COM SONDA NÃO RADIOATIVA (Fosfatase alcalina)**

MARCAÇÃO DA SONDA (*Gene Images Alk Phos Direct Labelling System - Amersham Pharmacia Biotech*)

Usar 2,5 a 5,0 ng de sonda por cm<sup>2</sup> de membrana a ser hibridada. Diluir em H<sub>2</sub>O na concentração de 10 ng/μl e desnaturar em banho-maria fervente por 5 minutos e logo em seguida, resfriar em banho de gelo por 5 minutos. Centrifugar brevemente. Para cada 10 μl da solução com a sonda, acrescentar 10 μl de *reaction buffer*, 2 μl de *labelling reagent* e 10 μl de *cross-linker* diluído. Agitar fortemente. Incubar a 37°C por 2 horas e manter em gelo até uso, que deve ser em no máximo duas horas.

### **HIBRIDAÇÃO**

Em forno de hibridação, pré-aquecer a 30°C o *hybridization buffer* diluído em volume de 0,25 ml/ cm<sup>2</sup> de membrana a ser hibridada, colocar a membrana e incubar a 30°C por 15 minutos sob agitação, depois acrescentar a sonda marcada e incubar a 30°C *overnight*. Proceder a duas lavagens com 2 ml/ cm<sup>2</sup> de membrana com *primary wash buffer* a 30°C sob agitação por 10 minutos e depois a mais duas lavagens de 5 minutos com *secondary wash buffer* em temperatura ambiente.

REVELAÇÃO (*Chemiluminescent detection with CDP-Star system - Amersham Pharmacia Biotech*)

Retirar a membrana do forno de hibridação, drenar o excesso de *secondary wash buffer* da mesma e colocá-la sobre a bancada de trabalho forrada com plástico. Pipetar *detection reagent* no volume de 30-40  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  de membrana sobre toda a superfície da mesma. Incubar a temperatura ambiente por 2 a 5 minutos. Retirar o excesso de *detection reagent* e colocar a membrana em saco plástico e vedar. Proceder à montagem em cassete com filme "Hyperfilm ECL", incubar a temperatura ambiente por 1 hora. Revelar o filme.

**ANEXO H - REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA IDENTIFICAÇÃO DO GENE PARA  $\beta$ -GLOBINA: (SAIKI**

et al., 1985)

**a) Soluções de amplificação:**

<b>Reagentes</b>	<b>Volume para uma amostra (<math>\mu</math>l)</b>	<b>Concentração final</b>
MgCl 50mM	2,0	2,0 mM
Tampão 10 x (Tris-HCl 20mM e KCl 50mM,pH 8,4)	5,0	1,0 x
Sol. de dNTP 2,5 mM de cada	2,0	100 $\mu$ M de cada
<i>Primer</i> (1) 25 $\mu$ M	1,0	500 nM
<i>Primer</i> (2) 25 $\mu$ M	1,0	500 nM
Taq DNA pol 5 UI/ul	0,3	1,5 UI
Amostra	2,0	0,8 a 1,6 $\mu$ g de DNA
H <sub>2</sub> O q.s.p. 50 $\mu$ l	q.s.p. 50 $\mu$ l	

Primers da primeira corrida:

(1) PC04: 5' CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3'

(2) GH20: 5' GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC 3'

(SAIKI et al,1985).

**b) Ciclos de amplificação:**

<b>No. de ciclos</b>	<b>Temperatura (<math>^{\circ}</math>C)</b>	<b>Tempo (s)</b>
1	94	60
35	94	20
	55	20
	72	30
1	72	420
	4	indeterminado

**c) Produto amplificado:** banda de 268 pb.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and Molecular Immunology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2000.

Araújo AQC, Serra MJA. Tropical Spastic Paraparesis. HTLV-I-Associated Myelopathy in Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 1996;13:S33-7.

Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montaigner L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983;220:868-71.

Bartholomew C, Cleghorn F, Blattner WA. The clinical spectrum of HTLV-I infection in Trinidad and Tobago. In: Blattner WA, editor. *Human Retrovirology: HTLV*. New York: Raven Press; 1990. 237-44.

Barun K, Srinivasan A. Multiple primers pairs for the detection of HTLV-I infection by PCR. *Nucleic Acids Res*. 1989;17:2142.

Brasil. Ministério da Saúde. Guia do manejo clínico do HTLV. *Normas e Manuais Técnicos- Série Manuais*; nº 3-CN-DST e Aids; Brasília (DF). 2003.

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria n. 1376 de 19 de novembro de 1993. Aprova as normas técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília (DF). 1993 2 dez; Seção I:18405.

Brites C, Harrington W Jr, Pedroso C, Badaro R. Infecção pelo HTLV/II em pacientes infectados pelo HIV-1 na Bahia. *Rev Soc Brasil Med Trop.* 1994;27:30 [Abstract]

Carneiro-Proietti ABF, Ribas JGR, Catalan-Soares BC, Martins ML, Brito-Melo GEA, Mertins-Filho AO, Pinheiro SR, Araujo AQC, Galvão-Castro B, Oliveira MSP, Guedes AC, Proietti FA. Infecção e doença pelos vírus linfotrópicos humanos de células T (HTLV-I/II) no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002;35:499-508.

Carvalho SMF, Oliveira MSP, Thuler LCS. Cross-reactivity between human T-cell leukemia/lymphoma vírus indeterminate Western blot and dengue virus in individuals from Rio de Janeiro, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1999;20:4(PO94). [Abstract]

Caterino-de-Araujo A, Santos-Fortuna E, Meleiro MCZ, Suleiman J, Calabró ML, Favero A, de Rossi A, Chieco-Bianchi L. Sensitivity of two enzyme-linked immunosorbent assay testes in relation of Western blot in detecting human

T-cell lymphotropic virus types I and II infection among HIV-1 infected patients from São Paulo, Brazil. *Diag Microbiol Infect Dis*. 1998;30:173-82.

Center for Disease Control. Licensure of screening tests for antibody to human T-lymphotropic virus type I. *JAMA*. 1989;261:513-25.

Césaire R, Bera O, Maier H, Lezin A, Martial J, Ouka M, Kerob-Bauchet B, Ould Amar AK, Vernant JC. Seroindeterminate patterns and seroconversions to human T-lymphotropic virus type I positivity in blood donors from Martinique, French West Indies. *Transfusion*. 1999;39:1145-9.

Clavel F, Gutard D, Brun-Vzinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, Laurent AG, Dauguet C, Katlama C, Rouzioux C, Klatzmann D, Champalimaud JL, Montaigner L. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*. 1986;233:343-6.

Coffin JM. Structure and classification of retroviruses. In: Levy JA, editor. *The Retroviridae*. New York: Plenum Press;1992. 19-50.

Cortes E, Detels R, Aboulaflia D, Li XL, Moudgil T, Alam M, Bonecker C, Gonzaga A, Oyafuso L, Tondo M, Boite C, Hamerschlak N, Capitani C, Slamon DJ, Ho DD. HIV-1, HIV-2 and HTLV-I infection in high-risk groups in Brazil. *N Engl J Med*. 1989;320:953-8.

Daenke S, Parker CE, Niewiesk S, Newsom-Davis J, Nightingale S, Bangham CR. Spastic paraparesis in a patient carrying defective human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) provirus sequences but lacking a humoral or cytotoxic T cell response to HTLV-I. *J Infect Dis.* 1994;169: 941-3.

Dourado I, Andrade T, Carpenter CL, Galvão-Castro B. Risk Factors for Human T-cell Lymphotropic Virus type I among Injecting Drug Users in Northeast Brazil: Possibly Greater Efficiency of Male to Female Transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94:13-8.

Eiraku N, Novoa P, Ferreira MC, Monken C, Ishak R, Ferreira OC, Zhu SW, Lourenço R, Ishak M, Azevedo V, Guerreiro J, Oliveira MP, Loureiro P, Hamerschlak N, Ijichi S, Hall WW. Identification and characterization of a new and distinct molecular subtype of human T-cell lymphotropic virus type II. *J Virol.* 1996;70:1481-92.

Etzel A, Shibata GY, Rozman M, Jorge ML, Damas CD, Segurado AA. HTLV-2 and HTLV-2 infections in HIV-infected individuals from Santos, Brazil: seroprevalence and risk factors. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2001;26:185-90.

Ferreira, OC Jr, Vaz RS, Carvalho MB, Guerra C, Fabron AL, Rosembliit J, Hamerschlak N. Human T-lymphotropic vírus type I and type II infections and

correlation with risk factor in blood donors from São Paulo, Brazil. *Transfusion*. 1995;35:258-63.

Franchini G. Molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I infection. *Blood*. 1995;86:3619–39.

Galvão-Castro B, Loures LGM, Rodrigues AS. Distribution of Human T-cell Lymphotropic Virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. *Transfusion*. 1997;37: 242-3.

Gastaldello R, Gallego S, Isa MB, Maturano E, Sileoni S, Nates S, Medeot S. Immunofluorescence assay reactivity patterns of serum samples presenting indeterminate Western blot results for antibodies to HIV-1 and HTLV-I/II in Cordoba, Argentina. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2001;43:277-82.

Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A, De Thé G. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paralysis. *Lancet*. 1985;2:407-10.

Greene WC, Ballard DW, Bohnlein E, Rimsky LT, Hanly SM, Kim JH, Malim MH, Cullen BR. The trans-regulatory proteins of HTLV-I: analysis of *tax* and *rex*. In: Blattner WA, editor. *Human Retrovirology: HTLV*. New York: Raven Press;1990. 35-43.

Hall WW, Kubo T, Ijichi S, Takahashi H, Zhu SW. Human T-cell leukemia/lymphoma virus type II (HTLV-II): Emergence of an important newly recognized pathogen. *Sem Virol*. 1994;5:165-78.

Hall WW, Liu CR, Schneewind O, Takahashi H, Kaplan MH, Roup G, Vahlne A. Deleted HTLV-I provirus in blood and cutaneous lesions of patients with mycosis fungoides. *Science*. 1991;253:317-20.

Hartley TM, Khabbaz RF, Cannon RO, Kaplan JE, Lairmore MD. Characterization of antibody reactivity to human T-cell lymphotropic virus types I and II using immunoblot and radioimmunoprecipitation assays. *J Clin Microbiol*. 1990;28:646-50.

Heneine W, Khabbaz RF, Lal RB, Kaplan JE. Sensitive and specific polymerase chain reaction assays for diagnosis of human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) and HTLV-II infections in HTLV-I/II – seropositive individuals. *J Clin Microbiol*. 1992;30:1605-7.

Hinuma Y, Komoda H, Chosa T, Kondo T, Kohakura M, Takenaka T, Kikuchi M, Ichimaru M, Yunoki K, Sato I, Matsuo R, Takiuchi Y, Uchino H, Hanaoka M. Antibodies to adult T-cell leukemia virus-associated antigen (ATLA) in sera from patients with ATL and controls in Japan: A nation-wide seroepidemiologic study. *Int J Cancer*. 1982;29:631-5.

Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White T. *PCR-Protocols: a guide to methods and applications*. New York, Academic Press, 1990.

Ishak R, Harrington WR Jr, Azevedo VN, Eiraku N, Ishak MOG, Guerreiro JF, Santos SB, Kubo T, Monken C, Alexander S, Hall WW. Identification of human T-cell lymphotropic virus type IIa infection in the Kaiapo, an indigenous population of Brazil. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1995;11:813-25.

Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Robert-Guroff M, Miyoshi I, Blayney D, Golde D, Gallo RC. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science*. 1982;218:571-3.

Kaplan, M. Human retroviruses: a common virology. *Trans Med Rev*. 1989;3:4-8.

Kira J, Koyanagi Y, Yamada T, Itoyama Y, Tateishi J, Akizuki S, Kishikawa M, Baba E, Nakamura M, Suzuki J, Nakamura N, Yamamoto N, Goto I. Sequence heterogeneity of HTLV-I proviral DNA in the central nervous system of patients with HTLV-I-associated myelopathy. *Ann. Neurol*. 1994;36:149-56.

Kitagawa T, Fujishita M, Taguchi I, Miyoshi I, Tadokoro H. Antibodies to HTLV-I in Japanese immigrants to Brazil. *JAMA*. 1986;256:2342.

Kitamura K, Rudolph DL, Goldsmith C, Folks TM, Lal RB. Isolation, characterization and transmission of human T-lymphotropic virus types I and II in culture. *Curr Microbiol*. 1993;27:355-60.

Kobayashi N, Konishi H, Sabe H, Shigesada K, Noma T, Honjo T, Hatanaka M. Genomic structure of HTLV (human T-cell leukemia virus): detection of defective genome and its amplification in MT-2 cells. *EMBO J*. 1984;3:1339-43.

Koenig RE, Tolentino M, Taveras L, Ferro F, Zornosos C, Ferreiras J, Matos G, Oquist C, Capelan M, Amoros C, Gatón F, Lavandera M, Castro L, Connelly M, Levy JA. Prevalence of HTLV infection in the Dominican Republic: association with neurological disease. *AIDS Res Hum Retrov*. 1992;8:221-6.

Komurian F, Pelloquin F, de The G. In vivo genomic variability of human T-cell leukemia virus type I depends more upon geography than upon pathologies. *J Virol*. 1991;65:3770-8.

Komurian-Pradel F, Pelloquin F, Sonoda S, Osame M, De The G. Geographical subtypes demonstrated by RFLP following PCR in the LTR region of HTLV-I. *AIDS Res Hum Retrov.* 1992;8:429-34.

Kwok S, Ehrlich G, Poiesz BJ, Kalish R, Sninsky JJ. Enzymatic amplification of HTLV-I viral sequences from peripheral blood mononuclear cells and infected tissues. *Blood.* 1988;72:1117-23.

Lal RB, Rudolph DL, Coligan JE, Brodine SK, Roberts C.R. Failure to detect evidence of human T-lymphotropic virus (HTLV) type I and II in blood donors with isolated gag antibodies to HTLV-I/II. *Blood.* 1992;80:544-50.

Lipka JJ, Miyoshi I, Hadlock KG, Reyes GR, Chow TP, Blattner WA, Shaw GM, Hanson CV, Galo D, Chan L, Fong SKH. Segregation of human T cell lymphotropic virus types I and II infections by antibody reactivity to unique viral epitopes. *J Infect Dis.* 1992;165:268-72.

Liu H, Shah M, Stramer SL, Chen W, Weiblen BJ, Murphy EL. Sensitivity and specificity of human T-lymphotropic virus (HTLV) types I and II polymerase chain reaction and several serologic assays in screening a population with a high prevalence of HTLV-II. *Transfusion.* 1999;39:1185-93.

Mahieux R, Horal P, Mauclère P, Mercereau-Puijalon O, Guillotte M, Meertens L, Murphy E, Gessain A. Human T-cell lymphotropic virus type 1

gag indeterminate western blot patterns in Central Africa: relationship to *Plasmodium falciparum* infection. *J Clin Microbiol.* 2000;38:4049-57.

Maloney EM, Biggar RJ, Neel JV, Taylor ME, Hahn BH, Shaw GM, Blattner WA. Endemic human T-cell lymphotropic virus type II infection among isolated Brazilian Amerindians. *J Infect Dis.* 1992;166:100-7.

Mangano AM, Remesar M, Del Pozo A, Sem L. Human T lymphotropic virus types I and II proviral sequences in argentinian blood donors with indeterminate Western blot patterns. *J Med Virol.* 2004;74:323-7.

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual.* New York: Cold Spring Harbor; 1989.

Manns A, Murphy EL, Wilks RJ, Haynes G, Figueroa JP, Hanchard B, Palker TJ, Blattner WA. Early antibody profile during HTLV-I seroconversion. *Lancet.* 1991;337:181-21.

Mauclère P, Le Hesran JY, Mahieux R, Salla R, Mfoupouendoun J, Abada ET, Millan J, De The G, Gessain A. Demographic, ethnic, and geographic differences between human T cell lymphotropic virus (HTLV) type I-seropositive and persons with HTLV-1 gag-indeterminate Western blots in Central Africa. *J Infect Dis.* 1997;176:505-9.

Miyoshi I, Kubonishi I, Yoshimoto S, Akagi T, Ohtsuki Y, Shiraishi Y, Nagata K, Hinuma Y. Type C virus particles in a cord T-cell line derived by co-cultivating normal human cord leukocytes and human leukaemic T cells. *Nature*. 1981;294:770-1.

Morimoto HK. *Infecção pelos vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos I (HTLV-I) e II (HTLV-II) em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) em Londrina e região, Paraná* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo; 2003.

Murphy EL, Glynn SA, Friley J, Sacher RA, Smith JW, Wright DJ, Newman D, Gibble JW, Ameti DI, Nass CC, Schreiber GB, Nemo GJ. Increased prevalence of infectious diseases and other adverse outcomes in HTLV infected blood donors. Retrovirus Epidemiology Donor Study (REDS) Group. *J Infect Dis*. 1997;176:1468-75.

Okayama A, Stuver S, Iga M, Okamoto M, Mueller N, Matsuoka M, Yamaguchi K, Tachibana N, Tsubouchi H. Sequential change of virus markers in seroconverters with community-acquired infection of human T lymphotropic virus type I. *J Infect Dis*. 2001;183:1031-7.

Patino-Sarcinelli F, Hyman J, Camacho LA, Linhares DB, Azevedo JG. Prevalence and risk factors for hepatitis C antibodies in volunteer blood donors in Brazil. *Transfusion*. 1994;34:138-41.

Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Mina JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980;77:7415-9.

Porter KR, Liang L, Long GW, Bangs MJ, Anthony R, Andersen EM, Hayes CG. Evidence for anti-*Plasmodium falciparum* antibodies that cross-react with human T-lymphotropic virus type I proteins in a population in Irian Jaya, Indonesia. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1994;1:11-5.

Ramirez E, Fernandez J, Cartier L, Villota C, Rios M. Defective Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) provirus in seronegative tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM) patients. *Virus Res*. 2003;91:231-239.

Reiche EM, Inouye MM, Pontello R, Morimoto HK, Itow Jankevicius S, Matsuo T, Jankevicius JV. Seropositivity for anti-trypanosoma cruzi antibodies among blood donors of the "Hospital Universitario Regional do Norte do Parana", Londrina, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1996;38:233-40.

Rosini N, Mousse D, Spada C, Treitinger A. Seroprevalence of HbsAg, Anti-HBc and anti-HCV in Southern Brazil, 1999-2001. *Braz J Infect Dis.* 2003;7:262-7.

Rouet F, Meertens L, Courouble G, Herrmann-Storck C, Pabingui R, Chancerel B, Abid A, Strobel M, Mauclere P, Gessain A. Serological, epidemiological, and molecular differences between human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-seropositive healthy carriers and persons with HTLV-I gag indeterminate Western blot patterns from the caribbean. *J Clin Microbiol.* 2001;39:1247-53.

Sabino EC, Zrein M, Taborda CP, Otani MM, Ribeiro-dos-Santos G, Sáez-Alquézar A. Evaluation of the INNO-LIA HTLV-I/II Assay for Confirmation of Human T-Cell Leukemia Virus-Reactive Sera in Blood Bank Donations. *J Clin Microbiol.* 1999;37:1324-8.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985;230:1350-54.

Santos TJT, Costa CMC, Goubau P, Vandamme AM, Desmyter J, Dooren SV, Mota RMS, Costa FBC, Oliveira ACS, Gomes VBAF, Carneiro-Proietti AB, Bruin VMS, Sousa FCF, Oriá RB. Western blot sorodeterminate

individuals for human T-lymphotropic virus1/2 (HTLV-1/2) in Fortaleza (Brazil): a serological and molecular diagnostic and epidemiological approach. *Braz J Infect Dis.* 2003;7:202-9.

Sato A, Isaka Y, Morita F, Ishii A, Goto Y, Imai J, Igarashi H, Yoshie O, Hinuma Y. Human sera from varicell-zoster-virus (VZV) infections cross-react with human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-I): common epitopes in VZV gene 22 protein and HTLV-1 p19 gag protein. *J Gen Virol.* 1992;73:2969-73.

Schupbach J. Human Retrovirology. Facts and concepts. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1989;142:1-27.

Segurado AAC, Malaque CMS, Sumita LM, Pannuti CS, Lal RB. Laboratory characterization of Human T-cell Lymphotropic Virus type 1 (HTLV-1) and 2 (HTLV-2) infections in blood donors from São Paulo, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1997;57:142-8.

Segurado AAC. Infecção pelos vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos I (HTLV-I) e II (HTLV-II) em candidatos a doador de sangue em São Paulo: estudo sorológico, caracterização molecular e isolamento viral [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 1994.

Seiki M, Hattori S, Hirayama Y, Yoshida M. Human adult T-cell leukemia virus: Complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983;80: 3618-22.

Sobreira AC, Gomes FV, Silva MA, Oliveira MF. Chagasic infection prevalence in blood donors at the Regional Blood Donation Center of Iguatu. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2001;34:193-6.

Sodroski J, Patarca R, Perkins D, Briggs D, Lee TH, Essex M, Coligan J, Wong-Staal F, Gallo RC, Haseltine WA. Sequence of the envelope glycoprotein gene of type II human T lymphotropic virus. *Science*; 225: 421-4, 1984.

Soldan SS, Graf MD, Waziri A, Flerlage AN, Robinson SM, Kawanishi T, Leist TP, Lehky TJ, Levin MC, Jacobson S. HTLV-I/II seroindeterminate Western blot reactivity in a cohort of patients with neurological disease. *J Infect Dis*. 1999;180:685-94.

Switzer WM, Pieniazek D, Swanson P, Samdal HH, Soriano V, Khabbaz RF, Kaplan JE, Lal RB, Heneine W. Phylogenetic relationship and geographic distribution of multiple human T-cell lymphotropic virus type II subtypes. *J Virol*. 1995;69:621-32.

Treitinger A, Spada C, Ferreira LA, Neto MS, Reis M, Verdi JC, de Miranda AF, de Oliveira OV, Van der Sander Silveira M, Abdalla DS. Hepatitis B and hepatitis C prevalence among blood donors and HIV-1 infected patients in Florianopolis--Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2000;4:192-6.

Trujillo G, Pearlman S, Hofheinz D Development of a monoclonal antibody-based p24 capsid antigen detection assay for HTLV-I and STLV-I infection. *AIDS Res Hum Retrov.* 1992;8:527-32.

Tuke PW, Luton P, Garson JA. Differential diagnosis of HTLV-I and HTLV-II infections by restriction enzyme analysis of "nested" PCR products. *J Virol Met.* 1992;40:163-74.

Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, Takatsuki K, Uchino H. Adult T-cell leukemia: Clinical and hematological features of 16 cases. *Blood.* 1977;50:481-92.

Vandamme AM, Van Laethem K, Liu HF, Van Brussel M, Delaporte E, De Castro-Costa CM, Fleischer C, Taylor G, Bertazzoni U, Desmyter J, Goubau P. Use of a generic polymerase chain reaction assay detecting human T-lymphotropic virus (HTLV) types I, II and divergent simian strains in the evaluation of individuals with indeterminate HTLV serology. *J Med Virol.* 1997;52:1-7.

Varma M, Rudolph DL, Knuchel M, Switzer WM, Hadlock KG, Velligan M, Chan L, Foundg SKH, Lal RB. Enhanced specificity of truncated transmembrane protein for serologic confirmation of human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-1) and HTLV-2 infections by Western blot (Immunoblot) assay containing recombinant envelope glycoproteins. *J Clin Microbiol.* 1995;33:3239-44.

Wattel E, Mariotti M, Agis F, Gordien E, Prou O, Courouce AM, Rouger P, Wain-Hobson S, Chen IS, Lefrere JJ. Human T lymphotropic virus (HTLV) type I and II DNA amplification in HTLV-I/II-seropositive blood donors of the French West Indies. *J Infect Dis.* 1992;165:369-72.

Waziri A, Soldan SS, Graf MD, Nagle J, Jacobson S. Characterization and sequencing of prototypic human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) from an HTLV-1/2 seroindeterminate patient. *J Virol.* 2000;74:2178-85.

Witt JD, Kuramoto K, Kemper M, Holland P. Utility of prospective study of donors deferred as HTLV indeterminate. *Vox sang.* 2000;78:130-1.

Yoshida M, Miyoshi I, Hinuma Y, Isolation and characterization of retroviruses from cell lines of human adult T cell leukemia and its implication in the disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982;79:2031-5.

Zaaijer HL, Cuypers HTM, Dudok de Wit C, Lelie PN. Results of 1-year screening of donors in the Netherlands for human T-lymphotropic virus (HTLV) type I: significance of Western blot pattern for confirmation of HTLV infection. *Transfusion*. 1994;34:877-80.

Zaninovic V. HTLV, truths and questions. Cali, Fundacion MAR *apud* Monteiro-de-Castro MS, Assunção RM, Proietti FA. Spatial distribution of the human T-lymphotropic virus types I and II (HTLV-I/II) infection among blood donors of Hemominas Foundation, Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil, 1994-1996. *Cad Saúde Pública*. 2001;17:1219-30.

## APÊNDICE



### HOSPITAL DAS CLÍNICAS

D A

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CAIXA POSTAL, 3671

SÃO PAULO – BRASIL

#### DIRETORIA CLÍNICA

### Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

### **APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 27.06.02, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **239/02**, intitulado: "**Padronização e emprego de métodos de amplificação molecular para pesquisa de seqüências genômicas dos vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos I e II (HTLV-I/II) em indivíduos com sorologia indeterminada**", do Departamento de DOENÇAS INFECCIOSAS E PARASITÁRIAS, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Pesquisador(a) Responsável: **PROF. DR. ALUÍSIO AUGUSTO COTRIM SEGURADO**

Pesquisador(a) Executante: **DR. JOSÉ MARCOS PEREIRA COSTA**

CAPPesq, 27 de Junho de 2002.

**PROF. DR. JORGE KALIL FILHO**

Presidente da Comissão de Ética para Análise  
de Projetos de Pesquisa

**OBSERVAÇÃO:** Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c").

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.  
This page will not be added after purchasing Win2PDF.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)