

**Ministério da Saúde**  
**Fundação Oswaldo Cruz**  
**Instituto René Rachou**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2):**

Desenvolvimento de novo método sorológico para o diagnóstico diferencial da infecção humana pelo HTLV-1/2 empregando plataforma única para pesquisa de anticorpos IgG1 por citometria de fluxo

por

**Luciene Pimenta de Paiva**

**Belo Horizonte**

**2020**

**DISSERTAÇÃO**

**MCS – IRR**

**L. P. PAIVA**

**2020**

**Luciene Pimenta de Paiva**

**FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2):**

Desenvolvimento de novo método sorológico para o diagnóstico diferencial da infecção humana pelo HTLV-1/2 empregando plataforma única para pesquisa de anticorpos IgG1 por citometria de fluxo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde - área de concentração: Doenças Infecto-parasitárias e crônicas não transmissíveis/ DIP-DCNT.

**Orientação:** Dr. Olindo Assis Martins Filho

**Coorientação:** Dr.<sup>a</sup>. Jordana G. A. Coelho dos Reis

**Belo Horizonte**

**2020**

Catálogo-na-fonte  
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ  
Biblioteca do IRR  
CRB/6 1975

P166d Paiva, Luciene Pimenta de Paiva.  
2020

Desenvolvimento de novo método sorológico para o diagnóstico diferencial da infecção humana pelo HTLV-1/2 empregando plataforma única para pesquisa de anticorpos IgG1 por citometria de fluxo / Luciene Pimenta de Paiva. – Belo Horizonte, 2020.

XIII; 111 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 88-104

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecto-parasitárias e crônicas não transmissíveis/ DIP- DCNT.

1. HTLV-1/2 2. Diagnóstico diferencial 3. Citometria de Fluxo/métodos. Título. II. Martins-Filho, Olindo Assis (Orientação). III. Coelho-dos-Reis, Jordana Graziela Alves (Coorientação).

CDD – 22. ed. – 572.8

**Luciene Pimenta de Paiva**

**FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2):**

Desenvolvimento de novo método sorológico para o diagnóstico diferencial da infecção humana pelo HTLV-1/2 empregando plataforma única para pesquisa de anticorpos IgG1 por citometria de fluxo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde - área de concentração: Doenças Infecto-parasitárias e crônicas não transmissíveis/ DIP-DCNT.

**Banca Examinadora:**

Prof. Dr. Olindo Assis Martins Filho (IRR-Fiocruz/MG)

Prof. Dra. Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis (UFMG)

Prof. Dra. Gabriela de Melo Franco (UFMG)

Prof. Dr. Marcelo Antônio Pascoal Xavier (IRR-Fiocruz/MG)

**Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, em 01/07/2020.**

*Ao meu avô, Lúcio José, que me ensinou, ainda na infância, o significado dos conceitos de ética, caráter e trabalho.*

## *Agradecimentos*

*Nessa vida não conseguimos chegar a lugar algum sozinhos. Na minha trajetória tive o privilégio de ter pessoas ímpares para me acompanhar e amparar. Minha família, especialmente meus pais, Luiz e Mirtes, são a base de tudo, a razão pela qual me levanto todos os dias e me esforço para ser, acima de tudo, um ser humano melhor! Meu noivo Luiz, amigo e companheiro nessa vida, que sempre, e incondicionalmente, apoia meus objetivos e sonhos e me levanta a cada queda, me incentivando a continuar. Minha irmã, Lucimara, que guarda as minhas melhores lembranças, e é pra ela que me volto quando preciso relembrar quem eu sou, e minhas irmãs de coração, Christiane e Maylla, que tornam os dias mais leves; meus padrinhos, Selma, Margareth e Fábio, e meus sogros, Luiz e Norma, que por diversas vezes são o conselho e ombro amigo nas horas mais necessárias.*

*Também existe a família que a caminhada nos traz. Minhas amigas de vida, Aniele, Luciana, Tamy, Gabrielle e Kênia, que sempre encontram uma forma de se mostrar presentes; minha amiga e terapeuta, Priscilla, que me deu direcionamento em cada etapa; os colegas do Lactário do Hospital Metropolitano Odilon Behrens, que foram de grande apoio durante esse período; a secretária Jucélia Amorim e os alunos e pesquisadores do Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores – GIPB, que estiveram comigo durante esta trajetória, especialmente aqueles que fizeram parte, diretamente, da construção deste trabalho, como Vanessa Peruhype, Kelly Bicalho e Júlia Martins, trabalhando ativamente no projeto e compondo o grupo HTLV.*

*E tudo isso jamais teria sido possível sem os ensinamentos dos mestres responsáveis pela minha formação acadêmica, desde os da graduação na Faminas-BH até os do mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Fiocruz-MG, assim como o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) e dos profissionais envolvidos nas plataformas e setores do Instituto René Rachou, como a Plataforma de Citometria de Fluxo, Núcleo de Inovação Tecnológica – NIT, Comitê de Ética em Pesquisa e Secretaria de Pós-Graduação.*

*Diante de todas essas pessoas, fundamentais em cada passo, penso que somente agradecer é pouco, pois apesar da enorme gratidão que sinto por cada uma delas, sei que todas merecem muito, talvez mais até do que eu possa oferecer. Por isso a cada uma delas*

*reafirmo o compromisso de seguir a caminhada, com dedicação, ética e muito respeito! E é com esse grande respeito que agradeço imensamente à Dr<sup>a</sup>. Andrea Teixeira, pela minha recepção na Fiocruz-MG desde os primeiros momentos; agradeço ao meu orientador, Dr. Olindo Assis, por compartilhar parte do seu vasto conhecimento e por abrir as portas do laboratório GIPB e permitir que eu pudesse aprender e me dedicar ao projeto HTLV, toda sua dedicação e compromisso com a Pesquisa e a Ciência são inspirações para que eu me aperfeiçoe a cada dia mais como profissional. E de forma singular, agradeço a Dr<sup>a</sup>. Jordana Reis, que mais que coorientadora, professora e mestre, como amiga particular me mostrou um caminho novo e abriu portas que eu nem sabia que existiam. Talvez nunca seja possível a íntegra compreensão de tudo o que significou ter contado com você durante todo esse processo, apenas tenha a certeza que sua contribuição em minha vida foi e é muito além do conhecimento científico!*

*E acima de todas as coisas agradeço a Deus, a grande força universal que permite que todos estes encontros aconteçam, para que nunca esqueçamos que o real motivo de todo o trabalho executado sobre a Terra é, primordialmente, nos tornarmos seres humanos dignos da dádiva da Vida!*



*“Conheça todas as teorias,  
domine todas as técnicas,  
mas ao tocar uma alma  
humana, seja apenas outra  
alma humana.”*

*Carl Jung*



## ***Resumo***

O HTLV (*Human T-lymphotropic virus*) é o primeiro retrovírus descoberto associado a doenças em humanos. Existem mais de 10 milhões de pessoas infectadas em todo o mundo, sendo o Brasil, globalmente, o país com o maior número absoluto de casos da infecção. Aproximadamente 95 a 98% dos indivíduos infectados pelo HTLV permanecem assintomáticos, no entanto, 2 a 5% dos infectados podem desenvolver manifestações clínicas graves. Enquanto a infecção pelo HTLV-1 pode se manifestar com doenças de alta gravidade, como a Mielopatia Associada ao HTLV ou Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP), o HTLV-2 é associado predominantemente com quadros benignos e doença assintomática. Apesar da importância clínica de se distinguir a infecção pelo HTLV-1 e HTLV-2, existe uma atual escassez de métodos de tipagem capazes de distinguir anticorpos gerados para estes dois tipos virais. Desta forma, este trabalho teve como foco o desenvolvimento de um novo método sorológico, denominado FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2), baseado em um protocolo de marcação fluorescente diferencial, utilizando Alexa Flúor-647, de linhagens celulares infectadas pelo HTLV-1 (MT-2) e HTLV-2 (MoT) para análise seletiva simultânea empregando plataforma única por citometria de fluxo. Por meio do FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2) foi possível avaliar a reatividade de anticorpos IgG1 anti-HTLV-1/2 em amostras de soro de indivíduos infectados pelo HTLV-1/2 e doadores saudáveis com alta sensibilidade e especificidade no diagnóstico universal e diferencial da infecção. A metodologia desenvolvida apresentou alta estabilidade da marcação fluorescente diferencial e da antigenicidade das linhagens celulares MT-2 e MoT em diferentes condições (TA, 4°C e -20°C) e tempos (2, 6 e 12 meses) de armazenamento. Utilizando um algoritmo de decisão assíncrono, foi possível realizar o diagnóstico diferencial da infecção pelo HTLV-1/2 empregando a metodologia FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2). Por fim, a avaliação do desempenho de FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2) indicou potencial para o prognóstico da infecção pelo HTLV-1. A metodologia permitiu o depósito de patente, o que define o potencial inovador de FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2) no diagnóstico universal e diferencial da infecção pelo HTLV-1/2. De nosso conhecimento, esta é a primeira estratégia sorológica, além do *Western Blot*, capaz de segregar indivíduos infectados pelo HTLV-1 e HTLV-2, empregando plataforma única para pesquisa de anticorpos IgG1 por citometria de fluxo.

**Palavras chaves:** HTLV-1/2, Diagnóstico diferencial, Citometria de Fluxo

## ***Abstract***

HTLV (Human T-lymphotropic virus) is the first retrovirus discovered associated with disease in humans. There are more than 10 million people infected worldwide, with Brazil being the country with the highest absolute number of cases of infection globally. Approximately 95 to 98% of individuals infected with HTLV remain asymptomatic, however, 2 to 5% of those infected may develop severe clinical manifestations. While HTLV-1 infection can manifest itself with highly serious diseases, such as HTLV-associated myelopathy or tropical spastic paraparesis (HAM/TSP), HTLV-2 is predominantly associated with benign conditions and asymptomatic clinical course. Despite the clinical importance of distinguishing HTLV-1 and HTLV-2 infection, there is a current shortage of typing methods capable of distinguishing antibodies generated for these two viral types. Thus, this work focused on the development of a new serological method, called FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2), based on a differential fluorescent labeling protocol, using Alexa Fluor 647, of cell lines infected by HTLV-1 (MT-2) and HTLV-2 (MoT) for simultaneous selective analysis using a single flow cytometry platform. Through FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2), it was possible to evaluate the reactivity of IgG1 anti-HTLV-1/2 antibodies in serum samples from individuals infected with HTLV-1/2 and healthy donors with high sensitivity and specificity in the universal and differential diagnosis of the infection. The developed methodology showed high stability of the differential fluorescent labeling and antigenicity of the MT-2 and MoT cell lines under different conditions (TA, 4°C and -20°C) and storage times (2, 6 and 12 months). Using an asynchronous decision algorithm, it was possible to perform the differential diagnosis of HTLV-1/2 infection using the FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2) methodology. Finally, the performance evaluation of FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2) indicated potential for the prognosis of HTLV-1 infection. The methodology allowed the patente request deposit, which defines the innovative potential of FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2) in the universal and differential diagnosis of HTLV-1/2 infection. To our knowledge, this is the first serological strategy, in addition to western blotting, capable of segregating individuals infected by HTLV-1 and HTLV-2, using a single platform for IgG1 antibody testing by flow cytometry.

**Keywords:** HTLV-1/2, Differential diagnosis, Flow Cytometry

## ***Lista de Figuras***

<b>Figura 1.</b> Representação da classificação dos HTLVs.....	<b>18</b>
<b>Figura 2.</b> Representação das formas de transmissão do HTLV.....	<b>19</b>
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática da estrutura do HTLV.....	<b>21</b>
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática do genoma do HTLV-1.....	<b>22</b>
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática do ciclo de replicação do HTLV-1.....	<b>23</b>
<b>Figura 6.</b> Representação esquemática da transmissão viral.....	<b>25</b>
<b>Figura 7.</b> Representação esquemática da transmissão viral.....	<b>25</b>
<b>Figura 8.</b> Distribuição do HTLV-1 no mundo.....	<b>26</b>
<b>Figura 9.</b> Distribuição geográfica do HTLV-1/2 no mundo.....	<b>27</b>
<b>Figura 10.</b> Soroprevalência representativa de HTLV-1/2 no Brasil, por estado.....	<b>29</b>
<b>Figura 11.</b> População alvo na infecção primária pelo HTLV-1 e consequência para a patogênese.....	<b>34</b>
<b>Figura 12.</b> Representação esquemática da desmielinização causada pelo HTLV-1 na HAM/TSP.....	<b>36</b>
<b>Figura 13.</b> "Flower cell" - células leucêmicas observadas ao microscópio.....	<b>38</b>
<b>Figura 14.</b> Representação da inflamação pulmonar induzida pelas células infectadas pelo HTLV-1.....	<b>41</b>
<b>Figura 15.</b> Algoritmo para o diagnóstico laboratorial de infecção pelo HTLV preconizado pelo Ministério da Saúde.....	<b>44</b>
<b>Figura 16.</b> Padrões de interpretação do <i>Western Blot</i> .....	<b>47</b>
<b>Figura 17.</b> Representação esquemática do protocolo laboratorial para execução da metodologia FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2) – protocolos FIX e FIX&Perm.....	<b>57</b>
<b>Figura 18.</b> Cultura das linhagens celulares MT-2 e MoT.....	<b>61</b>

<b>Figura 19.</b> Linhagens celulares MT-2 e MoT, lidas no citômetro de fluxo.....	62
<b>Figura 20.</b> Estratégias de seleção de MoT e MT-2.....	64
<b>Figura 21.</b> Reatividade de IgG1 anti-MT-2/MoT.....	66
<b>Figura 22.</b> Estabilidade da marcação fluorescente.....	67
<b>Figura 23.</b> Reconhecimento da estabilidade antigênica.....	68
<b>Figura 24.</b> Aplicabilidade do FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2) no diagnóstico universal da infecção pelo HTLV-1/2.....	70
<b>Figura 25.</b> Aplicabilidade do FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2) no diagnóstico diferencial da infecção pelo HTLV-1 e HTLV-2.....	72
<b>Figura 26.</b> Otimização do FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2) no diagnóstico diferencial da infecção pelo HTLV-1 e HTLV-2.....	74
<b>Figura 27.</b> Performance do FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2) no diagnóstico diferencial da infecção pelo HTLV-1 e HTLV-2.....	75
<b>Figura 28.</b> Aplicabilidade do FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2) no prognóstico da infecção pelo HTLV-1/2.....	76

## ***Lista de Abreviaturas e Siglas***

**ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**ATLL** - Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma

**AUC** - Area Under the Curve

**CHC-UFPR** - Complexo do Hospital de Clínicas

**CONITEC** - Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias

**EIA** - Enzyme Immunoassay

**ELISA** - Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

**FSC** - Forward Scatter

**GIPH** - Grupo Intedisciplinar de Pesquisas em HTLV

**HAM/TSP** - HTLV- 1-Associated Myelopathy/ Tropical Spastic Paraparesis

**HTLV** - Human T Cell Lymphotropic

**ICTV** - International Committee on Taxonomy of Viruses

**IL** – Interleucina

**LACEN** – Laboratórios Centrais de Saúde Pública

**LTR** - Long Terminal Repeats

**NIH** - National Institute of Health

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**ORF** - Open Reading Frame

**PBMC** - Peripheral Blood Mononuclear Cell

**PCFP** – Percentual de Células Fluorescentes Positivas

**PCR** - Polymerase Chain Reaction

**PEPG-MS** - Programa Estadual de Proteção à Gestante de Mato Grosso do Sul

**PSF** - Programa Saúde da Família

**PTLV** – Primate T-Lymphotropic Virus

**RDC** - Resolução da Diretoria Colegiada

**ROC** - Receiver Operating Characteristic

**WB** – Western Blot

**SAPE** - Streptavidin-Phycoerythrin

**SSC** - Side Scatter

**TCLE** - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**TG-ROC** - Two-Graph-ROC

**UDI** - Usuário de Drogas Injetáveis

**VPN** - Valor Preditivo Negativo

**VPP** - Valor Preditivo Positivo

## **Sumário**

<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>1.1 O HTLV</b> .....	<b>15</b>
<b>1.1.1 TRANSMISSÃO</b> .....	18
<b>1.1.2 ESTRUTURA DA PARTÍCULA VIRAL</b> .....	20
<b>1.1.3 BIOSÍNTESE E MULTIPLICAÇÃO VIRAL</b> .....	22
<b>1.1.4 EPIDEMIOLOGIA</b> .....	26
<b>1.1.5 RESPOSTA IMUNE E PATOGÊNESE</b> .....	33
<b>1.1.6 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS</b> .....	36
<b>1.1.7 DIAGNÓSTICO DO HTLV</b> .....	43
<b>2- JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>50</b>
<b>3- OBJETIVOS</b> .....	<b>52</b>
<b>3.1 OBJETIVO GERAL</b> .....	52
<b>3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	52
<b>4- MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>53</b>
<b>4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO</b> .....	53
<b>4.2 PROTOCOLO OPERACIONAL DA METODOLOGIA FC-DUPLEX IGG1 (HTLV-1/2)</b> .....	54
4.2.1 Suportes Antigênicos - Linhagens celulares de cultivo contínuo .....	54
4.2.2 Cultivo in vitro das linhagens celulares MT-2 e MoT .....	54
4.2.3 Protocolo de Fixação e Fixação/Permeabilização .....	55
4.2.4 Protocolo de marcação fluorescente diferencial de linhagens celulares MT-2 e MoT .....	55
4.2.5 Protocolo padrão para avaliação da reatividade de anticorpos IgG1 anti-HTLV-1/2 empregando a metodologia FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2) .....	56
4.2.6 Leitura das amostras no Citômetro de Fluxo .....	58
4.2.7 Análise da reatividade de anticorpos IgG1 anti-HTLV-1/2.....	58
<b>4.3 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DA MARCAÇÃO FLUORESCENTE DIFERENCIAL E DA ANTIGENICIDADE DAS LINHAGENS CELULARES MT-2 E MOT EM DIFERENTES CONDIÇÕES E TEMPOS DE ARMAZENAMENTO</b> .....	59
<b>4.4 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA METODOLOGIA FC-DUPLEX IGG1 (HTLV-1/2) PARA OS DIAGNÓSTICOS UNIVERSAL E DIFERENCIAL DA INFECÇÃO HUMANA PELO HTLV-1/2</b> .....	59
<b>5- RESULTADOS</b> .....	<b>61</b>

<i>5.1 ANÁLISE DE MARCAÇÃO FLUORESCENTE DIFERENCIAL DE LINHAGENS CELULARES INFECTADAS PELO HTLV-1 (MT-2) E HTLV-2 (MOT) POR CITOMETRIA DE FLUXO</i> .....	61
<i>5.2 AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE DE ANTICORPOS IGG1 ANTI-HTLV-1/2 EM AMOSTRAS DE SORO DE INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO HTLV-1/2 POR FC-DUPLEX IGG1 (HTLV-1/2)</i> .....	63
<i>5.3 DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE E ANTIGENICIDADE DA METODOLOGIA FC-DUPLEX IGG1 (HTLV-1/2)</i> .....	66
<i>5.4 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA METODOLOGIA FC-DUPLEX IGG1 (HTLV-1/2) PARA O DIAGNÓSTICO UNIVERSAL DA INFECÇÃO HUMANA PELO HTLV-1/2</i> .....	68
<i>5.5 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE FC-DUPLEX IGG1 (HTLV-1/2) NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DA INFECÇÃO HUMANA PELO HTLV-1 E HTLV-2</i> .....	70
<i>5.6 APLICABILIDADE DA METODOLOGIA FC-DUPLEX IGG1 (HTLV-1/2) PARA O PROGNÓSTICO DA INFECÇÃO HUMANA PELO HTLV-1</i> .....	75
<b>6- DISCUSSÃO</b> .....	<b>77</b>
<b>7- CONCLUSÃO</b> .....	<b>87</b>
<b>8- REFERÊNCIAS</b> .....	<b>88</b>
<b>9- APÊNDICES</b> .....	<b>105</b>
<b>APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)</b> .....	105
<b>APÊNDICE 2 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO INSTITUTO RENÉ RACHOU-IRR – FIOCRUZ/MG</b> .....	109



## ***1- Introdução***

O vírus linfotrópico de célula T humana – HTLV é um retrovírus que possui diferentes sorotipos, sendo que os tipos 1 e 2 são estruturalmente semelhantes, mas estão associados a quadros clínicos diferentes, fazendo-se necessário o diagnóstico diferencial da infecção viral. Para tanto, são utilizadas técnicas laboratoriais baseadas em sorologia - *Western Blot* (WB), e em biologia molecular - Reação em Cadeia de Polimerase – PCR. Atualmente as técnicas diagnósticas de tipagem viral, capazes de diferenciar os subtipos virais, apresentam diversos problemas como custos elevados e resultados indeterminados, não atendendo às necessidades dos hemocentros e dos laboratórios clínicos.

O presente trabalho traz uma abordagem relevante que permite realizar o diagnóstico da infecção de forma menos onerosa, com alta sensibilidade e especificidade, sendo possível ser realizado em uma única etapa, não necessitando de algoritmos de execução. A técnica utilizada na metodologia proposta é a Citometria de Fluxo, que tem sido considerada uma alternativa no diagnóstico de doenças por meio da detecção de imunoglobulinas específicas para diferentes agentes infecciosos.

Neste contexto, o ponto central deste trabalho consiste na avaliação da reatividade de anticorpos IgG1 anti-HTLV-1 e HTLV-2, por meio de ensaio por citometria de fluxo, com o objetivo de se conseguir diferenciar a infecção humana pelos subtipos virais HTLV-1 e HTLV-2, para que se possa preencher a grande lacuna existente no diagnóstico e acompanhamento de indivíduos infectados pelo HTLV.

### ***1.1 O HTLV***

O vírus linfotrópico da célula T humana – HTLV (*Human T cell lymphotropic* - HTLV) é um retrovírus que possui três sorotipos distintos, denominados HTLV-1, HTLV-2 e HTLV-3, e é classificado pelo ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) como pertencente ao Reino *Riboviria*, ordem *Ortervirales*, família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae*, gênero *Deltaretrovirus*, espécie *Primate T-lymphotropic vírus 1, 2 e 3* (ICTV, 2011). Embora possua tropismo preferencial para linfócitos TCD4<sup>+</sup>, já foi relatado que também pode infectar

outros tipos celulares em outras populações linfocitárias como TCD8<sup>+</sup> (MELAMED et al., 2015) ou em células da linhagem monocítica/macrofágica (AMARANTE et al., 2015; ZEHENDER et al., 1998).

A importância clínica do HTLV está relacionada à sua capacidade de levar ao desenvolvimento de doenças de natureza neoplásica ou inflamatória-degenerativa (COELHO-DOS-REIS et al., 2015), além de outras comorbidades secundárias e/ou infecções oportunistas (MARTINS et al., 2015).

Durante o início da década de 70 começou-se a pensar em uma possível relação do câncer com os retrovírus humanos (BEILKE, 2012), e a partir disso, em 1980 um vírus foi isolado de um paciente com Linfoma Cutâneo de Células T (POIESZ et al., 1980; GALLO, 2005) e isso levou à confirmação de que o HTLV era realmente o agente causador da Leucemia / Linfoma de células T do adulto (ATLL) (MIYOSHI, 1981).

Em 1984, Yoshida e cols. realizaram uma co-cultura de células ATLL com linfócitos do cordão umbilical que deu origem à linhagem celular produtora de HTLV-1, conhecida como MT-2 (YOSHIDA et al., 1984).

O HTLV também está relacionado ao desenvolvimento de uma condição clínica denominada Mielopatia Associada ao HTLV/Paraparesia Espástica Tropical - HAM/TSP, que foi descrita inicialmente em 1985, na Martinica, Jamaica e Colômbia, após a constatação da presença de anticorpos anti-HTLV-1 no soro de mais de 60% dos pacientes com Paraparesia Espástica Tropical – TSP (GESSAIN et al., 1985). Em 1986 foi descrita no Japão com a denominação de Mielopatia Associada ao HTLV-1 – HAM (OSAME et al., 1986). Somente em 1988, por concluírem que se tratava de uma mesma doença, foi reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e denominada HAM/TSP (BEILKE, 2012).

Também foi constatada a relação entre a infecção pelo vírus HTLV-1 com outras doenças como dermatite infecciosa, estrogiloidíase, escabiose, micoses, polimiosite, tireoidite, alveolite, uveíte, artrite reumatóide, síndrome de Sjögren, linfadenite, dentre outras (MARTINS et al., 2015; UCHIYAMA, 1997).

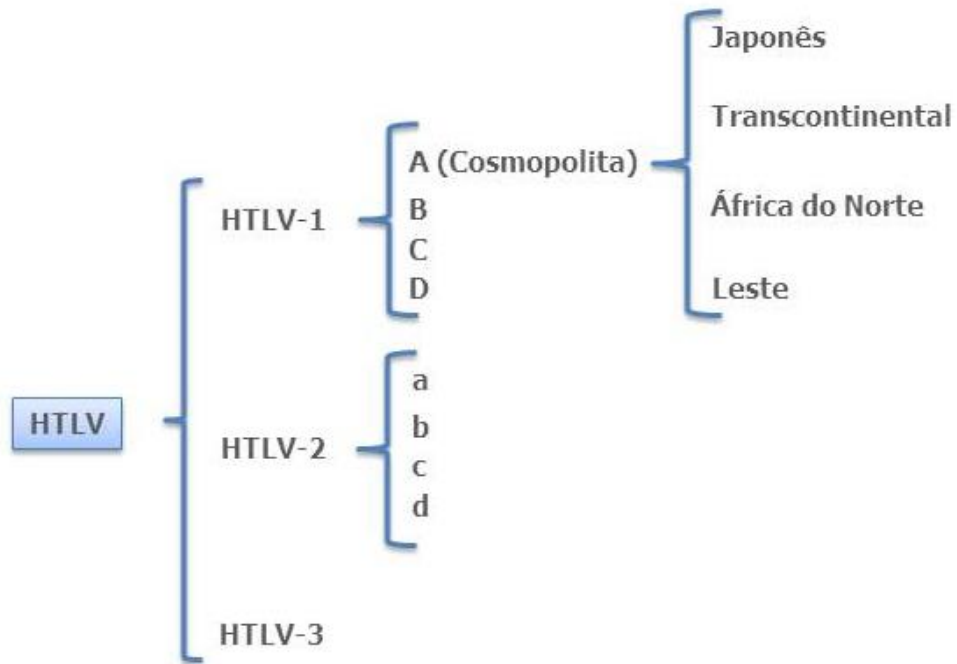
O HTLV-1 é classificado em quatro subtipos (A-D). O subtipo A (cosmopolita) é o mais disseminado, sendo encontrado em muitas populações e áreas geográficas e compreendem quatro grupos moleculares, o japonês, o transcontinental e da África do Norte e do Leste

(Figura 1). Não existe uma relação entre o subtipo e a doença causada pela amostra de vírus, sendo a variabilidade genômica do HTLV-1 muito mais dependente da sua origem geográfica (WOLFE et al., 2005).

O HTLV-2 foi identificado em um paciente com tricoleucemia (leucemia de células pilosas) (KALYANARAMAN et al., 1982), no entanto raramente foi associado a algum tipo de doença, o que fez com que se pensasse em propriedades diferenciais entre o HTLV-1 e HTLV-2 (MARTINEZ et al., 2019). O HTLV-2 apresenta diferenças antigênicas em relação ao HTLV-1 (KALYANARAMAN et al., 1982). Alguns estudos sugerem uma variação genética do HTLV-2 distribuída em tipos a/b/c/d (ISHAK et al., 1995; HALL et al., 1992).

Ainda há um terceiro tipo, o HTLV-3, descrito em 2005 em populações da República de Camarões que têm contato com primatas não humanos, caçadores e pessoas que manuseiam carne de animais (WOLFE et al., 2005; CALATTINI et al., 2005). Ainda não se sabe se o HTLV-3 pode ser transmitido entre seres humanos e se são capazes de desencadear doenças em seus portadores, como ocorre com os outros HTLVs (WOLFE et al., 2005; GESSAIN et al., 2013), entretanto, já existem alguns relatos iniciais sobre a associação deste vírus com doenças em populações humanas e a distribuição geográfica deles, o que ainda precisa ser melhor elucidado (MAHIEUX et al., 2009; VALLINOTO & ISHAK, 2017).

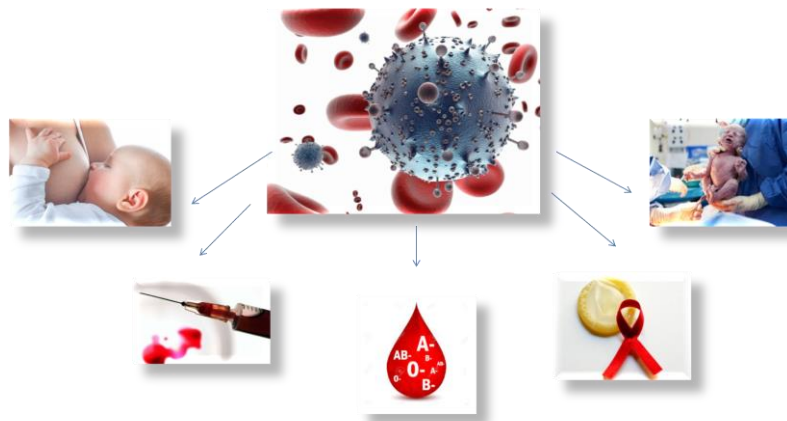
Algumas publicações se referem a um quarto subtipo, o HTLV-4, porém ele não foi aprovado como espécie pelo ICTV, uma vez que ele consiste, até agora, de uma única cepa humana (1863LE) cujo provírus foi encontrado em células mononucleares do sangue periférico (*PBMCs*) obtidas de um caçador que vive no Camarões (WOLFE et al., 2005). O perfil dos ensaios de *Western Blot* também foi classificado como indeterminado para HTLV. Estudos filogenéticos indicaram que o suposto HTLV-4 constitui claramente um grupo viral monofilogenético e é considerado pertencendo a uma linhagem mais antiga conhecida do PTLV - *Primate T-Lymphotropic Virus* (SWITZER et al., 2009), sua sequência é equidistante do HTLV-1 e HTLV-2, compartilhando apenas 62 e 71% de identidade nucleotídica com eles, respectivamente. Dados epidemiológicos anteriores sobre PTLV-1 e PTLV-3 indicam que é provável que uma espécie de macaco esteja infectada ou tenha sido infectada com a contrapartida símia do HTLV-4. No entanto, apesar da triagem de um grande número de espécies de macacos do Camarões, Gabão e República Democrática do Congo, a busca por esse vírus não teve êxito até agora (AHUKA-MUNDEKE et al., 2012; LIEGEOIS et al., 2008 e 2012; SINTASATH et al., 2009).



**Figura 1.** Representação da classificação dos HTLVs. Fonte: Do próprio autor.

### ***1.1.1 Transmissão***

O HTLV pode ser transmitido por via vertical (mãe para criança), principalmente pela amamentação, ou durante o parto; por via sexual e via parenteral (usuários de drogas injetáveis e transfusão de sangue e hemocomponentes) (Figura 2). Nas áreas endêmicas, as transmissões vertical e sexual têm sido as principais vias da disseminação da infecção por HTLV-1, porém, a hemotransfusão parece ter importante participação na introdução do HTLV em populações não endêmicas (DAMÁSIO et al., 2015; LOPES et al., 2008).



**Figura 2.** Representação das formas de transmissão do HTLV. Fonte: Do próprio autor.

No Brasil, com o objetivo de prevenir a infecção por meio de transfusão de sangue, foi implementada, em 1993, a triagem universal obrigatória de doadores de sangue para HTLV-1/2, através da Portaria nº 1.376 do Ministério da Saúde (BRASIL, 1993). Além disso, a doação de órgãos e tecidos segue as recomendações previstas na Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 220, de 27 de Dezembro de 2006 (BRASIL, 2006).

Como outras doenças (ou infecções) sexualmente transmissíveis, a soropositividade para HTLV está associada a sexo desprotegido, múltiplos parceiros sexuais, sexo pago e presença de ulceração genital (BARTHOLOMEW et al., 1987; SOARES et al., 2004). Estudos transversais têm postulado maiores taxas de transmissão sexual de homens para mulheres (DAMÁSIO et al., 2015; MURPHY et al., 1996).

A maioria dos indivíduos infectados com HTLV-1 permanece assintomática ao longo de toda a vida e, por este motivo, a infecção pode permanecer não diagnosticada (GONÇALVES et al., 2010), e sem esse conhecimento, os portadores do vírus poderão perpetuar a disseminação silenciosa em seus núcleos familiares e sociais (DAMÁSIO et al., 2015; SOARES et al., 2004).

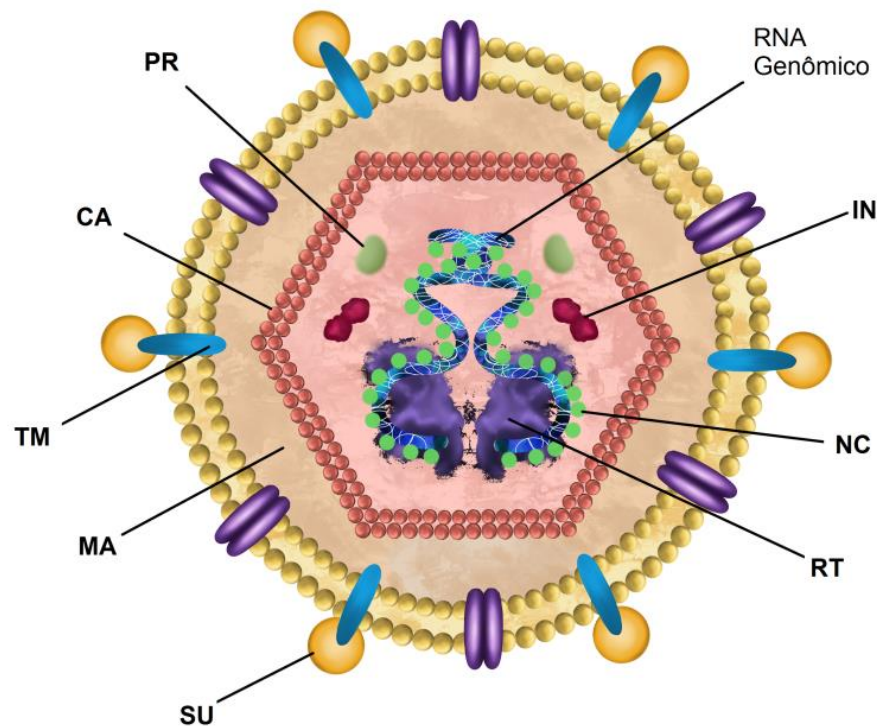
A transmissão vertical de HTLV-1/2 poderia, teoricamente, ocorrer durante o período intrauterino ou durante o parto, mas demonstrou-se que é por meio da amamentação que a maior parte da transmissão ocorre, à medida que células infectadas com HTLV entram no corpo da criança por via oral. Um período de exposição superior a seis meses (longo prazo de

amamentação) e alta carga proviral no leite materno são geralmente considerados fatores de risco para transmissão do HTLV (DAMÁSIO et al., 2015; HINO et al., 1985).

É importante reconhecer a via de transmissão da infecção, pois esta parece estar relacionada ao desenvolvimento de doenças associadas com o HTLV-1. Assim, o desenvolvimento de ATLL se associa com a via vertical, principalmente pela amamentação (OSAME et al., 1990), já a HAM/TSP foi relacionada com a transfusão de sangue (DAMÁSIO et al., 2015; GESSAIN et al., 1985; ROMANELLI et al., 2010).

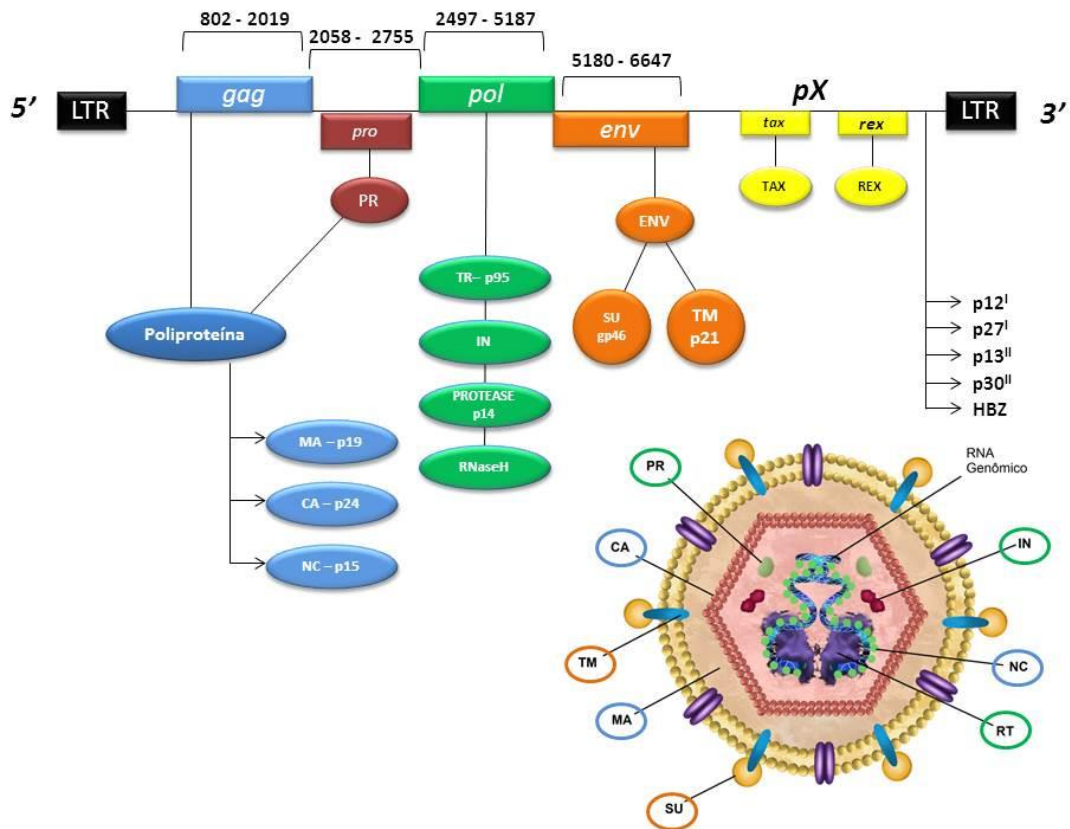
### ***1.1.2 Estrutura da Partícula Viral***

O HTLV possui uma estrutura similar à de outros retrovírus, conforme pode ser visto na figura 3, com morfologia esférica a pleomórfica medindo de 80 a 100nm de diâmetro, formada por um envelope, um nucleocapsídeo e um nucleóide, além de algumas projeções na superfície que são constituídas de pequenas espículas que estão densamente dispersas cobrindo uniformemente a superfície viral (SCHUPBACH, 1989; FRANCHINI, 1995). O cerne é esférico e o nucleóide concêntrico. O envelope é composto de uma proteína de superfície (**SU**) extracelular e uma proteína transmembrana (**TM**) que atravessa esta estrutura e ancora a SU. Junto à membrana do envelope se encontra a proteína da matriz (**MA**), a proteína Gag que está adicionada de um ácido graxo e na região amino-terminal apresenta uma modificação característica de muitas proteínas que se situam na face interna da membrana celular. O capsídeo (**CA**) de simetria icosaédrica, é composto principalmente pelas proteínas codificadas pelo gene *gag* que constitui o cerne da partícula viral. Outras proteínas também estão presentes no interior do CA, como a transcriptase reversa (**TR**) e a integrase (**IN**), essenciais no processo de integração do DNA no genoma da célula hospedeira (GOFF, 2001).



**Figura 3.** Representação esquemática da estrutura do HTLV, demonstrando as proteínas Protease-**PR**, Capsídeo-**CA**, Transmembrana-**TM**, de Matriz-**MA**, de Superfície-**SU**, Integrase-**IN**, Nucleocapsídeo-**NC** e Transcriptase Reversa-**TR**, além do **RNA** Genômico. Fonte: MARTINS, 2020, adaptado de COELHO-DOS-REIS, 2008.

O HTLV tem um genoma de RNA de fita simples, com polaridade positiva, possuindo os genes *gag*, *pro*, *pol* e *env*, além de uma sequência próxima à extremidade 3' conhecida como região X, na qual se encontram os genes reguladores *tax* e *rex* (Figura 4). As extremidades do genoma são flanqueadas por duas regiões repetidas, chamadas LTR (*long terminal repeats*), cujas sequências são essenciais na integração do DNA proviral no DNA cromossômico do hospedeiro e também para a regulação transcricional do genoma do HTLV (GOFF, 2001). Os DNAs provirais do HTLV-1 e do HTLV-2 possuem 9032 pb (SEIKI et al., 1983) e 8952 pb (SHIMOTOHNO et al., 1985), respectivamente.



**Figura 4.** Representação esquemática do genoma do HTLV-1 com as respectivas proteínas. Fonte: Do próprio autor.

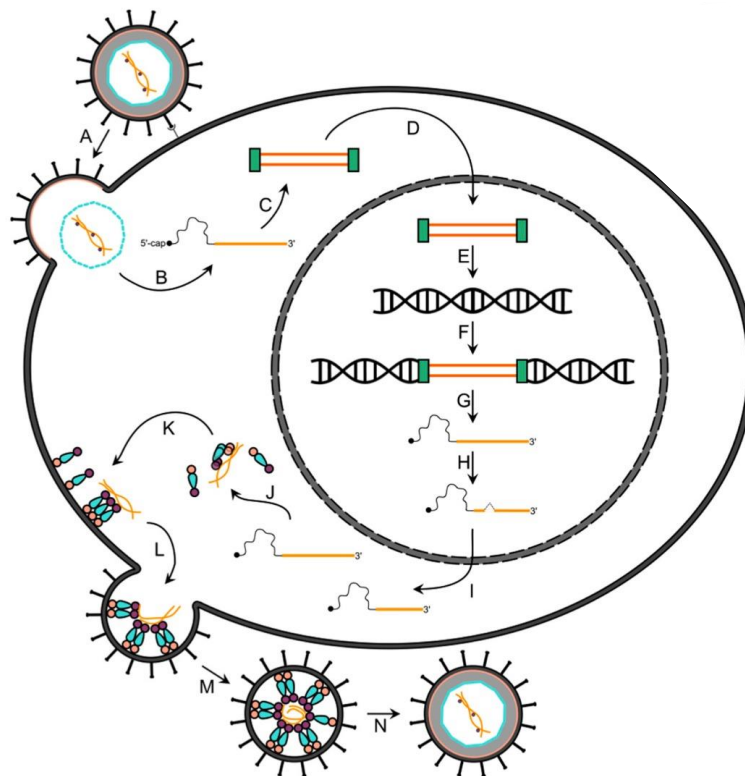
Três espécies de mRNAs são transcritos do DNA proviral do HTLV. Uma fita de RNA de sequência completa é utilizada para a síntese dos produtos dos genes *gag* e *pol* e também para o RNA genômico que é empacotado nos vírus. Um mRNA subgenômico é sintetizado a partir de uma única etapa de processamento e codifica o produto do gene *env*, enquanto outro mRNA subgenômico é produzido pela remoção de dois *introns* e codifica as proteínas regulatórias da região X. O mRNA viral na região X contém pelo menos 4 fases de leitura aberta (ORFS I, II III e IV) e as proteínas **Tax** e **Rex** são ambas codificadas pelo mesmo mRNA policistrônico, por meio das ORFS III e IV, respectivamente (GOFF, 2001).

### 1.1.3 Biossíntese e Multiplicação Viral

O HTLV apresenta um ciclo de multiplicação típico dos retrovírus. Após infecção, o HTLV integra-se ao DNA da célula, sendo denominado como provírus. A adsorção do vírus ocorre



no domínio de ligação ao receptor (RBD) amino terminal da SU ao receptor da membrana celular GLUT1 (Figura 5), um transportador de glicose, e às proteoglicanas heparan-sulfato e à neurofilina-1, para facilitar a penetração do vírus. A subunidade TM parece ser importante para a próxima etapa que é a de fusão de membrana, em que o cerne será introduzido no citoplasma da célula infectada (MANEL et al., 2004).



**Figura 5.** Representação esquemática do ciclo de replicação do HTLV-1. A entrada do vírus se dá pelo receptor celular GLUT-1 que se liga à proteína de superfície viral - SU. Após a perda do capsídeo, o genoma viral é convertido a DNA pela enzima transcriptase reversa TR e inserido no genoma celular na forma de provírus. Fonte: SOLTANI et al., 2019.

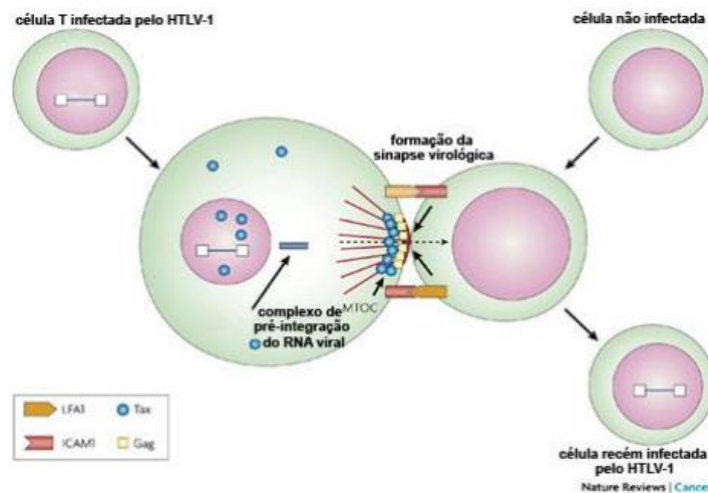
A transcrição do genoma viral de RNA para DNA, pela enzima TR, usando como primer o tRNA<sup>Pro</sup> ocorrerá dentro do cerne viral. Um passo importante para que a integração do genoma possa ocorrer é a entrada do DNA no núcleo da célula hospedeira. A proteína IN é responsável pela inserção do DNA linear no cromossomo do hospedeiro formando o provírus. O processo de integração do provírus marca o final da fase precoce do ciclo de multiplicação do vírus e inicia a fase tardia, que é mediada por enzimas do hospedeiro. Ocorre a síntese de RNA viral tendo como DNA molde o provírus integrado. A síntese do RNA viral leva à

formação de um longo transcrito primário, que é processado para formar os mRNAs e RNA genômico (LAVORGNA & HARHAJ, 2014).

As proteínas são sintetizadas nos ribossomos a partir dos mRNAs e algumas são processadas pós-traducionalmente. O genoma RNA é empacotado devido a sequências específicas próximo a terminação 5' denominadas sequências de empacotamento ou regiões Psi. A partícula madura contém um RNA dimérico que é altamente condensado em uma estrutura estável, compactamente enovelada. Um aspecto importante na etapa de empacotamento é a incorporação do tRNA junto com o genoma para servir como iniciador para a síntese da fita negativa de DNA. O processamento dos precursores Gag e Gag-Pro-Pol está ligado à montagem e brotamento e é controlado de forma que os precursores não são clivados até a montagem (KROON & CARNEIRO PROIETTI, 2015).

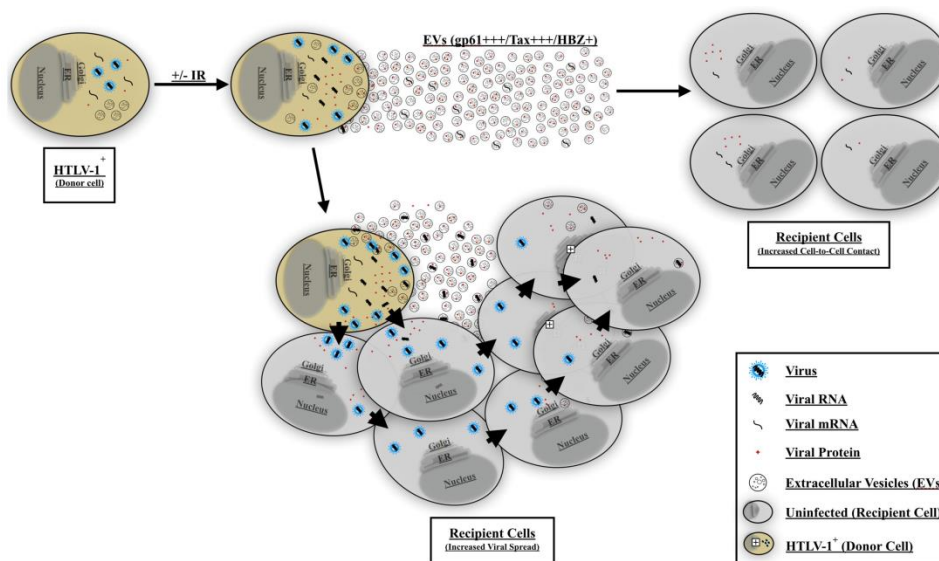
A maturação é um processo complexo que é necessário para a formação da partícula infecciosa. Ocorre o processamento proteolítico das proteínas do CA, obtendo-se finalmente a partícula viral madura que está pronta para infectar novas células (GOFF, 2001; MANEL et al., 2005).

O indivíduo infectado não apresenta viremia plasmática (presença de RNA viral circulante em grandes quantidades no plasma ou soro) (EHRlich et al., 1990; LIU et al., 1999), pois o HTLV pode induzir eventos que levam a polarização celular e formação de uma estrutura protéica que permitirá a sua interação e disseminação do DNA proviral via célula-célula (Figura 6), infectando células sadias pelo processo chamado de sinapse viral, essa disseminação também pode ocorrer por meio da proliferação da célula infectada (LIMA, 2014).



**Figura 6.** Representação esquemática da transmissão viral via contato célula-célula para criar a sinapse virológica. Fonte: Adaptado de Matsuoka & Jeang, 2007.

Recentemente foi relatada a existência de um mecanismo de disseminação viral através de vesículas extracelulares (Figura 7) que promoveriam o contato célula-célula e auxiliaria na transmissão do vírus de uma célula infectada à outra não infectada. Essas vesículas extracelulares, aparentemente, não são infecciosas, mas estariam diretamente ligadas à progressão de doenças causadas pelo HTLV. Os autores ainda sugerem um modelo de infecção em duas etapas, que compreendem a liberação das vesículas pelas células doadoras e o recrutamento de células receptoras (PINTO et al., 2019).

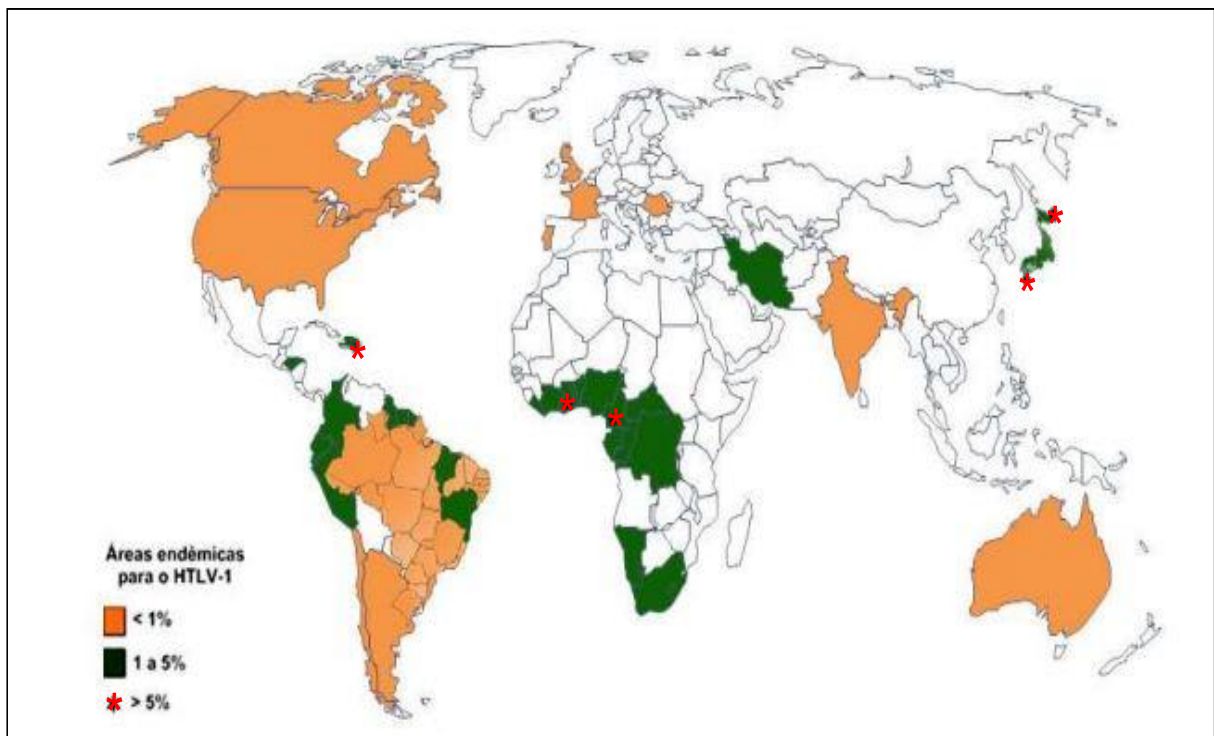


**Figura 7.** Representação esquemática da transmissão viral através de vesículas extracelulares. Fonte: Adaptado de PINTO et al., 2019.

### 1.1.4 Epidemiologia

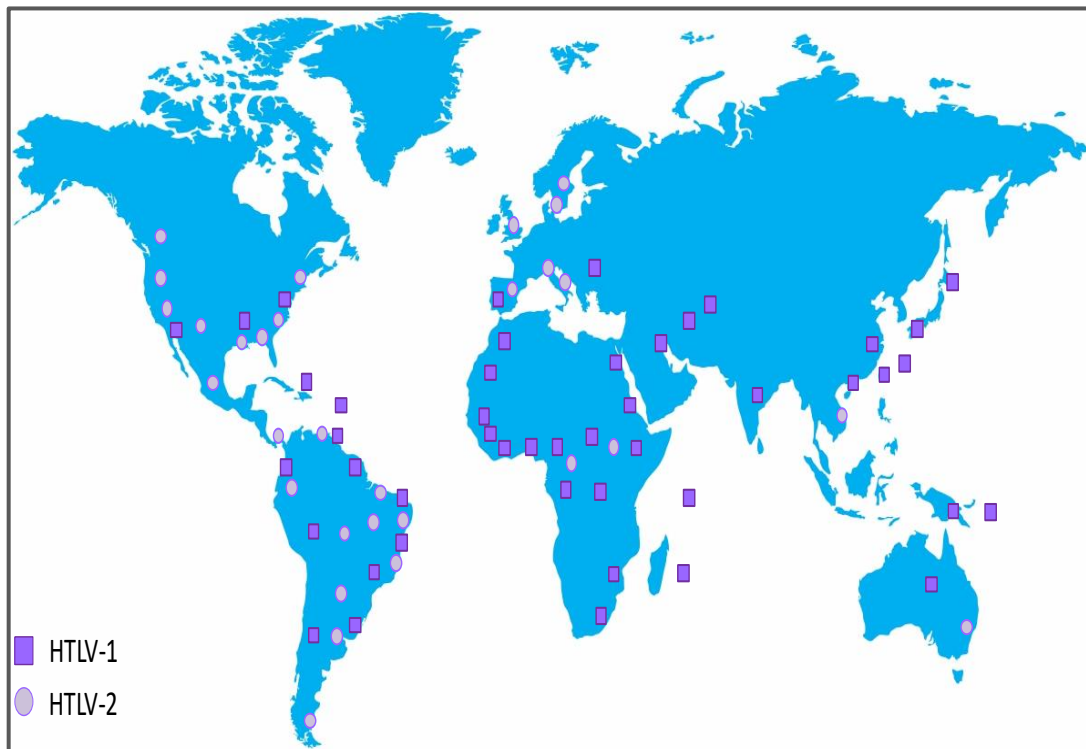
Estima-se que pelo menos 20 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HTLV-1 no mundo (WILLEMS et al., 2017) sendo a maioria portadores assintomáticos (VIANA et al., 2014). O que se sabe é que o HTLV é endêmico em áreas como Japão, Ilhas Caribenhas, África, América do Sul, algumas regiões da Romênia e Oriente Médio, conforme representado na figura 8 (YAMAGUCHI et al., 1994; MUELLER et al., 1996; CASTRO et al., 1997; MURPHY et al., 1991; LAPERCHE et al., 2009; RIBAS & MELO, 2002).

As regiões que apresentam mais de 5% de soropositividade para o HTLV-1 são consideradas de alta prevalência; entre 5 e 1%, de média prevalência; e menos de 1%, de baixa prevalência (BRASIL, 2013; SANTOS et al., 2015). A figura 8 mostra a distribuição das regiões de acordo com a taxa de soropositividade. Em regiões não endêmicas, como Europa (prevalência de 0,4% ou menos em doadores de sangue) e América do Norte (prevalência de 0,02%), a infecção pelo HTLV-1 é encontrada, principalmente, entre imigrantes provenientes de áreas endêmicas, seus filhos e contatos sexuais, entre profissionais do sexo e usuários de drogas injetáveis - UDIs (GESSAIN & CASSAR, 2012).



**Figura 8.** Distribuição do HTLV-1 no mundo. Fonte: ARAÚJO, 2012, adaptado de PROIETTI et al., 2005.

HTLV-1 e HTLV-2 têm uma distribuição mundial (figura 9), com taxas de prevalência que variam de 5% a 27%, com as maiores taxas ocorrendo em certas populações, onde o HTLV-1 é altamente endêmico (BEILKE, 2012; ARAÚJO et al., 2002).



**Figura 9.** Distribuição geográfica do HTLV-1/2 no mundo. Fonte: Adaptado de WHO, 2010.

Desde que os primeiros retrovírus humanos foram identificados, diversos autores têm procurado variações nos genomas virais, buscando estabelecer relações com as doenças associadas a estes vírus, porém estudos iniciais que analisaram o genoma do HTLV-1 identificaram um grande potencial deste para determinar rotas migratórias, além de sua distribuição genotípica (MIURA et al., 1994; VAN DOOREN et al., 1998). A partir desta identificação, estudos vêm sendo conduzidos em diversos países para se estabelecer a localização dos genótipos circulantes do HTLV-1, e com isso tentar entender como esse vírus se espalhou pelo mundo, com o intuito de tomar medidas preventivas (ALCANTARA et al., 2003).

O HTLV-2 é considerado um vírus evolutivamente relacionado com o Novo Mundo e, portanto, é endêmico em populações indígenas das Américas. Este vírus foi detectado em

comunidades indígenas em países como México, Brasil, Panamá, Colômbia, Venezuela, Argentina e nos Estados Unidos (estados da Flórida e do Novo México) (SWITZER et al., 1995). No entanto, ele também foi descrito, ocasionalmente, em tribos isoladas de pigmeus da República Democrática do Congo, Camarões e alguns países da África Ocidental assim como em aborígenes da Austrália (BOLTON et al., 1995). Em paralelo, o HTLV-2 está também presente, principalmente, em populações de alto risco, como usuários de drogas intravenosas (UDIs), profissionais do sexo e indivíduos infectados com HIV-1 em países da Europa, nos Estados Unidos e no Brasil (GABBAI et al., 1993).

No Brasil, o HTLV-1 foi primeiramente descrito em 1986, por Kitagawa e cols., em uma comunidade japonesa residente em Campo Grande (MS), com soroprevalência de 13%, sendo a maioria dos indivíduos oriundos de Okinawa, sul do Japão. O HTLV-2 é endêmico em diversas populações indígenas do Brasil, com prevalências de 33,3% a 57,9% na tribo Kaiapó; 12,2% na tribo Kraho; 0,42% a 15,4% na tribo Tiriyo; 8,1% na tribo Mundukuru e 11,4% na tribo Arara do Laranjal (SANTOS & LIMA, 2005; FUJIYOSHI et al., 1999; ISHAK et al., 1995; MALONEY et al., 1992).

Por falta de notificação compulsória, a infecção por HTLV acomete a população brasileira de forma invisível, uma vez que a disseminação do vírus pode ocorrer sem que os indivíduos tenham sequer conhecimento da infecção. Trata-se, portanto de um problema de saúde pública (ALVES, 2018).

O Brasil é considerado o país com maior número absoluto de indivíduos infectados pelo HTLV (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002). Dados publicados em 2012 serviram como base para considerar que cerca de 800.000 pessoas estariam infectadas pelo HTLV-1 no Brasil (GESSAIN & CASSAR, 2012), entretanto, Soares e cols. (2005) sugeriram o número de 2 a 2,5 milhões de pessoas infectadas em todo o país. Levando em consideração a falta de publicações, principalmente sobre a epidemiologia da infecção por HTLV-2 (ALVES, 2018) e ainda, conforme afirmado por Santos e cols. (2015), que os dados publicados não são representativos da população geral, este número pode ser ainda maior, uma vez que a maioria das amostras é de candidatos à doação de sangue ou grupos selecionados, como gestantes, pacientes com doenças neurológicas ou hematológicas, familiares de pessoas infectadas, nativos, usuários de drogas injetáveis (UDIs) e profissionais do sexo (MUELLER, 1991; FERREIRA JÚNIOR et al., 1997; MANNS et al., 1999). É o que ocorre, por exemplo, com dados da Argentina, Brasil, Colômbia e Peru que apresentam em torno de 1-2% de

soropositividade para HTLV-1 e HTLV-2 (GESSAIN & CASSAR, 2012; KAZANJI et al., 2003; LEON et al., 2003; PALACIOS et al., 2003; GASTALDELLO et al., 2004; ISHAK et al., 2003).

Não existe, no Brasil, um estudo epidemiológico completo de base populacional sobre a infecção pelo HTLV-1 e HTLV-2, o que, como citado anteriormente, não permite estimar a prevalência real desses vírus no país (SANTOS & LIMA, 2005).

Estudos realizados com o intuito de avaliar a prevalência do HTLV em doadores de sangue das 27 capitais brasileiras, concluiu que a heterogeneidade entre as regiões é considerável, o que pode ser observado na figura 10 (GOMES & JUNIOR, 2011; GESSAIN & CASSAR, 2012; BARMPPAS et al., 2014).



**Figura 10.** Soroprevalência representativa de HTLV-1/2 no Brasil, por estado. Dados coletados de estudos realizados no período de 2002 a 2019. Fonte: Do próprio autor.

No Acre, foram realizados dois estudos para se avaliar a soroprevalência de HTLV na população de Rio Branco. No estudo de Carvalho e cols. (2002) não foi encontrado nenhum indivíduo soropositivo nas 390 amostras testadas, já em 2003, 12 indivíduos das 11.121 amostras testadas foram soropositivos, correspondendo a uma taxa de soroprevalência de 0,11% (COLIN et al., 2003).

Três populações distintas do Amapá foram avaliadas em 2006, um total de 356 amostras de sangue foram testadas para HTLV, sendo 186 de comunidade afro-descendente do município de Mazagão, 140 amostras de indivíduos infectados pelo HIV-1 e 30 amostras de pacientes atendidos especificamente para diagnóstico de HTLV pelo LACEN-AP. Cinco amostras tiveram resultado positivo, pertencentes ao grupo de pacientes do LACEN-AP, correspondendo a uma soroprevalência de 1,4% (SILVA, 2006).

Na cidade de Salvador, Bahia, foram testadas 765 amostras de indivíduos assistidos pelo Programa Saúde da Família (PSF), destes 529 (69,2%) do sexo feminino e 236 (30,8%) do masculino. A soroprevalência geral para HTLV-1/2 foi de 1,96%, aumentando de acordo com a idade. Observou-se soroprevalência de 2,16% e 1,89% para os sexos masculino e feminino, respectivamente (SODRÉ et al., 2010). Já Pereira e cols. (2019) constataram uma soroprevalência de 0,85% para HTLV-1/2 em amostras de indivíduos de diferentes municípios do estado da Bahia.

No período de 2001 a 2008, 679.610 amostras de sangue de doares voluntários pertencentes à Hemorrede do Ceará foram testadas, destas, 164 deram resultados positivos (prevalência de 0,024%) sendo 33 tipadas para HTLV-2 (GOMES & JUNIOR, 2011). Já durante os anos de 2012 e 2013, de 111.931 amostras de doadores do HEMOCE, 15 foram efetivamente positivas para os testes de triagem e confirmação, mostrando uma prevalência de 0,013% (SOUZA et al., 2016).

Num município de Vitória-ES, no ano de 2009, foram testadas 1.502 amostras, distribuídas em seis regiões de saúde. A soroprevalência geral para HTLV-1/2 foi de 0,53%, sendo sete amostras positivas para HTLV-1 e uma amostra positiva para HTLV-2 (ORLETTI, 2012).

No período de abril de 2008 a agosto de 2012, um total de 1.252 indivíduos foi estudado em Goiânia-GO, sendo 402 pacientes com tuberculose (Grupo I), 505 indivíduos HIV-positivo (Grupo II) e 345 pacientes com doenças onco-hematológicas (Grupo III). 12 amostras tiveram



resultado positivo para HTLV-1/2, resultando em taxas de prevalência de 1,24%, 0,79% e 0,87%, respectivamente, e soroprevalência total de 0,96% (KOZLOWSKI, 2013). Almeida e cols. (2014) encontraram prevalência de 1,52% na cidade de Catalão – Goiás em um estudo no período de janeiro a dezembro de 2010, onde foram analisadas 3.108 amostras de doadores de sangue do Hemocentro Regional de Catalão.

Cruz (2011) realizou um levantamento de 398.363 cadastros de doadores de sangue do Hemocentro do Maranhão – HEMOMAR, referentes ao período de janeiro de 2002 a dezembro de 2009, destes, 924 doadores apresentaram resultados positivos para HTLV, representando uma soroprevalência de 0,02%. De abril a setembro de 2006, 2.965 puérperas de Cuiabá, Estado do Mato Grosso, com idade média de 23,9 anos, foram submetidas a testes sorológicos para o HTLV-1/2. A prevalência da infecção pelo HTLV-1/2 foi de 0,2%, semelhante à observada na população geral de vários centros desenvolvidos do país (YDY et al., 2009).

O Programa Estadual de Proteção à Gestante do Mato Grosso do Sul (PEPG-MS) realizou a triagem para a infecção pelo HTLV-1/2 em 155.807 gestantes entre 2002 e 2006, sendo encontrados 206 casos positivos, resultando em uma soroprevalência de 0,13% (PORTELA, 2008). A mesma taxa de soroprevalência (0,13%) foi encontrada em um estudo realizado no ano de 2008, em gestantes submetidas a exames sorológicos durante o pré-natal, onde 153 de 116.689 gestantes tiveram resultados positivos para HTLV-1/2, sendo que 133 eram do tipo 1 e 20 do tipo 2 (DAL FABRO et al., 2008).

Ribeiro (2009) avaliou a distribuição do HTLV-1/2 entre mulheres puérperas de Minas Gerais. Foram 55.293 amostras incluídas na análise, destas duas eram portadoras de HTLV-2 e todas as demais portadoras do HTLV-1, totalizando 42 amostras, com uma prevalência de 0,08%. Em 2010, uma análise retrospectiva dos testes sorológicos para HTLV-1/2, realizados no período de 1º de janeiro de 1995 a 31 de dezembro de 2008, no Hemocentro Regional de Uberaba, encontrou uma prevalência de sorologia positiva para o HTLV de 0,03% em um total de 147.489 amostras, onde 461 deram resultados positivos. Destes, 216 foram submetidos a teste confirmatório, com 36 reações positivas, representando uma prevalência de 0,02% (LIMA et al., 2010).

O Estado do Pará é o terceiro do Brasil com maior frequência de infecção por HTLV entre doadores de sangue. Um estudo objetivou investigar a infecção causada pelo HTLV em

comunidades ribeirinhas do nordeste paraense, atendidas pelo Programa Luz na Amazônia, entre fevereiro de 2009 e junho de 2010, em 175 ribeirinhos, resultando em uma prevalência total do HTLV-1 de 1,14% (2/175). Este estudo demonstrou a ocorrência de HTLV-1 nas comunidades ribeirinhas estudadas, com frequências semelhantes às de populações urbanas. O HTLV-2 não foi encontrado na amostra estudada (FERREIRA et al., 2010). Outra pesquisa realizada entre novembro de 2014 e novembro de 2015 por Silva e cols. (2018), com 1.059 indivíduos transeuntes de logradouros públicos de Belém-PA, constataram a prevalência 1,4% (15/1.059) para HTLV-1 e 0,5% (5/1.059) para HTLV-2.

Na Paraíba, um estudo realizado entre janeiro de 2002 e janeiro de 2011, entre os doadores de sangue da cidade de Patos, teve como objetivo analisar a soroprevalência da infecção pelo HTLV-1/2. Dos 39.127 doadores registrados no Hemonúcleo de Patos-PB, 10 apresentaram sorologia positiva para o HTLV-1, representando 0,025% e nenhum doador apresentou sorologia positiva para o HTLV-2 (BRAGA et al., 2012).

No Paraná, um estudo avaliou a prevalência da infecção pelo HTLV em 643 gestantes de alto risco atendidas no ambulatório de pré-natal do Serviço de Tocoginecologia do Complexo do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (CHC-UFPR), no período de agosto de 2015 a agosto de 2016, das quais duas (0,31%) foram confirmadas como portadoras de HTLV, sendo uma HTLV-1 e outra HTLV-2 (MEDEIROS, 2017).

Os aspectos soropidemiológicos da infecção pelo HTLV-1/2 foram investigados em primodoadores de sangue e seus familiares no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Piauí (HEMOPI) no período de agosto/2011 a julho/2012, das 37.306 amostras de sangue, 47 (0,13%) foram reagentes, destas, 22 (0,06%) eram HTLV-1 e 14 (0,04%) HTLV-2 (RIBEIRO, 2014). A soroprevalência de HTLV-1 e 2 também foi analisada no HEMOPI, por Xavier e Oliveira (2019), no período de 1º de janeiro de 2006 a 31 de dezembro de 2016, em que 727 bolsas de sangue, de um total de 531.152 doações, foram descartadas por ter um resultado sorológico positivo para HTLV-1/2, indicando uma prevalência de 0,14%.

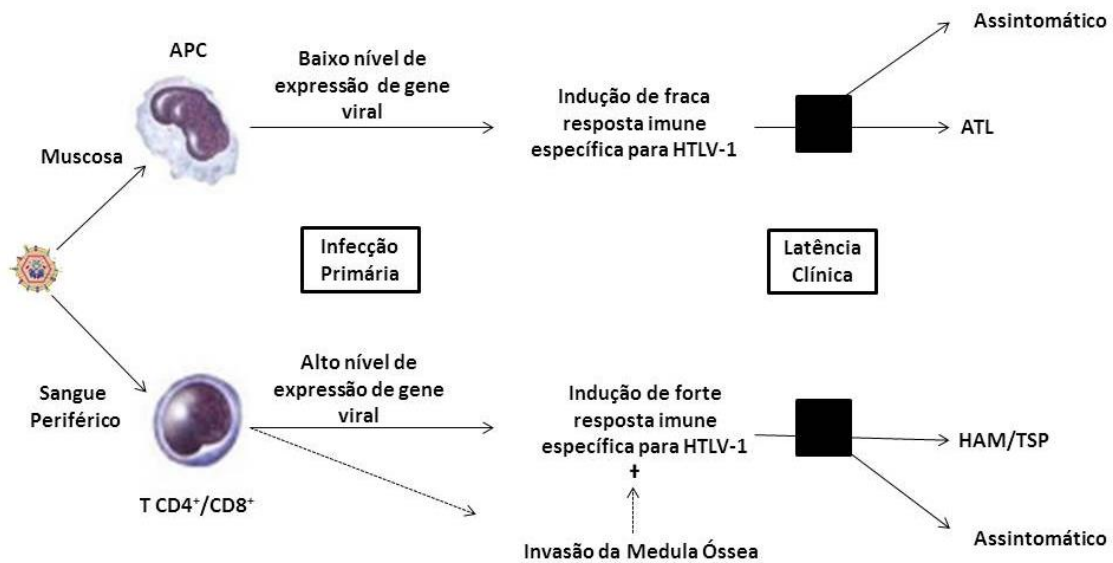
Em 2015, foi descrita a prevalência de HTLV em Boa Vista, Roraima, no período de 2007 a 2010 em doadores de sangue de um Hemocentro do município. De 50.855 amostras, 32 foram reagentes para HTLV, representando a prevalência de 0,06% (SEMEÃO et al., 2015).

Um trabalho realizado em 2018 identificou a soroprevalência do vírus HTLV-1/2 em doadores de sangue no Hemocentro Regional de Blumenau, Santa Catarina, no período de fevereiro de 2010 a dezembro de 2016. Foram 136.689 amostras avaliadas, das quais 18 foram positivas, representando uma soropositividade de 0,01% (REUTER, 2018).

### ***1.1.5 Resposta Imune e Patogênese***

A infecção pelo Vírus Linfotrófico de Células T Humanas (HTLV) pode apresentar diferentes manifestações clínicas durante a fase crônica. Embora a maioria dos indivíduos infectados permaneça assintomática durante toda a vida, cerca de 5 a 10% dos pacientes desenvolvem algum tipo de sintoma que pode ou não evoluir para doenças mais graves. Proietti e cols. (2006) sugerem que a janela imunológica do HTLV-1 adquirido por via transfusional seria de 51 dias (36 a 72 dias, intervalo de confiança de 95%), porém a do HTLV-2 é desconhecida. Entretanto, ainda não se conhece bem o período de janela imunológica e a cinética dos títulos de anticorpos anti-HTLV ao longo da infecção. O período para soroconversão parece variar de acordo com a via de transmissão da infecção e com a carga viral recebida no evento de transmissão. A transfusão sanguínea é considerada a mais eficiente e o receptor geralmente se soroconverte em dois meses, enquanto que para as outras vias, pode demorar seis ou mais (ERICHSEN et al., 2009).

Alguns estudos sugerem que a via de infecção também pode ser determinante no direcionamento da natureza neoplásica/inflamatória-degenerativa da infecção crônica (Figura 11) (GRANT et al., 2002).



**Figura 11.** População alvo na infecção primária pelo HTLV-1 e consequência para a patogênese. O desfecho da infecção pelo HTLV-1 com desencadeamento ou não de doença dependeria da porta de entrada do vírus e a efetividade da resposta imune em controlar o nível das células infectadas. Fonte: Adaptado de Grant et al., 2002.

Embora não sejam conhecidos todos os eventos que levam o indivíduo portador do HTLV-1 permanecer no estado assintomático ou desenvolver doença hematológica ou de caráter inflamatório, o nível de expressão viral, a invasão de células infectadas a outros compartimentos corporais e a efetividade da resposta imune durante toda a infecção são considerados fatores importantes para determinar o nível da carga proviral e o risco de desenvolvimento de doença associada ao HTLV-1 (COELHO-DOS-REIS et al., 2015).

A principal característica da infecção por HTLV é a sua perenidade. Na maioria dos casos o vírus desenvolve-se de forma a não prejudicar o infectado e, por isso, perdura de forma assintomática e indetectável pelo sistema imune por anos, décadas e, em alguns casos, por toda a vida do hospedeiro (DREZETT et al., 2013).

As doenças associadas ao HTLV com maior importância clínica são de natureza neoplásica (Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto – ATLL) ou inflamatória-degenerativa (Mielopatia Associada ao HTLV/Paraparesia Espástica Tropical – HAM/TSP) (COELHO-DOS-REIS et al., 2015), mas os portadores do vírus também podem apresentar outros tipos de comorbidades secundárias e/ou infecções oportunistas como dermatite infecciosa, estrogiloidíase, escabiose, micoses, polimiosite, tireoidite, alveolite, uveíte, artrite

reumatóide, síndrome de Sjögren, linfadenite, dentre outras (MARTINS et al., 2015; UCHIYAMA, 1997).

A princípio, acreditava-se que células TCD4<sup>+</sup> (Linfócitos T-auxiliares) do sangue periférico representavam o alvo primário para a infecção pelo HTLV, hoje já foi demonstrado que outras populações celulares tais como monócitos, células epiteliais e outras populações de linfócitos também são susceptíveis à infecção pelo vírus (AMARANTE et al., 2015; ZEHENDER et al., 1998).

Como as sequências de nucleotídeos de HTLV-1 e 2 apresentam uma similaridade de 65%, a variabilidade genética observada entre as amostras, tanto do HTLV-1 quanto do HTLV-2, tem levado à descrição de subtipos e análises filogenéticas, mostrando as relações evolutivas entre eles (BERTAZZONI et al., 2011), com isso, acredita-se que as características funcionais e estruturais diferenciais das proteínas Tax1 e Tax2 podem explicar as diferenças no potencial da doença associadas aos dois subtipos (BEILKE, 2012; HIGUCHI et al., 2009).

Em cenários clínicos em que ocorre a superexpressão de Tax1 e Tax2, o aumento da transativação de genes celulares pode resultar em desregulação imunológica nos indivíduos afetados (YAMANO et al., 2002). Um estudo realizado em 2011 relatou a capacidade das proteínas recombinantes Tax1 e Tax2 de regular negativamente a expressão do receptor CCR5 nos linfócitos, juntamente com a indução de quimiocinas CC (BEILKE, 2012; BARRIOS et al., 2011).

Outro trabalho também relacionou a regulação da expressão dos genes *tax1* e *tax2* por proteínas expressas por um transcrito antisense (ou seja, o fator HTLV-1 bZIP e a proteína antisense do HTLV-2 conhecida como APH-2) mostrando, ainda mais, diferenças importantes na maneira como Tax1 e Tax2 são expressas (BEILKE, 2012; MATSUOKA et al., 2009; HALIN et al., 2009).

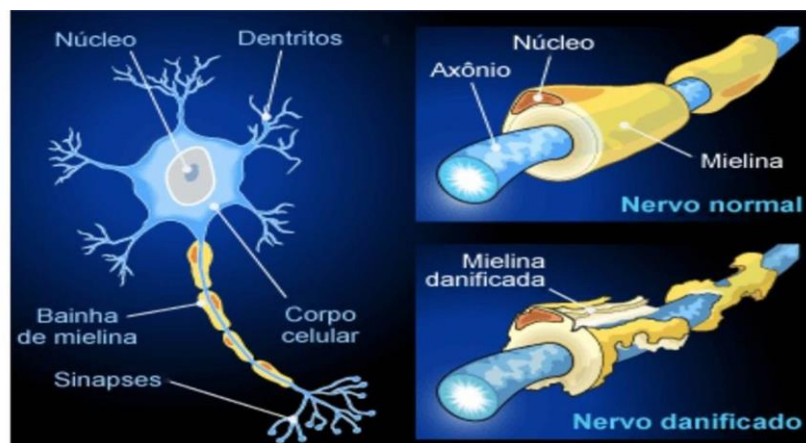
Enquanto a associação do HTLV-1 com doenças como ATLL e a HAM/TSP já é definida, o HTLV-2 não está claramente associado a nenhuma comorbidade ou desequilíbrio na homeostase corporal e ainda precisa ser melhor estudado (PEREIRA & MESQUITA, 2015). Embora a Tax2 compartilhe muitas propriedades características da Tax1, seu potencial para induzir transformação celular e sua capacidade de induzir a expressão gênica de citocinas são inferiores à Tax1 (BEILKE, 2012; YAMANO et al., 2002; HIGUCHI et al., 2009).

### 1.1.6 Manifestações Clínicas

#### Mielopatia Associada ao HTLV-1/Paraparesia Espástica Tropical – HAM/TSP

A Paraparesia Espástica Tropical (TSP) foi descrita inicialmente em 1985, na Martinica, Jamaica e Colômbia, após a constatação da presença de anticorpos anti-HTLV-1 no soro de mais de 60% dos pacientes com essa doença (GESSAIN et al., 1985). Em 1986 foi descrita no Japão com a denominação de Mielopatia Associada ao HTLV-1 – HAM (OSAME et al., 1986). Somente em 1988, por concluírem que se tratava de uma mesma doença, foi reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e denominada de HAM/TSP.

O período de incubação do HTLV-1 é longo, e por esta razão, a sintomática é, na maioria dos casos, inexistente. Estima-se que 2 a 3% dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 irão desenvolver HAM/TSP (NETO et al., 2012). A proteína Tax age como facilitadora da passagem das células TCD4<sup>+</sup> infectadas para o sistema nervoso central - SNC, levando a desmielinização dos neurônios (Figura 12), com isso observa-se o desenvolvimento de paraparesia espástica progressiva, distúrbio esfincteriano (com perda sensorial ou não), distúrbio intestinal, disfunção motora (fraqueza dos membros inferiores) e disfunção erétil (MARTINS et al., 2011).



**Figura 12.** Representação esquemática da desmielinização causada pelo HTLV-1 na HAM/TSP. Fonte: HowStuffWorks, 2007.

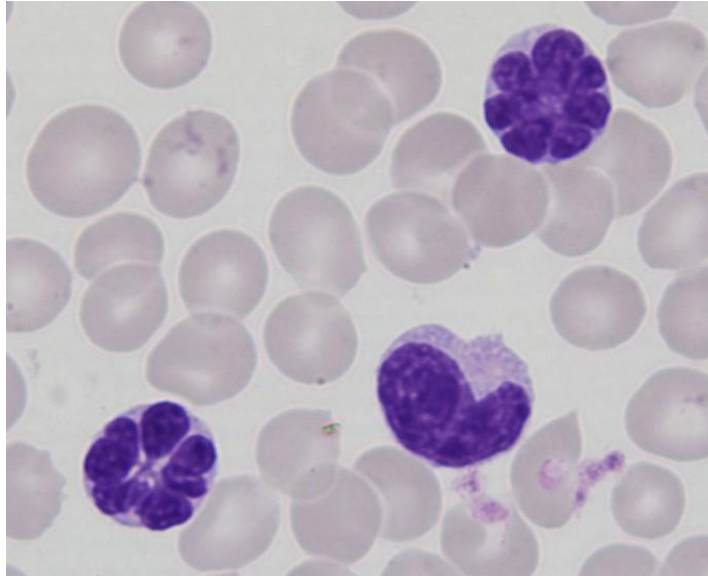
Os indivíduos com HAM/TSP apresentam alterações em diversos parâmetros imunológicos quando comparados aos indivíduos infectados assintomáticos. Dentre os mais relevantes destacam-se os elevados títulos de anticorpos específicos para antígenos do HTLV-1, tanto no soro quanto no líquido cefalorraquidiano, o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias nas regiões afetadas da medula espinal, o aumento da capacidade migratória dos leucócitos circulantes e o aumento percentual de linfócitos TCD8<sup>+</sup> ativados, específicos para o HTLV-1 (COELHO-DOS-REIS et al., 2015).

A expressão da proteína viral Tax no compartimento celular de linfócitos TCD4<sup>+</sup> levaria a ativação do fator nuclear  $\kappa$ -B (NF- $\kappa$ B), fatores séricos de resposta (SRF) e fatores ativadores de transcrição/proteínas ligantes de elementos de resposta ao AMP-cíclico (ATF/CREB). Neste contexto, estas células proliferam espontaneamente e expressam moléculas de adesão, quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (IFN- $\gamma$ , TNF) que poderiam favorecer a migração direcionada dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> infectados da circulação para o sistema nervoso central - SNC (GRANT et al., 2002; GOON et al., 2003).

No SNC, os astrócitos e as células TCD4<sup>+</sup> representam as células que possuem produtos protéicos virais em seu citoplasma bem como o DNA proviral integrado ao genoma celular. A expressão gênica viral dentro do SNC não só promove a ativação de linfócitos T e migração de monócitos, como resulta na criação de um microambiente favorável a ação citotóxica de células TCD8<sup>+</sup> específicas para antígenos do HTLV-1 associados às moléculas do MHC-I. Neste contexto, tem sido mostrado que a expressão de Tax causa uma produção exacerbada de TNF- $\alpha$  por astrócitos resultando em aumento na expressão de MHC-I, redução no influxo de glutamato, destruição de oligodendrócitos, desmielinização e, conseqüentemente, neurotoxicidade (COELHO-DOS-REIS et al., 2015).

#### *Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto – ATLL*

A Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto (ATLL) foi inicialmente descrita no Japão em 1977 (GALLO, 2005). É uma doença agressiva, linfoproliferativa, causada por linfócitos T maduros (UCHIYAMA et al., 1977). O quadro sintomatológico clássico inclui: mal-estar, febre, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, perda de peso, lesões cutâneas, icterícia, sede, fadiga e imunossupressão. Alterações na morfologia nuclear das células T que se mostram com núcleo multilobulado também são observadas (Figura 13) (MATSUOKA, 2005).



**Figura 13. "Flower cell"** - células leucêmicas observadas ao microscópio. Podem ser vistos núcleos multilobulados, típicas no sangue periférico de um paciente com quadro agudo de ATLL. Fonte: Matsuoka, 2005.

A proteína do HTLV-1 (Tax1) está envolvida centralmente nas etapas complexas da leucemogênese após anos de infecção subclínica. Tax1 afeta uma ampla variedade de vias de sinalização celular e conseqüente expressão de proteínas de células hospedeiras incluindo fatores de transcrição e citocinas, como interleucina-2 (IL-2), fator de necrose tumoral (TNF) e outros, levando à ativação transcricional, proliferação e, finalmente, transformação celular (BEILKE, 2012; BOXUS et al., 2008; BANERJEE et al., 2007) e ainda atua na intermediação dos processos que envolvem a transcrição viral que leva à imortalização dos linfócitos T e posterior surgimento da ATLL (PEREIRA & MESQUITA, 2015).

#### Dermatite infecciosa

A dermatite infecciosa associada ao HTLV-1 (DIH) é um tipo de eczema infectado e recidivante que incide em crianças que adquirem verticalmente a infecção pelo HTLV-1. Normalmente inicia-se após os 18 meses de idade, podendo também ocorrer no início da vida adulta. As lesões são eritemato-descamativas, infectadas e frequentemente crostosas. Localizam-se, com maior frequência, no couro cabeludo, regiões retro-auriculares, pescoço e região inguinal, mas podem ser generalizadas. Veem-se também fissuras retro auriculares,



pápulas eritemato-descamativas e foliculares. Prurido discreto a moderado, secreção nasal crônica e blefarconjuntivite podem ser observados. A DIH sempre se associa à infecção por *Staphylococcus aureus* e/ou *Streptococcus beta hemolyticus*. O diagnóstico diferencial clínico deve ser feito com as dermatites atópica e seborréica e, do ponto de vista anatomopatológico, com a psoríase e o linfoma cutâneo de células T (BITTENCOURT & OLIVEIRA, 2005).

### Estrongiloidíase

A estrongiloidíase é uma das mais importantes helmintíases em países tropicais, e estudos epidemiológicos têm demonstrado associação desta parasitose com o vírus HTLV-1. Em regiões onde estes dois agentes são endêmicos a coinfeção pode resultar no desenvolvimento de formas disseminadas da estrongiloidíase assim como em estrongiloidíase recorrente. Enquanto que o vírus HTLV-1 está relacionado com uma alta produção de IFN- $\gamma$  e desvio da resposta imune para o tipo Th1, a proteção contra helmintos está associada a uma resposta Th2. Devido a este viés da resposta imune, indivíduos infectados pelo HTLV-1 apresentam redução na produção de IL-4, IL-5, IL-13 e IgE, componentes participantes dos mecanismos de defesa contra *S. stercoralis*. Estas anormalidades constituem a base para a ocorrência de maior frequência e de formas mais graves da estrongiloidíase em pacientes infectados pelo HTLV-1 (PORTO et al., 2002).

### Escabiose

Acredita-se que a escabiose, ectoparasitose causada pelo ácaro *Sarcoptes scabiei*, ocorra nos pacientes infectados pelo HTLV-1 predominantemente devido à imunodepressão determinada pelo vírus. A escabiose em geral cursa com manifestações discretas, mas pode se agravar em pacientes infectados pelo HTLV-1. A forma grave dessa doença é chamada de escabiose crostosa ou norueguesa. Tem-se demonstrado, inclusive, que a infecção pelo HTLV-1 determina o desenvolvimento dessas apresentações independentemente da presença de ATLL (NOBRE et al., 2005).

### Micoses

À semelhança da escabiose, as micoses cutâneas, notadamente as dermatofitoses, ocorrem com maior frequência nos pacientes infectados pelo HTLV-1. Casos de dermatofitose extensa associada à escabiose norueguesa foram descritos, o mecanismo sugerido é o da imunossupressão celular determinada pelo vírus (NOBRE et al., 2005).

### Polimiosite

O HTLV-1 está associado a manifestações clínicas de envolvimento de diversos órgãos e sistemas, inclusive os músculos, levando ao aparecimento de polimiosite (PM). Geralmente as manifestações musculares estão envolvidas com alterações no sistema nervoso central ou periférico. A associação entre poliomiosite e HTLV-1 foi identificada, por exemplo, na Jamaica, onde foi descrito que 85% dos pacientes portadores de PM são HTLV-1 positivos e no Japão, onde 16% da população é positiva para HTLV-1, e a incidência de PM em soropositivos é superior a 30% (OLIVEIRA et al., 2000).

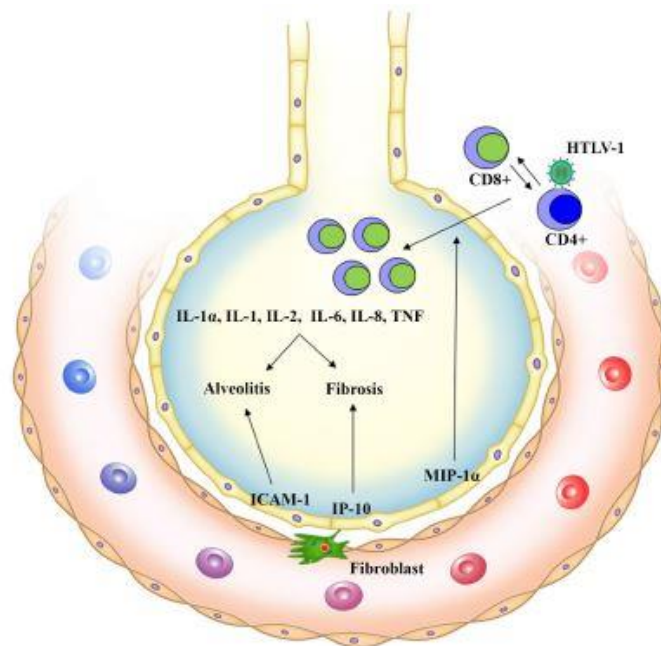
### Tireoidite

As doenças autoimunes da tireoide são o resultado da quebra da autotolerância causada principalmente por fatores genéticos e ambientais. O retrovírus HTLV-1 tem sido implicado como um importante fator ambiental desencadeador destas doenças. Vários mecanismos são propostos para explicar a indução da autoimunidade pela infecção, entretanto, parece que somente três possibilidades seriam importantes entre os indivíduos susceptíveis a desenvolverem doença autoimune da tireoide: (1) infecção direta das células tireoideanas com estímulo de células T e liberação de citocinas, levando à indução do antígeno de classe II do complexo maior de histocompatibilidade (MHC); (2) mimetismo molecular com auto-antígenos e indução de auto-anticorpos e ativação de células T auto-reativas e (3) ativação policlonal de células T, incluindo subpopulações de células T auto-reativas, por um superantígeno endógeno, ou mesmo um organismo infeccioso. A presença das proteínas p19 e gp21 foi detectadas no tecido tireoideano e em tecidos normais de pacientes com doença autoimune da tireoide. Isso pode indicar a expressão genética de sequências do HTLV-1 integradas ao genoma desses indivíduos, ou reação cruzada, causada pela presença de antígenos comuns entre as proteínas p19 e gp21 do HTLV-1 e as células epiteliais foliculares da tireoide, ou talvez mimetismo molecular (FILHO et al., 2000).

### Alveolite e complicações pulmonares

Complicações pulmonares como alveolite e bronquiectasias foram encontradas em indivíduos que desenvolvem HAM/TSP devido à inflamação crônica. O vírus HTLV-1 parece ter um tropismo peculiar em relação aos pulmões, expresso pelas lesões pulmonares encontradas em indivíduos com HAM/TSP. O HTLV-1 causa inflamação persistente em todos os órgãos nos

quais se manifesta. Nos pulmões, a fibrose característica dessas lesões está relacionada à inflamação crônica, levando à ativação de fibroblastos pulmonares. As alterações pulmonares causadas pelo HTLV-1 parecem estar relacionadas à liberação de citocinas (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ ) e quimiocinas (MIP-1 $\alpha$  e IP-10), que danificam os tecidos pulmonares através da infiltração de linfócitos TCD8<sup>+</sup> ativados (Figura 14) com um padrão de resposta imune alterado devido à expressão de Tax e HBZ (DIAS et al., 2018). Outra característica dos distúrbios pulmonares em pacientes com HTLV-1 é a presença de alveolite (alveolite de fibrose criptogênica) e linfocitose (CD4<sup>+</sup> e CD25<sup>+</sup>) (MATSUYAMA et al., 2003). Além disso, indivíduos infectados têm maior suscetibilidade à tuberculose pulmonar, devido a alterações na resposta imune inata, em portadores assintomáticos ou a uma doença oportunista ligada à imunodepressão em indivíduos que desenvolvem ATLL. Diversos estudos reforçam a hipótese de que indivíduos com HTLV-1 estão em maior risco de infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (MARINHO et al., 2005; GRASSI et al., 2016).



**Figura 14.** Representação da inflamação pulmonar induzida pelas células infectadas pelo HTLV-1 (células TCD4<sup>+</sup>, TCD25<sup>+</sup> e epiteliais pulmonares). Recrutadas de quimiocinas MIP-1 $\alpha$  ativa células inflamatórias nos pulmões (células TCD8<sup>+</sup> específicas do HTLV-1) que expressam citocinas inflamatórias (IL-1 $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 e TNF). Há um aumento de IP-10, uma quimiocina que desempenha um papel fundamental na patogênese da fibrose pulmonar. Associado a isso, o ICAM-1 atua facilitando a adesão de neutrófilos às células epiteliais pulmonares e potencializando a inflamação crônica local. O resultado é o desenvolvimento de alveolite e fibrose. Fonte: Dias et al., 2018.

### Uveíte

Clinicamente, a uveíte associada ao HTLV-1 (HAU) é caracterizada por moderada a grave infiltração celular ocular e moderada vasculite retiniana. O achado ocular típico da HAU é uma infiltração dos tecidos oculares, particularmente no corpo vítreo e uma vasculite retiniana moderada (57,4% dos casos), mas pode se apresentar também como uma uveíte anterior (17,6%), uveíte posterior (17%) e panuveíte com lesões retinocoroidianas (exsudatos e hemorragias) (5,1%). A HAU está relacionada com a presença de linfócitos TCD4<sup>+</sup> infectados com o HTLV-1 que produzem uma variedade de citocinas (IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ ) desencadeando a resposta inflamatória. Em particular, a IL-6 é uma citocina multifuncional típica com diversas atividades biológicas, incluindo hemopoiese e resposta de fase aguda (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002). Também foi demonstrado que quantidades significativas de várias citocinas, incluindo TNF $\alpha$ , são produzidas no humor aquoso de pacientes portadores de HAU. Paralelamente, estudos demonstraram que indivíduos que apresentem polimorfismos nas posições -238, -308, -863 e -1031 do gene produtor de TNF $\alpha$  produzem maiores níveis dessa citocina na resposta imune frente a diferentes estímulos (CORDEIRO et al., 2008).

### Artrite reumatoide

Doença inflamatória sistêmica, de caráter crônico e progressivo, de natureza autoimune, que lesa a membrana sinovial, em alguns casos ocasionando destruição dos ossos e cartilagens. Estudos demonstram que o HTLV-1 é um agente capaz de desencadear e perpetuar doenças inflamatórias crônicas, pois os linfócitos parasitados pelo vírus produzem uma maior quantidade de citocinas pró-inflamatórias, que agem estimulando a proliferação das células sinoviais (OZAWA et al., 2012).

### Síndrome de Sjögren

A Síndrome de Sjögren é uma doença autoimune caracterizada pela infiltração por linfócitos T das glândulas salivares e lacrimais, causando a destruição de sua estrutura ductal e secura de mucosas oral e conjuntival. Eventualmente podem ocorrer outros sintomas inflamatórios sistêmicos como pneumonite, vasculite e comprometimento do sistema nervoso central. Vários mecanismos patogênicos foram propostos, incluindo determinantes genéticos, fatores hormonais e infecções virais como hepatite C e outros retrovírus, mas não existem evidências

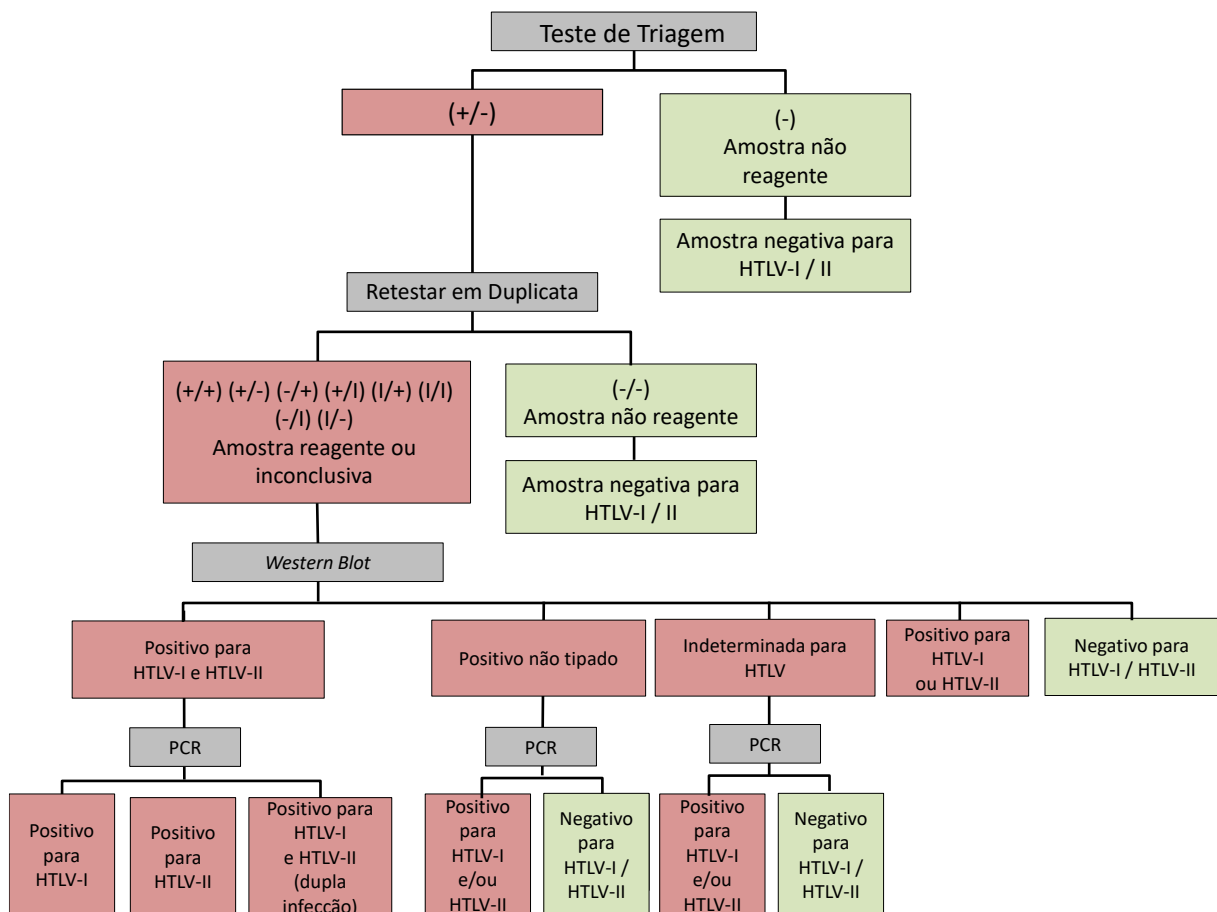
de uma etiologia definitiva. A associação entre HTLV-1 e Síndrome de Sjögren foi descrita por Vernant e cols. (1988) a partir de cinco pacientes das Índias Ocidentais com HAM/TSP e alveolite linfocítica, que preenchiam critérios diagnósticos para a exocrinopatia. Também foi demonstrada uma alta prevalência de anticorpos contra HTLV-1 em pacientes com Síndrome de Sjögren (COULDERC et al., 1995). Autores japoneses (EGUCHI et al., 1992) verificaram o mesmo em áreas endêmicas de seu país, sendo que foram encontrados anticorpos anti-HTLV-1 da classe IgA preferencialmente na saliva de indivíduos com Síndrome de Sjögren, em comparação aos pacientes com outras doenças relacionadas ao HTLV-1 como HAM/TSP (CRUZ et al., 2005).

### ***1.1.7 Diagnóstico do HTLV***

O Japão, em 1986, foi o primeiro país a iniciar a triagem sorológica para o HTLV em serviços de hemoterapia. Já nos EUA, em novembro de 1988, o FDA (*Food and Drug Administration*) recomendou que se fizesse a triagem sorológica para o HTLV em todos os doadores voluntários. No Canadá e nas Ilhas Francesas Caribenhas (Guadalupe, Martinica e Guiana), a triagem sorológica se iniciou em 1989. Na França Continental, o teste tornou-se obrigatório na triagem sorológica em 1991, e na Dinamarca, em 1994, seguidos pela Grécia e Portugal, Inglaterra e o País de Gales, em agosto de 2002. A Suécia, em 1994, iniciou a triagem sorológica universal para doadores de sangue, reviu a conduta em 1995, realizando triagem sorológica unicamente para doadores de primeira vez. A Escócia, em novembro de 2002, implantou a triagem rotineira para HTLV em *mini-pools* (mistura de plasmas de doadores de sangue). Outros países com baixa prevalência para HTLV têm discutido ao longo das décadas a relação custo/benefício da implantação de triagem sorológica para HTLV (LOPES et al., 2008).

No Brasil, a triagem sorológica tornou-se obrigatória em bancos de sangue no ano de 1993, por meio da portaria nº 1.376 do Ministério da Saúde, e desde então o algoritmo para o diagnóstico sofreu diversas adaptações ao longo dos anos, com o objetivo de melhorar o processo. Já em 2008 foi promulgada, pelo Governo de Minas Gerais, a Lei 17.344, que torna obrigatória a realização de testes sorológicos para o diagnóstico da infecção pelo vírus HTLV e o tratamento dos casos identificados.

Atualmente é preconizado pelo Ministério da Saúde que o diagnóstico da infecção pelo HTLV seja feito por meio de duas etapas, sendo uma de triagem, onde são utilizados testes sorológicos que detectam anticorpos contra os diferentes subtipos (HTLV-1 e HTLV-2), não sendo possível a diferenciação entre eles. Se o teste inicial de triagem for reativo, ele deve ser repetido e as amostras com resultados repetidamente reativos devem ser submetidas a testes confirmatórios que possuam maior especificidade e que também possam discriminar entre os subtipos virais (Figura 15). Para essa etapa confirmatória, além de testes sorológicos, também são utilizados testes moleculares, para isso, nos hemocentros brasileiros, segundo instrução da ANVISA, por meio da Resolução da Diretoria Colegiada – RDC 153, de 14 de julho de 2004, emprega-se como teste de triagem sorológica para HTLV-1 e 2 o teste de ELISA e como teste confirmatório o *Western Blot* (ERICHSEN et al., 2009).



**Figura 15.** Algoritmo para o diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV preconizado pelo Ministério da Saúde. Fonte: Adaptado de BRASIL, 2004.

O diagnóstico sorológico da infecção pelo HTLV baseia-se na detecção de anticorpos específicos para as proteínas virais tanto da matriz, capsídeo e nucleocapsídeo (p19, p24, p15) quanto do envelope (gp46 e p21). O principal método utilizado para a triagem sorológica do HTLV é o ensaio imunoenzimático – EIA e/ou ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*), onde os antígenos específicos são adsorvidos a uma placa de poliestireno e a reação é revelada após a incubação do soro do indivíduo e de um conjugado anti-Ig humana marcado com uma enzima (COSTA, 2010).

O EIA/ELISA constitui métodos simples com boa sensibilidade. Os testes de primeira geração usavam na fase sólida apenas o lisado de células infectadas com HTLV-1 purificado. Nos testes de segunda geração, proteínas recombinantes e/ou peptídeos sintéticos do envelope viral foram adicionados como antígenos, aumentando a sensibilidade, principalmente para o HTLV-2 (POIESZ et al., 2000).

Anteriormente também eram utilizadas reações de aglutinação, que são caracterizadas pela utilização de partículas de gelatina e/ou de látex sensibilizadas com antígenos virais inativados. Estas são baseadas no princípio de que as partículas sensibilizadas aglutinam-se na presença de anticorpos anti-HTLV que se encontram no soro ou plasma de indivíduos infectados, porém não são mais tão comumente utilizadas uma vez que podem gerar resultados falso-positivos e não são capazes de discriminar o HTLV-1 do HTLV-2, sendo utilizados preferencialmente, neste caso, os testes EIA/ELISA (FUJINO et al., 1991).

Atualmente tem sido utilizado o método de quimioluminescência (CLIA) para a detecção da infecção pelo HTLV, que se trata de um método totalmente automatizado, simples, sensível, específico, rápido e útil para triagem de anticorpos anti-HTLV-1. Esse método foi desenvolvido por Kamihira e cols. (1992), utilizando antígenos virais parcialmente purificados, revestidos em pequenas esferas de poliestireno, juntamente com anticorpos anti-IgG-humano, marcados com éster de acridínio. Trata-se de um imunoensaio realizado em dois passos para a detecção qualitativa de anticorpos contra o HTLV-1/2 que consiste em uma combinação da amostra e do diluente de ensaio. Uma alíquota da amostra pré-tratada e as micropartículas paramagnéticas revestidas de HTLV-1/2 são combinadas em uma nova célula de reação. Os anticorpos anti-HTLV presentes na amostra ligam-se às micropartículas revestidas de peptídeo sintético de HTLV-1/2 e antígeno recombinante do HTLV-1. Após a lavagem, os conjugados marcados com acridínio ligam-se aos anticorpos anti-HTLV-1/2. Após o ciclo de lavagem, a solução pré-ativadora é adicionada à mistura de reação. A reação

quimioluminescente resultante é medida em unidades de luz relativa (ULR) (MEDEIROS, 2017).

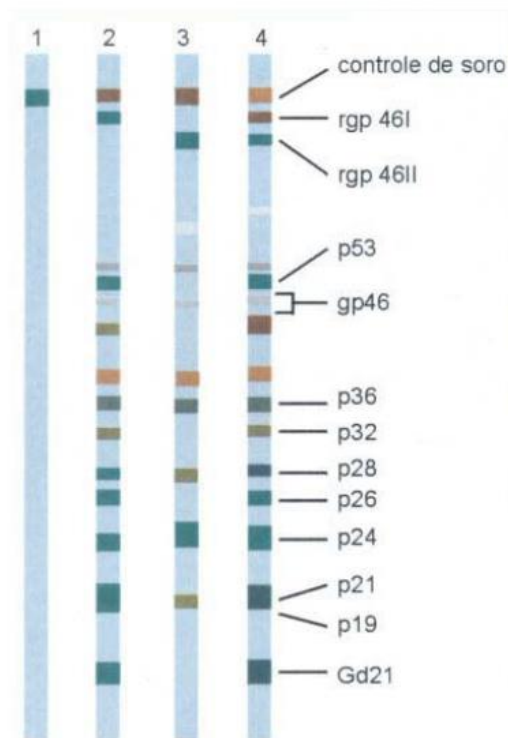
A quimioluminescência (CLIA) tem boa concordância de resultados com os ensaios de imunofluorescência indireta, testes de aglutinação de partículas e imunoenaios enzimáticos, porém oferece vantagens em relação a eles. A CLIA apresenta praticidade de execução e menor variação durante a pipetagem, pois o operador só precisa colocar os tubos nas *racks* de operação, podendo utilizar tubos primários, oriundos da coleta do material, sem precisar de alíquotas. Além disso, os demais reagentes podem ser colocados em *packs*, sem a necessidade de preparo, uma vez que serão adicionados pelo próprio equipamento, além da não utilização de material radioativo e maiores prazos de validade dos produtos, possibilitando um maior aproveitamento. Existe igualmente a possibilidade de execução de mais de um teste para uma mesma amostra, sem a necessidade de permanência por muito tempo dentro do equipamento. Ao contrário do ELISA ou os testes de imunofluorescência, a quimioluminescência é um sistema fechado de análise, ou seja, sistema automatizado, que não permite ao operador interferir nas diferentes etapas do processo (LIMA, 2012). Porém a CLIA não possibilita a tipagem, ou seja, diferenciação da infecção pelo HTLV-1 ou HTLV-2, fazendo-se necessário a aplicação de outros métodos de confirmação e diferenciação de sorotipos.

Para a etapa de confirmação, o teste recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é o *Western Blot* (WB), em que os antígenos virais, obtidos a partir de culturas de células infectadas, são submetidos a uma eletroforese em gel de poliacrilamida, que permite a separação das proteínas virais de acordo com o seu peso molecular. Este material é transferido para um papel de nitrocelulose que, posteriormente, é cortado em tiras. Esta reação é semelhante a um teste de ELISA, pois o soro do indivíduo é incubado juntamente com as tiras que contêm as frações protéicas e, em seguida, é adicionado um conjugado anti-Ig humana, ligado a uma enzima que agirá sobre o seu substrato, precipitando-o após uma reação de oxidação-redução. No final da reação, bandas são visualizadas sobre a fita de nitrocelulose (SABINO et al., 2015).

As bandas normalmente visualizadas nos testes *Western Blot* (WB) são conforme ilustrado na figura 16: **gp46** (gene *env*): proteína recombinante da gp46; **gp46** (gene *env*): proteína de superfície; **Gd21** (gene *pol*): proteína recombinante que corresponde a uma parte da gp21; **gp21** (gene *env*): proteína de transmembrana; **gp24** (gene *gag*): proteína do capsídeo viral; **p19** (gene *gag*): proteína da matriz viral. Conforme pode ser visto na figura, o WB também



possui a característica de tipagem para HTLV-1 e/ou HTLV-2, as proteínas utilizadas para a tipagem do HTLV são a rgp-46-I(para HTLV-1) e a rgp-46-II (para HTLV-2) (MARTINS et al., 2015).



**Figura 16.** Padrões de interpretação do *Western Blot*: Na tira 1, controle negativo; na tira 2, o controle positivo para HTLV-1; na tira 3, o controle positivo para HTLV-2; na tira 4, infecção pelo HTLV-1/2. Fonte: Adaptado de HTLV-I/II, 1998.

Não existe um consenso internacional para a interpretação dos testes de *WB*. A Organização Mundial de Saúde adotou o critério que inclui a reatividade para uma proteína da região gag (p19 e p24) e para uma proteína do envelope viral (gp46 e gp21), para que uma amostra seja considerada positiva. Algumas amostras podem ter resultado positivo no *WB*, sem diferenciação entre o tipo 1 e 2 (positivo não tipado). Quando uma amostra reage com uma das proteínas, porém não completa o critério de positividade, seu resultado é considerado “indeterminado” (CAMPOS, 2016).

Diante de resultados indeterminados, deve-se realizar testes moleculares para a confirmação da infecção pelo HTLV. Conforme descrito anteriormente, o vírus HTLV não apresenta

viremia plasmática, por essa razão o método mais adequado para o diagnóstico molecular é a detecção do provírus por meio da Reação em Cadeia de Polimerase - PCR que está baseada na amplificação exponencial de uma sequência genômica do DNA proviral, denominada de DNA alvo. Essa reação é dependente da presença da enzima Taq DNA polimerase, dos iniciadores ou *primers* e das bases nucleotídicas (A,T,C e G), que são essenciais para a construção das novas cópias do DNA alvo. O produto da reação pode ser observado por eletroforese dos fragmentos amplificados em suporte sólido, como gel de agarose ou poliacrilamida (COSTA, 2010).

A PCR é valiosa na detecção da infecção durante o período compreendido entre a exposição e a soroconversão, na caracterização de amostras não tipadas por sorologia e na resolução dos casos indeterminados nos testes de *Western Blot*, além de ser útil no diagnóstico precoce da transmissão mãe-filho, em crianças até dois anos, uma vez que os testes sorológicos não podem ser indicativos de infecção, por causa da transferência passiva de anticorpos maternos (SABINO et al., 2015).

Com a finalidade de aumentar tanto a sensibilidade como a especificidade, pode-se optar pela Nested PCR, em que é realizada uma segunda amplificação, utilizando como molde o produto da amplificação anterior e um par de *primers* que se situe em posição interna ou flanqueada na sequência do DNA proviral à do par de *primers* consensuais empregados na primeira amplificação. A distinção entre os dois retrovírus pode ser feita tratando-se o produto da Nested PCR com enzimas de restrição, como por exemplo, a *Sau 3A* e a *TaqI* e após digestão pelas enzimas, são obtidos fragmentos que são detectados após eletroforese em gel de agarose, corados com brometo de etídio e analisadas sob luz ultravioleta (GALLEGO et al., 2004).

Ainda pode ser utilizada a PCR em tempo real. Por meio de sondas luminescentes ou utilizando corantes que se ligam à fita dupla de DNA, é possível detectar o produto da PCR durante a sua síntese no próprio aparelho onde a reação de amplificação está acontecendo. Esta tecnologia, além de detectar, pode também quantificar o número de cópias presentes na amostra (LEE et al., 2004; MILEY et al., 2000).

Uma variação desta técnica é a PCR multiplex em tempo real quantitativa, na qual duas ou mais sequências alvo podem ser amplificadas, incluindo-se mais de um par de *primers* no mesmo tubo. Desenvolvida para detectar e quantificar os dois tipos virais, HTLV-1 e HTLV-

2, na mesma reação, tem como vantagem o uso de uma tecnologia que reduz a possibilidade de contaminação cruzada e permite a amplificação de várias amostras na mesma corrida, sem a etapa de pós-amplificação, diminuindo, assim, o tempo gasto e fornecendo bons resultados (ESTES et al., 2003).

## ***2- Justificativa***

Os vírus linfotrópicos de célula T humana (HTLV-1/2) são retrovírus estruturalmente semelhantes, mas estão associados a quadros clínicos diferentes. A infecção pelo HTLV não tem cura, e os indivíduos infectados são, predominantemente, assintomáticos, dificultando o diagnóstico, que apenas é feito após aparecimento dos sintomas de doenças associadas aos vírus. Essas doenças, normalmente, levam a quadros muito graves, com incapacitação física do indivíduo, depressão e até morte. O Brasil possui o maior número de infectados, mas não dispõe de programas efetivos de contenção da transmissão do vírus, e poucos estudos profundos envolvendo o tema são realizados (PEREIRA & MESQUITA, 2015).

Quando os primeiros sintomas da infecção começam a se manifestar, normalmente o paciente já tem idade avançada e, nos poucos casos em que este consegue um diagnóstico da infecção, a profilaxia de transmissão a familiares já é ineficiente e os métodos de tratamento são apenas paliativos e tem apenas o papel de melhorar a qualidade de vida (NASCIMENTO et al., 2012).

O governo brasileiro, por meio da Portaria 1.376, de 1993, do Ministério da Saúde, tornou obrigatório o teste de triagem para HTLV-1/2 em bancos de sangue. Porém, a triagem do HTLV no atendimento primário às DST's ainda é negligenciada, com ineficiência dos serviços de diagnóstico, atendimento e, principalmente, acompanhamento dos pacientes. Em cartilha disponibilizada pelo Governo Federal, por meio do Ministério da Saúde (BRASIL, 2006), o órgão admitiu a problemática, ao afirmar categoricamente que: “não há proposta de triagem de HTLV devido às restrições de acesso ao diagnóstico e tratamento”, e ainda assim, até o momento, no país, apenas doadores de sangue fazem testes de triagem compulsórios, o que dificulta sua identificação, tratamento e contenção da sua transmissão (PEREIRA & MESQUITA, 2015). Apesar disso, ainda não existe um teste padrão ouro para HTLV, todos os testes confirmatórios têm limitações, o que dificulta a orientação do indivíduo reativo (SABINO et al., 2015). Diagnosticar precocemente a infecção pode auxiliar substancialmente na prevenção e tratamento de doenças que têm como agente etiológico o vírus HTLV.

As técnicas preconizadas pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico confirmatório da infecção pelo HTLV foram incluídas no relatório da CONITEC (Comissão Nacional de

Incorporação de Tecnologias no SUS) no ano de 2016. Neste relatório, os membros da comissão deliberaram por recomendar a inclusão das técnicas de *Western Blot* e PCR em tempo real na Tabela do SUS de procedimentos laboratoriais para o diagnóstico de Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto associada ao HTLV-1, uma vez que, por conta da baixa acurácia do teste ELISA, são necessárias outras provas confirmatórias que permitam um diagnóstico preciso da infecção para os pacientes com possibilidade de tratamento, como é o caso dos indivíduos com Leucemia/Linfoma acometidos pelo HTLV-1, permitindo que recebam melhor acompanhamento. Vale ressaltar que os exames de *Western Blot* e PCR em tempo real já eram disponibilizados no SUS para diagnóstico do HIV (CONITEC, 2016).

Porém, além de se realizar a triagem de indivíduos infectados pelo vírus, é necessário que se faça um diagnóstico diferencial entre os tipos 1 e 2, a fim de que os pacientes identificados como portadores do vírus sejam devidamente acompanhados pois, conforme foi dito, as diferentes linhagens do vírus causam complicações distintas. Atualmente as técnicas diagnósticas de tipagem viral capazes de diferenciar essas infecções apresentam alto custo e resultados indeterminados. Portanto, estudos nessa área merecem maior atenção com a finalidade de se desenvolver novas técnicas diagnósticas, menos onerosas e mais eficazes.

Desta forma, torna-se fundamental buscar alternativas para o diagnóstico diferencial da infecção pelo HTLV-1 e 2 em amostras de soro de indivíduos doadores de sangue e para pacientes com resultado prévio de sorologia positiva para HTLV que necessitem de acompanhamento e esclarecimento. Estudos anteriores do nosso grupo tem revelado que a citometria de fluxo pode ser uma metodologia alternativa importante para detecção de imunoglobulinas específicas para o HTLV (COELHO-DOS-REIS et al., 2009 e 2017) e ainda para outras doenças infecciosas de importância para saúde pública (ZACCHE-TONINI et al., 2017; JESUS et al., 2016; TEIXEIRA-CARVALHO et al., 2015; ALESSIO et al., 2014; WENDLING et al., 2011; PISSINATE et al., 2008; VITELLI-AVELAR et al., 2007). Assim, considerando o potencial da detecção da reatividade de imunoglobulinas séricas por imunofluorescência indireta por citometria de fluxo, aplicada ao diagnóstico de doenças infecciosas, esta técnica foi empregada no presente trabalho, que teve como foco principal o desenvolvimento de uma metodologia baseada em citometria de fluxo, em plataforma única, com um sistema competitivo, para o diagnóstico universal e diferencial da infecção crônica pelo HTLV-1, assim como o prognóstico da infecção com HTLV-1 quanto ao desenvolvimento de doenças associadas ao vírus.

### **3- Objetivos**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Desenvolver um novo método sorológico [**FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2)**] para o diagnóstico diferencial da infecção humana pelo HTLV-1/2 empregando plataforma única para pesquisa de anticorpos IgG1 por citometria de fluxo.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

1. Estabelecer um protocolo de marcação fluorescente diferencial de linhagens celulares infectadas pelo HTLV-1 (MT-2) e HTLV-2 (MoT) para análise seletiva simultânea empregando plataforma única por citometria de fluxo;
2. Estabelecer um protocolo para a avaliação da reatividade de anticorpos IgG1 anti-HTLV-1/2 em amostras de soro de indivíduos infectados pelo HTLV-1/2 e doadores saudáveis, empregando a metodologia FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2);
3. Determinar a estabilidade da marcação fluorescente diferencial e da antigenicidade das linhagens celulares MT-2 e MoT em diferentes condições (TA, 4°C e -20°C) e tempos (2, 6 e 12 meses) de armazenamento;
4. Avaliar o desempenho da metodologia FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2) para o diagnóstico universal e diferencial da infecção humana pelo HTLV-1/2;
5. Estabelecer um algoritmo de decisão para o diagnóstico diferencial da infecção humana pelo HTLV-1/2 empregando a metodologia FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2);
6. Avaliar o desempenho da metodologia FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2) para o prognóstico da infecção humana pelo HTLV-1/2.

## ***4- Material e Métodos***

### ***4.1 População de estudo***

De acordo com os critérios de inclusão e exclusão mencionados abaixo, um total de 63 voluntários foi selecionado para o desenvolvimento do estudo, categorizado em três grupos distintos, incluindo: 1) indivíduos não infectados (NI, n=15) = doadores de sangue da Fundação Hemominas com sorologia negativa para doenças infecciosas avaliadas na triagem sorológica pré-doação e considerados saudáveis; 2) indivíduos infectados pelo HTLV-1 (n=27) e 3) indivíduos infectados pelo HTLV-2 (n=21). Adicionalmente o grupo HTLV-1 foi subdividido em três subgrupos de acordo com a manifestação clínica da infecção, incluindo: i) casos de infecção assintomática (HAC, n=9); ii) pacientes com quadro clínico sugestivo de HAM, mas que não preenchem todos os requisitos das escalas internacionais (pHAM, n=9) e iii) pacientes com quadro clínico de HAM/TSP (HAM, n=9). A avaliação clínica dos pacientes do grupo HTLV-1 foi realizada pela equipe médica vinculada ao Grupo Interdisciplinar de Pesquisas em HTLV (GIPH) da fundação Hemominas, segundo anamnese, exame físico e avaliações neurológicas complementares.

***Critérios de Inclusão:*** Indivíduos adultos entre 18 e 75 anos, não infectados, monoinfectados pelo HTLV-1, monoinfectados pelo HTLV-2.

***Critérios de Exclusão:*** Pacientes com deficiência mental, pacientes em uso de corticosteróides ou fármacos imunossupressores.

Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Apêndice 1), uma alíquota de 5mL de sangue periférico foi coletada de cada voluntário em tubo sem anticoagulante para a obtenção de amostras de soro por centrifugação a 3000rpm por 15min, a 4°C. Alíquotas de 500µL de soro foram armazenadas a -80°C até o momento do uso.

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto René Rachou – Fiocruz/MG (IRR), sob o parecer de nº 1.047.847 (Apêndice 2), conforme a resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, que trata das diretrizes e normas de pesquisas envolvendo seres humanos.

## **4.2 Protocolo Operacional da metodologia FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2)**

### **4.2.1 Suportes Antigênicos - Linhagens celulares de cultivo contínuo**

Como suportes antigênicos para a metodologia FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2) foram empregadas linhagens celulares de cultivo contínuo incluindo: **MT-2**, permanentemente infectada pelo HTLV-1 e **MoT**, permanentemente infectada pelo HTLV-2. A linhagem celular MT-2 se originou da co-cultura de células de um paciente com Leucemia/Linfoma de células T do adulto (ATLL) com linfócitos do cordão umbilical (YOSHIDA et al., 1984). Essa linhagem contém o HTLV-1 na forma de próvirus integrado ao genoma celular. A linhagem celular MoT originou-se do cultivo contínuo de células T obtidas de um paciente com tricoleucemia (leucemia de células pilosas) e é permanentemente infectada com o vírus HTLV-2 (KALYANARAMAN et al., 1982). A linhagem MT-2 foi cedida pelo Laboratório de Reativos para Diagnósticos de Bio-manguinhos – Fiocruz/RJ, e a linhagem MoT cedida pelo *National Institute of Health* (NIH, USA).

### **4.2.2 Cultivo in vitro das linhagens celulares MT-2 e MoT**

Alíquotas das linhagens MT-2 e MoT criopreservadas, mantidas em biorrepositório no Laboratório de Virologia Básica e Aplicada do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, foram descongeladas e semeadas em garrafas de cultura de tecido de 75cm<sup>2</sup> contendo meio RPMI suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino - SFB numa proporção aproximada de 1x10<sup>6</sup> céls/mL. As culturas foram mantidas em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de umidade por passagens semanais a cada 72h. A cada passagem foi realizada a avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de *Trypan Blue*, utilizando contador automático de células (Countess<sup>®</sup>, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). As culturas em fase *log* de crescimento foram expandidas para a obtenção de lotes com elevado quantitativo necessário para a realização de baterias de ensaios. Para tal, as culturas foram homogeneizadas com auxílio de pipetador automático para obtenção de uma suspensão de células individualizadas e posterior centrifugação a 200rpm, por 10min para a eliminação dos grumos celulares. As células individualizadas foram recuperadas no sobrenadante e lavadas duas vezes com PBS-0,5% de SFB por centrifugação a 1.300rpm por 10min. As suspensões celulares finais foram ajustadas para 1,0x10<sup>6</sup> células/mL em PBS.



#### 4.2.3 Protocolo de Fixação e Fixação/Permeabilização

As suspensões de células MT-2 e MoT, individualizadas, foram submetidas ao protocolo de fixação (**FIX**) segundo proposto por Coelho-dos-Reis e cols. (2017), com pequenas alterações, conforme descrito a seguir: Alíquotas das suspensões celulares individualizadas ( $1,0 \times 10^6$  células/mL em PBS) foram misturadas a igual volume de solução fixadora para citometria de fluxo (MFF, 10g/L de paraformaldeído; 10,2g/L de cacodilato de sódio; 6,63g/L de cloreto de sódio, pH 7.2) e incubadas *overnight* a 4°C. As suspensões de células individualizadas fixadas foram lavadas com PBS por centrifugação a 1.300rpm por 10min e mantidas a 4°C até o momento do uso no protocolo **FIX**.

Paralelamente, alíquotas das suspensões de células individualizadas fixadas foram adicionalmente submetidas ao protocolo de permeabilização (**FIX&Perm**), segundo proposto por Coelho-dos-Reis e cols. (2017). Para tal, alíquotas das suspensões celulares pré-fixadas ( $1,0 \times 10^6$  células/mL em PBS) foram submetidas à centrifugação a 1.300rpm por 10min e ressuspendidas em igual volume de PBS-0,5% de soroalbumina bovina, 0,1% de azida, suplementado com 0,5% de saponina (PBS-P). As suspensões celulares foram incubadas por 10min à temperatura ambiente. Em seguida as células fixadas e permeabilizadas foram lavadas com PBS-0,5% de soroalbumina bovina, 0,1% de azida, por centrifugação a 1.300rpm por 10min e mantidas a 4°C até o momento do uso no protocolo **FIX&Perm**. Ao final de cada etapa de fixação ou fixação/permeabilização os perfis morfométricos das linhagens celulares foram avaliados no citômetro de fluxo, como controle de qualidade, utilizando os parâmetros de tamanho (FSC - *Forward Scatter*) e granulosidade (SSC - *Side Scatter*).

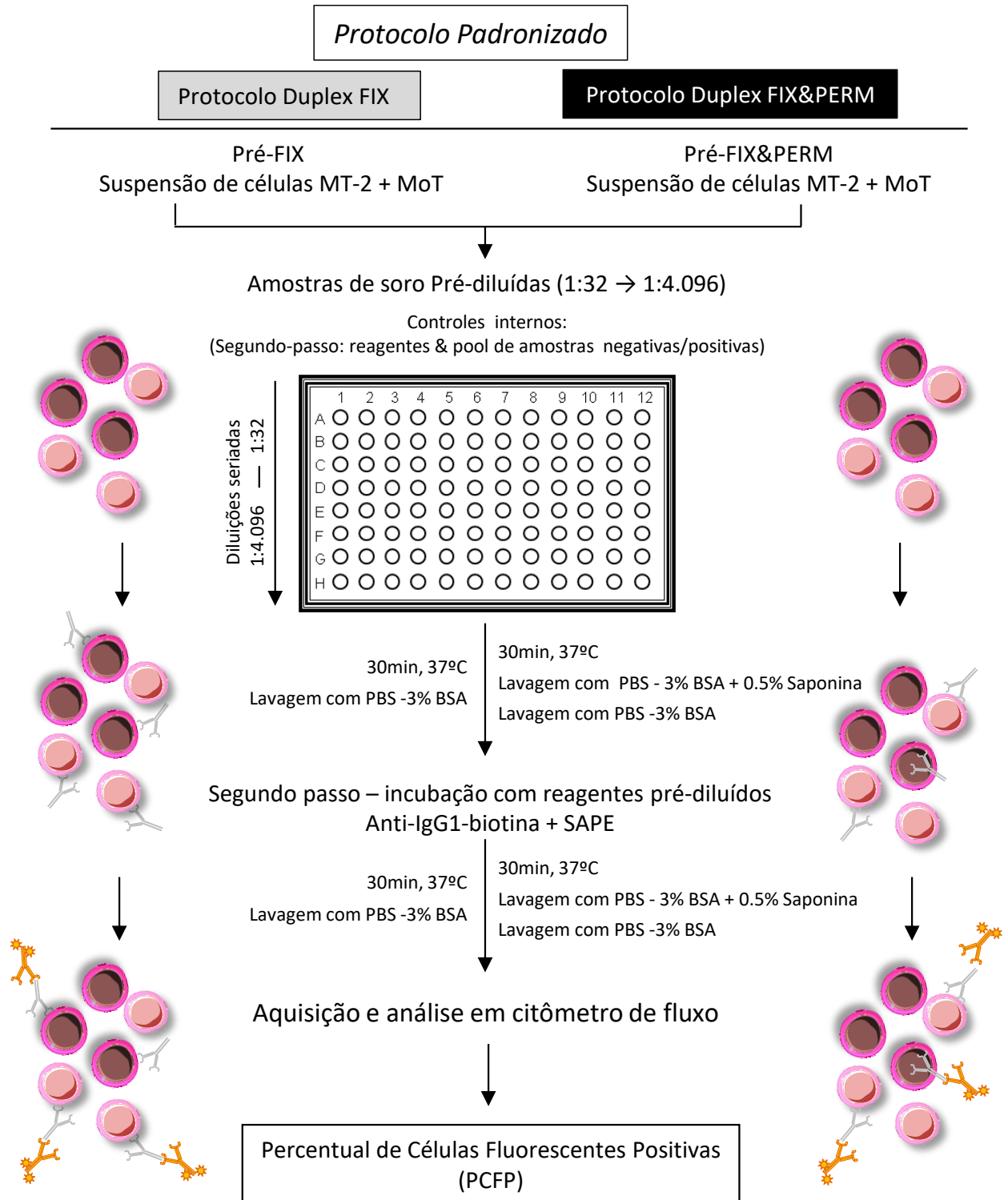
#### 4.2.4 Protocolo de marcação fluorescente diferencial de linhagens celulares MT-2 e MoT

As linhagens celulares de MT-2 e MoT empregadas nos protocolos **FIX** e **FIX&Perm** foram previamente submetidas a um protocolo de marcação diferencial empregando concentrações distintas de isotiocinato de fluoresceína (FITC) ou Alexa Flúor-647. Para tal, alíquotas de células fixadas ou fixadas/permeabilizadas ( $1,0 \times 10^6$  células/mL em PBS) foram incubadas por 30min, a 37°C com FITC, nas concentrações finais de 0,001µg/mL para MT-2 e 0,01µg/mL para MoT ou Alexa Flúor-647 nas concentrações finais de 0,002 µg/mL para MT-2 e 0,04µg/mL para MoT. Ao final da incubação as suspensões celulares foram lavadas com PBS, por centrifugação a 1.300rpm por 10min e mantidas a 4°C até o momento do uso nos

protocolos **FIX** ou **FIX&Perm**. Ao final de cada etapa de marcação os perfis fluorométricos das linhagens celulares foram avaliados no citômetro de fluxo, como controle de qualidade, utilizando os parâmetros de FL1 (FITC) e FL4 (Alexa Flúor-647). No momento do uso, misturas 1:1 das linhagens celulares MT-2 e MoT, marcadas com FITC ou Alexa Flúor-647, foram preparadas e a proporção avaliada no citômetro de fluxo, como controle de qualidade, utilizando os parâmetros de FL1 (FITC) e FL4 (Alexa Flúor-647).

#### *4.2.5 Protocolo padrão para avaliação da reatividade de anticorpos IgG1 anti-HTLV-1/2 empregando a metodologia FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2)*

Numa etapa pré-analítica, alíquotas de soro, mantidas no biorrepositório do Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores (GIPB) da Fiocruz-Minas, foram descongeladas, inativadas a 56°C por 30min e centrifugadas a 14.000rpm, a 4°C por 5min para remoção de partículas. Em placas de 96 poços com fundo em “U” (Nunc, Roskilde, Denmark), alíquotas de 50µL de soro foram submetidas à diluição seriada (1:32 a 1:4.096) em PBS-3% SFB. Em seguida, a cada poço, foram adicionados 50µL da mistura de células MT-2 e MoT ( $5 \times 10^4$  células/poço), previamente fixadas e/ou permeabilizadas e marcadas com concentrações distintas de fluorocromo. A placa foi homogeneizada com movimentos circulares e incubada a 37°C por 30min. Após a incubação as células foram lavadas 2 vezes, inicialmente com 100µL e subsequentemente com 150µL de PBS-3% SFB, por centrifugação a 1.300rpm, 4°C, por 10min. Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado, o sedimento homogeneizado e a cada poço foram adicionados 50µL do anticorpo secundário anti-IgG1 humano biotilado, previamente diluído 1:6.400 e 10µL de SAPE diluído 1:400, empregando PBS-3% SFB para o protocolo **FIX** e PBS-P para o protocolo **FIX&Perm**. As placas foram incubadas a 37°C por 30min e em seguida as células foram lavadas duas vezes como descrito acima. Após a centrifugação o sobrenadante foi desprezado, o sedimento homogeneizado e a cada poço foram adicionados 200µL de MFF. As placas foram mantidas a 4°C, ao abrigo de luz, até o momento da leitura no citômetro de fluxo, por um tempo máximo de 24h. Para cada ensaio foi realizado um controle interno de ligação inespecífica dos reagentes secundários, no qual as células foram incubadas na ausência de soro humano, porém na presença do anticorpo secundário anti-IgG1 humano biotilado e SAPE. O protocolo operacional padrão, empregando suporte antigênico MT-2 e MoT após marcação diferencial com Alexa Flúor-647 encontra-se ilustrado em representação esquemática na figura 17.



**Figura 17.** Representação esquemática do protocolo operacional padrão para execução da metodologia FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2) – protocolos **FIX** e **FIX&Perm**.

#### 4.2.6 Leitura das amostras no Citômetro de Fluxo

A leitura das amostras foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur equipado com laser de argônio (488nm) e laser de HeNe (633nm), empregando ajustes previamente definidos para os parâmetros de tamanho, granulosidade e fluorescências, conforme descrito a seguir: os ganhos de tamanho - *Forward Scatter* (FSC) e granulosidade - *Side Scatter* (SSC) foram empregados em escala linear (FSC= E00; SSC= 300), mantendo o eliminador de “*debris*” (threshold) posicionado no parâmetro tamanho com ganho de 200, para minimizar a interferência de ruído durante a leitura. Os ganhos de fluorescência (FL1, FL2 e FL4) foram mantidos em escala *log*, empregando os ajustes obtidos durante a calibração do citômetro empregando o kit CaliBrite® (BD Biosciences). Os sistemas de compensação das fluorescências foram acionados para eliminar a sobreposição da emissão de luz por diferentes fluorocromos no mesmo comprimento de onda, principalmente no que se refere à fluorescência FL1 *versus* FL2 excitadas pelo laser de argônio. Um total de 10.000 eventos foi lido para cada amostra empregando o software CellQuest® para a aquisição e armazenamento de dados.

#### 4.2.7 Análise da reatividade de anticorpos IgG1 anti-HTLV-1/2

A análise da reatividade de anticorpos IgG1 anti-HTLV-1/2 foi feita a partir da seleção das populações celulares de interesse, utilizando gráficos bidimensionais de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC), seguida por estratégias de seleção das linhagens MT-2 e MoT. As fluorescências FL1 e FL4 foram empregadas como parâmetros de segregação das linhagens celulares previamente marcadas com concentrações distintas de fluorocromos FITC e Alexa Flúor-647. Na Estratégia #1, foram empregados gráficos bidimensionais de intensidade de fluorescência FL3 (Canal Vazio-VOID) *versus* FL1 (FITC) ou FL4 (Alexa Flúor-647). Na Estratégia #2, foram empregados histogramas unidimensionais de fluorescência FL1 ou FL4 em função do número de células. Uma vez selecionadas as linhagens celulares de interesse, foram construídos histogramas unidimensionais de fluorescência FL2, empregada como repórter, para avaliar a magnitude de sinal do reagente secundário (SAPE), proporcional à reatividade de anticorpos IgG1 anti-HTLV-1/2. Os resultados de reatividade foram estimados como percentual de células fluorescentes positivas (PCFP), posicionando um marcador de limiar de positividade para o controle interno da

reação, estabelecido para obter o máximo 2% de PCFP (ligação inespecífica dos reagentes secundários anti-IgG1 humano biotilado e SAPE). Em seguida, empregando-se o mesmo marcador, foram obtidos os valores de PCFP para todas as diluições das amostras teste. Todas as análises foram realizadas empregando o software *FlowJo* 10.0.1 (TreeStar, San Diego, CA, USA).

#### ***4.3 Avaliação da estabilidade da marcação fluorescente diferencial e da antigenicidade das linhagens celulares MT-2 e MoT em diferentes condições e tempos de armazenamento***

A estabilidade da marcação fluorescente diferencial e da antigenicidade das linhagens celulares MT-2 e MoT foram empregadas como critério de controle de qualidade da metodologia proposta. Para tal, alíquotas de células MT-2 e MoT, previamente submetidas aos protocolos de fixação ou fixação/permeabilização e marcadas com diferentes concentrações de Alexa Fluóor-647, foram mantidas em diferentes temperaturas (temperatura ambiente - TA, 4°C e -20°C) e tempos (2, 6 e 12 meses) de armazenamento. Ao término de cada período de armazenamento as alíquotas foram descongeladas, a mistura MT-2/MoT na proporção 1:1 preparada, e foram avaliados, no ensaio de imunofluorescência por citometria de fluxo, conforme descrito no item 4.2.7, tanto o perfil fluorométrico de marcação diferencial quanto a antigenicidade.

#### ***4.4 Avaliação do desempenho da metodologia FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2) para os diagnósticos universal e diferencial da infecção humana pelo HTLV-1/2***

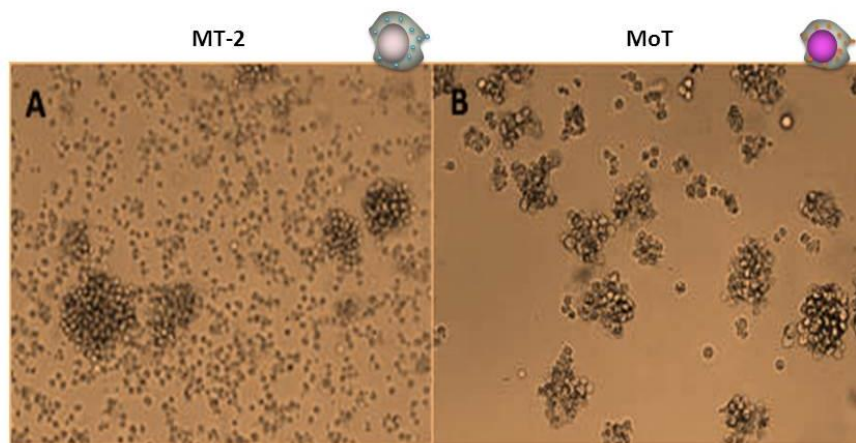
Para avaliar a aplicabilidade da metodologia do FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2) para o diagnóstico universal e diferencial da infecção humana pelo HTLV-1 e HTLV-2, empregando os protocolos **FIX** e **FIX&Perm**, foram construídas curvas de reatividade ao longo de diluições seriadas (1:32 a 1:4.096) das amostras de soros dos grupos NI *versus* HTLV-1/2 bem como HTLV-1 *versus* HTLV-2, respectivamente. Para a avaliação do desempenho da metodologia em ambos os protocolos, foram utilizadas como ferramentas estatísticas as curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic Curve*) no intuito de avaliar a acurácia global do método aplicado e o ponto de corte associado ao menor número de resultados incorretos, e TG-ROC (*Two-Graph-ROC*) que possibilita a visualização de uma ampla faixa de valores de

ponto de corte para sensibilidade e especificidade (GREINER et al., 1995; MARTINEZ et al., 2003 e 2008). O desempenho da metodologia FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2), empregando os protocolos **FIX** e **FIX&Perm**, foi avaliado segundo os índices expressos em porcentagem e em chance. Os índices expressos em porcentagem incluirão a Sensibilidade ou Co-positividade =  $[\text{verdadeiros positivos} / \text{verdadeiros positivos} + \text{falsos negativos}] \times 100$ ; Especificidade ou Co-negatividade =  $[\text{verdadeiros negativos} / \text{verdadeiros negativos} + \text{falsos positivos}] \times 100$ ; Valor preditivo positivo – VPP =  $[\text{verdadeiros positivos} / \text{total de positivos}] \times 100$ ; Valor preditivo negativo – VPN =  $[\text{verdadeiros negativos} / \text{total de negativos}] \times 100$ ; Probabilidade de infecção/doença pós-teste negativo =  $[1 - (\text{verdadeiros negativos} / \text{total de negativos})] \times 100$ ; Eficiência =  $(\text{prevalência da amostra} \times \text{Sensibilidade}) + (1 - \text{prevalência da amostra})$  (VIEIRA, 2015; GREINER et al., 1995). O software MedCalc, versão 7.3.0.0 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Flandres Ocidental, BE) foi empregado para a análise de desempenho. O programa Prisma GraphPad, versão 5.0 (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, EUA) foi empregado para a construção dos gráficos de dispersão, das curvas ROC e TG-ROC.

## 5- Resultados

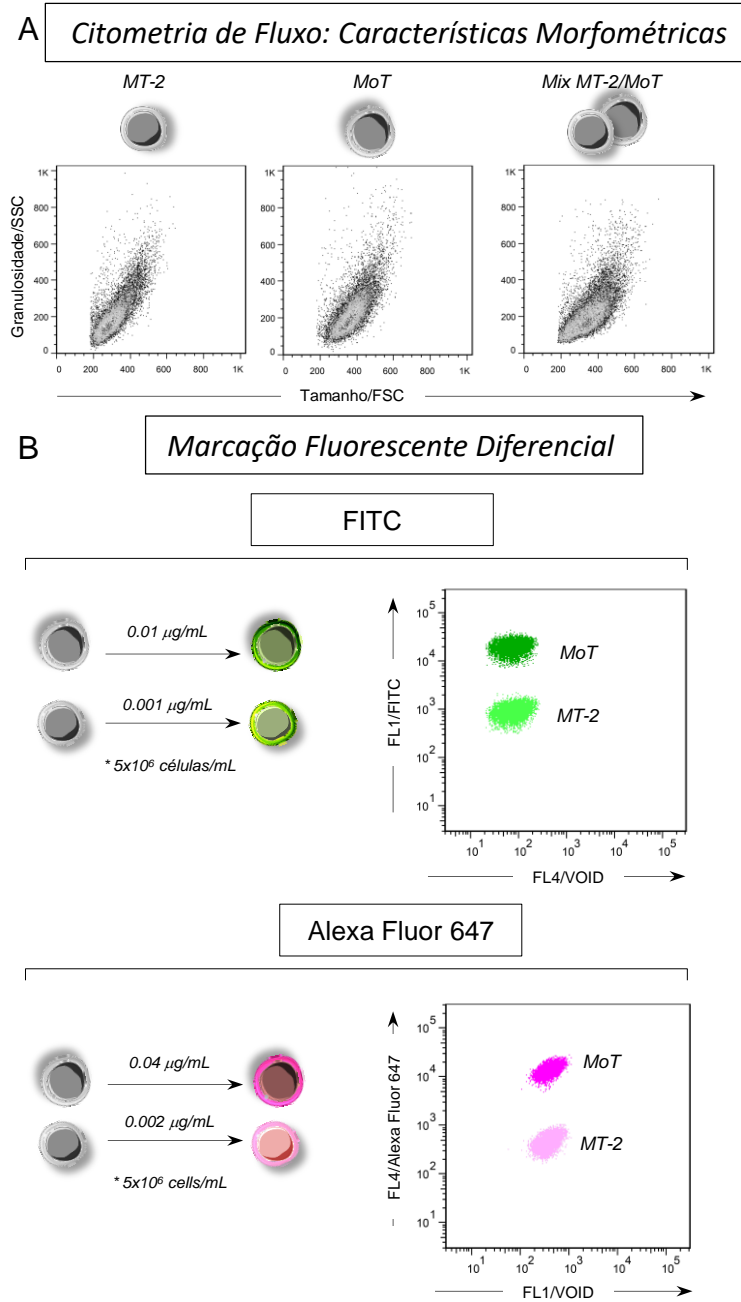
### 5.1 Análise de marcação fluorescente diferencial de linhagens celulares infectadas pelo HTLV-1 (MT-2) e HTLV-2 (MoT) por citometria de fluxo

O cultivo das linhagens celulares MT-2 e MoT foi realizado com êxito, conforme demonstrado na figura 18. Foi possível observar o contínuo crescimento da cultura em cada passagem semanal. Para que fosse possível realizar os ensaios de reatividade sorológica foram necessárias 50.000 células ( $5 \times 10^4$ ) de cada linhagem celular para cada amostra de soro analisada, totalizando 100.000 células (Mix de MT-2 e MoT) em cada ensaio.



**Figura 18.** Cultura das linhagens celulares (A) MT-2 e B (MoT).

As linhagens celulares lidas no citômetro de fluxo sem nenhum protocolo de marcação apresentaram sobreposição nos gráficos de tamanho *versus* granulosidade, como pode ser visto na figura 19A, isso se deve aos seus perfis morfométricos similares resultantes da homologia existente entre elas. Como não foi possível diferenciar as linhagens MT-2 e MoT por esses parâmetros, utilizou-se a estratégia metodológica de marcação diferencial com os fluorocromos FITC e Alexa Flúor-647.



**Figura 19.** (A) Linhagens celulares MT-2 e MoT lidas no citômetro de fluxo sem nenhum protocolo de marcação. Pode-se observar uma sobreposição nos gráficos de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (SSC). (B) Linhagens celulares MT-2 e MoT submetidas à marcação fluorescente diferencial, utilizando fluorocromos FITC e Alexa Flúor-647 em diferentes concentrações.

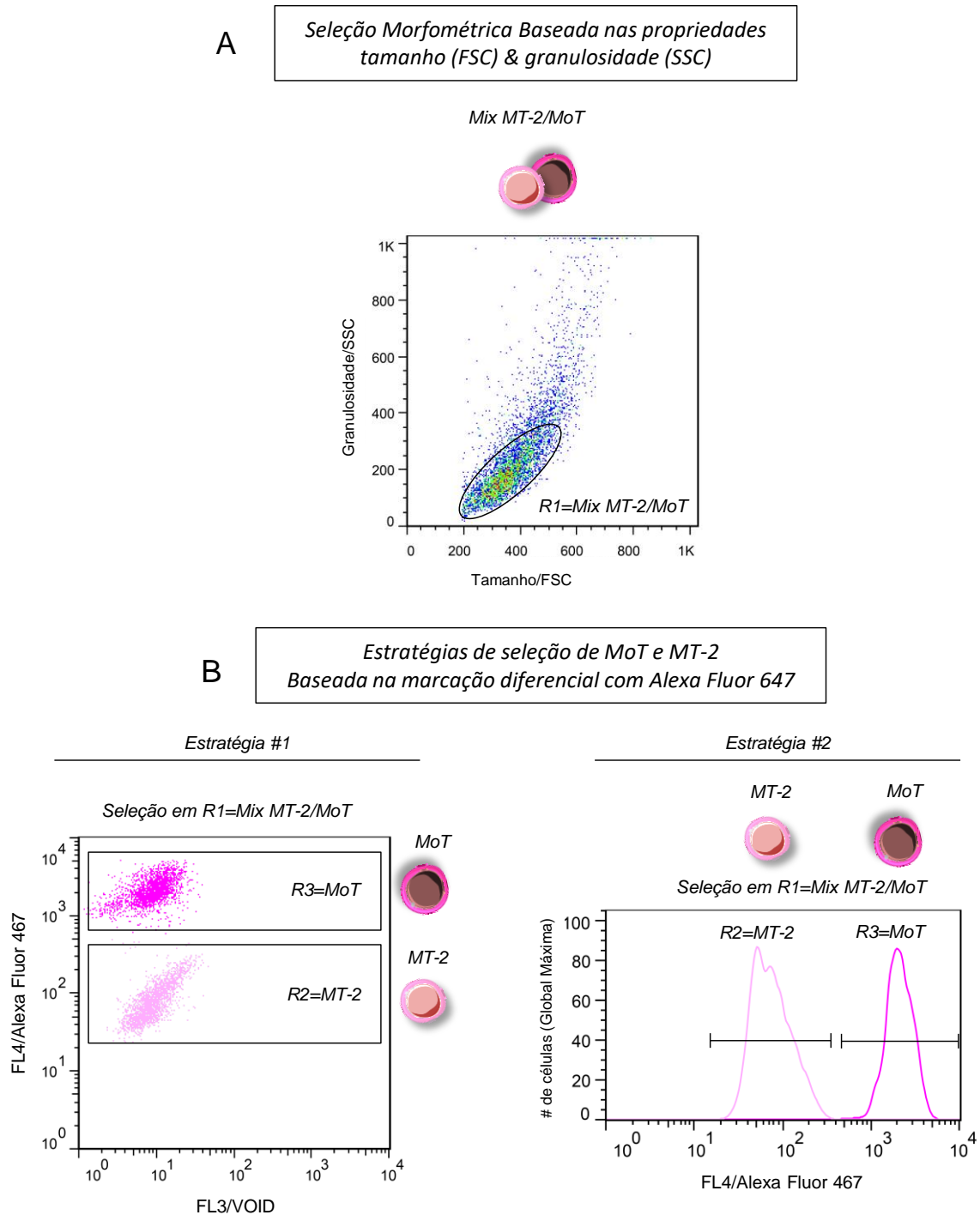
Em todas as configurações das marcações realizadas, tanto no protocolo **FIX**, quanto no **FIX&Perm**, utilizando marcação fluorescente diferencial, foi verificado que é possível diferenciar as linhagens MT-2 e MoT, como pode ser observado na figura 19B, porém com base nos resultados obtidos, o fluorocromo FITC não seria ideal para os ensaios, uma vez que foi observada uma autofluorescência da linhagem MT-2 que pode ser identificada no mesmo



espectro de emissão de luz do fluorocromo FITC, o que superestimaria os dados de intensidade média de fluorescência (IMF) desta linhagem celular. Além disso, para o ensaio sorológico, a estratégia para a revelação da reatividade de IgG1 anti-HTLV-1/2 propõe o emprego do conjugado de anticorpos anti-IgG1 + biontina com estreptoavidina-ficoeritrina (SAPE), tendo o fluorocromo PE, em citometria, um espectro de emissão de luz na cor laranja que é lido no mesmo espectro de emissão de luz do fluorocromo FITC. Portanto, o fluorocromo Alexa Flúor-647 demonstrou melhor desempenho para diferenciar as linhagens celulares, apresentando maior segregação por intensidade média de fluorescência - IMF, e nenhuma interferência na fluorescência repórter, sendo o fluorocromo de escolha para as etapas posteriores do ensaio.

### ***5.2 Avaliação da reatividade de anticorpos IgG1 anti-HTLV-1/2 em amostras de soro de indivíduos infectados pelo HTLV-1/2 por FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2)***

A análise da reatividade de anticorpos IgG1 anti-HTLV-1/2 foi feita a partir da seleção das populações celulares de interesse. Com os ganhos de FSC (*Forward Scatter*) e SSC (*Side Scatter*) empregados na escala linear, foi possível selecionar as duas populações celulares em R1=Mix MT-2/MoT, conforme pode ser observado na figura 20A. Utilizando a marcação diferencial de Alexa Flúor-647, foi possível fazer a seleção das populações celulares de acordo com a intensidade média de fluorescência – IMF, selecionando R2=MT-2 e R3=MoT, utilizando duas estratégias distintas, como pode ser observado na figura 20B.



**Figura 20.** Estratégias de seleção de MoT e MT-2. (A) Seleção morfométrica baseada nas propriedades de tamanho (FSC) e granulidade (SSC). (B) Estratégias de seleção de MoT e MT-2, baseada na marcação diferencial com Alexa Fluó-647, seleção de R1=MT-2/MoT, R2=MT-2 e R3=MoT.

O percentual de células fluorescentes positivas (PCFP) para cada amostra foi avaliado para se identificar o limiar de negatividade em função da curva de fluorescência obtida para o controle da ligação do conjugado.

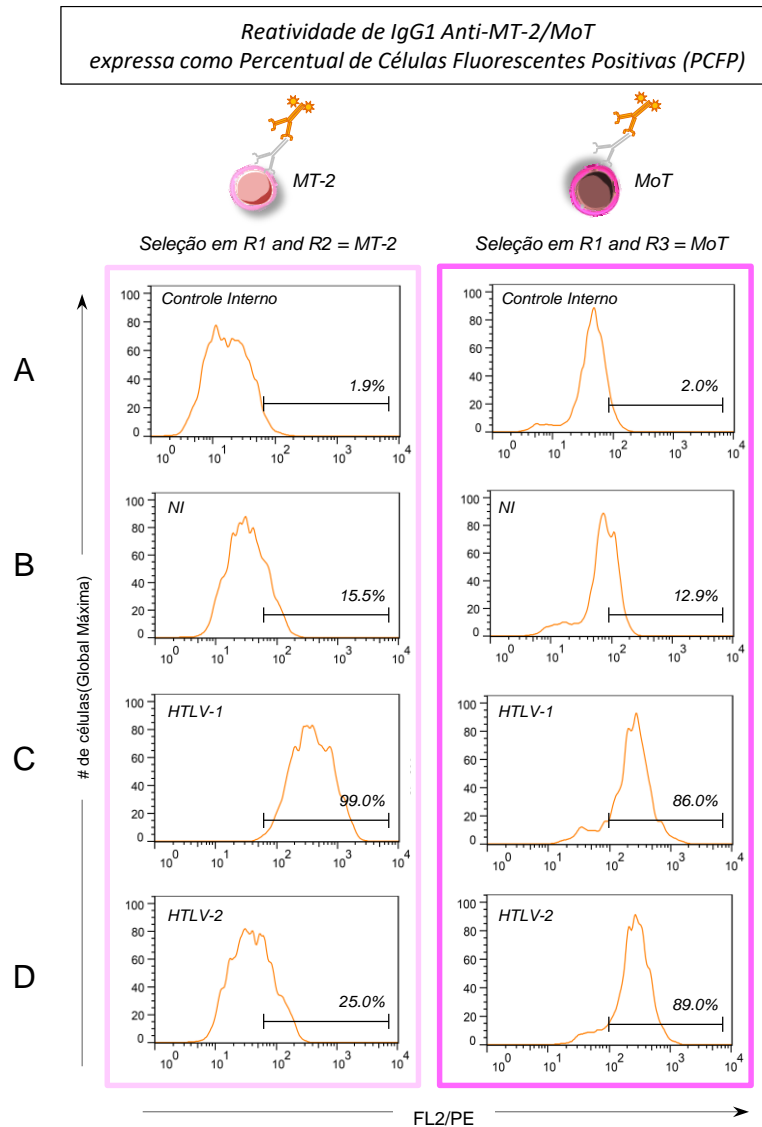
Quando avaliada a reatividade obtida nas amostras utilizadas como controle interno, pôde-se identificar que o limiar de negatividade para MT-2 foi de 1,9% e para MoT foi de 2,0% (Figura 21A).

Definido este limiar de negatividade, seguiu-se com a avaliação nas amostras de indivíduos não infectados (NI), o que permitiu constatar que há uma reatividade de 15,5% para MT-2 e 12,9% para MoT (Figura 21B).

Quando avaliadas as amostras de indivíduos sabidamente infectados por HTLV-1 foi identificada uma reatividade de 99% para MT-2 e 86% para MoT, demonstrando que os anticorpos IgG1 anti-HTLV-1 possuem uma reatividade de 86% com o suporte antigênico para HTLV-2 (MoT) (Figura 21C).

E finalmente, para as amostras de indivíduos sabidamente infectados por HTLV-2 houve uma reatividade de 25% para MT-2 e 89% para MoT, demonstrando que amostras de indivíduos HTLV-2 tem uma reatividade com MT-2, pequena quando comparada com a reatividade com MoT (Figura 21D).

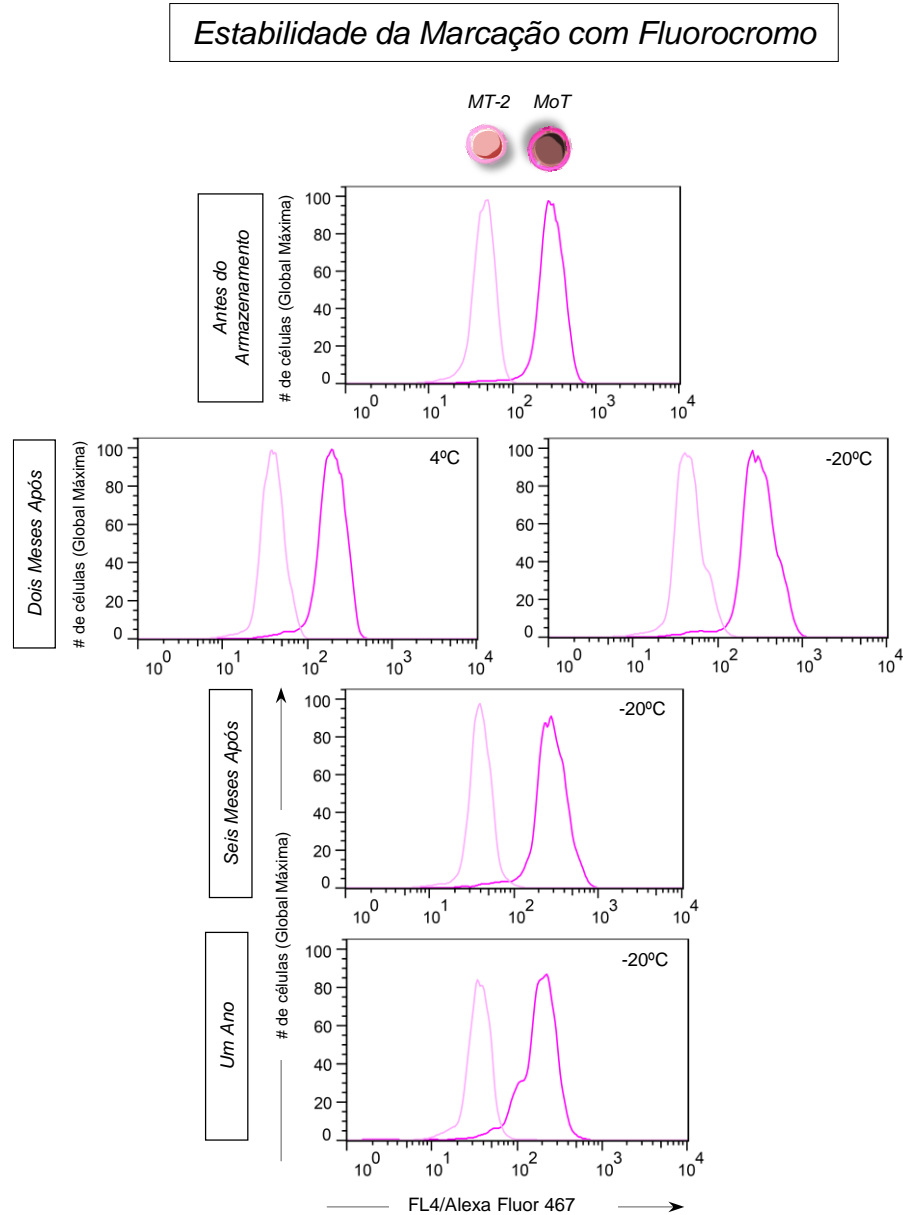
Isso reafirma que anticorpos anti-HTLV-1 tem uma reatividade alta com amostras sabidamente infectadas com HTLV-2, o que explica os casos de resultados indeterminados encontrados nas metodologias sorológicas disponíveis para o diagnóstico diferencial da infecção humana pelo HTLV-1/2, fazendo-se necessário o desenvolvimento de uma metodologia que seja capaz de eliminar, ou ao menos reduzir, a interferência dessa reatividade.



**Figura 21.** Reatividade de IgG1 anti-MT-2/MoT expressa como Percentual de Células Fluorescentes Positivas (PCFP) em histogramas de fluorescência em FL2. (A) Limiar de negatividade: MT-2=1,9% e MoT=2,0% (B) NI versus MT-2=15,5% e NI versus MoT=12,9% (C) HTLV-1 versus MT-2=99,0% e HTLV-1 versus MoT=86,0% (D) HTLV-2 versus MT-2=25,0% e HTLV-2 versus MoT=89,0%.

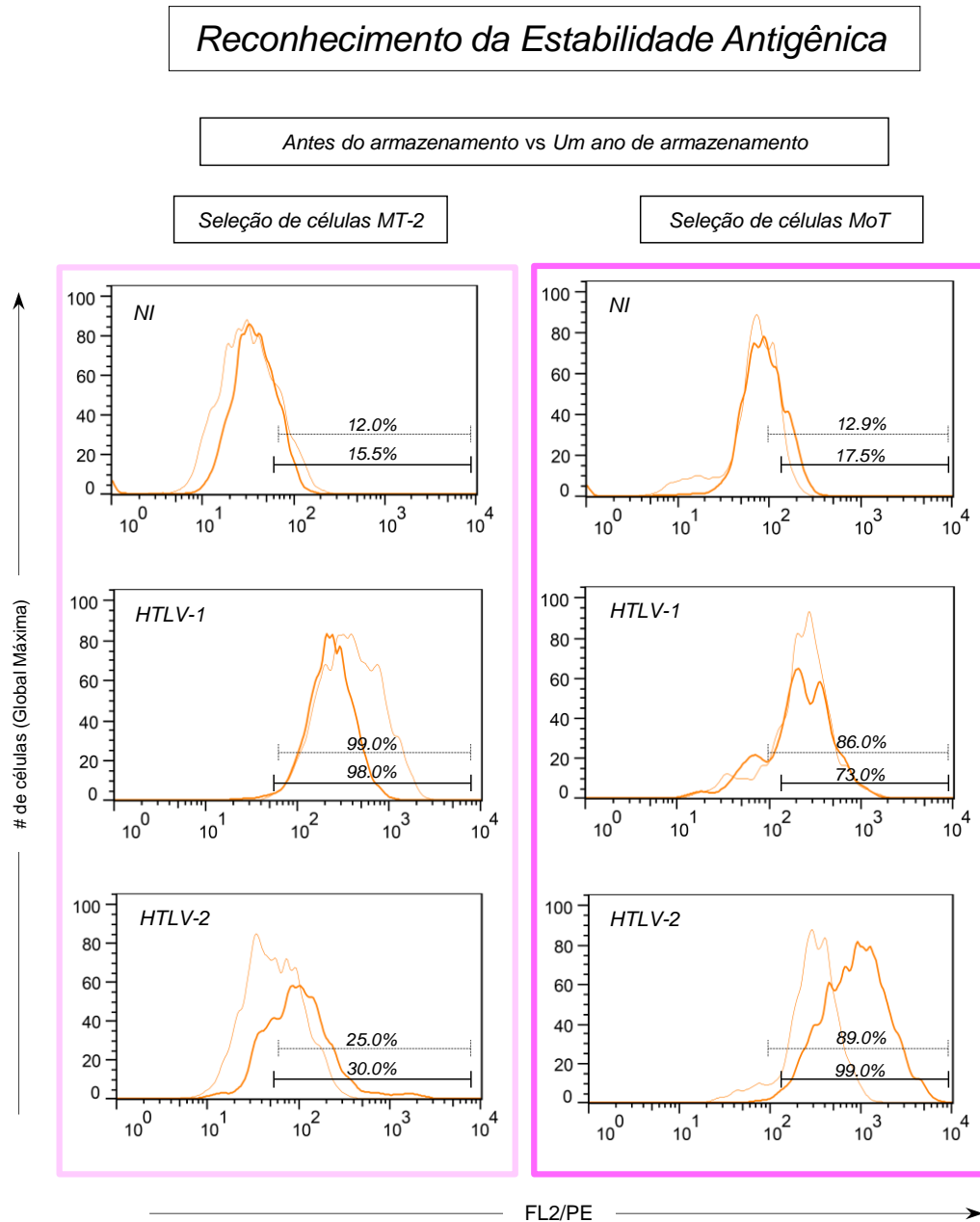
### 5.3 Determinação da estabilidade e antigenicidade da metodologia FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2)

Na análise da estabilidade da marcação das linhagens celulares MT-2 e MoT com Alexa Flúor-647, pôde-se observar que em todas as condições de temperatura (TA, 4°C e -20°C) a marcação se manteve estável pelos períodos de 2, 6 e 12 meses, com exceção da temperatura de 4°C, que só manteve a estabilidade de marcação até o período de dois meses de armazenamento, como pode ser observado na figura 22.



**Figura 22.** Estabilidade da marcação fluorescente. Os histogramas de fluorescência FL4 apresentam a estabilidade da marcação de MT-2 e MoT, com o fluorocromo Alexa Flúor-647, antes do armazenamento, após dois meses, seis meses e um ano, nas temperaturas de TA, 4°C e -20°C.

A estabilidade da reatividade ao suporte antigênico celular foi igualmente mantida por até 12 meses após a preparação das suspensões celulares, quando acondicionadas sob temperatura de -20°C (Figura 23). Isso mostra que a metodologia é totalmente empregável nas rotinas laboratoriais por permitir acondicionamento de até um ano à temperatura de -20°C.



**Figura 23.** Reconhecimento da estabilidade antigênica antes do armazenamento *versus* um ano de armazenamento à  $-20^{\circ}\text{C}$ , representados em histogramas de fluorescência em FL2 e percentuais de células fluorescentes positivas (PCFP) das amostras NI, HTLV-1 e HTLV-2.

#### 5.4 Avaliação do desempenho da metodologia FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2) para o diagnóstico universal da infecção humana pelo HTLV-1/2

Avaliando a média do percentual de células fluorescentes positivas (PCFP) no soro de indivíduos infectados com HTLV-1/2, nas oito diferentes diluições realizadas (1:32 à 1:4.096) para o protocolo FIX, tanto para MT-2 quanto para MoT, foi possível verificar que a

reatividade tem uma tendência à diminuição à medida que se aumenta a diluição do soro (Figura 24), o que não ocorre no protocolo FIX&Perm, onde a reatividade cresce proporcionalmente ao aumento da diluição do soro, tanto para MT-2 quanto para MoT.

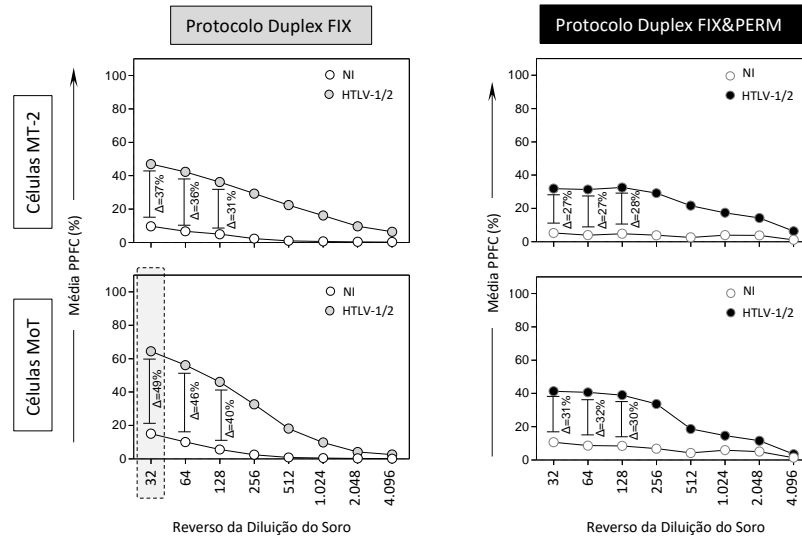
Nas diluições de 1:32 a 1:2.048 a reatividade manteve um perfil de PCFP capaz de diferenciar indivíduos não-infectados (NI) de indivíduos infectados com HTLV-1/2, mostrando que o teste seria eficaz para diferenciar indivíduos infectados de não-infectados.

As diluições que apresentaram o maior delta- $\Delta$  (média de PCFP de NI – média de PCFP de infectados HTLV-1/2) foram consideradas as melhores diluições para o diagnóstico da infecção. Sendo assim, as diluições 1:32, 1:64 e 1:128 foram as escolhidas para os dois protocolos (FIX e FIX&Perm), tanto nas células MT-2 quanto nas células MoT.

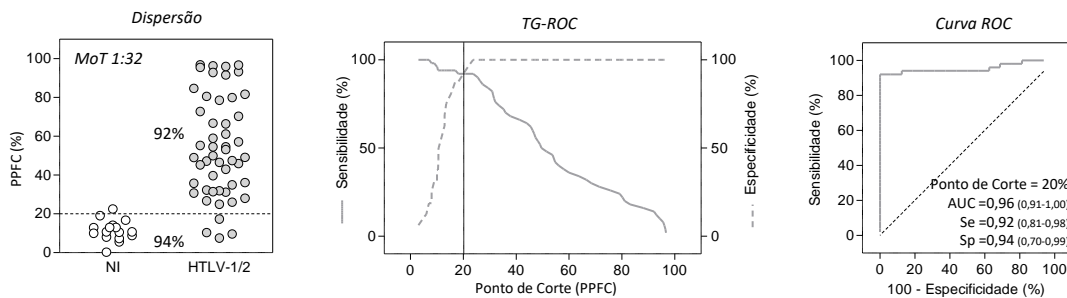
De acordo com as diluições escolhidas (1:32, 1:64 e 1:128), no protocolo FIX, MT-2 apresentou  $\Delta$  de 37%, 36% e 31%, respectivamente, e MoT apresentou  $\Delta$  de 49%, 46% e 40%, respectivamente. Já para o protocolo FIX&Perm, MT-2 apresentou  $\Delta$  de 27%, 27% e 28%, respectivamente, e MoT apresentou  $\Delta$  de 31%, 32% e 30%, respectivamente.

Utilizando as ferramentas de análise estatística ROC (*Receiver Operating Characteristic Curve*) e TG-ROC (*Two-Graph-ROC*), foi possível identificar que o teste apresentou bom desempenho para o diagnóstico universal, demonstrando que a diluição de 1:32, utilizando o protocolo FIX, foi a que apresentou maior reatividade média diferencial (49%) entre soros NI e HTLV-1/2. Nesta diluição e com ponto de corte de 20%, a técnica mostrou que 94% dos indivíduos não-infectados foram realmente identificados no grupo NI (especificidade) e 92% dos indivíduos sabidamente infectados com HTLV-1/2 foram identificados no grupo de positivos (sensibilidade), demonstrando excelente performance, com uma acurácia (AUC) de 0.96.

Anti-MT-2/MoT IgG1 Duplex para Diagnóstico Universal da Infecção por HTLV-1/2 por Citometria de Fluxo



Performance do Anti-MT-2/MoT IgG1 Duplex para Diagnóstico Universal da Infecção por HTLV-1/2 por Citometria de Fluxo



**Figura 24.** Aplicabilidade do **FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2)** no diagnóstico universal da infecção pelo HTLV-1/2. Curvas de titulação com reatividade média expressa em PCFP das diluições do soro de 1:32 a 1:4.096 demonstram a reatividade de anticorpos anti-HTLV-1/2 utilizando plataforma duplex com MT-2 e MoT em *pool* de soros NI e HTLV-1/2. As preparações antigênicas foram realizadas com células fixadas (FIX – em cinza) e com as células fixadas e permeabilizadas (FIX&Perm – em preto). A reatividade média diferencial entre NI e HTLV-1/2 está ilustrada na figura por meio do delta ( $\Delta$ ). A diluição do soro com maior delta (retângulo cinza pontilhado) foi selecionada para posterior análise em gráficos de dispersão, análise de TG-ROC e curva ROC. O ponto de corte selecionado pela curva ROC permitiu o cálculo de índices de desempenho e respectivos intervalos de confiança, como área sob a curva (AUC), sensibilidade (Se) e especificidade (Sp) que estão ilustrados no gráfico.

### 5.5 Avaliação do desempenho de FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2) no diagnóstico diferencial da infecção humana pelo HTLV-1 e HTLV-2

A mesma avaliação foi feita para diferenciar os soros de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e pelo HTLV-2, com avaliação da média do percentual de células fluorescentes positivas (PCFP) nos soros de indivíduos infectados com HTLV-1 e HTLV-2, nas oito diferentes diluições realizadas (1:32 a 1:4.096) para os protocolos FIX e FIX&Perm, tanto para MT-2



quanto para MoT. Foi possível verificar que a reatividade tem uma tendência à diminuição à medida que se aumenta a diluição do soro (Figura 25), tanto para MT-2 quanto para MoT, o que nem sempre ocorreu no protocolo FIX&Perm, onde a reatividade apresenta um leve aumento com posterior diminuição à medida que se aumenta a diluição do soro, tanto para células MT-2 quanto para MoT.

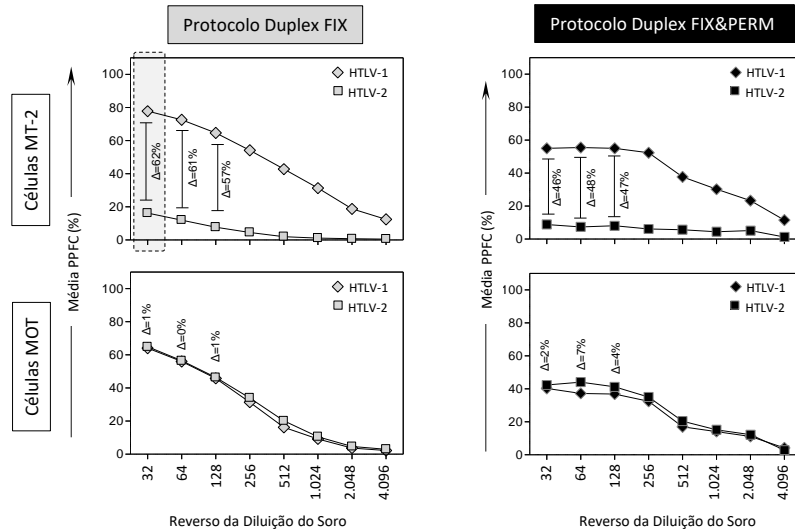
Somente nas células MT-2 pôde-se identificar uma média de PCFP capaz de diferenciar indivíduos infectados com HTLV-1 de indivíduos infectados com HTLV-2, o que não ocorreu em MoT.

As diluições que apresentaram o maior delta- $\Delta$  (média de PCFP de infectados com HTLV-1 – média de PCFP de infectados com HTLV-2) foram consideradas as melhores diluições para o diagnóstico diferencial da infecção. Sendo assim, as diluições 1:32, 1:64 e 1:128 novamente foram as escolhidas para os dois protocolos (FIX e FIX&Perm) nas células MT-2.

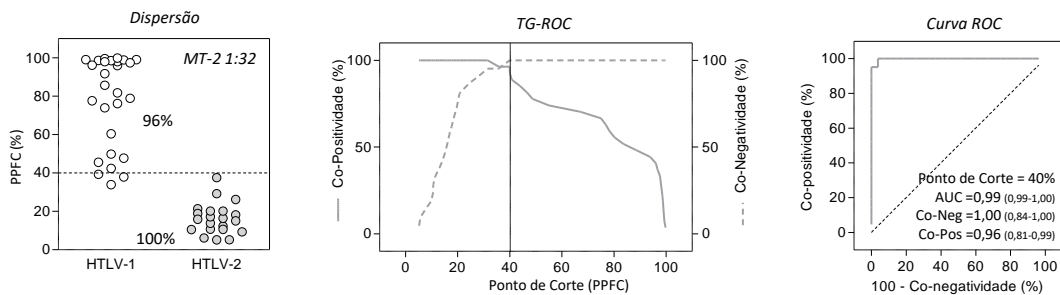
De acordo com as diluições escolhidas (1:32, 1:64 e 1:128), no protocolo FIX, MT-2 apresentou  $\Delta$  de 62%, 61% e 57%, respectivamente, e MoT apresentou  $\Delta$  de 1%, 0% e 1%, respectivamente. Já para o protocolo FIX&Perm, MT-2 apresentou  $\Delta$  de 46%, 48% e 47%, respectivamente, e MoT apresentou  $\Delta$  de 2%, 7% e 4%, respectivamente.

Utilizando as mesmas ferramentas de análise estatística utilizadas para o diagnóstico universal (ROC e TG-ROC), verificou-se que o teste apresentou bom desempenho para o diagnóstico diferencial entre HTLV-1 e HTLV-2. Os resultados demonstraram que a diluição de 1:32, utilizando o protocolo FIX, foi a que apresentou maior reatividade média diferencial (62%) entre soros de indivíduos infectados com HTLV-1 e HTLV-2. Nesta diluição e com ponto de corte de 40%, a técnica mostrou que 96% dos indivíduos infectados com HTLV-1 foram realmente identificados no grupo HTLV-1 (co-positividade) e 100% dos indivíduos infectados com HTLV-2 foram identificados como negativos para HTLV-1 (co-negatividade), demonstrando excelente performance, com uma acurácia (AUC) de 0.96.

Anti-MT-2/MoT IgG1 Duplex para Diagnóstico Diferencial da Infecção por HTLV-1/2 por Citometria de Fluxo



Performance do Anti-MT-2/MoT IgG1 Duplex para Diagnóstico Diferencial da Infecção por HTLV-1/2 por Citometria de Fluxo



**Figura 25.** Aplicabilidade do **FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2)** no diagnóstico diferencial da infecção pelo HTLV-1 e HTLV-2. Curvas de titulação com reatividade média expressa em PCFP das diluições do soro de 1:32 a 1:4.096 demonstram a reatividade de anticorpos anti-HTLV-1 e anti-HTLV-2, utilizando plataforma duplex com MT-2 e MoT em *pool* de soros HTLV-1 e HTLV-2. As preparações antigênicas foram realizadas com células fixadas (FIX - em cinza) e com as células fixadas e permeabilizadas (FIX&Perm - em preto). A reatividade média diferencial entre HTLV-1 e HTLV-2 está ilustrada na figura por meio do delta ( $\Delta$ ). A diluição do soro com maior delta (retângulo cinza pontilhado) foi selecionada para posterior análise em gráficos de dispersão, análise de TG-ROC e curva ROC. O ponto de corte selecionado pela curva ROC permitiu o cálculo de índices de desempenho e respectivos intervalos de confiança, como área sob a curva (AUC), Co-Negatividade (Co-Neg) e Co-Positividade (Co-Pos) que estão ilustrados no gráfico.

Apesar do excelente desempenho do método FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2) no diagnóstico universal e diferencial da infecção humana pelo HTLV-1/2, alguns indivíduos HTLV-1, assintomáticos, não foram identificados como infectados. Desta forma, com o objetivo de melhorar o desempenho do teste, foi proposta a realização de um algoritmo assíncrono, baseado na subtração da reatividade de MT-2 – MoT.

Após a realização de vários cálculos, a subtração foi escolhida como mais adequada, com base no fato de que a reatividade de uma das células poderia ser a reatividade de “*background*”, ou seja, a reatividade de interferência que deveria ser subtraída na reatividade obtida para linhagem alvo (MT-2 para HTLV-1 e MoT para HTLV-2).

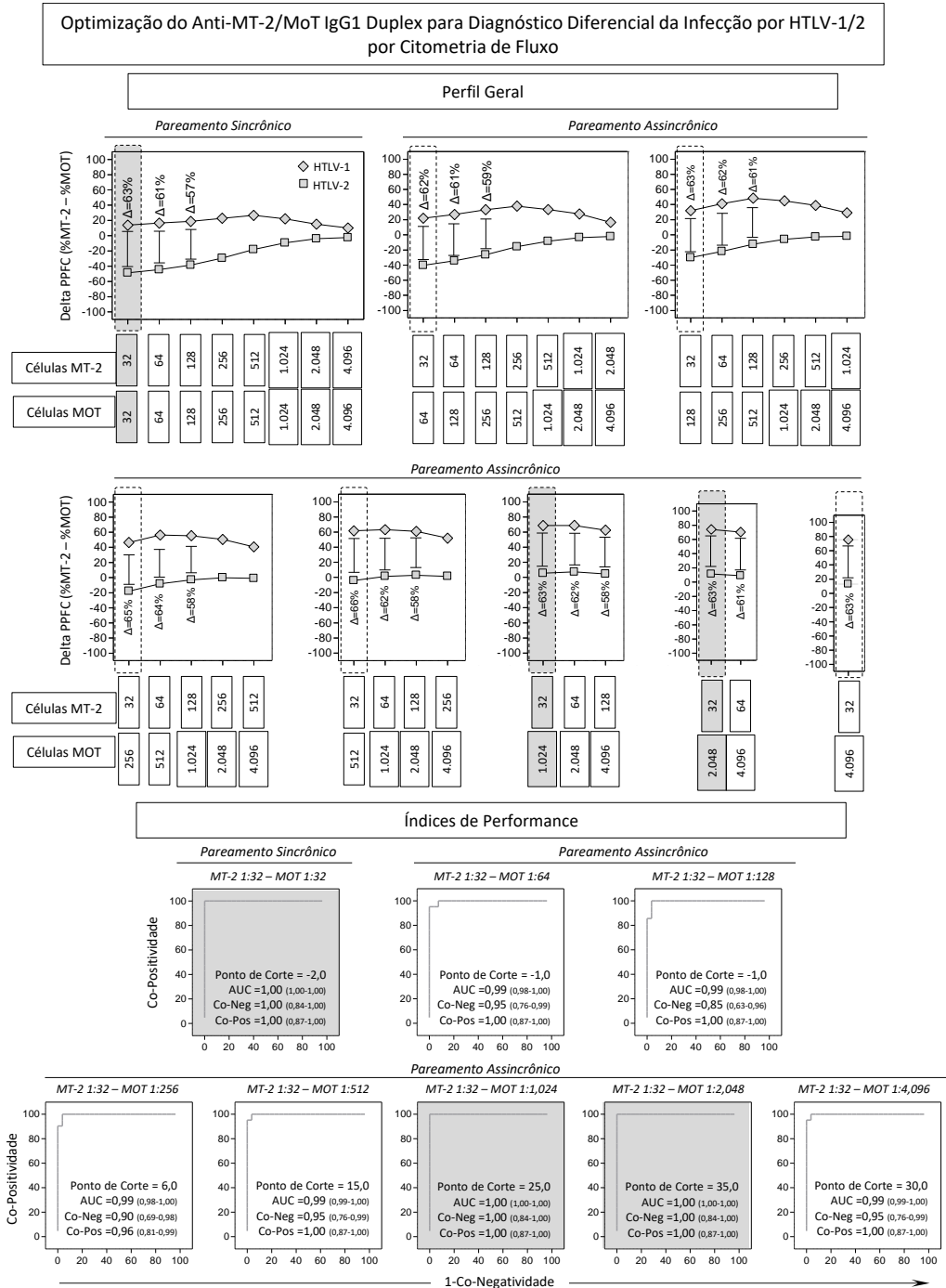
O termo sincrônico/assincrônico foi utilizado para indicar que as diluições do soro selecionadas para a subtração seriam as mesmas (sincrônico) para MT-2 e MoT ou com diluições dos soros não pareadas (assincrônico), conforme ilustra a figura 26.

Os resultados do algoritmo sincrônico indicaram que a diluição de 1:32 demonstrou o maior delta ( $\Delta$ ) de segregação entre a reatividade obtida para MT-2 e MoT nesta diluição.

Em relação ao algoritmo assincrônico, a subtração da reatividade de MT-2, na diluição de 1:32, de todas reatividades obtidas para as diluições de MoT apresentaram deltas ( $\Delta$ ) com valores superiores a 60%.

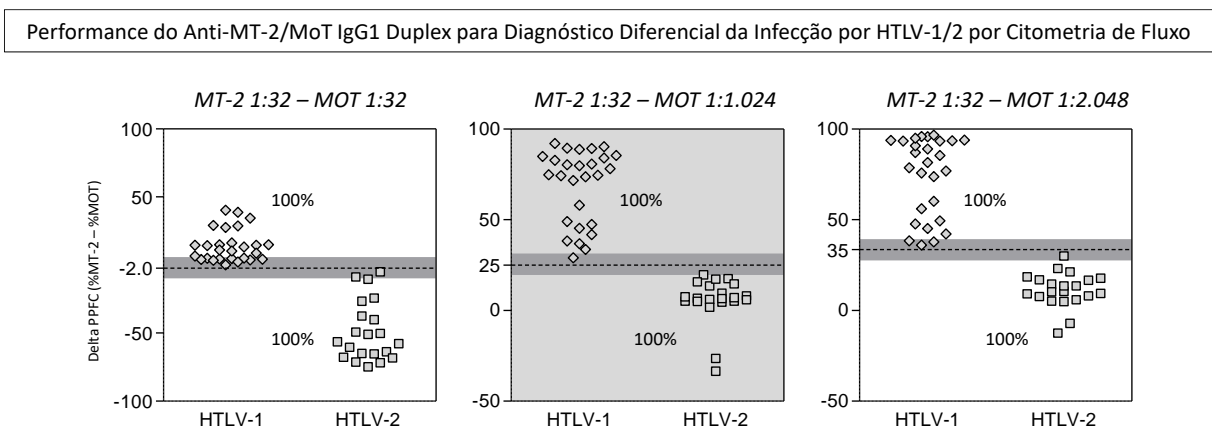
A análise da curva ROC, utilizando os pontos de corte indicados por esta análise, apontou que o algoritmo sincrônico apresentou resultados com elevado desempenho com AUC, Co-neg e Co-pos de 1,00, indicando que não houve resultados incorretos, ou seja, falso-positivos e falso-negativos, quando se aplicou o algoritmo.

O mesmo foi observado para o algoritmo assincrônico, baseado na subtração da reatividade de MT-2, na diluição de 1:32, das reatividades obtidas para as diluições de MoT 1:1.024 e 1:2.048.



**Figura 26.** Otimização do **FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2)** no diagnóstico diferencial da infecção humana pelo HTLV-1 e HTLV-2. Curvas de titulação sincrônica e assincrônica, com reatividade média expressa em PCFP das diluições do soro de 1:32 a 1:4.096 demonstram a reatividade de anticorpos anti-HTLV-1 e HTLV-2, utilizando plataforma duplex com MT-2 e MoT em *pool* de soros HTLV-1 e HTLV-2. As preparações antigênicas foram realizadas com células fixadas (FIX - em cinza) e com as células fixadas e permeabilizadas (FIX&Perm - em preto). A reatividade média diferencial entre HTLV-1 e HTLV-2 está ilustrada na figura por meio do delta ( $\Delta$ ). A diluição do soro com maior delta (retângulo cinza pontilhado) foi selecionada para posterior análise em gráficos de dispersão, análise de TG-ROC e curva ROC. O ponto de corte selecionado pela curva ROC permitiu o cálculo de índices de desempenho e respectivos intervalos de confiança, como área sob a curva (AUC), Co-Negatividade (Co-Neg) e Co-Positividade (Co-Pos), que estão ilustrados no gráfico.

Considerando que os algoritmos sincrônicos (MT-2 1:32-MoT 1:32) e assincrônicos (MT-2 1:32-MoT 1:1.024; MT-2 1:32-MoT 1:2.048) obtiveram desempenho semelhante conforme indicado pela curva ROC, foi aplicada uma análise mais estrigente, considerando uma margem de erro de 10%. Desta forma, como mostrado na figura 27, o algoritmo que apresentou o menor número de indivíduos dentro da margem de erro, denominada zona cinza, foi o esquema MT-2 1:32-MoT 1:1.024. É importante ressaltar que os três algoritmos apresentaram resultados verdadeiros de 100%, no entanto, o esquema MT-2 1:32-MoT 1:1.024 apresentou um número de resultados na zona cinza menor quando aplicado à zona de erro arbitrária possível do teste.



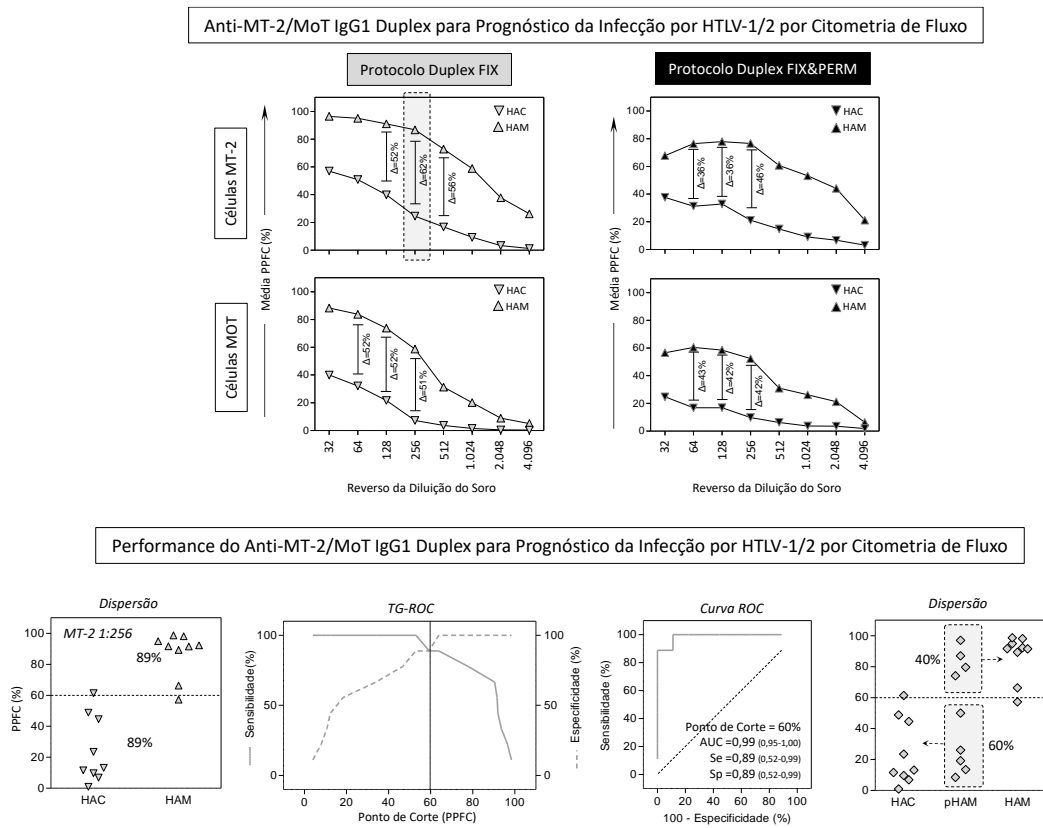
**Figura 27.** Performance do **FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2)** no diagnóstico diferencial da infecção pelo HTLV-1 e HTLV-2. Gráficos de delta ( $\Delta$ ) PCFP entre reatividade de MT-2–reatividade de MoT dos algoritmos sincrônico (MT-2 1:32-MoT 1:32) e assincrônicos (MT-2 1:32-MoT 1:1.024; MT-2 1:32-MoT 1:2.048) obtidos para soros de pacientes HTLV-1(n=27) e HTLV-2 (n=26). Em cinza escuro, está representada a “zona cinza” que corresponde à margem de erro arbitrária que aumenta a estringência da análise. Em plano de fundo cinza claro, está representada o algoritmo que produz a menor taxa de indivíduos dentro da “zona cinza”.

### ***5.6 Aplicabilidade da metodologia FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2) para o prognóstico da infecção humana pelo HTLV-1***

Quanto a fins prognósticos para a identificação de pacientes HAM/TSP, o desempenho foi elevado, demonstrando a segregação entre a maioria dos indivíduos infectados assintomáticos (HAC) dos com HAM/TSP (HAM), com co-positividade (HAM= 89%) e co-negatividade (HAC= 89%) moderados. Como demonstrado na figura 28, o melhor desempenho foi obtido para o suporte antigênico de MT-2 com a diluição do soro de 1:256 ( $\Delta=62\%$ ), ponto de corte na curva ROC em 60%, com área sob a curva de 0.99 e sensibilidade e especificidade de 89%.

Gráficos de dispersão, utilizando o ponto de corte selecionado (60% PCFP), foram plotados para avaliar a reatividade de IgG1 de pacientes com classificação de “possível HAM” (pHAM) em comparação com HAC e HAM. Nesta análise, foi possível evidenciar um perfil intermediário com 40% de pacientes com perfil de alta reatividade e 60% de pacientes com perfil de baixa reatividade. Alguns estudos ainda são necessários para corroborar o desempenho do método para fins prognósticos. Como perspectiva o grupo pretende avaliar os mesmos indivíduos 10 anos após essa primeira análise.

A Figura 28 mostra os resultados obtidos para a análise da aplicabilidade do FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2) para diferenciar indivíduos assintomáticos (HAC) de HAM/TSP (HAM).



**Figura 28.** Aplicabilidade do **FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2)** no prognóstico da infecção humana pelo HTLV-1/2. Curvas de titulação com reatividade média expressa em PCFP das diluições de soro de 1:32 a 1:4.096 demonstram a reatividade de anticorpos anti-HTLV-1/2 utilizando plataforma duplex com MT-2 e MoT em soros de pacientes HTLV-1 assintomáticos (HAC) e com HAM/TSP (HAM). As preparações antigênicas foram realizadas com células fixadas (FIX – em cinza) e com as células fixadas e permeabilizadas (FIX&Perm – em preto). A reatividade média diferencial entre HAC e HAM está ilustrada na figura por meio do delta ( $\Delta$ ). A diluição do soro com maior delta (retângulo cinza pontilhado) foi selecionada para posterior análise em gráficos de dispersão, análise de TG-ROC e curva ROC. Gráficos de dispersão utilizando o ponto de corte selecionado foram plotados para pacientes HAC e HAM em comparação com pacientes classificados como possível HAM (pHAM). O ponto de corte selecionado pela curva ROC permitiu o cálculo de índices de desempenho e respectivos intervalos de confiança, como área sob a curva (AUC), sensibilidade (Se) e especificidade (Sp), que estão ilustrados no gráfico.

## **6- Discussão**

O HTLV é um vírus que está relacionado a doenças graves como a Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto (ATLL) e a Mielopatia Associada ao HTLV/Paraparesia Espástica Tropical (HAM/TSP), dentre outras comorbidades de menor gravidade, mas a grande importância desse vírus não se dá apenas à manifestação dessas condições clínicas, e sim ao fato de que a grande maioria dos indivíduos que se infectam com o vírus permanece assintomática por longos períodos ou até mesmo durante toda a vida, sem nunca sequer ter conhecimento da infecção.

Como a transmissão pode ocorrer facilmente pelo contato sexual, durante o parto e amamentação e compartilhamento de materiais perfurocortantes contaminados, indivíduos portadores do vírus que não possuem conhecimento da infecção podem disseminar o HTLV de forma silenciosa em seus núcleos familiares e sociais. Isso torna o HTLV um problema de saúde pública, uma vez que os dados epidemiológicos estimam que pelo menos 20 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HTLV-1 no mundo (WILLEMS et al., 2017), dados estes que podem estar subestimados, uma vez que a maioria das amostras analisadas em estudos anteriores pertence a candidatos à doação de sangue ou grupos selecionados, não incluindo outros indivíduos representativos da população em geral que poderiam ser portadores do vírus e ser assintomáticos.

Mesmo após a Portaria nº 1.376 do Ministério da Saúde ter tornado obrigatória a triagem universal para HTLV-1/2 em candidatos à doação de sangue, a infecção por HTLV ainda é negligenciada pelos serviços de saúde, uma vez que não existem programas de triagem nos serviços de pré-natal, nos testes em recém-nascidos e na população geral, e também não há grandes centros institucionalizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) para acompanhamento dos indivíduos identificados como portadores do vírus, apenas organizações de iniciativas não-governamentais como ambulatórios criados pelas universidades e centros de pesquisas, e por profissionais de saúde voluntários. A exemplo disso, podemos citar os centros de referência como o Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecto-Parasitárias (CTR/DIP Orestes Diniz / Hospital das Clínicas) e o Hospital Eduardo de Menezes, ambos em Belo Horizonte – MG, e outras associações de portadores do HTLV

existentes no Brasil, como o Grupo Vitamore, no Rio de Janeiro e o Grupo HTLVida, no estado da Bahia.

Com o objetivo de demonstrar o quanto a triagem universal para HTLV em candidatos à doação de sangue é importante, um estudo que analisou os dados de sorologia para o HTLV na Fundação Hemominas, de 1993 a 2004, observou que 390 doadores de primeira vez tiveram seu sangue descartado devido à sorologia positiva para o HTLV-1 (NAMEN-LOPES et al., 2009), mostrando que novas infecções foram evitadas e que tantas outras podem ter ocorrido antes que a triagem se tornasse obrigatória com a portaria do Ministério da Saúde acima referida.

À medida que novos estudos são realizados e se aumenta o conhecimento sobre os vírus HTLV, outras iniciativas para evitar novas transmissões vão sendo realizadas, como o que ocorre no Estado do Mato Grosso do Sul, desde 2002, onde foi instituído o Programa de Proteção à Gestante, que inclui a sorologia para HTLV-1/2 no pré-natal como estratégia para controle de transmissão dessa infecção viral (DAL FABRO et al., 2008) e em Minas Gerais, com a Lei nº 17.344, que dispõe que os serviços de saúde pública devem realizar testes sorológicos para o diagnóstico da infecção humana por HTLV-1/2 em casos com sintomatologia clínica sugestiva e em todas as gestantes no pré-natal e ainda inclui o aconselhamento clínico e familiar e o tratamento do infectado (Minas Gerais, 2008). Porém essas iniciativas nunca serão suficientes se não houver uma testagem laboratorial eficiente em todo o país, uma vez que o teste sorológico para HTLV ainda não é amplamente disponibilizado pelo SUS e, uma vez solicitado pelo médico, deve ser realizado em rede particular, o que não é acessível à grande parte da população.

Um dos grandes motivos da falta de triagem populacional é o custo elevado e a complexidade das metodologias diagnósticas atualmente utilizadas. No Brasil, os testes de triagem como o Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e confirmatórios como o *Western Blot* (WB) e a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), preconizados pelo Ministério da Saúde, não atendem às necessidades dos hemocentros e dos laboratórios clínicos, para que estes testes possam ser realizados em larga escala, a fim de se identificar os portadores da infecção pelo HTLV na população, não apenas em candidatos à doação de sangue.

Os testes acima citados foram incluídos na tabela de procedimentos laboratoriais do SUS em 2016, pela Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (CONITEC), depois



de ter sido feita uma estimativa do impacto orçamentário na incorporação do *Western Blot* e do PCR como testes laboratoriais confirmatórios. Essa estimativa levou em consideração um valor aproximado entre R\$21.580,00 a R\$ 32.470,00/ano, visto que estes procedimentos já possuíam valor definido na tabela de procedimentos do SUS, no diagnóstico do HIV, ao valor de R\$ 85,00 por teste, para o *Western Blot*, e de R\$ 65,00 para o PCR em tempo real, estimando que este valor permaneceria equivalente. Porém, o real custo do *Western Blot* para confirmação do HTLV é de aproximadamente R\$ 170,00, diferentemente do que é comercializado para o HIV, fazendo com que o diagnóstico do HTLV ficasse muito mais oneroso do que se esperava.

Além disso, apesar da inclusão dessas duas técnicas como padrão para a detecção da infecção por HTLV ter representado um grande avanço, ainda não se pode considerar esses métodos como definitivos, pois eles apresentam limitações que ainda precisam ser suplantadas para que as dificuldades existentes, principalmente para a tipagem sorológica, possam ser diminuídas.

Quanto a essas limitações, pode-se citar que o kit de *Western Blot* utilizado para o diagnóstico de HTLV é identificado pela ANVISA como RUO (“*Research Use Only*”), para esclarecer que são insumos e reagentes em fase de desenvolvimento e pesquisa laboratorial, utilizados em metodologias *in house* - desenvolvidas internamente pelos laboratórios pesquisa, o que muitas vezes pode levar a resultados indeterminados.

Da mesma forma, a PCR apresenta limitações no que tange ao tempo de execução, padronização e desenvolvimento, podendo apresentar resultados falso-positivos devido a problemas de contaminação tão frequentes em laboratórios de biologia molecular, fazendo-se necessário a realização somente por profissionais com grande experiência.

Adicionalmente, essas técnicas somente foram aprovadas por não existir nenhuma outra disponível, e assim, o diagnóstico da infecção pelo HTLV apresenta-se ainda como um vasto campo para investigações, levando ao desafio da criação de metodologias mais eficazes, de fácil execução, com resultados mais assertivos, menos onerosos, e possíveis de serem executadas de forma rápida e precisa.

Diante disso, o presente trabalho traz uma abordagem relevante que permite realizar o diagnóstico da infecção de forma menos onerosa, com alta sensibilidade e especificidade,

sendo possível ser realizado em uma única etapa, não necessitando de algoritmos de execução, e ainda preenche uma grande lacuna, que é o diagnóstico diferencial entre os subtipos virais HTLV-1 e HTLV-2, determinante no prognóstico dos pacientes.

Além da utilização de microplacas de 96 poços empregando microvolumes de reagentes, diminuindo o manejo laboratorial da técnica e possibilitando não somente um processo de automação, mas também a redução de custos para a realização dos testes, o método ainda permite leitura e interpretação dos resultados de forma simplificada, uma vez que diluições pré-determinadas podem indicar a positividade ou negatividade para a infecção e positividade para cada subtipo viral. No caso de resultados positivos, é importante ressaltar que o FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2) garante valores numéricos de reatividade, caracterizando esta estratégia diagnóstica como semi-quantitativa, na qual os dados são emitidos por uma unidade de medida determinada, o percentual de células fluorescentes positivas (PCFP).

Essa leitura se dá por meio da metodologia de Citometria de Fluxo, um sistema ótico eletrônico, que avalia a emissão de fluorescência e a dispersão de raios lasers incidentes sobre uma célula, permitindo a análise de três parâmetros celulares distintos: tamanho, granulosidade e a emissão de fluorescência (CUNHA et al., 2012). Essa metodologia apresenta pouca variabilidade e já é amplamente utilizada nos hemocentros brasileiros desde a publicação da Portaria nº 29, em 17 de dezembro de 2013, que aprova o Manual Técnico para o Diagnóstico da Infecção pelo HIV (BRASIL, 2013) e normatiza a testagem para o HIV em todo território nacional, o que não representaria nenhum investimento a mais para aquisição de equipamentos de citometria de fluxo por parte dos hemocentros do país.

Outra vantagem do método proposto diz respeito ao suporte antigênico, que são células permanentemente infectadas com os subtipos virais. Estudos anteriores realizados pelo Grupo Intedisciplinar de Pesquisas em HTLV (GIPH) demonstraram, por Microscopia de Força Atômica, a avaliação da superfície de MT-2, que revelou a presença de brotamento viral na superfície destas células (COELHO-DOS-REIS et al., 2011), confirmando achados anteriores da literatura (MOROZOV & WEISS, 1999; MIYOSHI et al., 1981). Desta forma, estes dados sugerem fortemente que esta linhagem celular é ideal para ser aplicada no diagnóstico universal da infecção por HTLV, conforme observado por nossos estudos. Estes achados igualmente indicam que a superfície de MT-2 é um suporte abundante e profícuo de antígenos de HTLV-1, o que corrobora nossos dados que demonstram que tanto o protocolo FIX, que utiliza antígenos de membrana, quanto o protocolo FIX&Perm que permite acesso de ligação

a antígenos virais citoplasmáticos, apresentam ambos um excelente desempenho no diagnóstico universal.

Neste contexto, em relação à expressão de proteínas virais em MT-2, antígenos Gag e Env predominam como fonte de proteínas virais, conforme identificado por nossos estudos anteriores, com contribuição significativa da proteína Tax, que é largamente expressa em sua forma original (40 KDa) nesta linhagem celular (JIN & JEANG, 1997; COELHO-DOS-REIS et al., 2008 e 2009) diferentemente de outras linhagens celulares infectadas pelo HTLV-1 que podem ou não expressar Tax. Além disso, MT-2 apresenta uma forma de Tax que é expressa fusionada à proteína do envelope, Env (Env-Tax - 69 KDa) (JIN & JEANG, 1997), o que aumenta a expressão desta proteína não estrutural e sua disponibilidade para o ensaio sorológico.

Estes achados foram evidenciados em ensaio de *Western Blot* que utilizou proteínas do HTLV-1, ou seja, o extrato bruto purificado por Trizol, proveniente de células MT-2 cultivadas por passagens múltiplas após o terceiro dia de cultivo. É possível extrapolar que as mesmas proteínas reagiram na técnica de imunofluorescência indireta por lâmina (GASTALDELLO et al., 1999) e por citometria de fluxo, embora seja relevante ressaltar que a forma de fixação antigênica e o sistema de revelação, bem como o sistema de fixação e desnaturação dos antígenos virais, sejam distintos nas duas técnicas. Estes achados indicam que esta linhagem celular é o protótipo ideal para desenvolvimento de ensaios por imunofluorescência indireta para contribuir para o diagnóstico e prognóstico da infecção pelo HTLV-1 (JIN & JEANG, 1997; COELHO-DOS-REIS, 2008 e 2009).

No entanto, recentemente as células MT-2 foram alvo de escrutínio, no qual Nomura e cols. (2019) relataram a diversidade de locais de estrutura e integração do provírus do HTLV-1 entre diferentes linhagens de células MT-2. Foram observados fenótipos celulares distintos entre as linhagens celulares MT-2, classificadas como MT-2J e MT-2B. Estas células apresentaram influência divergente no crescimento da linhagem celular U937, proveniente de Leucemia promonocítica. Níveis de proteína e expressão de mRNA de citocinas também foram investigados. Além disso, também foi realizada a análise de *Western Blot* das proteínas reguladoras do HTLV-1, Tax e HBZ destas duas sub-linhagens de MT-2. O sobrenadante da cultura das células MT-2B, mas não das MT-2J, mostrou efeitos supressores marcantes no crescimento celular de U937. A sub-linhagem MT-2B mostrou alto Fator de Necrose Tumoral TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  e interferon IFN- $\gamma$ , ambos nos níveis de proteína do sobrenadante da cultura e

nos níveis de mRNA codificantes destas citocinas nas células. A análise, utilizando citocinas recombinantes, indicou que os efeitos supressores de MT-2B foram associados, pelo menos em parte, a altos níveis de TNF- $\beta$  e seus efeitos sinérgicos com o IFN- $\gamma$  no sobrenadante da cultura. Os níveis de proteína de HTLV-1, Tax e HBZ, foram maiores na MT-2B do que aqueles nas células MT-2J. Foi relatado que essas moléculas afetam a produção de citocinas das células infectadas com HTLV-1; portanto, a diferença nessas moléculas pode ter sido responsável pelas diferenças na produção de citocinas entre as células MT-2J e MT-2B (HASHIKURA et al., 2016). Além disso, como as células MT-2 mostraram uma grande variação de provírus HTLV-1 integrados, bem como fenótipos celulares, é importante ter cuidado na avaliação e interpretação dos dados experimentais das células MT-2 (NOMURA et al., 2019). Ainda não identificamos se a sub-linhagem celular de MT-2 do nosso estudo se assemelha mais a MT-2B ou MT-2J, no entanto, este conhecimento será buscado por nosso grupo. Ainda assim, acreditamos que a produção de antígenos virais foi robusta em nossa linhagem e foi capaz de distinguir soros reagentes de não reagentes.

Quanto a outras metodologias descritas recentemente, podemos citar os testes imunocromatográficos e os biossensores. Como um biossensor baseado em uma sonda molecular em formato de grampo (*hairpin*) que foi criado recentemente por Cao e cols. (2015), contendo região rica em guanina capaz de intensificar fluorescência de *nanoclusters* de prata desenvolvido para detecção de DNA. Três genes relacionados aos vírus HIV, HBV e HTLV-1 são alvos do teste criado. O método é muito sensível e tem um limite de detecção tão baixo quanto nanomolar. O teste é capaz de distinguir polimorfismo de nucleotídeo único sendo altamente aplicável em estudos de polimorfismos e na tipagem do HTLV, no entanto, ainda está por ser esclarecida a aplicabilidade do biossensor proposto para este último fim (CAO et al., 2015).

Em relação aos testes rápidos, não existem atualmente testes imunocromatográficos disponíveis para triagem sorológica e identificação rápida de indivíduos soropositivos para HTLV. Esta grande lacuna gera grandes dificuldades para o rastreamento sorológico de indivíduos positivos para HTLV e dificulta o manejo clínico da infecção crônica pelo vírus no Brasil e em escala global. Neste contexto, o GIPH vem trabalhando no intuito de contribuir no desenvolvimento de plataformas diagnósticas para a detecção rápida de anticorpos baseada em antígenos recombinantes de HTLV-1. Neste sentido, Franco e cols. (2019) desenvolveram um protocolo envolvendo proteína multiepitopo de HTLV para o

diagnóstico sorológico por ensaio imunoenzimático. Neste estudo é proposto um teste inovador para o diagnóstico sorológico, utilizando sistema de produção brasileira de um antígeno recombinante desenhado baseado nas sequências de proteínas Gag (p19), Env (gp46) e Tax (p40) para detecção de anticorpos anti-HTLV-1/2. Os resultados do estudo, em sistema duplo-cego, revelaram que o ensaio denominado “ELISA indireto LVBA-recHTLV-1/2” apresentou especificidade de 88,46-98%, sensibilidade de 98,82-100% e acurácia elevada (área sob a curva ROC = 0,9578 com IC 95%  $\pm$  0,0187). Estes resultados estão de acordo com os observados pelo FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2) que permitiu uma alta taxa de resultados corretos com elevada sensibilidade e especificidade.

Vale ressaltar, porém, que este teste apresentou dificuldade na detecção de anticorpos anti-HTLV-2 (sensibilidade de 44,44-85,71%), concluindo que o teste LVBA-recHTLV-1/2 tem potencial para ser utilizado e aplicado no desenvolvimento de kits diagnósticos para triagem sorológica das infecções pelos vírus HTLV-1 e HTLV-2. Mais estudos devem ser feitos para aprimorar a sensibilidade da plataforma para o diagnóstico para HTLV-2 (FRANCO, 2019). Neste sentido, a citometria de fluxo apresentou desempenho superior na detecção de anticorpos anti-HTLV-2, utilizando o sistema de células da linhagem MoT. Embora tenha existido reatividade de soros HTLV-2 para MT-2, estes soros apresentam reatividade maior para MoT, conforme evidenciado pelo algoritmo assíncrono utilizado neste estudo. Assim, o FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2) se destaca na sua capacidade de confirmar casos e, ainda, diferenciar a infecção por HTLV-1 e HTLV-2, grande questão no acompanhamento dos indivíduos infectados por HTLV. Diante do exposto, este trabalho propõe que a confirmação do diagnóstico da infecção humana por HTLV deve ser realizada utilizando a metodologia FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2) após resultados prévios obtidos de triagem sorológica realizada com metodologias de alta sensibilidade, baixo custo e fácil manuseio, como a LVBA-recHTLV-1/2, CLIA e futuros testes rápidos a serem desenvolvidos.

No que tange a aplicabilidade para o prognóstico da infecção pelo HTLV, a infecção assintomática é capaz de produzir diferenças imunológicas significativas em pacientes com a infecção crônica (BRITO-MELO et al., 2002; 2003; 2007). Existem problemas concretos no manejo clínico dos pacientes com HTLV, especialmente no que se refere ao acompanhamento e predição de desenvolvimento de manifestações clínicas como a HAM/TSP. Atualmente, não existem biomarcadores de acompanhamento clínico de pacientes com a Mielopatia Associada ao HTLV ou qualquer outra das manifestações associadas ao vírus. Vários fatores, como

subpopulações celulares, citocinas, quimiocinas e leucotrienos já foram propostos como biomarcadores de acompanhamento clínico, no entanto, nenhum deles pode ser utilizado isoladamente para a diferenciação do quadro clínico assintomático de pacientes com possível HAM e também daqueles com o quadro clínico já instalado de HAM/TSP (LABANCA et al., 2015; COELHO-DOS-REIS et al., 2007 e 2009).

No presente trabalho, amostras de indivíduos com HTLV-1, assintomáticos, foram capazes de apresentar reatividade de IgG1 anti-antígenos do HTLV de forma semelhante em um percentual significativo dos pacientes HTLV apresentando HAM/TSP. Foi possível evidenciar que a metodologia FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2) apresentou performance moderada em identificar indivíduos assintomáticos e HAM/TSP com valores de sensibilidade. Dentro deste contexto, é importante ressaltar que os epitopos aqui pesquisados são de origem não conformacional devido aos processos de desnaturação decorrente da fixação, que utiliza o reagente paraformoldeído capaz de desnaturar as proteínas e mantê-las em conformação estável (não móvel) e linear, sem sua estrutura quaternária tridimensional. Porém, mesmo com este processo ocorrendo, a reatividade obtida nas amostras foi extremamente elevada, gerando resultados que contribuem em 100% na sensibilidade do teste para o diagnóstico.

No entanto, o resultado acurado de reatividade de anticorpos observado no FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2) deve ser observado considerando o ambiente desnaturante, que favorece a ligação de anticorpos específicos para epitopos lineares do HTLV. Dentro dos antígenos de HTLV, já foram descritos por Hadlock e cols. (1999) epitopos conformacionais reconhecidos como associados à resposta de proteção, ou seja, apenas pacientes assintomáticos tem anticorpos que reconhecem estes determinados epitopos conformacionais, e ainda descreveram que anticorpos anti-Env (gp46), que predominam em indivíduos assintomáticos, são direcionados para epitopos específicos conformacionais desta proteína. Esses anticorpos não foram direcionados para epitopos não imunodominantes. Assim, anticorpos neutralizantes, que prevalecem no grupo assintomáticos (AS) em relação ao grupo sintomático (HT), só reagiriam para epitopos conformacionais presentes na proteína na forma nativa. Desta forma, novas estratégias necessitam de desenho acurado para testar epitopos conformacionais e, assim, contribuir para o melhoramento do desempenho do FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2) e sua aplicabilidade ao prognóstico da infecção crônica pelo HTLV. Levando em conta, ainda, que anticorpos neutralizantes não são o principal mecanismo de proteção contra a infecção do HTLV, é necessário considerar estratégias que englobem outros

elementos associados à proteção, como expressão de HBZ e a ativação de células TCD8<sup>+</sup> (HADLOCK et al., 1999; JACOBSON et al., 1980).

A proposta inicialmente apresentada pelo presente estudo foi executada de forma a preencher a lacuna existente quanto à possibilidade de se ampliar o acesso da população ao diagnóstico da infecção pelo HTLV, para tanto, a grande contribuição deste trabalho foi trazer uma estratégia inovadora, inclusive com patente já depositada em 18 de maio de 2020 sob o nº BR102020009911-6, por se tratar de uma metodologia ainda não descrita ou realizada anteriormente, que compreende etapas que podem facilmente ser executadas e com custos muito menores em relação às metodologias existentes.

Dentro do contexto de técnicas utilizando a citometria de fluxo como base para produção de métodos diagnósticos para doenças infecciosas, é importante citar que o nosso grupo possui um pedido de patente nº BR102012005567-8, que se refere a um método para diagnóstico diferencial de doença de chagas, leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar, utilizando igualmente a citometria de fluxo, corroborando sua aplicabilidade no diagnóstico clínico com potencial para o mercado. O teste denominado FC-TRIPLEX Chagas/Leish IgG1 é realizado em um ensaio multiplex, que utiliza marcação fluorescente diferencial dos agentes biológicos com concentrações gradativas de fluorocromos distintos, incluindo Alexa Flúor-647, o que permite a verificação do perfil de reatividade de IgG1 com os agentes biológicos. A análise dos resultados emprega um algoritmo dessincronizado, assim como o teste do presente trabalho, no entanto, para FC-TRIPLEX Chagas/Leish IgG1, a avaliação é baseada na detecção do percentual de parasitas fluorescentes positivos em uma sequência pré-estabelecida de três avaliações, com variações no suporte antigênico e diluições do soro. A cada avaliação da sequência é possível confirmar ou excluir a reação a um dos agentes etiológicos envolvidos no teste, de forma que, finalizada a última análise, pode-se confirmar a infecção para leishmaniose visceral, leishmaniose tegumentar, doença de chagas, ou excluir a infecção por um dos três patógenos (TEIXEIRA-CARVALHO et al., 2015).

Como pôde ser observado nos resultados apresentados, a metodologia FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2) apresenta elevada sensibilidade, permitindo identificar com assertividade até mesmo indivíduos assintomáticos por utilizar um algoritmo assíncronico baseado na subtração de reatividades, o que leva a resultados com elevado desempenho (AUC, Co-neg e Co-pos de 1,00), livre de falso-positivos e falso-negativos, o que representa um grande avanço para a solução do enorme desafio enfrentado na detecção de indivíduos infectados pelo

HTLV. A metodologia FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2) propõe a otimização da triagem sorológica e da tipagem viral nos bancos de sangue e permite o imediato encaminhamento dos indivíduos confirmados como portadores dos vírus HTLV-1/2 aos centros de referência para adequado acompanhamento.



## **7- Conclusão**

No presente trabalho foi possível desenvolver um novo método sorológico, denominado FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2), que demonstrou elevado desempenho e aplicabilidade para o diagnóstico universal da infecção humana pelo HTLV-1/2. Adicionalmente, FC-Duplex IgG1 (HTLV-1/2) apresentou aplicabilidade no diagnóstico diferencial da infecção humana pelo HTLV-1 e HTLV-2, empregando a citometria de fluxo, em plataforma única, para a pesquisa de anticorpos IgG1. De nosso conhecimento, esta é a primeira estratégia sorológica além do *Western Blot* capaz de segregar indivíduos infectados pelo HTLV-1 e HTLV-2, preenchendo a grande lacuna existente no diagnóstico diferencial da infecção humana pelo HTLV.

## 8- Referências

AHUKA-MUNDEKE, S. et al. Identification and molecular characterization of new simian T cell lymphotropic viruses in nonhuman primates bushmeat from the Democratic Republic of Congo. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v.28, n.6, p.628-635, jun, 2012. DOI: 10.1089/aid.2011.0211

ALCANTARA, L C J. Globin haplotypes of human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) infected individuals in Salvador, Bahia, Brazil suggest a postcolumbian African origin of this virus. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome**, v. 33, n. 4 p. 536-542, agosto, 2003. DOI: 10.1097/00126334-200308010-00016

ALESSIO, G D. et al. Innovations in diagnosis and post-therapeutic monitoring of Chagas disease: Simultaneous flow cytometric detection of IgG1 antibodies anti-live amastigote, anti-live trypomastigote, and anti-fixed epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Immunological Methods**, Publicado por Elsevier BV, v. 413, p. 32-44, nov, 2014. DOI: 10.1016/j.jim.2014.07.005

ALMEIDA, L G.; FERNANDES, L V.; MACHADO, G. Soroprevalência de HTLV-1/2 em doadores de sangue do hemocentro regional de Catalão, Goiás. **Revista Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.19, p.93, set, 2014.

ALVES, F A. **Prevalência de infecção pelos vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 e 2 (HTLV-1 e HTLV-2) e vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (HIV-1) em população infectada pelos vírus da hepatite B (HBV) e hepatite C (HCV)**. Dissertação de Mestrado. - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2018.

AMARANTE, M F C. et al. Human T Cell Leukemia Virus Type 1 Infection of the Three Monocyte Subsets Contributes to Viral Burden in Humans. **Journal of Virology**, v. 90 n. 5, p. 2195-2207, mar, 2016. DOI: 10.1128/JVI.02735-15

ARAÚJO, A P Q C.; FONTENELLE, L M C.; PÁDUA, P A. Juvenile Human T Lymphotropic Virus Type 1– Associated Myelopathy. **Clinical Infectious Disease**, v. 35, n. 2, p. 201-204, jul, 2002. DOI: 10.1086/341251

ARAÚJO, T H A. **Desenvolvimento de um banco de dados (HTLV-1 Molecular Epidemiology Database) para datamining e data management de sequências do HTLV-1**. Dissertação (Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2012.

BANERJEE, P.; FEUER, G.; BARKER, E. Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1) p12I Down-Modulates ICAM-1 and -2 and Reduces Adherence of Natural Killer Cells, Thereby Protecting HTLV-1-Infected Primary CD4<sup>+</sup> T Cells from Autologous Natural Killer Cell-Mediated Cytotoxicity despite the Reduction of Major Histocompatibility Complex Class I Molecules on Infected Cells. **Journal of Virology**, v. 81, n.18, p. 9707-9717. DOI: 10.1128/JVI.00887-07.

BARMPAS, D B S. et al. Infecção pelo HTLV-1/2 em gestantes brasileiras. **Revista HUPE**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 3, p. 80-87, 2014. DOI: 10.12957/rhupe.2014.12132

BARRIOS, C S. Recombinant Human T-cell Leukemia Virus Types 1 and 2 Tax Proteins Induce High Levels of CC-chemokines and Downregulate CCR5 in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. **Viral Immunology**, v. 24, n. 6, p. 429-439, dez, 2011. DOI: 10.1089/vim.2011.0037

BARTHOLOMEW, C. et al. Transmission of HTLV-I and HIV among homosexual men in Trinidad. **Jama**, v. 257, n. 19, p. 2604-2608, maio, 1987. DOI: 10.1001/jama.1987.03390190082024

BEILKE, M A. Retroviral coinfections: HIV and HTLV: taking stock of more than a quarter century of research. **AIDS Research and Human Retroviruses**, New York, v. 28, n. 2, p. 139-147, fev, 2012. DOI: 10.1089/aid.2011.0342

BERTAZZONI, U. et al. Intracellular localization and cellular factors interaction of HTLV-1 and HTLV-2 Tax proteins: similarities and functional differences. **Viruses**, v. 3 n. 5, p. 541-560, maio, 2011. DOI: 10.3390/v3050541

BITTENCOURT, A L.; OLIVEIRA, M F. Dermatite infecciosa associada ao HTLV-I (DIH) infante-juvenil e do adulto. **Anais Brasileiros Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 80, supl. 3, p. S364-S369, nov-dez, 2005. DOI: 10.1590/S0365-05962005001000017

BOLTON, W V. et al. Partial nucleotide sequence analysis of the first case of human T lymphotropic virus type II from Australia. **AIDS Research and Human Retroviruses**, New York, v. 11, n. 6, p. 765-767, mar, 2009. DOI: 10.1089/aid.1995.11.765

BOXUS, M. et al. The HTLV-1 Tax interactome. **Retrovirology**, v. 5, n. 76, ago, 2008. DOI: 10.1186/1742-4690-5-76

BRAGA, A A. et al. Análise da soroprevalência de HTLV-1/2 em doadores de sangue de Patos-PB. **Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança**, João Pessoa, v. 10, n. 1, p. 7-10, jun, 2012. ISSN 1679-1983. Semestral

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. – Portaria nº 1376 de 19 de novembro de 1993. Aprova alterações na Portaria n. 721/GM, de 09.08.89, que aprova Normas Técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Seção 1, Brasília, DF, dez, 1993.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 153, de 14 de junho de 2004. Determina o Regulamento Técnico para os procedimentos hemoterápicos, incluindo a coleta, o processamento, a testagem, o armazenamento, o transporte, o controle de qualidade e o uso humano de sangue, e seus componentes, obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, da placenta e da medula óssea. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, junho de 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. RDC Nº. 220, de 27 de Dezembro de 2006. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o Funcionamento de Bancos de Tecidos Musculoesqueléticos e de Bancos de Pele de origem humana, **ANVISA**, Secretaria de Estado de Saúde, dez, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. Manual de controle das doenças sexualmente transmissíveis. **Ministério da Saúde**, 4ª ed. Brasília, DF, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia do manejo clínico do HTLV. **Ministério da Saúde**, Secretaria de Vigilância em Saúde, Brasília, DF, 2013.

BRITO-MELO G E A. et al. Phenotypic study of peripheral blood leucocytes in HTLV-I-infected individuals from Minas Gerais, Brazil. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 55, ed. 6, p. 621-628, jun, 2002. DOI: 10.1046/j.1365-3083.2002.01087.x

BRITO-MELO, G. E. A. et al. Establishment of a flow cytometric serological assay to detect anti-HTLV-I serum IgG applicable in the prognosis of HTLV-I infection. In: The 11th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses, **AIDS Research and Human Retroviruses**, São Francisco, v. 19. p. S-39, jun, 2003.

BRITO-MELO, G. E. A. et al. Searching for leukocyte phenotypic features applicable as prognostic tool for HTLV-I syndrome in clinical immunology. In: The 11th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Viruses. **AIDS Research and Human Retroviruses**, São Francisco, v. 19, p. S39-S39, jun, 2003.

BRITO-MELO, G E A. et al. IL-10 produced by CD4+ and CD8+ T cells emerge as a putative immunoregulatory mechanism to counterbalance the monocyte-derived TNF-alpha and guarantee asymptomatic clinical status during chronic HTLV-I infection. **Clinical Experimental Immunology**, v. 147, n, 1, p. 35-44, jan, 2007. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2006.03252.x

CALATTINI, S. et al. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. **Retrovirology**, v. 2, n. 30, maio, 2005. DOI: 10.1186/1742-4690-2-30

CAMPOS, K R. **Desafios no diagnóstico da infecção pelos Vírus Linfotrópicos de Células T Humanas do tipo 1 e tipo 2 (HTLV-1 e HTLV-2) em pacientes infectados com o HIV-1**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. São Paulo, 2016.

CAO, Q. et al. A Label-Free Fluorescent Molecular Beacon Based on DNA-Ag Nanoclusters for the Construction of Versatile Biosensors. **Biosens Bioelectron**, v. 74, p. 318-321, dez, 2015. DOI: 10.1016/j.bios.2015.06.044.

CARVALHO, J F. et al. Soroprevalência para retrovírus em uma amostra da população de Rio Branco (Acre). **Revista Baiana De Saúde Pública**, v. 26, n. 1-2, p. 9-18, jan-dez, 2002.

CASTRO, B G. et al. Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. **Transfusion**, v. 37, n. 2, p. 242-243, fev, 1997. DOI: 10.1046/j.1537-2995.1997.37297203532.x

COELHO-DOS-REIS, J G A. Desempenho da pesquisa de imunoglobulinas G por citometria de fluxo aplicada ao diagnóstico e prognóstico da infecção pelo HTLV-1. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG, 2008.

COELHO-DOS-REIS, J G A. et al. Performance of IgG and IgG1 anti-HTLV-1 reactivity by an indirect immunofluorescence flow cytometric assay for the identification of persons infected with HTLV-1, asymptomatic carriers and patients with myelopathy. **Journal of Virological Methods**, v.160, ed. 1-2, p. 138-148, set, 2009. DOI: 10.1016/j.jviromet.2009.5.007

COELHO-DOS-REIS, J G A. et al Evaluation of the effects of Quercetin and Kaempferol on the surface of MT-2 cells visualized by atomic force microscopy. **Journal of Virological Methods**, v. 174 ed. 1-2, p. 47-52, jun, 2011. DOI: 10.1016/j.jviromet.2011.03.019

COELHO-DOS-REIS, J G A. et al. O sistema imune na infecção crônica pelo HTLV: biomarcadores imunológicos de diagnóstico e monitoração de evolução e implicações no tratamento. **Cadernos Hemominas**, Belo Horizonte, FUNDAÇÃO HEMOMINAS, v.16. cap. 4, ed. 6, 2015. ISBN: 978-85-60055-04-3 (e-book)

COELHO-DOS-REIS, J G A. et al. Flow cytometric-based protocols for assessing anti-MT-2 IgG1 reactivity: High-dimensional data handling to define predictors for clinical follow-up of Human T-cell Leukemia virus type-1 infection. **Journal of Immunological Methods**, v. 444, p. 36-46, mai,2017. DOI: 10.1016/j.jim.2017.02.006

COLIN, D D. et al. Prevalência da infecção pelo vírus linfotrópico humano de células T e fatores de risco associados à soropositividade em doadores de sangue da cidade de Rio Branco, AC, Brasil (1998-2001). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 6, p. 677-683, nov-dez, 2003. DOI: 10.1590/S0037-8682200300060006

CONITEC - Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias. *Western Blot* e PCR em tempo real em pacientes com leucemia/linfoma de células T do adulto associado ao HTLV-1. Relatório de Recomendação N° 220, Maio/2016. **Ministério da Saúde**, Brasília, DF, 2016.

CORDEIRO, C A. et al. Imunogenética das uveítes. **Arq. Brasileira de Oftalmologia**. São Paulo, v.71, n. 2, p. 295-299, abr, 2008.

COSTA, C A. **Transmissão Intrafamiliar do HTLV: Investigação Sorológica em Familiares de Pacientes Acompanhados no Ambulatório do Núcleo de Medicina Tropical da UFPA**. 2010. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais) – Universidade Federal do Pará, Pará, 2010.

COULDERC L. J.; et. al. Antibodies to HTLV-I in Sjögren's syndrome. **Lancet**, v. 345, n. 8941, p. 72, jan, 1995.

CRUZ, B A.; SOARES, B C.; PROIETTI, Fernando. Manifestações reumáticas associadas ao vírus linfotrópico humano de células T do tipo I (HTLV-I). **Revista Brasileira de Reumatologia**. São Paulo, v. 45, n. 2, p. 71-77, abr, 2005. DOI: 10.1590/S0482-50042005000200005

CRUZ, D M. **Vírus Linfotrópico de Células T humano (HTLV) – Tipo 1 e Tipo 2: estudo epidemiológico dos doadores de sangue soropositivos – Maranhão, Brasil. 2011**. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Programa de Pós-Graduação Saúde e Ambiente da Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2011.

CUNHA, C F. et al. Citometria de Fluxo: Imunofenotipagem e Avaliação da Produção de Citocinas. **Mistério da Saúde**. Fundação Oswaldo Cruz, 2012.

DAL FABRO, M M F J. et al. Infecção pelo HTLV 1/2: atuação no pré-natal como estratégia de controle da doença no Estado de Mato Grosso do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 2, p. 148-151, mar-abr, 2008. DOI: 10.1590/S0037-86822008000200003

DAMÁSIO, M. A. S. et al. PROIETTI, A. B. F (org). Transmissão Vertical do HTLV. **Cadernos Hemominas**, Belo Horizonte, FUNDAÇÃO HEMOMINAS v. 16, cap. 7, ed. 6, p. 150-161, 2015.

DIAS, A R N. et al. Human T Lymphotropic Virus and Pulmonary Diseases. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n.1879, ago, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01879

DREZETT, J. et al. Doenças sexualmente transmissíveis em mulheres que Sofrem crimes sexuais. Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. **Reprodução & climatério**, Elsevier Editora Ltda, v. 27, n.3, p. 109–116, set-dez, 2013. DOI: 10.1016/j.recli.2013.03.004

EGUCHI, K. et al. Primary Sjögren's syndrome with antibodies to HTLV-I: clinical and laboratory features. **Ann Rheum Dis**, v. 51, n. 6, p. 769-776, jun, 1992. DOI: 10.1136/ard.51.6.769

EHRlich, G D et al. **PCR protocols: A guide to methods and applications**. (edits). Detection of human T-cell lymphoma/leukemia viruses. San Diego, Academic Press, 1989. p. 324-336. ISBN: 9780123721815

ERICHSEN, E S. et al. **Medicina Laboratorial para o Clínico**, 1. ed. Coopmed. 2009, 783 p. ISBN: 978-85-7825-005-8

ESTES, M C.; SEVALL, J S. Multiplex PCR using real time DNA amplification for the rapid detection and quantification of HTLV I or II. **Mol Cell Probes**, v. 17, n. 2-3, p. 59-68, jun, 2003. DOI: 10.1016/s0890-8508(03)00002-1

FERREIRA JUNIOR, O C.; PLANELLES, V.; ROSENBLATT, J D. Human T-cell leukemia viruses: epidemiology, biology, and pathogenesis. **Blood Rev**, v. 11 n. 2, p. 91-104, junho, 1997. DOI: 10.1016/s0268-960x(97)90015-1

FERREIRA, L S C. et al. Soroprevalência do vírus linfotrópico de células T humanas em comunidades ribeirinhas da região nordeste do Estado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Ananindeua, v.1, n.3, p. 103-108, set, 2010. DOI: 10.5213/S2176-62232010000300014

FILHO, R A C. et al. Expressão das Proteína p19 (gag) e gp21 (env) do HTLV-1 no Tecido Tireoideano de Pacientes com Doença Auto-imune da Tireoide e no Tecido Tireoideano Normal. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, v. 44, n. 5, out, 2000. DOI:10.1590/S0004-27302000000500009

FRANCHINI, G. Molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I infection. **Blood**, Washington, v. 86, n.10, p. 3619-3639, fev, 2013.

FRANCO, G M. **Desenvolvimento e avaliação de desempenho de um teste diagnóstico sorológico para a detecção da infecção pelos vírus HTLV-1 e HTLV-2.** 2019. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. Belo Horizonte, 2019.

FUJINO, R. Improvement of gelatin particle agglutination test for detection of anti-HTLV-I antibody. **Jpn J Cancer Res**, v. 82, n. 4, p. 367-370, abr, 1991. DOI: 10.1111/j.1349-7006.1991.tb01856.x

FUJIYOSHI, T. et al. Characteristic distribution of HTLV type I and HTLV type II carriers among native ethnic groups in South America. **AIDS Res Human Retroviruses**, v. 15, n. 14, p. 1235-1239, set, 1999. DOI: 10.1089/088922299310124

GABBAI, A A. et al. Seletivity of human T-lymphotropic virus type-I (HTLV-I) and HTLV-2 infection among different populations in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v. 49, n. 6, p. 664-671, dez, 1993. DOI: 10.4269/ajtmh.1993.49.664

GALLEGO, S. et al. Medeot S. Usefulness of a Nested-polymerase chain reaction for molecular diagnosis of human T-cell lymphotropic virus type I/II. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 4, p. 377-380. DOI: 10.1590/S0074-02762004000400006

GALLO, R C. The discovery of the first human retrovirus: HTLV-1 and HTLV-2. **Retrovirology**, v. 2, n. 17, mar, 2005. DOI: 10.1186/1742-4690-2-17

GASTALDELLO, R. et al. Efficiency of indirect immunofluorescence assay as a confirmatory test for the diagnosis of human retrovirus infection (HIV-1 and HTLV-I/II) in different at risk populations. **Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 41, n. 3, p. 159-164, mai, 1999. DOI: 10.1590/S0036-46651999000300005

GASTALDELLO, R.; HALL, W W.; GALLEGGO, S. Seroepidemiology of HTLV-I/II in Argentina: an overview. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 35, n. 3, p. 301-308, mar, 2004. DOI: 10.1097/00126334-200403010-00012

GESSAIN, A. et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. **Lancet**, v, 2, p. 407-410, ago, 1985. DOI: 10.1016/s0140-6736(85)92734-5

GESSAIN, A.; CASSAR, O. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 388, nov, 2012. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00388

GESSAIN, A. et al. HTLV-3/4 and simian foamy retroviruses in humans: Discovery, epidemiology, cross-species transmission and molecular virology. **Virology**, v. 435, n. 1, p. 187-199, jan, 2013. DOI: 10.1016/j.virol.2012.09.035

GOFF, S P. et al. **Fields Virology.** The Retroviruses and Their Replication. 6. Ed. USA, Edition Lippincott Williams & Wilkins, 2001, cap. 47, p. 1424-1473. ISBN-13: 978-1-4511-0563-0

GOMES & JUNIOR. HTLV II em doadores de sangue na Hemorrede do Ceará – HEMOCE. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n. 3, p. 315-318, mar, 2011.

GONÇALVES, D.U. et al. Epidemiology, treatment, and prevention of human T-cell leukemia virus type 1-associated diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 3 p. 577-589, jul, 2010. DOI: 10.1128/CMR.00063-09

GOON, P K. et al. High circulating frequencies of tumor necrosis alpha- and interleukin-2-secreting human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) -specific CD4+ T-cells in patients with HTLV-1-associated neurological disease. **Journal of Virology**, v. 77, n. 17 p. 9716-9722, set, 2003. DOI: 10.1128/JVI.77.17.9716-9722.2003

GRANT, C. et al. Human T cell leukemia virus type I and neurologic disease: events in bone marrow, peripheral blood, and central nervous system during normal immune surveillance and neuroinflammation. **Journal Cell Physiol**, v. 190, n. 2, p. 133-159, fev, 2002. DOI: 10.1002/jcp.10053

GRASSI, M. F. R. et al. Tuberculosis incidence in a cohort of individuals infected with human T-lymphotropic vírus type 1 (HTLV-1) in Salvador, Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, p. 491, 2016. DOI: 10.1186/s12879-016-1428-z

GREINER, M.; SOHR, D.; GÖBEL, P. A modified ROC analysis for the selection off cut-off vales and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. **Journal Immunology Methods**, v.185, n.1, p.123 -132, set, 1995. DOI: 10.1016/0022-1759(95)00121-p

HADLOCK, K G.; ROWE, J.; FOUNG, S K H. The humoral immune response to human T-cell lymphotropic virus type 1 envelope glycoprotein gp46 is directed primarily against conformational epitopes. **Journal of Virology**, v. 73, n. 2, p. 1205-1212, fev, 1999. DOI: 10.1128/JVI.73.2.1205-1212.1999

HALIN, M. et al. Human T-cell leukemia virus type 2 produces a spliced antisense transcript encoding a protein that lacks a classic bZIP domain but still inhibits Tax2-mediated transcription. **Blood**, v. 114, n. 12, p. 2427-2438, jul, 2009. DOI: 10.1182/blood-2008-09-179879

HALL, W W. et al. Multiple isolates and characteristics of human T-cell leukemia virus type II. **Journal Virol**, v. 66, n. 4, p. 2456-2463, abr, 1992. DOI: 10.1128/JVI.66.4.2456-2463.1992

HASHIKURA, Y. et al. The diversity of the structure and genomic integration sites of HTLV-1 provirus in MT-2 cell lines. **Hum Cell**, v. 29, n. 3, p. 122-129, jul, 2016. DOI: 10.1007/s13577-016-0136-8

HIGUCHI, M.; FUJII, M. Distinct functions of HTLV-1 Tax1 from HTLV-2 Tax2 contribute key roles to viral pathogenesis. **Retrovirology**, v. 6, n. 117, dez, 2009. DOI: 10.1186/1742-4690-6-117

HINO, S. et al. Mother to child transmission of human T-cell leukemia virus type I. Japanese. **Journal of Cancer Research**, v. 76, p. 474-480, 1985.



ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses. **Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses**. The 9th Report of the ICTV, 2011.

ISHAK R. et al. Identification of human T-cell lymphotropic virus type IIa infection in the Kayapo, an Indigenous population of Brazil. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 11 n. 7, p. 813-821, jul, 1995. DOI: 10.1089/aid.1995.11.813

ISHAK, R. et al. Epidemiological aspects of retrovirus (HTLV) infection among Indian populations in the Amazon Region of Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 4, p. 901-914, jul-ago,2003. DOI:10.15190/S012-311X2003000400013

JACOBSON S.; et. al. Circulating CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocytes specific for HTLV-I pX in patients with HTLV-I associated neurological disease. **Nature**, v. 348, p. 245-248, nov, 1990. DOI: 10.1038/348245a0

JESUS, L N N P. et al. IgA and IgG1 reactivities assessed by flow cytometry mirror clinical aspects of infants with ocular congenital toxoplasmosis. **Journal Immunological Methods**, v. 428, n. 1-8, jan, 2016. DOI: 10.1016/j.jim.2015.11.004

JIN D. Y.; JEANG K. T. HTLV-I Tax self-association in optimal trans-activation function. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, n. 2, p. 379-387, jan. 1997. DOI: 10.1093/nar/25.2.379.

KALYANARAMAN, V. S.; et. al. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. **Science**, v. 218, n. 4572, p. 571-573, nov. 1982. DOI: 10.1126/science.6981847.

KAMIHIRA, M.; KAUL, R.; MATTIASSON, B. Purification of recombinant protein A by aqueous two-phase extraction integrated with affinity precipitation. **Biotechnol Bioeng**, v. 40, ed. 11, p. 1381-1387, dez, 1992. DOI: 10.1002/bit.260401112

KAZANJI, M.; GESSAIN, A. Human T-cell Lymphotropic Virus types I and II (HTLV-I/II) in French Guiana: clinical and molecular epidemiology. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 5, p. 1227-1240, set./out. 2003. DOI: 10.1590/S0102-311X2003000500002

KITAGAWA, T.; et al. Antibodies to HTLV-I in Japanese immigrants in Brazil. **JAMA**, v. 256, n. 17, p. 2342, nov, 1986. DOI: 10.1001/jama.1986.03380170058009

KOZLOWSKI, A. G. **Perfil soroepidemiológico e molecular das infecções pelos vírus linfotrópicos de células T humanas 1 e 2 em grupos populacionais em Goiânia, Goiás**. Tese (Doutorado em Medicina Tropical e Saúde Pública) - Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, 2013.

KROON E. G.; PROIETTI A. B. F. C. HTLV-1/2 – O vírus, sua multiplicação e estrutura genômica. **Cadernos Hemominas**, v.16, cap.1, ed. 6, atual, Belo Horizonte: FUNDAÇÃO HEMOMINAS, 2015.

LABANCA L. et al. Electrophysiological analysis shows dizziness as the first symptom in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 31, n. 6, p. 649-654, jun, 2015. DOI: 10.1089/AID.2014.0153.

LAPERCHÉ S. et. al. Blood safety strategies for human T-cell lymphotropic virus in Europe. **Vox Sang**, v. 96, n. 2, p. 104-110, fev, 2009. DOI: 10.1111/j.1423-0410.2008.01136.x.

LAVORGNA A.; HARHAJ E. W. Regulation of HTLV-1 tax stability, cellular trafficking and NF- $\kappa$ B activation by the ubiquitin-proteasome pathway. **Viruses**, v. 6, n. 10, p. 3925-3943, out, 2014. DOI: 10.3390/v6103925

LEE T. H. et al. Quantitation of HTLV-I and II proviral load using real-time quantitative PCR with SYBR Green chemistry. **Journal Clin Virol**, v. 31, n. 4, p. 275-282, dez, 2004. DOI: 10.1016/j.jcv.2004.05.016.

LEON G. et. al. Seropositivity for HTLV types I and II among donors at the Municipal Blood Bank of Caracas and associated risk factors. **Rev Panam Salud Publica**, v. 13, n. 2-3, p. 117-123, fev-mar, 2003. DOI: 10.1590/s1020-49892003000200012

LIEGEOIS F. et. al. Identification and molecular characterization of new STLV-1 and STLV-3 strains in wild-caught nonhuman primates in Cameroon. **Virology**, v. 317, n. 2, p. 405-417, fev, 2008. DOI: 10.1016/j.virol.2007.09.037.

LIEGEOIS, F. et al. New STLV-3 strains and a divergent SIV<sub>mus</sub> strain identified in non-human primate bushmeat in Gabon. **Retrovirology**, v. 9, n. 28, mar, 2012. DOI: 10.1186/1742-4690-9-28

LIMA, G. M. et. al. Declínio da prevalência do HTLV-1/2 em doadores de sangue do Hemocentro Regional da Cidade de Uberaba, Estado de Minas Gerais, 1995 a 2008. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, Uberaba, v. 43, n. 4, p. 421-424, jul-ago. 2010. DOI: 10.1590/S0037-86822010000400017

LIMA, H. L. S. **Avaliação do perfil de progesterona plasmática em ovinos por quimioluminescência durante a gestação**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, fev. 2012.

LIMA M. V. A. **Avaliação fenotípica e funcional dos linfócitos T citotóxicos de indivíduos infectados pelo HTLV-1 com diagnóstico de HAM/TSP**. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa. Salvador: Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2014.

LIU H. et. al. Sensitivity and specificity of human T- lymphotropic virus (HTLV) type-I and II polymerase chain reaction and several serological assays in screening a population with a high prevalence of HTLV-II. **Transfusion**, v. 39, n. 11-12, p. 1185-1193, nov-dez. 1999. DOI: 10.1046/j.1537-2995.1999.39111185.x.

LOPES, M. S. S. N.; PROIETTI, A. B. F. C. HTLV-1/2 transfusional e hemovigilância: a contribuição dos estudos de look-back. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto v. 30, n. 3, p. 229- 240, 2008. DOI: 10.1590/S1516-84842008000300013

- MAHIEUX, R.; GESSAIN, A. The human HTLV-3 and HTLV-4 retroviruses: New members of the HTLV family. **Pathol Biol**, v. 57, n. 2, p. 161-166, Paris, mar. 2009. DOI: 10.1016/j.patbio.2008.02.015
- MALONEY, E. M. et al. Endemic human T cell lymphotropic virus type II infection among isolated Brazilian Amerindians. **Journal Infect Dis**, v. 166, n. 1, p. 100-107, jul. 1992. DOI: 10.1093/infdis/166.1.100.
- MANEL N. et. al. GLUT-1 is the receptor of retrovírus HTLV. **Medical Sciences**, Paris, v. 20, n. 3, p. 277-279, mar. 2004. DOI: 10.1051/medsci/2004203277.
- MANEL N.; BATTINI J.L.; TAYLOR N.; SITBON M. HTLV-1 tropism and envelope receptor. **Oncogene**, v. 24, n. 39, p. 6016-6025, set, 2005. DOI: 10.1038/sj.onc.1208972.
- MANNS, A.; HISADA, M.; GRENADE, L. Human T-lymphotropic virus type I infection. **The Lancet**, v.353, n. 9168, p. 1951-1958, jun, 1999. DOI: 10.1016/S0140-6736(98)09460-4.
- MARINHO, J. et. al. Increased risk of tuberculosis with human T-lymphotropic virus-1 infection: a case control study. **JAIDS**, v. 40, n. 5, p. 625-628, dez. 2005. DOI: 10.1097/01.qai.0000174252.73516.7
- MARTINEZ, E. Z.; LOUZADA N. F.; PEREIRA, B. B. A curva ROC para testes diagnosticos. **Caderno de Saúde Col**, Rio de Janeiro, v.11, p.7-31, jan, 2003.
- MARTINEZ, E. Z.; LOUZADA-NETO, F. Curvas TG-ROC com confiança. **Revista Brasileira de Biomedicina**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 87-97, abr, 2008.
- MARTINEZ M. P.; AL-SALEEM J.; GREEN P. L. Comparative virology of HTLV-1 and HTLV-2. **Retrovirology**, v. 16, n. 21, ago, 2019. DOI: 10.1186/s12977-019-0483-0
- MARTINS F.M. et al. Conhecendo o HTLV e suas implicações no atendimento odontológico. **Revista Gaúcha de Odontologia**, Porto Alegre, v.59, n.2, p.293-297, abr-jun., 2011.
- MARTINS, M. L. et. al. Patogênese da infecção pelo HTLV. HTLV. **Cadernos Hemominas**, Belo Horizonte: FUNDAÇÃO HEMOMINAS, v.16. cap.2. 6.ed. 2015. ISBN: 978-85-60055-04-3 (e-book)
- MATSUOKA M. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) infection and the onset of adult T-cell leukemia (ATL). **Retrovirology**, v. 2, n. 27, abr. 2005. DOI: 10.1186/1742-4690-2-27
- MATSUOKA M.; JEANG K.T. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 4, p. 270-280, abr. 2007. DOI: 10.1038/nrc2111.
- MATSUOKA M.; GREEN P.L. The HBZ gene, a key player in HTLV-I pathogenesis. **Retrovirology**, v. 6, n. 71, ago, 2009. DOI: 10.1186/1742-4690-6-71.
- MATSUYAMA, W. et. al. Influence of human T lymphotropic virus type I on cryptogenic fibrosing alveolitis - HTLV-I associated fibrosing alveolitis: proposal of a new clinical entity.

**Clin Exp Immunol**, v.133, n.3, p. 97–403, set, 2003. DOI: 10.1046/j.1365-2249.2003.02240.x

MEDEIROS, A. C. M. **Investigação da prevalência da infecção por vírus linfotrópico das células T Humanas (HTLV) em gestantes de alto risco**. Dissertação (Mestrado em Tocoginecologia) - Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

MELAMED A. et. al. HTLV-1 drives vigorous clonal expansion of infected CD8(+) T cells in natural infection. **Retrovirology**, v. 12, n. 91, nov. 2015. DOI: 10.1186/s12977-015-0221-1

MILEY W. J. et al. Real-time polymerase chain reaction assay for cell-associated HTLV type I DNA viral load. **AIDS Res Hum Retroviruses**, v. 16, n. 7, p. 665-675, maio 2000. DOI: 10.1089/088922200308891.

MINAS GERAIS. **Lei nº 17.344 de 15 de Janeiro de 2008**. Torna obrigatória a realização de testes sorológicos para o diagnóstico da infecção pelo Vírus Linfotrópico da Célula T Humana – HTLV-1 e HTLV-2 – E o tratamento dos casos identificados. Lex: Governo do Estado de Minas Gerais, 2008.

MIURA T. et al. Phylogenetic subtypes of human T-lymphotropic virus type I and their relations to the anthropological background. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 91, n. 3, p. 1124-1127, fev. 1994. DOI: 10.1073/pnas.91.3.1124.

MIYOSHI I. et. al. Type C virus particles in a cord T-cell line derived by co-cultivating normal human cord leukocytes and T human leukaemic T cell. **Nature**, v. 294, n. 5843, p. 770-771, dez. 1981. DOI: 10.1038/294770a0.

MOROZOV, V. A.; WEISS R. A. Two types of HTLV-1 particles are released from MT-2 cells. **Virology**, v. 255, n. 2, p. 279-284, mar. 1999. DOI: 10.1006/viro.1998.9578.

MUELLER, N. The epidemiology of HTLV-I infection. **Cancer Causes Control**, v. 2, n. 1, p. 37-52, jan. 1991. DOI: 10.1007/BF00052359.

MUELLER, N. et al. Findings from the Miyazaki Cohort Study. **JAIDS**, Filadélfia, v. 13, ed. 1, p. s2-s7, 1996.

MURPHY E. L. et. al. Human T-Lymphotropic Virus Type I (HTLV-I) Seroprevalence in Jamaica: I. Demographic Determinants. **Am J Epidemiol**, v. 133, n. 11, p. 1114-1124, jun. 1991. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a115824.

MURPHY, F.A et al. **Virus Taxonomy. In: Fundamental Virology**. Lippincott Raven, Philadelphia, 1996.

NAMEN-LOPES MSS, et. al. Lookback study of HTLV-1 and 2 seropositive donors and their recipients in Belo Horizonte, Brazil. **Transfus Med**, v. 19, n. 4, p. 180-188, ago. 2009. DOI: 10.1111 /j.1365-3148.2009.00932.x.

NASCIMENTO L. R. et. al. Mielopatia Sinalizando o Diagnóstico Tardio da Infecção por HTLV: Um Relato de Caso. **J. Bras. Doenças Sex. Transm.**, v. 24, n. 4, p. 267-271, Rio de Janeiro, 2012. ISSN: 0103-4065. DOI: 10.5533/DST-2177-8264-201224409.

NETO I. F. et. al. Fortalecimento muscular em pacientes com HTLV-I e sua influência no desempenho funcional: um estudo piloto. **Revista Pesquisa em Fisioterapia**, Salvador, v. 2, n. 2, p. 143-155, dez. 2012. DOI: 10.17267/2238-2704rpf.vi2.96

NOBRE V. et al. Dermatologic lesions in patients infected with the human T-cell lymphotropic vírus type 1 (HTLV-1). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, Uberaba, vol. 38, n. 1, p. 43-52, jan-fev. 2005. DOI: 10.1590/S0037-86822005000100009

NOMURA, H. et. al. Diversity of cell phenotypes among MT-2 cell lines affects the growth of U937 cells and cytokine production. **Hum Cell**, v. 32, n. 2, p.185-192, ar. 2019. DOI: 10.1007 / s13577-018-00231-3.

OLIVEIRA, H. A.; MACIEIRA, J. C.; FAKHOURI, R. Polimiosite associada a infecção por HTLV-I: relato de caso. **Arq Neuropsiquiatr**, 2000, vol. 58, n. 3B, p. 935-938, São Paulo, set. 2000. DOI: 10.1590/S0004-282X2000000500025

ORLETTI, M. P. S. V. **Prevalência de infecção pelos vírus Linfotrópicos de Células T Humanas (HTLV-1/2) em população adulta, atendida nas unidades de saúde do município de Vitória-ES.** Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) - Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, 2012.

OSAME M. et. al. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. **Lancet**, v. 327, ed. 8488 p. 1031-1032, maio 1986. DOI: 10.1016/s0140-6736(86)91298-5.

OSAME M. et al. Nationwide survey of HTLV-I-associated myelopathy in Japan: association with blood transfusion. **Ann Neurol**, v. 28, n. 1, p. 50-56, jul. 1990. DOI: 10.1002 / ana.410280110.

OZAWA P. M. M. et al. Vírus linfotrópico de células T humano tipo 1 (HTLV-1): implicações em doenças autoimunes. **Semina: Ciênc. Biol. Saúde**, v. 33, n. 1, p. 83-96, Londrina, jan./jun. 2012. DOI: 10.5433/1679-0367.2012v33n1p83.

PALACIOS, C. S. et al. Seroprevalence and risk factors for HTLV-I infection among ethnically and geographically diverse Peruvian women. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, p. 132-137, jun, 2003. DOI: 10.1016/S1201-9712(03)90009-9

PEREIRA, F. M. et. al. Evidence of New Endemic Clusters of Human T-Cell Leukemia Virus (HTLV) Infection in Bahia, Brazil. **Front Microbiol**, USA, v. 10, article 1002, maio 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01002.

PEREIRA W. A.; MESQUITA E. M. Vírus linfotrópico de células t humana (htlv): doenças associadas e dificuldades no diagnóstico e tratamento. **Rev. Ciênc. Saúde**, São Luís, v.17, n.1, p. 40-46, jan-jun, 2015. ISSN 2526-6179.

PINTO, D. O. et. al. HTLV-1 Extracellular Vesicles Promote Cell-to-Cell Contact. **Front Microbiol**, USA, v. 10, n. 2147, set. 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02147.

PISSINATE J. F. et. al. Upgrading the flow-cytometric analysis of anti-Leishmania immunoglobulins for the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Métodos J Immunol**, v. 336, n. 2, p. 193-202, jul. 2008. DOI: 10.1016 / j.jim.2008.04.018.

POIESZ B. J. et. al. 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**, v. 77, n. 12, p. 7415-7419, dez. 1980. DOI: 10.1073 / pnas.77.12.7415.

POIESZ B. et al. HTLV-II associated cutaneous T-cell lymphoma in a patient with HIV-1 infection. **The New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 342, n. 13, p. 930-936, mar. 2000. DOI: 10.1056/NEJM20000330342130

PORTELA, P. C. **Prevalência e diagnóstico laboratorial da infecção pelo vírus HTLV em gestantes de Mato Grosso do Sul, no período de 2002 a 2006**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília. Distrito Federal, 2008.

PORTO M. A. F. et al. Clinical and immunological consequences of the association between HTLV-1 and strongyloidiasis. **Rev. Soc. Bras. Med Trop**, Uberaba, v. 35, n. 6, p. 641-649, nov-dez. 2002. ISSN 1678-9849. DOI: 10.1590 / s0037-86822002000600016.

PROIETTI, A B F C.; SOARES, B C.; PROIETTI, F A. Human T cell lymphotropic viruses (HTLV-I/II) in South America: should it be a public health concern?. **Journal of Biomedical Science**, v. 9, p. 587-595, jun, 2002. DOI: 10.1159/000067286

PROIETTI, F A. et al. Global epidemiology of HTLV-1 infection and associated diseases. **Oncogene**, v. 24, n. 39, p. 6058-6060, set. 2005. DOI: 10.1038/sj.onc.1208968.

PROIETTI, A B F C. HTLV-I/II. **Cadernos Hemominas**, Belo Horizonte: Fundação Hemominas, v. 16, p. 651, ed. 6, 2006.

REUTER, A. C. S. M. **Soroprevalência do vírus HTLV em doadores de sangue do Hemocentro Regional de Blumenau no período de 2010 à 2016**. Dissertação (Graduação em Biomedicina) - Centro de Ciências da Saúde da Universidade Regional de Blumenau. Santa Catarina, 2018.

RIBAS J. G. R.; MELO G. C. N. Mielopatia associada ao vírus linfotrópico humano de células T do tipo 1 (HTLV-1). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, Uberaba, v. 35, n. 4, p. 377-384, jul-ago, 2002. DOI: 10.1590/S0037-86822002000400015

RIBEIRO, M. A. **Distribuição geográfica do HTLV-1/2 em mães de recém-nascidos submetidos à triagem neonatal em Minas Gerais, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia) - Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2009.

RIBEIRO, I. P. **Prevalência e caracterização molecular dos vírus linfotrópicos de células T humanas 1 e 2 em primodoadores de sangue e seus familiares no Estado do Piauí**.

Tese (Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública) - Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2014.

ROMANELLI, L. C. F.; CARAMELLI, P.; PROIETTI, A. B. F. C. O vírus linfotrópico de células T humanos tipo 1 (HTLV-1): Quando suspeitar da infecção?. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, vol.56, n.3, p.340-347, São Paulo, 2010. ISSN 0104-4230.

SABINO, E C.; CARVALHO, S M F. Diagnóstico laboratorial do HTLV. **Cadernos Hemominas**, Belo Horizonte: Fundação Hemominas, v.16, cap.3, ed. 6, 2015.

SANTOS, F. L. N.; LIMA, F. W. M. Epidemiologia, fisiopatogenia e diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV-I. **J. Bras. Patol. Med. Lab**, v. 41, n. 2, p. 105-116, Rio de Janeiro, abril 2005. DOI: 10.1590/S1676-24442005000200008.

SANTOS, M. M. et. al. Aspectos epidemiológicos da infecção por htlv-1 e htlv-2. **Cadernos Hemominas**, Belo Horizonte: Fundação Hemominas, v.16, cap.5, ed. 6, 2015.

SCHUPBACH, J. Human retrovirology. Facts and concepts. **Curr Top. Microb**, v. 142, p.1-115, 1989.

SEIKI, M. et al. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 80, n. 12, p. 3618-3622, jun, 1983. DOI: 10.1073/pnas.80.12.3618

SEMEÃO, L. E. S. et al. Soroprevalência do vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV) entre doadores de sangue em hemocentros de Maringá-Paraná e Boa Vista-Roraima. **Epidemiol. Serv. Saúde**, vol.24, n.3, p.523-529, Brasília, jul-set 2015. ISSN 2237-9622. DOI: 10.5123/S1679-49742015000300018.

SHIMOTOHNO, K. et al. Complete nucleotide sequence of an infectious clone of human t-cell leukemia virus type ii: an open reading frame for the protease gene. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.82, n. 10, p.3101-3105, maio, 1985. DOI: 10.1073/pnas.82.10.3101

SILVA, I. S. P. **Epidemiologia molecular do vírus linfotrópico de células t humanas – htlv-1/2 no estado do Amapá – Brasil**. Dissertação (Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitárias) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Macapá, 2006.

SILVA, I. C. et al. Moderada endemicidade da infecção pelo vírus linfotrópico-t humano na região metropolitana de Belém, Pará, Brasil. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 21, ed. 180018, São Paulo, out, 2018. ISSN 1980-5497. DOI: 10.1590/1980-549720180018

SINTASATH, D. M. et al. Genetic characterization of the complete genome of a highly divergent simian T-lymphotropic virus (STLV) type 3 from a wild Cercopithecus mona monkey. **Retrovirology**, v. 6, p. 97, out, 2009. DOI: 10.1186 / 1742-4690-6-97.

SOARES, B C.; PROIETTI, A B C.; PROIETTI, F A. Grupo Interdisciplinar de Pesquisas em HTLV. Vírus-T linfotrópico humano em familiares de candidatos a doação de sangue soropositivos: disseminação silenciosa. **Rev Panam Salud Publica**, Washington, v. 16, n. 6, p. 387-394, mai, 2004.

SOARES, B C.; PROIETTI, A B F C.; PROIETTI, F A. A. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 3, p. 926-931, mai-jun, 2005. DOI: 10.1590/S0102-311X2005000300027

SODRÉ, H. R. S. et al. Soroepidemiologia da infecção por HTLV-I/II em população assistida pelo Programa Saúde da Família em Salvador, Bahia. **J. Bras. Patol. Med. Lab**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 5, p. 369-374, out, 2010.

SOLTANI, A. et al. B. Molecular targeting for treatment of human T-lymphotropic virus type 1 infection. **Biomed Pharmacother**, publicado por Elsevier, v.109, p. 770-778, jan, 2019. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.10.139.

SOUZA, L. F. et. al. Soroprevalência e perfil dos doadores com HTLV-1/2 em um Hemocentro de Fortaleza. **Revista Encontros Universitários da UFC**, Fortaleza, v.1, n. 1, 2016.

SWITZER, W. M. et. al. Molecular analysis of human T-cell lymphotropic virus type II from Wayuu Indians of Colombia demonstrates two subtypes of HTLV-IIb. **Virus Genes**, Califórnia, v. 10, p. 153-162, jun, 1995.

SWITZER, W. M. et al. Evolução antiga e independente e características moleculares distintas do novo vírus linfotrópico T humano tipo 4. **Retrovirology**, v. 6, p. 9, fev, 2009. DOI: 10.1186/1742-4690-6-9

TEIXEIRA-DE-CARVALHO, A. et. al. FC-TRIPLEX Chagas/Leish IgG1: a multiplexed flow cytometry method for differential serological diagnosis of chagas disease and leishmaniasis. **Plos One**, Califórnia, v. 10, n. 4, abril, 2015.

UCHIYAMA, T. et. al. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. **Blood Sociedade Americana de Hematologia**, Washington, v. 50, n. 3, p. 481-492, set, 1977.

UCHIYAMA, T. Human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) and human diseases. **Annu Rev. Immunol.** Uchiyama, v. 15, p. 15-37, abril, 1997. DOI: 10.1146/annurev.immunol.15.1.15

VALLINOTO, A C R.; ISHAK, R. HTLV-2: uma infecção antiga entre os povos indígenas da Amazônia brasileira. **Rev Pan-Amaz. Saude**, Pará, vol.8, n.2, p.9-11, 2017. DOI: 10.5123/S2176-62232017000200001

VAN DOOREN, S. et. al. Evidence for a post-Columbian introduction of human T-cell lymphotropic virus [type I] [corrected] in Latin America. **Journal of General Virology**, v. 79, n. 2695 p. 708, errata abril, 1999, 80 (Pt4): 1087. DOI: 10.1099/0022-1317-79-11-2695

VERNANT, J. C et al. T-lymphocyte alveolitis, tropical spastic paresis and Sjögren's syndrome. **Lancet**, Londres, v. 331, ed.8578, p. 177, jan, 1988. DOI: 10.1016/s0140-6736(88)92744-4



VIANA, G. M. C. et. al. Seroprevalence of HTLV-1/2 among blood donors in the state of Maranhao, Brazil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, São José do Rio Preto, v. 36, ed. 1, p. 50-53, jan-fev, 2014. DOI: 10.5581/1516-8484.20140013

VIEIRA, Sonia. **Introdução à Bioestatística**. 5ª ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2015.

VITELLI-AVELAR, D. M. et. al. Non-conventional flow cytometry approaches to detect anti-Trypanosoma cruzi immunoglobulin G in the clinical laboratory. **Journal of Immunological Methods**, Publicado por Elsevier BV, v. 318, ed. 1-2, p. 102-112, jan, 2007. DOI: 10.1016/j.jim.2006.10.009

WENDLING, A. P. B. et al. The use of IgG antibodies in conventional and non-conventional immunodiagnostic tests for early prognosis after treatment of Chagas disease. **Journal of Immunological Methods**, Publicado por Elsevier BV, v. 370 n. 1-2, p. 24-34, jul, 2011. DOI 10.1016. ISSN 0022-1759.

WILLEMS, L. et al. Reducing the global burden of HTLV-1 infection: an agenda for research and action. **Antiviral Research**, publicado por Elsevier BV, v. 137, p. 41-48, jan, 2017. DOI: 10.1016./j.antiviral.2016.10.015

WOLFE, N. D. et. al. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. **Proceedings of The National Academy of Sciences, USA**, v. 102, n. 22, p. 7994-7999, may, 2005. DOI: 10.1073/pnas.0501734102

XAVIER, S N R.; OLIVEIRA, T S. **Soroprevalência de HTLV I e II em doadores de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia do estado do Piauí – HEMOPI entre os anos de 2006 a 2016**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biomedicina) - Centro Universitário de Saúde, Ciências Humanas e Tecnológicas do Piauí – UNINOVAFAPI, Teresina, 2019.

YAMAGUCHI, K. et. al. Human T lymphotropic virus type 1 uveitis after Graves' disease. **British Journal of Ophthalmology**, Reino Unido, v. 78, ed. 3, p.163–166, mar, 1994. DOI: 10.1136/bjo.78.3.163

YAMANO, Y. et. al. Correlation of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) mRNA with proviral DNA load, virus-specific CD8(+) T cells, and disease severity in HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP). **Blood Sociedade Americana de Hematologia**, Washington, v. 99, n 1, p. 88-94, jan, 2002. DOI: 10.1182/blood.v99.1.88

YDY, R. R. A. et al. Prevalência da infecção pelo vírus linfotrópico humano de células T - HTLV-1/2 entre puérperas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso, 2006. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v.42, n.1, p. 28-32, jan-fev, 2009. DOI: 10.1590/S0037-86822009000100007

YOSHIDA, M. SEIKI, M.; YAMAGUCHI, K.; TAKATSUKI, K. Monoclonal integration of human T-cell leukemia provirus in all primary tumors of adult T-cell leukemia suggests causative role of human T-cell leukemia virus in the disease. **Proc Natl Acad Sci, USA**, v.81, n.8, p. 2534–2537, abril, 1984; DOI: 10.1073/pnas.81.8.2534

ZACCHE-TONINI, A. C. et. al. Establishing tools for early diagnosis of congenital toxoplasmosis: Flow cytometric IgG avidity assay as a confirmatory test for neonatal screening. **Journal of Immunological Methods**. Publicado por Elsevier BV, v. 451, p. 37-47, dez, 2017. DOI: 10.1016/j.jim.2017.08.005

ZEHENDER, G. et. al. Human T-lymphotropic virus type 2 (HTLV-2) provirus in circulating cells of the monocyte/macrophage lineage in patients dually infected with human immunodeficiency virus type 1 and HTLV-2 and having predominantly sensory polyneuropathy. **Journal of Virology**, Washigton, v. 72, n. 9, p. 7664-7668, set, 1998. DOI:10.1128/JVI.72.9.7664-7668-1998

## 9- Apêndices

### Apêndice 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Título do Projeto:** Avanços no diagnóstico sorológico diferencial da infecção humana pelo HTLV-1 e HTLV-2: pesquisa de IgG1 anti-MT2/BJAB em plataforma única por citometria de fluxo (FC-Duplex HTLV-1/2-IgG1)

**Coordenador Geral do Estudo:** Dra. Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal

**Investigador:** Dra. Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal

**Centro de Pesquisa:** Centro de Pesquisas René Rachou – FIOCRUZ/MG, Av. Augusto de Lima, 1715, Belo Horizonte – MG, Telefone: (31) 3349-7764.

Leia este documento cuidadosamente, para entender a importância e significado do estudo. Ele pode conter palavras que você não entende. Para esclarecer suas dúvidas faça todas as perguntas que achar necessário. Você deve saber que quando assinar este documento estará concordando em participar de uma pesquisa aplicada, não devendo permanecer qualquer dúvida. Colocamo-nos a disposição para respondermos todas as suas perguntas.

## CONVITE PARA PARTICIPAÇÃO

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ler atentamente e compreender as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, deverá assinar ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado (a) de forma alguma.

### Carta de Informação

Prezado (a) participante,

O HTLV é um vírus associado a doença em humanos. Aproximadamente 98% dos indivíduos infectados não desenvolvem doença. No entanto, o HTLV-1 apresenta importância clínica significativa por participar na etiologia da mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP), uveíte associada ao HTLV-1 (HAU), eczema grave da infância, também denominado dermatite infecciosa (DI), entre outras. Já o HTLV-2, pode estar eventualmente associado a manifestações clínicas, como HAM/TSP, inflamação pulmonar e aumento da mortalidade por câncer. No Brasil a soroprevalência média encontrada entre doadores de sangue aptos à doação é cerca de 20 a 100 vezes mais alta do que a relatada para os Estados Unidos e Europa. Esse fato, aliado à extensão territorial e ao tamanho da população, indica que o Brasil abriga o maior número absoluto de indivíduos soropositivos para o HTLV-1 e 2 entre todos os países endêmicos.

Entre os grandes desafios encontrados pelos pesquisadores envolvidos em estudos sobre HTLV atualmente, destaca-se a busca pela preparação antigênica que possibilite o desenvolvimento de técnicas de caráter confirmatório (com elevada especificidade), tendo em vista o elevado custo e limitações das técnicas atualmente empregadas para o diagnóstico da infecção pelo HTLV-1e 2. Assim, o projeto proposto visa estabelecer novo método para diagnóstico sorológico diferencial da infecção humana pelo HTLV-1 e 2. Acredita-se que os resultados do trabalho promoverão alternativa viável e de utilização factível nos bancos de sangue e hospitais de referência que atendem a população doadora e portadores do vírus HTLV.

Todos os indivíduos que concordarem em participar como voluntários do estudo, serão submetidos gratuitamente às avaliações clínica e laboratorial a serem realizadas por

profissionais especialistas na Fundação Hemominas, Hospital das Clínicas e Centro de Pesquisas René Rachou. Essas avaliações não oferecem nenhum risco a você nem ao seu tratamento, uma vez que são exames simples realizados comumente. Caso seja detectada alguma alteração nessas avaliações, você receberá tratamento e acompanhamento adequados.

Sua participação é voluntária e você poderá desistir de participar a qualquer momento da pesquisa sem a perda de nenhum de seus benefícios. Além disso, durante toda a realização da pesquisa, você terá o direito de sanar suas dúvidas sobre os procedimentos a que está sendo submetido.

Os dados dessa pesquisa serão analisados e os resultados serão divulgados em revista científica da área de interesse, mas seu nome sempre estará guardado em sigilo, não aparecendo em nenhum local. Sendo assim, sua colaboração é fundamental, e desde já, contamos com sua participação.

Atenciosamente,

---

Dra. Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal

**TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO**

Eu, \_\_\_\_\_, concordo em participar da pesquisa “Avanços no diagnóstico sorológico diferencial da infecção humana pelo HTLV-1 e HTLV-2: pesquisa de IgG1 anti-MT2/BJAB em plataforma única por citometria de fluxo (FC-Duplex HTLV-1/2-IgG1)” sabendo que meus dados serão guardados em total sigilo e que poderei deixar de participar do estudo em qualquer momento sem a perda de nenhum dos benefícios.

Belo Horizonte, \_\_\_\_\_, de \_\_\_\_\_, 20\_\_\_\_.

Telefone para contato:

Dra. Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal: (31) 97096086

**Apêndice 2 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto René Rachou-IRR – Fiocruz/MG**

CENTRO DE PESQUISAS  
RENÉ RACHOU/FUNDAÇÃO  
OSWALDO CRUZ/ CPQRR/



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Avanços no diagnóstico sorológico diferencial da infecção humana pelo HTLV-1 e HTLV-2: pesquisa de IgG1 anti-MT2/BJAB em plataforma única por citometria de fluxo (FC-Duplex HTLV-1/2-IgG1)

**Pesquisador:** Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal

**Área Temática:** Novos procedimentos terapêuticos invasivos;

**Versão:** 2

**CAAE:** 15047313.8.0000.5091

**Instituição Proponente:** Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz/ CPqRR/

**Patrocinador Principal:** Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz/ CPqRR/ FIOCRUZ

**DADOS DA NOTIFICAÇÃO**

**Tipo de Notificação:** Envio de Relatório Parcial

**Detalhe:**

**Justificativa:** Em anexo o relatório parcial para acompanhamento. Obrigado.

**Data do Envio:** 02/03/2015

**Situação da Notificação:** Parecer Substanciado Emitido

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.047.847

**Data da Relatoria:** 30/03/2015

**Apresentação da Notificação:**

Relatório parcial do projeto de pesquisa: "Avanços no diagnóstico sorológico diferencial da infecção humana pelo HTLV-1 e HTLV-2: pesquisa de IgG1 anti-MT2/BJAB em plataforma única por citometria de fluxo (FC-Duplex HTLV-1/2-IgG1)".

**Objetivo da Notificação:**

A pesquisadora apresenta o relatório parcial do projeto em cumprimento ao Inciso IX.2.c da Resolução CNS 196/96.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

O projeto não apresenta riscos aos voluntários participantes.

**Endereço:** Avenida Augusto de Lima, 1715

**Bairro:** Barro Preto

**CEP:** 30.190-002

**UF:** MG

**Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3349-7825

**Fax:** (31)3349-7825

**E-mail:** cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br

**CENTRO DE PESQUISAS  
RENÉ RACHOU/FUNDAÇÃO  
OSWALDO CRUZ/ CPQRR/**



Continuação do Parecer: 1.047.847

Todos os indivíduos doadores de sangue e/ou portadores da infecção pelos vírus HTLV-1, HTLV-2, HIV-1, HTLV-1/HIV-1 convidados a participar do estudo serão acompanhados por médicos profissionais especialistas do Grupo Interdisciplinar de Pesquisas em HTLV da Fundação Hemominas e por médicos especialistas do Hospital das Clínicas da UFMG.

O projeto apresenta os critérios de inclusão, a saber: Indivíduos adultos entre 18 e 75 anos não infectados, mono infectados pelo HTLV-1, mono infectados pelo HTLV-2, co infectados pelo vírus HIV-1 e HTLV-1 e mono infectados pelo HIV-1. A amostra total será composta por 200 indivíduos. Critérios de exclusão: Pacientes com deficiência mental; pacientes em uso de corticosteróides ou fármacos imunossupressores.

**Comentários e Considerações sobre a Notificação:**

No relatório parcial menciona-se que o número de sujeitos envolvidos no projeto até a data da elaboração do mesmo era de 150 e o previsto foi de 200.

Não há relatos de efeitos adversos e não houve mudanças no projeto inicial. A execução das etapas do projeto estão sendo cumpridas, à exceção de uma ação vinculada ao seguinte objetivo específico "Estabelecer protocolo de marcação e avaliação simultânea das linhagens de células MT-2 e BJAB por citometria de fluxo.

O pesquisador relata o seguinte fato: "Foi realizada cultura de células GU, porém ainda estamos padronizando o cultivo desta linhagem já que a taxa de multiplicação e viabilidade destas células foi baixa. Devido a esta dificuldade, o andamento do projeto está atrasado". Entretanto, o autor informa que encontra-se em andamento solicitação de novas amostras de células GU. Esse procedimento poderá aumentar a chance de sucesso no cultivo dessa célula, não acarretando dificuldades no cumprimento dos objetivos do projeto.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O projeto apresenta o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE adequado aos objetivos do projeto, não apresentando nenhum constrangimento ao indivíduo participante da pesquisa. Apresenta os seguintes termos: Termo de Compromisso do Hemominas; do Hospital das Clínicas e do CPQRR.

**Recomendações:**

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

A execução das etapas referentes aos demais objetivos específicos estão de acordo com o

**Endereço:** Avenida Augusto de Lima, 1715  
**Bairro:** Barro Preto **CEP:** 30.190-002  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3349-7825 **Fax:** (31)3349-7825 **E-mail:** cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br



CENTRO DE PESQUISAS  
RENÉ RACHOU/FUNDAÇÃO  
OSWALDO CRUZ/ CPQRR/



Continuação do Parecer: 1.047.847

cronograma inicial proposto no projeto inicial.

O atraso na execução da padronização do cultivo da linhagem de células ainda não impactaram do desenvolvimento do projeto e na obtenção de sucesso na realização plena do projeto.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Colocado em discussão o parecer do relator, o Comitê de Ética Envolvendo Seres Humanos do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ Minas, decidiu pela Aprovação do Relatório Parcial de Estudo.

BELO HORIZONTE, 04 de Maio de 2015

---

**Assinado por:**  
**Naftale Katz**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Avenida Augusto de Lima, 1715

**Bairro:** Barro Preto

**CEP:** 30.190-002

**UF:** MG

**Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3349-7825

**Fax:** (31)3349-7825

**E-mail:** cepsh-cpqrr@cpqrr.fiocruz.br