

TELMA VITORINA RIBEIRO LIMA

CARACTERIZAÇÃO SOROLÓGICA E DETECÇÃO
MOLECULAR DO HTLV EM AMOSTRAS DE
PACIENTES COM DISTÚRBIOS NEUROLÓGICOS
NO ESTADO DO PARÁ, BRASIL (1996 – 2005).

BELÉM
2006

TELMA VITORINA RIBEIRO LIMA

CARACTERIZAÇÃO SOROLÓGICA E DETECÇÃO
MOLECULAR DO HTLV EM AMOSTRAS DE
PACIENTES COM DISTÚRBIOS NEUROLÓGICOS
NO ESTADO DO PARÁ, BRASIL (1996 – 2005).

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA
AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
DOENÇAS TROPICAIS DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARÁ COMO REQUISITO PARA
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
PATOLOGIAS DAS DOENÇAS TROPICAIS

ORIENTADOR: DR. ALEXANDRE DA COSTA
LINHARES

BELÉM
2006

L732c Lima, Telma Vitorina Ribeiro

Caracterização sorológica e detecção molecular do HTLV em amostras e pacientes com distúrbios neurológicos no Estado do Pará, Brasil (1996 – 2005) / Telma Vitorina Ribeiro Lima. — Belém, 2006.

101f.: il.; 30cm.

Orientador: Alexandre da Costa Linhares

Dissertação (Mestrado em Patologia das Doenças Tropicais) — Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, 2006.

1. Infecções por HTLV-I e HTLV II. 2. Paraparesia Espástica. 3. Imunoensaio. 4. Técnicas de Diagnóstico Molecular. I. Linhares, Alexandre da Costa. II. Universidade Federal do Pará, Núcleo de Medicina Tropical. III. Título.

CDU: 578.24

TELMA VITORINA RIBEIRO LIMA

CARACTERIZAÇÃO SOROLÓGICA E DETECÇÃO MOLECULAR
DO HTLV EM AMOSTRAS DE PACIENTES COM DISTÚRBIOS
NEUROLÓGICOS NO ESTADO DO PARÁ, BRASIL (1996 – 2005).

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do grau de mestre em Patologias das Doenças Tropicais, pela comissão formada pelos professores:

Dr. José Alexandre Lemos
Universidade Federal do Pará – UFPA.

Dr. Rita Catarina Medeiros Souza
Universidade Federal do Pará – UFPA

Dr Márcio Roberto Teixeira Nunes
*Instituto Evandro Chagas – IEC. Secretaria de
Vigilância em Saúde- MS*

Dr. Wyller Alencar de Mello (suplente)
*Instituto Evandro Chagas – IEC. Secretaria de
Vigilância em Saúde- MS*

Dissertação defendida e aprovada em 7 de julho de 2006

“O mistério é a coisa mais nobre de que podemos ter experiência. É a emoção que se encontra no cerne da verdadeira ciência. Aquele que não sente essa emoção e que não pode mais se maravilhar nem se espantar, é como se já estivesse morto.”

Albert Einstein

DEDICATÓRIA

A Deus, pela alegria mais pura de sentir a Sua presença todos os dias da minha vida.

A meus pais, Maria Tereza e Manoel José, não há palavras que possam descrever o amor e a gratidão pelas duas pessoas que tantas oportunidades me proporcionaram e com quem quero celebrar e compartilhar a alegria do fechamento deste ciclo.

À minha família, especialmente meus avós, à dindinha Inês, à tia Alice e às minhas “manas” Angélica, Arlene e Danielle, por fazerem parte dos momentos mais importantes da minha vida, por todo auxílio, pelo amor, pela compreensão e pela paciência.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Linhares, pela oportunidade de orientação, por ter acreditado junto comigo neste projeto, pelo auxílio fundamental na concretização do mesmo e pelos seus exemplos de ética e disciplina que procuro ter como referência.

Às amigas Lourdes Gomes, Luana Soares, Mirleide Santos, Ceyla Castro, Darleise Oliveira, Ana Lúcia Wanzeller e Olinda Macedo, pela alegria do convívio no laboratório e pelo muito que me auxiliaram com seus conhecimentos e experiências.

À Universidade Federal do Pará (UFPA), ao Instituto Evandro Chagas (IEC) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por viabilizarem a realização deste trabalho.

À Fundação HEMOPA e às Dra. Ana Carolina Paulo e Dra. Rosa Kotsuki (FIOCRUZ), pela inestimável colaboração, representado pelo apoio técnico e metodológico ao presente trabalho.

À equipe da Biblioteca do Instituto Evandro Chagas, especialmente, a Vânia Araújo, Nilton Pereira, Joel Moraes e Rodrigo Soares, pelo apoio logístico no processo de normalização deste trabalho.

Aos pacientes deste estudo, especialmente alguns daqueles contatados por ocasião das novas coletas, pela oportunidade de ver que as dificuldades motoras trazidas pela doença não comprometeram sua alegria e esperança, e ainda os estimulam a buscar melhor conviver com suas limitações.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

O vírus linfotrófico de células de T humanas tipo 1 (HTLV-1) é reconhecido como agente etiológico da paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 (PET/MAH). Quadro clínico muito similar a este vem sendo crescentemente associado ao HTLV-2, cuja patogenicidade ainda requer maiores esclarecimentos. Este inquérito epidemiológico transversal objetivou determinar a prevalência do HTLV entre indivíduos com distúrbios neurológicos e esclarecer, por métodos de biologia molecular, os casos de sorologia inconclusiva. O presente estudo envolveu pacientes residentes no Estado do Pará e/ou internados em instituições de saúde desse Estado, e que tenham sido encaminhados à Seção de Virologia (SEVIR) do Instituto Evandro Chagas (IEC) por médicos locais, entre janeiro de 1996 e dezembro 2005, com vistas à pesquisa de anticorpos específicos para HTLV-1/2. Dessa população foram selecionados 353 pacientes, com idades entre 9 meses e 79 anos, que apresentassem pelo menos um sinal ou sintoma do Complexo de Marsh (1996), bem como sorologia positiva para os testes de triagem e confirmatório de EIE específico para HTLV-1/2. A prevalência geral de anticorpos específicos para HTLV por EIE foi de 8,8% (31/353), com taxas de 10,6% (19/179) e 6,9% (12/174) nos sexos feminino e masculino, respectivamente. Entre os pacientes positivos para HTLV-1/2 por EIE, verificou-se que, tomadas em conjunto, as manifestações de paresia (n = 8), parestesia (n = 5) e paraplegia (n = 3) ocorreram em 48,4% (15/31) dos casos. Dos 31 pacientes positivos para HTLV por EIE, 25 puderam ser submetidos ao *WB* para definição do tipo viral, encontrando: 80% (20/25) de HTLV-1, 12% (3/25), HTLV-2, uma infecção mista (4%) e um perfil indeterminado (4%). Destes 25 indivíduos, apenas 14 puderam ser re-localizados para coleta de nova amostra visando à análise molecular. Verificou-se que 78,6% das amostras tipadas por *WB* revelaram amplificação da região TAX pró-viral pela nested-PCR e foram confirmadas quanto à tipagem pela pesquisa da região POL por PCR em tempo real, denotando especificidade e sensibilidade satisfatórias do método de *WB* empregado no estudo. A amostra definida como infecção mista por *WB* foi amplificada para região TAX, porém a PCR em tempo real confirmou infecção apenas pelo HTLV-1. O paciente com perfil indeterminado e uma das amostras tipadas como HTLV-2 por *WB* foram amplificadas pela nested-PCR, porém a PCR em tempo real não detectou genoma pró-viral de HTLV-1, nem do -2 em quaisquer das duas amostras. Uma paciente, portadora de quadro de mialgia e parestesia crural com duração de aproximadamente 7 anos se apresentou positiva para HTLV-2 por *WB* e PCR em tempo real, caracterizando um quadro compatível com mielopatia associada a esse tipo. Registraram-se indícios de transmissão vertical em dois casos distintos: uma paciente cuja mãe apresentou anticorpos para HTLV-1 por *WB* e duas irmãs com diagnóstico de HTLV-1 por *WB* e PCR em tempo real. Os resultados deste trabalho evidenciam a necessidade de análises mais profundas acerca da epidemiologia molecular dos tipos e subtipos do HTLV, bem como avaliações clínicas mais rigorosas do ponto de vista neurológico, visando a melhor caracterizar a associação do vírus à condição mórbida designada mielopatia crônica.

ABSTRACT

Human T-lymphotropic virus type 1 is recognized as the etiologic agent of tropical spastic paraparesis/HTLV-1 associated myelopathy (TSP/HAM). A very similar clinical disease has been increasingly associated to HTLV-2, whose pathogenicity still requires further assessments. This transversal, retrospective epidemiological survey aimed to determine the prevalence of HTLV among individuals with neurological disturbances and further evaluate cases of inconclusive serology using molecular biology methods. The present study involved patients inhabitants of Pará State and/or admitted at health institutions of the and who were referred to the Virology Section of Instituto Evandro Chagas (IEC) by local doctors between January of 1996 and December 2005, to search for the presence of HTLV-1/2 serum antibodies. Of these patients 353 were selected, with age between 9 months and 79 years, who presented at least one signal or symptom of the Marsh's Complex (1996), as well as had HTLV-1/2 positive serology at screening and confirmatory ELISA. The overall prevalence of HTLV antibodies by ELISA as 8,8% (31/353), with rates of 10,6% (19/179) and 6,9% (12/174) for female and male patients, respectively. Among HTLV-1/2 the 31 ELISA-positive patients it was noted that 15 (48.4%) of 31 had paresis (n = 8), paresthesia (n = 5), and paraplegia (n = 3). Of these 31 HTLV ELISA-positive patients, 25 could be submitted to WB for assessment of viral types, which were distributed as follow: 80% (20/25) were HTLV-1, 12% (3/25) were HTLV-2, one case was of HTLV-1+HTLV-2 infection (4%), and serum from one patient yielded an indeterminate profile (4%). Only 14 of these 25 patients could be re-localised for collection of an additional sample for molecular analysis. It was observed that 78.6% of samples typed by WB had the proviral TAX region successfully amplified by nested-PCR. In addition, types were confirmed as based on results obtained from the amplification of the POL region using real-time PCR; this denoted good specificity and sensitivity of the WB used in this study. The sample defined as HTLV-1+HTLV-2 infection by WB was amplified in its TAX region but real time PCR confirmed HTLV-1 infection only. The patient with WB indeterminate profile and one of samples typed as HTLV-2 by WB were amplified by nested-PCR but the real time PCR was negative for HTLV-1 and HTLV-2 in both samples. One patient presenting clinical manifestations of crural myalgia and paresthesia with duration of about 7 years reacted HTLV-2-positive by both WB and real-time PCR, a denoting a clear HTLV-2-related chronic myelopathy. This study has identified a case of possible vertical transmission in two distinct situations: a patient whose mother presented antibodies for HTLV-1 by WB and two sisters who reacted HTLV-1-positive by WB and real-time PCR. Although of epidemiological relevance, results from this study warrant further and broader analyses concerning the molecular epidemiology of HTLV types and subtypes HTLV. In addition, a more complete clinical assessment of neurological symptoms should be further performed, in order to better characterise cases of HTLV-related chronic myelopathy in our region.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Representação esquemática da estrutura e composição da partícula de HTLV.....	18
Figura 2 –	Representação esquemática da distribuição dos genes de HTLV.....	20
Figura 3 –	Distribuição geográfica dos subtipos de HTLV-1 no globo terrestre.....	23
Figura 4 –	Distribuição geográfica dos subtipos de HTLV-2 no globo terrestre.....	24
Figura 5 –	Modelo esquemático da patogênese da PET/MAH.....	32
Figura 6 –	Algoritmo para o Diagnóstico Laboratorial de Infecção pelo HTLV.....	35
Figura 7 –	Representação esquemática da técnica de PCR em Tempo Real.....	53
Figura 8 –	Freqüência anual de positividade para HTLV, por EIE, em pacientes com distúrbios neurológicos no Estado do Pará, janeiro de 1996 a dezembro de 2005.....	58
Figura 9 –	Distribuição dos tipos de HTLV por <i>WB</i> em pacientes com distúrbios neurológicos no Estado do Pará, janeiro de 1996 a dezembro de 2005.....	58
Figura 10 –	Distribuição dos tipos de HTLV por <i>WB</i> , de acordo com o sexo, em pacientes com distúrbios neurológicos no Estado do Pará, janeiro de 1996 a dezembro de 2005	59
Figura 11 –	Caracterização das amostras de <i>WB</i> em pacientes com distúrbios neurológicos e com sorologia positiva por EIE no Estado do Pará, janeiro de 1996 a dezembro de 2005.....	60

Figura 12 – Perfis de <i>Western-Blotting</i> dos 14 pacientes positivos para HTLV por EIE localizados para análise molecular.....	66
Figura 13 – Gel de agarose mostrando amplificação do fragmento de 368 pb da região TAX de HTLV-1/2.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS

° C	graus centígrados
CMV	citomegalovírus
CNAH	complexo neurológico associado ao HTLV-1
CV	carga viral
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (ácido desoxirribolucleico)
dNTP	<i>Deoxyribonucleotide triphosphate</i> (Desoxirribonucleotídeos Trifosfato)
dUTP	<i>Deoxyuridin triphosphate</i> (DesoxiUridina Trifosfato)
EDTA	<i>Ethylene Diamine TetrAcetic Acid</i> .(ácido etilenodiamino tetra-acético)
EIE	ensaio imuno-enzimático
EUA	Estados Unidos da América
FAM	<i>6-carboxyfluorescein</i> (6-carboxi-fluoresceína)
gp	glicoproteína
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> (Antígeno Leucocitário Humano)
HTLV	Vírus linfotrópico de células T humanas
IEC	Instituto Evandro Chagas
IEMI	imunoeletromicroscopia indireta
IFN- γ	interferon- γ
IgA	imunoglobulina de classe A
IgG	imunoglobulina de classe G
IgM	imunoglobulinas de classe M
IL-10	interleucina-10
IL-2	interleucina-2
KCl	cloreto de potássio
kd	kilo-dalton.

LCR	líquido céfalo-raquidiano
LLTA	Leucemia / linfoma de células T de adultos
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i> (terminal de longa repetição nucleotídica)
MAH	Mielopatia associada ao HTLV
MgCl ₂	cloreto de magnésio
ml	mililitros
mM	milimolar
MS	Ministério da Saúde
ng	nanograma
nm	nanômetros
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	pares de bases
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i> - reação em cadeia da polimerase
PET	Paraparesia espástica tropical
pH	potencial hidrogeniônico
rgp	<i>Recombinant glycoprotein</i> (glicoproteína recombinante)
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (ácido ribonucléico)
RNA _m	<i>Ribonucleic Acid messenger</i> (ácido ribonucléico mensageiro)
rpm	rotações por minuto
RT-PCR	<i>real time PCR</i> (PCR em tempo real)
seg	Segundo
SEVIR	Seção de Virologia
SNC	sistema nervoso central
STLV-3	Vírus Linfotrópico de Células T de Símio tipo 3
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde

TAE	tris-acetato EDTA
TAMRA	<i>Tetramethylrhodamine</i> (tetra-metil-rodamina)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> (polimerase)
TGFβ1	<i>Transforming growth factor-beta 1</i> (fator de transformação de crescimento – beta 1)
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> (fator de necrose tumoral)
UDI(s)	usuário(s) de droga intravenosa
UNG	<i>uracil-N-glycosylase</i> (uracil-N-glicosilase)
USA	<i>United States of American</i>
WB	<i>Western-Blotting</i>
μl	microlitro
μM	micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1	VIRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS.....	15
2.1.1	Histórico.....	15
2.1.2	Agente Etiológico.....	17
2.1.3	Vias de transmissão.....	20
2.1.4	Epidemiologia.....	21
2.1.5	Distúrbios Neurológicos Associados ao HTLV.....	28
2.1.6	Patogênese da MAH.....	30
2.1.7	Tratamento da MAH.....	32
2.1.8	Perfis sorológicos definidos por WB.....	33
2.1.9	Relevância dos perfis soro-indeterminados por WB.....	35
2.1.10	Associação dos tipos de HTLV a quadros clínicos.....	37
3	OBJETIVOS.....	39
3.1	OBJETIVO GERAL.....	39
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	39
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	40
4.1	CASUÍSTICA.....	40
4.1.1	Paciente.....	40
4.1.2	Critérios de inclusão.....	41
4.1.3	Critérios de exclusão.....	42
4.1.4	Riscos e benefícios.....	42
4.1.5	Ética.....	42
4.1.6	Avaliação clínica.....	43
4.2	MÉTODOS.....	43
4.2.1	Obtenção das amostras.....	43
4.2.1.1	Soro.....	43
4.2.1.2	Líquido céfalo-raquidiano (LCR).....	43
4.2.2	Avaliação Sorológica.....	44
4.2.2.1	Ensaio Imunoenzimático (EIE).....	44
4.2.2.2	<i>Western-Blotting</i>	44
4.2.3	Separação de Linfócitos.....	45

4.2.4	Extração do ácido nucléico.....	46
4.2.5	Controle endógeno da Nested-PCR.....	48
4.2.6	Nested-PCR.....	48
4.2.7	Visualização dos produtos da nested-PCR.....	50
4.2.8	PCR em tempo real.....	50
4.2.9	Análise estatística dos resultados.....	54
5	RESULTADOS.....	55
6	DISCUSSÃO.....	68
7	CONCLUSÕES.....	81
8	PERSPECTIVAS.....	83
	REFERÊNCIAS.....	84
	ANEXOS.....	94

1 INTRODUÇÃO

O vírus linfotrópico de células T humanas (*Human T Cell Lymphotropic Virus*, HTLV) tem sido frequentemente associado a quadros de distúrbios neurológicos e relatado sob caráter endêmico em diversas regiões do mundo. Vários estudos registram diferenças na frequência com que os tipos e subtipos do vírus ocorrem entre populações específicas. No Brasil já foram caracterizados importantes focos de endemicidade do HTLV-1 na região nordeste e do HTLV-2 na Amazônia.

Ainda há muitas lacunas a esclarecer acerca da etiopatogenia e do tratamento das doenças associadas ao HTLV. Por este motivo se têm demonstrado necessários maiores esforços no campo do diagnóstico laboratorial destas infecções, com intuito de melhor esclarecer o papel do HTLV como fator determinante ou predisponente do desenvolvimento das mesmas.

O avanço de meios de biologia molecular tecnologia aplicados ao campo da sorologia trouxe o melhoramento dos ensaios imuno-enzimáticos (EIE) e de *immuno-blotting*, pelo uso de proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos. Por este motivo, a técnica de *Western-Blotting* (WB) ainda representa um instrumento muito útil para o esclarecimento diagnóstico dos tipos virais associados às infecções por HTLV, principalmente em laboratórios que ainda não disponham da infraestrutura para manter procedimentos moleculares em sua rotina.

Entretanto, apesar de a técnica de WB possibilitar o esclarecimento quanto ao tipo viral responsável por infecções em parte da demanda de amostras positivas para EIE, uma expressiva parcela das mesmas permanece sem tal definição. Portanto, as amostras não tipadas por WB e os padrões indeterminados, quando não confirmados por métodos moleculares, permanecem sem

esclarecimento, o que dificulta o aconselhamento do paciente, que permanece sem um perfil sorológico definido.

Este trabalho se propõe a contribuir para a elucidação de casos de infecções com tipagem sorológica duvidosa, visando a caracterizar a distribuição dos tipos virais encontrados nos pacientes envolvidos no estudo.

Os conhecimentos adquiridos podem ser posteriormente utilizados nas estratégias de profilaxia junto à população em geral e, particularmente, entre grupos de risco.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 VIRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS

2.1.1 Histórico

O HTLV foi primeiramente descrito por Poiesz et al. (1980), a partir de um paciente com linfoma cutâneo de células T. Esse vírus tem sido relacionado principalmente a duas entidades mórbidas, quais sejam: a leucemia / linfoma de células T de adultos (LLTA) e a mielopatia associada ao HTLV (MAH); esta, também conhecida como paraparesia espástica tropical (PET) (REPORT..., 1989).

Em 1982, Kalyanaraman et al. (1982) descreveram, por ensaios imunológicos, a existência de um novo tipo de vírus que seria relacionado àquele primeiro descrito por Poiesz, porém, distinto do mesmo. A partir de então, as variantes isoladas por Poiesz e por Kalyanaraman passaram a ser denominadas HTLV-1 e HTLV-2, respectivamente.

Recentemente, Calattini et al. (2005) descreveram outro tipo de retrovírus humano, ao qual denominaram HTLV-3. Esse vírus, isolado a partir de pigmeu habitante do Sul de Camarões, África, revelou ser estreitamente relacionado com o Vírus Linfotrópico de Células T de Símio, tipo 3 (*Simian T Cell Lymphotropic Virus - type 3*, STLV-3).

A LLTA começou a ganhar destaque ao final da década de 1970 no Japão, onde já se apresentava endêmica (UCHIYAMA et al., 1977; HINUMA et al., 1981). A partir de um paciente portador da LLTA, Myoshi et al. (1977) estabeleceram uma linhagem para cultivo celular com cujos antígenos, mais tarde, viriam a reagir com os mesmos anticorpos encontrados por Hinuma et al. (1981), em soro de

pacientes com LLTA. Posteriormente, o primeiro estudo sobre o HTLV realizado nos Estados Unidos (EUA) por Gallo et al. (1983) também demonstrou a associação entre o HTLV-1 e a LLTA.

As mielopatias crônicas de etiologia desconhecida têm suscitado interesse de cientistas de diversas regiões do mundo, principalmente nas zonas tropicais, na busca do seu esclarecimento. Castro-Costa (2001) reúne registros de diversos estudos descrevendo variados quadros de paraparesia espástica crônica progressiva, dentre eles, o relato do Cruickshank, na Jamaica, em 1956, acerca de uma certa neuropatia de etiologia desconhecida. O mesmo artigo refere, ainda, a primeira proposição do termo paraparesia espástica tropical atribuída a Mani, em 1969, no sul da Índia; além de mencionar a meta-análise publicada por Leon, em 1997, a qual descreveu a positividade para o HTLV de 44,9%, de 2.811 casos reunidos de vários estudos sobre PET.

Convém ainda ressaltar o relato dos primeiros casos de PET na América do Sul, feito em 1981, na Colômbia, por Zaninovic, que denominou o quadro de “paraplegia espástica do Pacífico”. Vinte e três anos depois, em 2004, o mesmo autor propõe a PET como uma síndrome multifatorial no que concerne à sua gênese, porém, sem diminuir a importância do papel que exerce o HTLV como seu agente causal.

A correlação entre o HTLV-1 e a PET teve início em 1985, com a demonstração da alta prevalência de anticorpos anti-HTLV-1 em soro e líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com diagnóstico de PET na Martinica e entre jamaicanos e colombianos (GESSAIN et al., 1985; ZANINOVIC, 1987). Posteriormente, no Japão, Osame et al. (1986) descreveram casos de PET relacionando-os a altas taxas de anticorpos específicos para o HTLV-1. Em 1989, a

Organização Mundial de Saúde (OMS) reconheceu oficialmente que a paraparesia espástica tropical e a mielopatia associada ao HTLV representavam a mesma doença (REPORT..., 1989).

2.1.2 Agente Etiológico

O HTLV pertence à família *Retroviridae*, subfamília *Oncovirinae*, gênero *Deltaretrovirus*. Trata-se de um vírus envelopado, com diâmetro de aproximadamente 100 a 140 nanômetros (nm), seu core contribuindo com cerca de 80 a 100 nm. Os retrovírus se caracterizam por apresentar duas moléculas de protease em seu core, juntamente com um genoma composto por duas fitas simples de RNA com polaridade positiva, estando, cada uma delas, acompanhada de uma molécula da enzima transcriptase reversa (Figura 1).

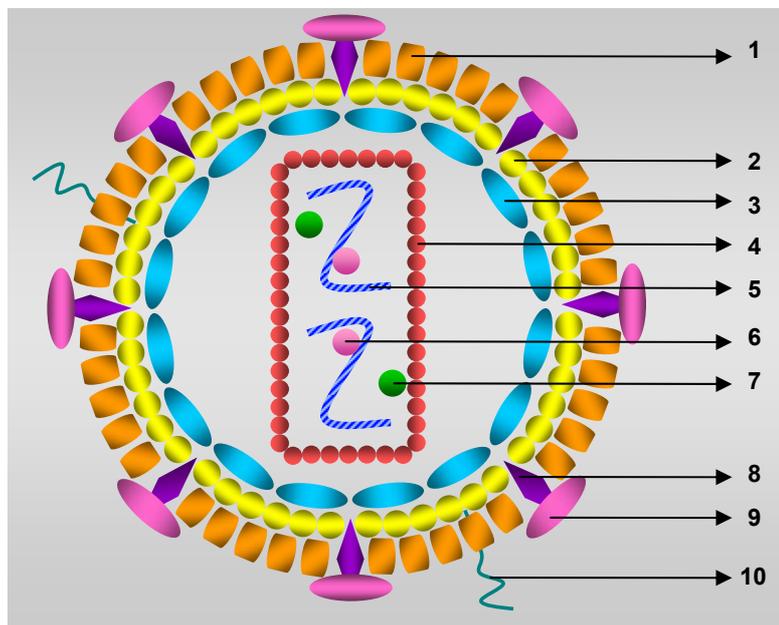


Figura 1 – Representação esquemática da estrutura e composição da partícula de HTLV. 1) envelope; 2) p 19; 3) p 24; 4) p 15; 5) RNA fita simples; 6) transcriptase reversa ; 7) protease; 8) gp 21; 9) gp 46; 10) proteína da célula hospedeira. Fonte: adaptada de Romanos et al., 2002.

As proteínas estruturais do core viral são as do nucleocapsídeo (p15), do capsídeo (p24) e da matriz (p19), enquanto que no envelope se encontram as glicoproteínas transmembrana (gp21) e aquelas de superfície (gp46). Esta última apresenta uma diferença no padrão de bandas à eletroforese, que permite distinguir os tipos 1 e 2 de HTLV (Figura 1).

Semelhante aos vírus pertencentes à família *Retroviridae*, o genoma do HTLV possui as regiões GAG, POL, ENV e LTR.

O gene *gag* dos retrovírus é responsável pela síntese das proteínas estruturais do capsídeo viral. O seu produto inicial, logo após a tradução, é uma poliproteína precursora que é posteriormente clivada em fragmentos finais menores, a saber: p19, p24 e p15. Ainda relacionada à região GAG está a síntese da enzima protease, cujo gene codificador estende-se da porção 3' da região GAG até a porção 5' da POL. A protease sofre autoclivagem autocatalizada, gerando a molécula ativa responsável pelo processamento dos produtos dos genes *gag* e *gag-pol*.

A porção 5' do gene *pol*, por sua vez, é conhecida por codificar a enzima transcriptase reversa. O produto de tradução da região codificadora do gene *env* representa uma glicoproteína com peso molecular entre 61 e 69 kd, sendo posteriormente clivada em seus produtos finais gp46 e gp21. E, finalmente, as duas regiões de terminais de longa repetição nucleotídica (*long terminal repeat*, LTR), localizadas nas extremidades do DNA viral, e contêm regiões promotoras virais, bem como outros elementos regulatórios.

Por outro lado, a presença de uma região no genoma do HTLV o distingue dos demais retrovírus. Denominada região pX, quando ainda não se conhecia a sua função, essa área do genoma codifica duas proteínas com funções reguladoras de expressão. Uma a proteína indutora da tradução (*translator*, Tax),

cujo subproduto, p40Tax, é responsável por ativar a transcrição do gene U3 na região de LTR, dando início ao processo de transcrição dos provírus. Outra, a proteína reguladora de expressão (*regulator of expression, rex*), que atua em uma espécie de retro-alimentação negativa, de forma que, sendo sintetizada nas mesmas taxas que os demais produtos da replicação viral, quando atinge níveis de concentração mais elevados passa a inibir a transcrição de novas fitas de RNA mensageiro (RNAm) (Figura 2).

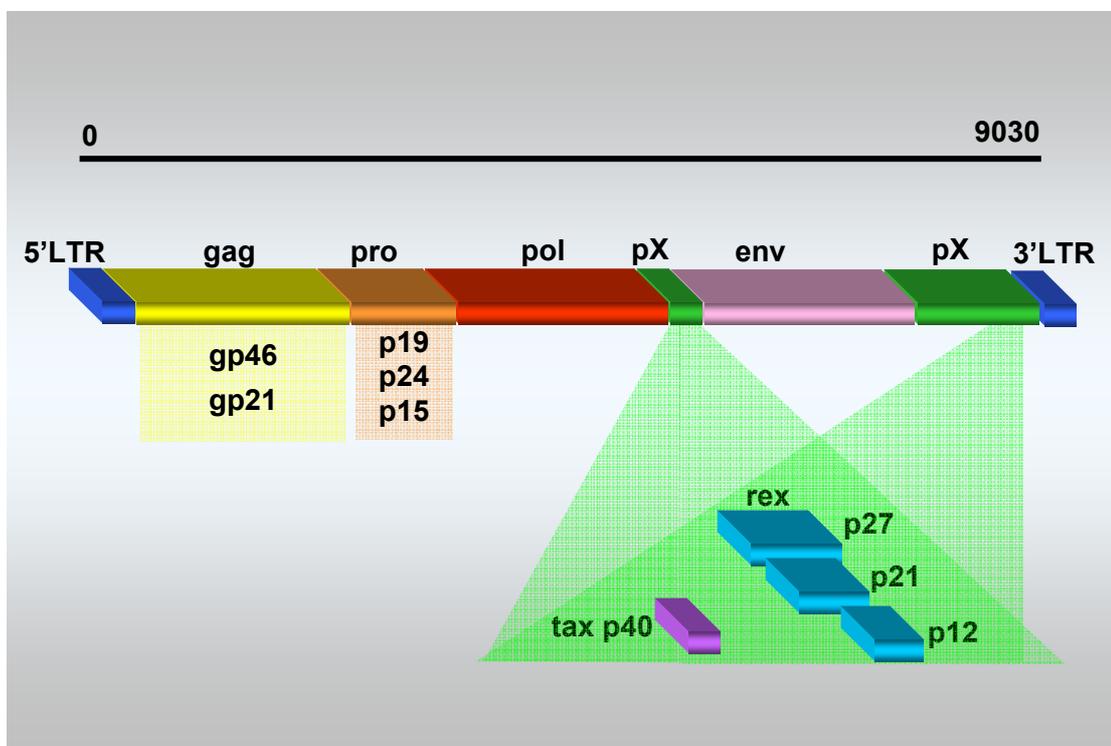


Figura 2 – Representação esquemática da distribuição dos genes de HTLV. Fonte: adaptada de Romanos et al., 2002

Esse mecanismo é capaz de regular os níveis de expressão dos genes codificadores dos componentes virais, determinando maior ou menor síntese dos vírions infectantes. É importante lembrar que o LTR se caracteriza por ser a região do genoma viral na qual se detecta o maior número de variações genéticas, no entanto, as regiões acima descritas, por possuírem caráter regulador, são altamente conservadas (CANN; CHEN, 2001; VERONESI, 2002).

2.1.3 Vias de transmissão

Diversos estudos vinculam a transmissão vertical ao aleitamento materno, seja pela identificação de células infectadas pelo HTLV-1 em grandes quantidades no leite das mães portadoras, seja pelas taxas de soropositividade dos seus bebês para o mesmo vírus, que variam de 15,4% a 25%. Por outro lado, índices menos elevados, de 3,3% a 12,8%, têm sido descritos em crianças amamentadas por mamadeira, evidenciando que outras vias que não o aleitamento podem estar envolvidas, tais como a transplacentária ou por ocasião do parto natural (HINO et al., 1996; BITTENCOURT, 1998).

Durante o intercuro sexual, a transmissão é cerca de quatro vezes mais eficiente do homem para a mulher do que o inverso, fato possivelmente associado à maior quantidade de linfócitos infectados e viáveis liberada durante a ejaculação masculina (MURPHY, 1996; MANNS et al., 1999). Lesões ulcerativas presentes nas genitálias representam solução de continuidade, aumentando os riscos da transmissão por esta via (MURPHY et al., 1989; VERONESI, 2002). Aspectos referentes ao comportamento sexual já foram apontados como fatores determinantes do grau de exposição (MELBYE et al., 1998; SANCHEZ-PALACIOS et al., 2003).

A via parenteral inclui a transfusão sanguínea e o compartilhamento de agulhas e seringas contaminadas. As taxas de soroconversão entre hemotransfundidos têm variado de 40% a 60%, apontando-se a transfusão sanguínea como a mais eficiente via de transmissão, o que mostra a importância da triagem dos doadores de sangue, seja em áreas de baixa endemicidade, seja naquelas altamente endêmicas (MANNS et al., 1999). As baixas taxas de positividade entre hemofílicos parecem estar relacionadas à perda dos linfócitos infectados e viáveis durante o processamento do plasma. Por outro lado, os usuários

de drogas intravenosas (UDIs) constituem grupo de altíssimo risco no tocante à transmissão parenteral, apresentando elevada endemicidade para o HTLV-2 (MURPHY, 1996; DOURADO et al., 1999).

As principais vias de transmissão para o HTLV-1 são: contato sexual, transmissão vertical e história de transfusão sangüínea. Para o HTLV-2, preocupa mais o contato sexual com UDIs, história de uso dessas drogas, bem como da transfusão sangüínea (MURPHY, 1996).

2.1.4 Epidemiologia

Veronesi (2002) destaca África, Japão, Melanésia, Ilhas do Caribe e Brasil como as cinco maiores aglomerações, no mundo, de indivíduos infectados pelos diferentes tipos de HTLV.

Os portadores do HTLV-1 foram estimados em cerca de 15 a 20 milhões de indivíduos, distribuídos em focos de caráter endêmico por todo o mundo, de acordo com determinadas áreas geográficas ou grupos étnicos a que pertencem (KAZANJI; GESSAIN, 2003). Dentre estes infectados, calcula-se que cerca de 3% a 8% virão a desenvolver alguma doença relacionada ao HTLV (KAZANJI; GESSAIN, 2003). A ocorrência endêmica do HTLV-1 tem sido registrada nas seguintes regiões:

- Sul do Japão (Kyushu, Shikoku e as ilhas da cadeia de Ryukyu);
- Ilhas do Caribe (Jamaica, Trinidad Tobago, Martinica, Guadalupe, Barbados e Haiti);
- parte da África (Costa do Marfim, Nigéria, Zaire, Kenia e Tanzânia);
- Melanésia (Papua Nova Guiné, Austrália e Ilhas Salomão);

- América do Sul (Equador, Venezuela, Guianas, Argentina, Brasil);
- América Central (Panamá, Costa Rica);
- América do Norte (sudeste dos EUA); e
- algumas áreas do Oriente Médio (CANN; CHEN, 2001; VERONESI, 2002; KAZANJI; GESSAIN, 2003) (Figura 3).

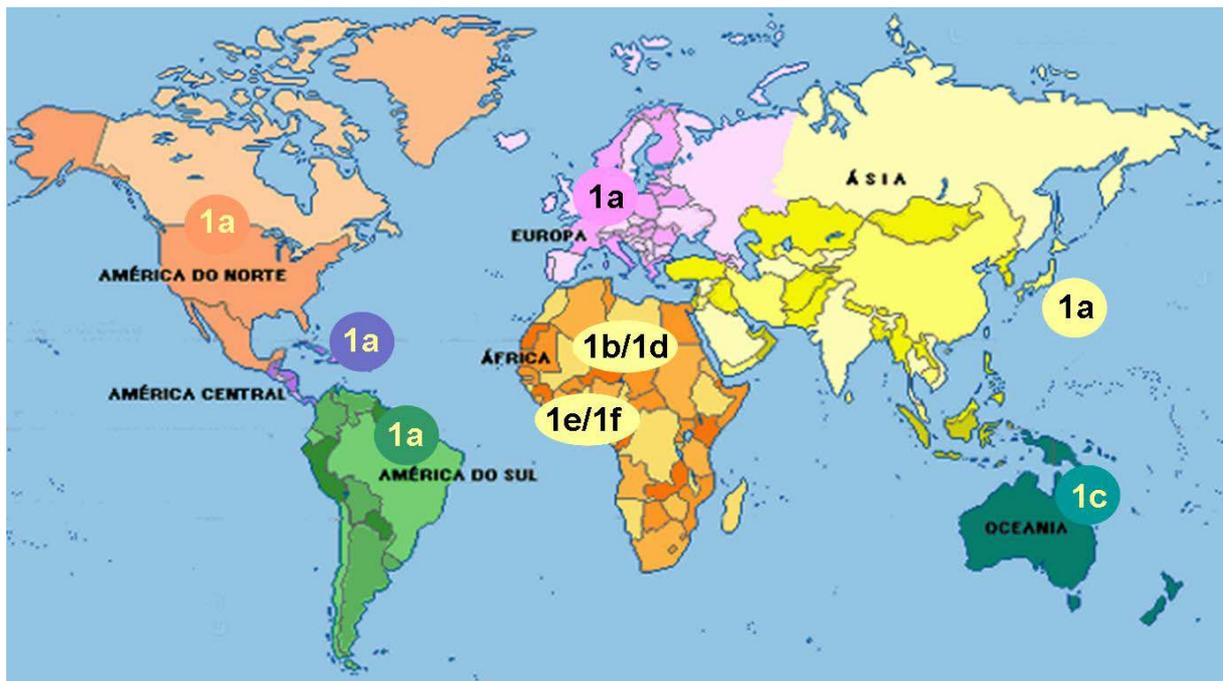


Figura 3 – Distribuição geográfica dos subtipos de HTLV-1 no globo terrestre. Fonte: <http://www.boletimportuario.com.br/html/ports_of_the_world.htm>

O HTLV-2, por outro lado, possui características epidemiológicas bem mais particulares, pelo fato de que, conquanto apresente menor prevalência na população geral, quando comparado ao HTLV-1, mostra-se altamente endêmico em grupos específicos de UDIs norte-americanos e nos países europeus tais como Itália, França, Espanha, Noruega e Reino Unido (SWITZER et al., 1995). Também entre populações indígenas ao longo das Américas, com ocorrência em países como

Estados Unidos, Canadá, México, Panamá, Venezuela, Brasil, Colômbia, Paraguai e Argentina (ISHAK et al., 2003) (Figura 4).

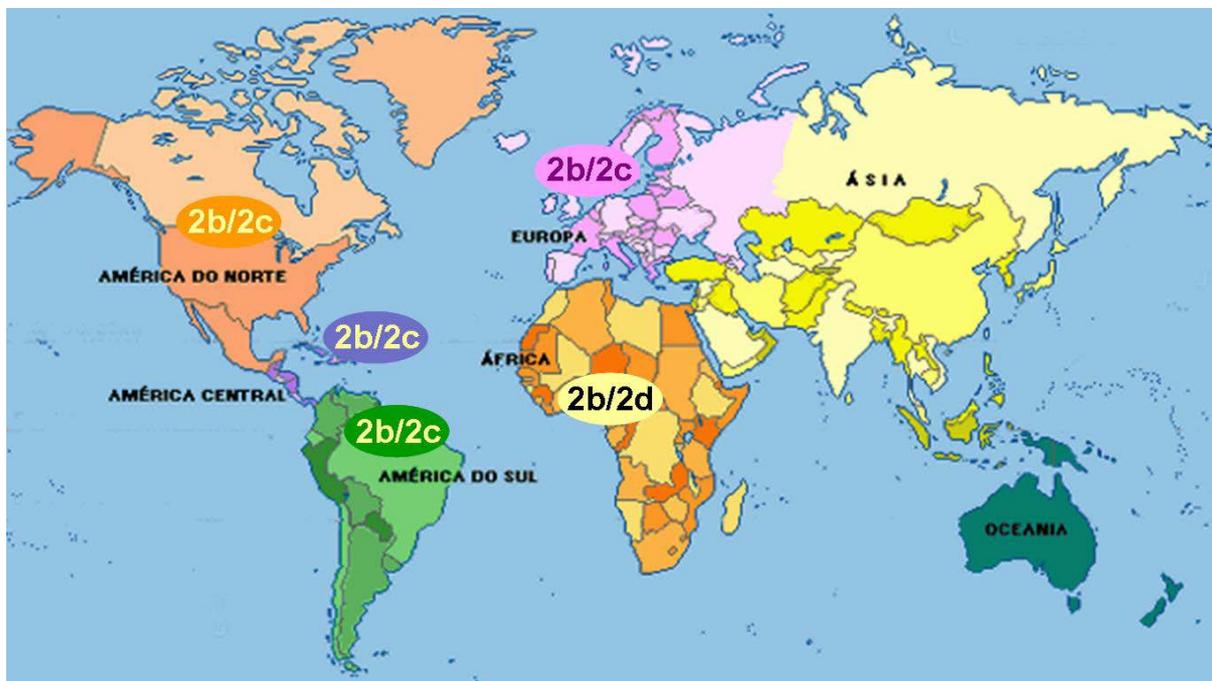


Figura 4 – Distribuição geográfica dos subtipos de HTLV-2 no globo terrestre. Fonte: <http://www.boletimportuario.com.br/html/ports_of_the_world.htm>

Estudos mais detalhados com base em origem geográfica, na comparação das seqüências nucleotídicas e análise filogenética de determinadas regiões gênicas têm viabilizado a subtipagem dos tipos 1 e 2 do HTLV. Deste modo, já foram descritos seis subtipos de HTLV-1, a saber: 1a (Cosmopolita), 1b (África Central), 1c (Australo-Melanésia), 1d (novo subtipo da África Central), 1e (Gabão) e 1f (Congo). Quanto ao HTLV-2, são conhecidos os subtipos 2a, 2b, 2c e 2d (PARDI et al., 1993; EIRAKU et al., 1996; VANDAMME et al., 1998; ISHAK et al., 2003).

A prevalência da infecção por HTLV, apesar de baixa na população urbana em geral, apresenta-se sob caráter endêmico mais variável entre grupos particularmente distintos, seja por sua origem étnica (ameríndios e negros), seja por

fatores comportamentais (UDIs, número de parceiros sexual), ou mesmo entre indivíduos submetidos a procedimentos clínicos de risco (hemodiálise e recepção de sangue e de órgãos).

Em todo o mundo, a literatura especializada carece de informações mais fidedignas sobre a população geral, pois a grande maioria dos inquéritos soropidemiológicos sobre o HTLV tem como alvo grupos específicos, principalmente doadores de sangue, UDIs, pacientes com clínica de LLTA ou de PET/MAH. Com base, portanto, nestes dados disponíveis, estimativas atribuem ao Brasil o maior número absoluto de infecções pelo HTLV, com cerca de 2,5 milhões de portadores (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002).

No Brasil, Veronesi (2002) refere os esforços conjuntos de sua equipe com pesquisadores do Japão, onde o HTLV revela-se altamente endêmico, em procurar definir o perfil epidemiológico do vírus no território nacional, procurando estabelecer possíveis fatores de risco associados à referida infecção. Tais esforços resultaram na avaliação de grupos humanos diversos, tais como populações indígenas da Amazônia, imigrantes japoneses, indivíduos portadores do HIV, doadores de sangue e pacientes com mielopatias de causas não esclarecidas, dentre outros. Atualmente, os dados obtidos de tais trabalhos constituem rica fonte de referências sobre os primeiros passos da pesquisa acerca do HTLV no país.

Recentemente, foi realizado um levantamento transversal envolvendo as unidades de banco de sangue pertencentes à Rede Pública de Bancos de Sangue das 27 maiores áreas metropolitanas do Brasil, sendo os 26 Estados e o Distrito Federal (Brasília). Tal estudo revelou uma importante heterogeneidade geográfica na distribuição das taxas de prevalência de anticorpos anti-HTLV-1/2 entre potenciais doadores de sangue submetidos a triagem sorológica específica para o mesmo

vírus. Essas taxas variaram de 0,04% em Florianópolis, Estado de Santa Catarina, até 1% em São Luiz, Estado do Maranhão; tendo-se encontrado os valores mais elevados nas regiões Norte e Nordeste, cabendo os menores aos Estados da região Sul (CATALAN-SOARES et al., 2005).

Na região amazônica, o primeiro relato sobre a associação do HTLV-1 a condições mórbidas coube a Nakauchi et al. (1989), compreendendo trabalho sobre a prevalência do vírus em pacientes cancerosos. Neste estudo, do total de 43 amostras de soro, 23,3% (n=10) revelaram-se positivas por Ensaio Imunoenzimático (EIE) para HTLV-I, das quais 50% (n=5) provenientes de pacientes com câncer da cérvix uterina. As amostras reativas por EIE foram posteriormente confirmadas por *Western-Blotting* (WB) e/ou imunomicroscopia eletrônica indireta. O trabalho menciona, também, a presença de partículas virais do “retrovírus tipo C” (HTLV-1) em microscopia eletrônica de células de cultivo testadas com soro de uma paciente com câncer da cérvix uterina envolvida no estudo (NAKAUCHI et al., 1989).

Um levantamento soropidemiológico realizado em duas comunidades indígenas da Amazônia revelou um percentual de 31,4% (n=43) de positividade para o HTLV-1 entre 137 indivíduos. Os grupos pesquisados foram os Mekranoití (n=82) e os Tiriyo (n=55), que apresentaram, respectivamente, 39% e 20% de reatividade para o vírus pelo método EIE. O mesmo trabalho refere, ainda, que 10 (23,2%) de 43 pacientes portadores de algum tipo de câncer e residentes na área urbana de Belém, Pará, possuíam anticorpos para o HTLV-1 (NAKAUCHI et al., 1990).

Posteriormente, outro estudo envolvendo as duas comunidades indígenas acima referidas, acrescentadas de um terceiro grupo, os Xikrin, veio contribuir com novos dados. As amostras de soro dos indivíduos envolvidos no estudo foram submetidas ao teste de WB, o que ampliou os resultados obtidos no estudo anterior;

este, limitando-se ao método imunoenzimático. Por *WB*, os grupos Tiryó, Mekranoiti e Xikrin revelaram taxas de soropositividade para HTLV-1 de 3,63% (2/55), 12,19% (10/82) e 13,88% (10/72), respectivamente. Na mesma ordem, duas, nove e seis das amostras positivas de cada grupo foram reativas pela imunoeletromicroscopia indireta (IEMI). O mesmo estudo refere, também, que 44 amostras dos soros provenientes de uma colônia de imigrantes japoneses, localizada na cidade de Tomé-Açu, Estado do Pará, foram pesquisadas quanto à presença de anticorpos específicos para o HTLV-1, demonstrando resultados negativos pelos métodos de *WB* e IEMI (NAKAUCHI et al., 1992).

Uma ocorrência importante foi registrada ao se detectarem anticorpos específicos para o HTLV-1 em um menino de 12 anos de idade com a Síndrome de Guillain-Barré. Não houve evidências de infecção por poliovírus, uma vez que a tentativa do isolamento de enterovírus a partir do material fecal resultou negativa, assim como a análise das amostras pareadas de soro, obtidas durante a fase aguda e a convalescente. Não foram detectadas imunoglobulinas de classe M (IgM) específicas para citomegalovírus (CMV), a reação de Paul-Bunnell foi negativa e a sorologia específica para o vírus de Epstein-Barr não era disponível. Por outro lado, a reatividade para HTLV-1 por EIE do soro da criança foi posteriormente confirmada por *WB*, que revelou reação para o peptídeo p19 da região GAG (NAKAUCHI et al., 1991).

O perfil epidemiológico da infecção pelo HTLV entre as populações indígenas da Amazônia brasileira é particularmente interessante, devido à notória endemicidade do HTLV-2 nesses grupos. Inquéritos epidemiológicos têm sido realizados buscando-se evidenciar a associação do HTLV-2 com distúrbios

neuroológicos ou hematológicos entre esses grupos, apesar de raros os relatos (ISHAK et al., 2003).

Em 1995, pesquisando um total de 1382 indivíduos, Ishak et al. (1995), demonstraram a presença do HTLV em 17 de 26 comunidades indígenas em seis Estados da Amazônia brasileira (Maranhão, Amapá, Roraima, Amazonas, Rondônia e Pará). Seus dados evidenciaram uma escassa ocorrência do HTLV-1 (apenas cinco indivíduos de três tribos) e uma elevada endemicidade do HTLV-2, cuja distribuição geográfica sugere ampla disseminação entre populações indígenas culturalmente distintas e isoladas (ISHAK et al. 1995). Os autores descreveram a Amazônia brasileira como a maior área endêmica do mundo quanto à ocorrência do HTLV-2 (ISHAK et al., 2003).

À semelhança do inquérito realizado em Trinidad e Tobago (BLATTNER et al. 1990), demonstrou-se a potencial utilidade do HTLV-1 como marcador de movimentos migratórios humanos ao trabalhar-se com populações brasileiras de origem africana. Dentre esses estudos revelou-se o caráter endêmico do HTLV-1 entre descendentes africanos do Estado da Bahia, região Nordeste do Brasil; e, por outro lado, registrou-se a ausência de reatividade sorológica para HTLV-1 entre três comunidades quilombolas na região Norte do país, das quais duas do Estado do Pará e uma do Amapá (BRITES et al., 1997; ISHAK et al., 2003). Tal divergência de dados epidemiológicos pode estar relacionada à origem geográfica dos diversos grupos étnicos de escravos africanos, oriundos de diferentes regiões da África, e que deram origem às comunidades ora estudadas (ISHAK et al., 2003).

Evidências sorológicas e moleculares de transmissão vertical do HTLV-2 têm sido descritas em grupos indígenas da Amazônia, nos quais já se demonstrou uma elevada taxa (20%) de soropositividade para o HTLV-2 em crianças com idades

abaixo de nove anos, bem como similaridade genética dos vírus obtidos das amostras de mãe e filho em grupos indígenas da Amazônia. Registre-se, ainda, a presença do HTLV-2 em leite materno de mães infectadas (LAL et al., 1993).

Convém destacar que o subtipo HTLV-2, antes descrito apenas entre os grupos indígenas da Amazônia brasileira, já teve entrada na população urbana de Belém, posto que o mesmo já foi detectado circulando entre portadores do HIV-1 e UDIs (ISHAK et al., 1995; EIRAKU et al., 1996; LAURENTINO et al., 2005).

Recente levantamento soropidemiológico transversal com abrangência de cinco anos (1996 a 2001), realizado em Belém, Pará, descreveu a presença de anticorpos para HTLV-1/2 em 7,9% (15/190) dos pacientes com quadro de doença neurológica crônica e progressiva. Dentre os portadores do vírus, 80% apresentaram manifestações clínicas, dentre as quais, dificuldade na deambulação, espasticidade e “fraqueza” nos membros inferiores. Com base em seus resultados, os autores sugerem uma possível associação do HTLV-1 e do HTLV-2 à gênese das mielopatias crônicas na referida cidade, e encorajam o monitoramento dos tipos e subtipos circulantes através de técnicas de biologia molecular (MACEDO et al., 2004).

2.1.5 Distúrbios Neurológicos Associados ao HTLV

Os distúrbios neurológicos causados por processo de desmielinização são importantes ocorrências em saúde pública, por compreenderem doenças neurodegenerativas com caráter crônico e não reversível. Neste grupo, enquadra-se a MAH, que constitui uma infecção viral de caráter inflamatório exacerbado e com tropismo pelo sistema nervoso central (SNC). Pacientes acometidos pela MAH apresentam perda progressiva da capacidade motora, com quadro de paraparesia,

urgência ou incontinência dos esfíncteres, dificuldade na deambulação, distúrbios sensoriais, impotência, hiperreflexia e dor lombar entre outros sinais e sintomas que culminam com o declínio da qualidade de vida do paciente (MANNNS et al., 1999; CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002; RIBAS; MELO, 2002).

Desde os seus primeiros registros, realizados por Gessain et al., (1985) e Osame et al., (1986), e o reconhecimento pela OMS, a relevância do HTLV-1 na gênese da PET/MAH tem sido reforçada ao longo das duas décadas seguintes (MANNNS et al., 1999; BANGHAM et al., 2000; CASTRO-COSTA et al., 2001).

O caráter patogênico do HTLV-2, por sua vez, tem sido questionado devido à pouca quantidade de relatos de evidências concretas acerca da associação entre clínica e sorologia, possivelmente porque os métodos sorológicos que detectam com maior facilidade o HTLV-1, em geral apresentam menor sensibilidade para o HTLV-2.

Peters et al. (1999) citam brevemente importantes casos de mielopatia e outros distúrbios neurológicos associados ao HTLV-2. O mesmo tema é posteriormente tratado com maiores detalhes por Roucoux e Murphy (2004) em revisão atualizada sobre os aspectos epidemiológicos e clínicos do HTLV-2. Os autores referem uma tendência crescente nos registros que evidenciam o caráter patogênico do HTLV-2.

Um estudo de caso clínico realizado por Silva et al. (2002) forneceu mais uma evidência quanto ao potencial patogênico do HTLV-2. Trata-se do primeiro caso bem documentado no Brasil de doença neurodegenerativa associada à infecção pelo HTLV-2. Análises filogenéticas da região do LTR definiram o subtipo 2a como responsável pelo quadro. Os autores destacam, ainda, que o mesmo subtipo isolado

no referido estudo já havia sido anteriormente encontrado entre índios Kayapó e usuários de drogas intravenosas (UDI) no Brasil.

No estado do Pará, Ishak et al. (2002) registraram três pacientes do sexo masculino que preenchiam satisfatoriamente os critérios clínicos para serem classificados como mielopatia. Os três indivíduos envolvidos no estudo, todos negros e do sexo masculino, eram provenientes do interior do Estado. Verificou-se também, no mesmo trabalho, a reatividade sorológica para EIE e WB da esposa e do filho de um dos pacientes.

Um estudo posterior foi realizado em Belém, Pará, envolvendo 190 pacientes que apresentavam um ou mais sintomas do “Complexo neurológico associado ao HTLV-1” (CNAH), descrito por Marsh (1996). Destes pacientes, 15 (7,9%) apresentaram sorologia positiva para HTLV-1/2. Tais quadros, característicos de doença neurológica crônica e progressiva incluíram manifestações clínicas como dificuldade na deambulação, espasticidade e “fraqueza” nos membros inferiores (MACEDO et al. 2004).

A importância epidemiológica de dados como estes implica a necessidade de um monitoramento efetivo dos perfis sorológicos e moleculares que o HTLV vem apresentando entre a população amazônica.

2.1.6 Patogênese da MAH

Ainda existem muitas lacunas a esclarecer no processo de patogênese da PET/MAH, mas se sabe que este resulta de diversos fatores e suas variáveis envolvidos na resposta imunológica do hospedeiro contra o HTLV. Estes eventos culminam com um processo inflamatório seguido de desmielinização do tecido nervoso, com destaque para a medula espinhal torácica (figura 5).

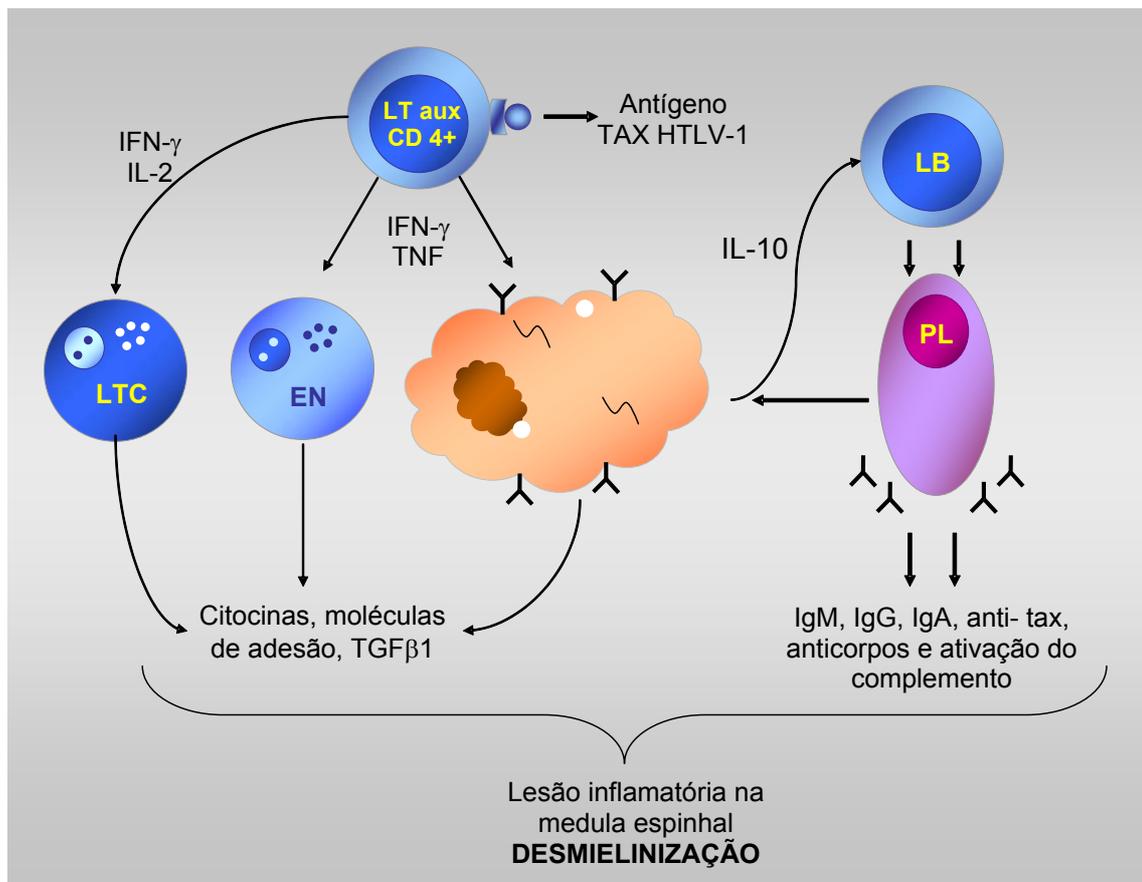


Figura 5 – Modelo esquemático da patogênese da PET/MAH (IFN- γ , interferon- γ ; IL-2, interleucina-2; IL-10, interleucina-10; TNF, fator de necrose tumoral; TGF β 1; IgM, imunoglobulina de classe M; IgG, imunoglobulina de classe G; IgA, imunoglobulina de classe A; EN, célula exterminadora natural; LB, linfócito B; LT aux, linfócito T auxiliar; LTC, linfócito T citotóxico; MF, macrófago; PL, plasmócito). Fonte: adaptada de Casseb e Penalva-de-Oliveira, 2000.

Dentre as principais hipóteses levantadas atualmente na tentativa de buscar esclarecer a patogênese da PET/MAH, citem-se: 1) a presença de antígenos do HTLV na medula espinhal lombar, verificado pelo aumento da carga viral nesse tecido; 2) a ativação de linfócitos T citotóxicos específicos contra o vírus, seja por ação lítica, seja pela produção e liberação de fatores solúveis, tais como citocinas e

moléculas de adesão; 3) a expressão do gene viral tax que induz a proliferação de linfócitos T ou induz um processo inflamatório na medula espinhal; 4) a produção de anticorpos neutralizantes e ativação do sistema complemento por linfócitos B sensibilizados; 5) baixa produção de interleucina-2 (IL-2) e interferon- γ (IFN- γ) e aumento de interleucina-10 (IL-10), direcionando a resposta imune para um padrão de citocinas tipo 2 em indivíduos com PET/MAH e, ainda, 6) a existência de fatores genéticos possivelmente envolvidos no processo de patogênese, tais como alguns haplótipos de antígenos leucocitários humanos (do inglês: HLA - *Human Leukocyte Antigen*), que são grupos gênicos cuja recombinação de seus alelos podem conferir ao hospedeiro um perfil de susceptibilidade ou de proteção contra o desenvolvimento das mais diversas enfermidades (CASSEB; PENALVA-DE-OLIVEIRA, 2000; DONADI, 2000).

2.1.7 Tratamento da MAH

O tratamento da MAH, como em outros quadros clínicos de etiologia viral, envolve medidas terapêuticas de custo elevado, por vezes economicamente inviável para a grande maioria da população, oneroso para o Estado e de caráter meramente paliativo, podendo retardar, porém não impedir a progressão da doença. A terapêutica em uso atual inclui medicamentos que, no geral, oferecem mais efeitos adversos do que eficácia quimioterápica sensível e concreta (MANNNS et al., 1999; RIBAS; MELO, 2002; VERONESI, 2002).

O Ministério da Saúde (MS) do Brasil recomenda que os pacientes portadores de distúrbios neurológicos comprovadamente associados ao HTLV sejam acompanhados, de preferência por um corpo médico que disponha de neurologista clínico (BRASIL, 2003).

Segundo o Guia de Manejo Clínico do Paciente com HTLV, publicado em 2003 pelo MS, “não há consenso na literatura acerca da existência de um tratamento específico comprovadamente eficaz para as manifestações neurológicas do HTLV”. Por isso é importante que o paciente seja encaminhado para centros especializados onde deverá receber tratamento geral e sintomático.

O tratamento geral e sintomático sugerido pelo MS recomenda fisioterapia para os casos de paresia, visando a melhorar a força e manter a musculatura ativa, assim evitando a atrofia e contraturas.

Fármacos como baclofeno, tizanidina e diazepam são recomendados para melhorar a mobilidade nos casos de espasticidade, enquanto que drogas como amitriptilina, nortriptilina, imipramina, gabapentina carbamazepina e hidantoína estão indicadas no tratamento sintomático das dores neuropáticas de origem medular, radicular ou neural periférica.

Os quadros de bexiga neurogênica podem ser tratados com oxibutinina ou Imipramina, recomendando-se também a cateterização vesical intermitente, visando a manter um volume residual adequado. Estes pacientes também devem ser acompanhados por estudo urodinâmico e avaliação urológica. A profilaxia da infecção urinária pode ser feita com o uso de nitrofurantoína ou norfloxacina.

Em casos de constipação intestinal recomenda-se uma avaliação nutricional, dando-se preferência a uma dieta anti-constipante, rica em fibras e com elevado teor hídrico (BRASIL, 2003).

2.1.8 Perfis sorológicos definidos por WB

Com o propósito de produzir um protocolo padronizado de diagnóstico laboratorial, o MS publicou, em 2004, um “algoritmo para o diagnóstico laboratorial

do HTLV”. A amostra suspeita deve, a princípio, passar por uma triagem sorológica, ou seja, pesquisa de anticorpos por ensaio imunoenzimático ou reação aglutinadora com partículas de gelatina ou látex. As amostras reagentes devem ser retestadas em duplicata e, de acordo com os critérios de seleção, submetidas ao teste de *Western-Blotting* (WB). Este, apesar de também envolver pesquisa de anticorpos, 50

possui caráter confirmatório e possibilita definir a infecção como causada por HTLV-1 ou HTLV-2 (Figura 6) (BRASIL, 2003).

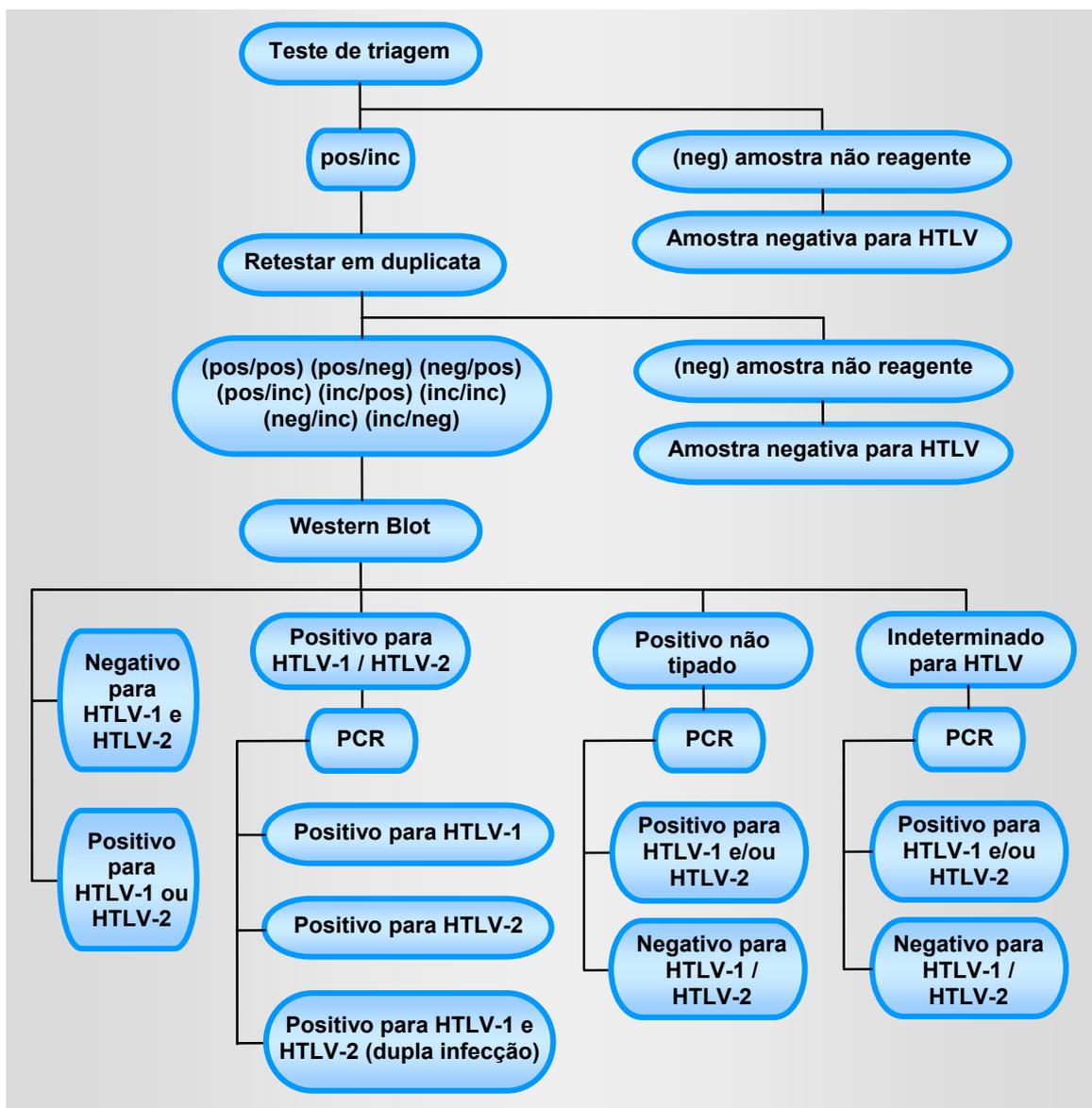


Figura 6 – Algoritmo para o Diagnóstico Laboratorial de Infecção pelo HTLV. (pos), positivo; (neg), negativo; (inc), inconclusivo. Fonte: Brasil, 2003.

O método de *WB* pode revelar seis perfis, descritos no Quadro 1. As amostras não reagentes para *WB* devem ter seus resultados definidos como “amostra negativa para HTLV-1/HTLV-2”. Dos quatro perfis positivos descritos na tabela 1, as amostras definidas como “positivas para HTLV-1” e “positivas para HTLV-2” podem ser liberadas com tais resultados. Por outro lado, o MS recomenda que as amostras “positivas não tipadas” e “positivas para HTLV-1/2” sejam submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR). O mesmo procedimento também se recomenda para as amostras com resultados definidos como “indeterminadas para *WB*” (Figura 6) (BRASIL, 2003).

Resultado	Bandas Encontradas
Positivo para HTLV-1	P19 e/ou p24 + gd 21 + rgp 46-1
Positivo para HTLV-2	P19 e/ou p24 + gd 21 + rgp 46-2
Positivo para HTLV-1 e HTLV-2	P19 e/ou p24 + gd 21 + rgp 46-1 + rgp 46-2
Positivo para HTLV (não tipado)	P19 e/ou p24 + gd 21 ou gp 46-1 (nativa ou recombinante)
Indeterminado	Qualquer combinação de bandas que não as descritas acima.
Negativo	Nenhuma reatividade

Nota: p19 e p24 (proteínas de *gag*);
 gd21 (proteína transmembrana);
 rgp 46-1, rgp 46-2 (proteína de *env*)

Quadro 1 – Critérios de interpretação do *WB* anti-HTLV. Fonte. BRASIL, 2003.

2.1.9 Relevância dos perfis soro-indeterminados por *WB*

É com uma frequência importante que vem sendo descrita ao redor do mundo a ocorrência dos padrões indeterminados de banda de *WB* para HTLV-1/2. Estes casos se caracterizam pela ausência de bandas características do perfil

completo, o que é fundamental para a adequada definição do tipo de infecção. Trata-se dos chamados “padrões soro-indeterminados de *WB* para HTLV-1/2”.

A sensibilidade dos *kits* de *WB* tem sido avaliada comparando-se os resultados obtidos por esse método com àqueles da PCR. O uso dessa metodologia tem fornecido dados que justificam sua aplicabilidade na tipagem das infecções em indivíduos com perfil indeterminado por *WB*. Estudos como estes têm sido realizados principalmente em populações de doadores de sangue dos EUA, Argentina e Brasil (HJELLE et al., 1992; LAL et al., 1992; SANTOS et al., 2003); em UDIs dos EUA e da Itália (GALLO et al., 1994; COLOMBO et al., 1995) e entre portadores de distúrbios neurológicos dos EUA (SOLDAN et al., 1999).

Dentre os trabalhos de grupos brasileiros, cabe citar mais uma vez o de Silva et al. (2002), realizado no Rio de Janeiro, demonstrando a associação do HTLV-2 a um caso de doença neurodegenerativa. Por ter apresentado padrão indeterminado ao *WB*, a infecção só pôde ser confirmada, e o seu subtipo definido, por métodos moleculares. Esse fato levou os autores a recomendar que todos os casos em que uma mielopatia esteja associada a resultado sorológico indeterminado sejam avaliados por PCR, para que se possa obter noção do número real quanto à ocorrência da mielopatia associada ao HTLV-2 (SILVA et al., 2002).

Um estudo realizado no hemocentro de Fortaleza, Ceará, revelou que de 191 indivíduos reativos para HTLV-1/2 por EIE, 118 (61,78%) se mostraram com padrão indeterminado para *WB*. De 41 destas amostras, submetidas à análise por PCR, apenas 9 (22%) confirmaram a infecção, enquanto que 32 (78%) foram negativas para HTLV-1/2 (SANTOS et al., 2003).

Em Belém, um estudo envolvendo doadores de sangue demonstrou que, de 112 indivíduos positivos para EIE em duplicata, 27,7% (n=31) não puderam ser

definidos quanto ao tipo viral associado à infecção (RIBEIRO-LIMA, 1999). Mais recentemente, na mesma cidade, de 190 pacientes apresentando distúrbios neurológicos, 15 (7,9%) foram reativos pelo EIE. Destes indivíduos, 10 (71,4%), 3 (21,4%) e 1 (7,2%) foram caracterizadas por *WB* como HTLV-1, HTLV-2 e dupla reação (HTLV-1 e HTLV-2), respectivamente (MACEDO et al., 2004).

Os padrões soro-indeterminados de *WB* para HTLV-1/2 têm motivado estudos que tencionam melhor esclarecer suas causas e, ao mesmo tempo, solucionar as limitações dos ensaios sorológicos, buscando, desta forma, evitar a disseminação silenciosa e contínua do vírus. Os dados acima apresentados denotam a relevância do assunto e a necessidade de estudos mais acurados sobre o mesmo. Ao mesmo tempo, a região amazônica se tem revelado epidemiologicamente importante, merecendo por isso atenção nos esforços que visem ao monitoramento das infecções por HTLV.

2.1.10 Associação dos tipos de HTLV a quadros clínicos

Desde quando fora inicialmente descrito, o HTLV-1 tem sido associado a um espectro abrangente de doenças que vai além da LLTA e da MAH. Por outro lado, o caráter patogênico do HTLV-2 tem sido questionado ao longo das últimas décadas por carecer de evidências da associação entre clínica e sorologia, possivelmente porque os métodos sorológicos que detectam com maior facilidade o tipo 1 apresentam menor sensibilidade para o HTLV-2. Entretanto, recentemente, diversos achados clínicos têm sido descritos em associação ao HTLV-2, dentre os quais uma condição patológica muito semelhante à MAH.

Em recente estudo prospectivo multicêntrico realizado entre doadores de sangue nos EUA, Murphy et al. (2004a) descreveram a associação dos dois tipos de HTLV a outros quadros clínicos que não a LLTA e a PET/MAH. Neste estudo, o

HTLV-2 foi relacionado à incidência mais elevada de bronquite aguda, infecção da bexiga ou dos rins, artrite e asma, bem como à maior probabilidade de adquirir pneumonia quando se efetua a comparação com os doadores soronegativos. A incidência do HTLV-1, por sua vez, apresentou-se mais elevada nos casos de infecção da bexiga e dos rins e artrite. Deste modo, os achados do referido trabalho sugerem que a infecção pelo HTLV-1 pode estar relacionada à inibição das respostas imunológicas nas infecções respiratórias e que ambos, HTLV-1 e HTLV-2, induziriam reações inflamatórias ou auto-imunes (MURPHY et al., 2004a).

Em outro trabalho, o mesmo grupo descreveu o uso da reação em cadeia da polimerase para avaliar os níveis de carga viral (CV) do HTLV-1 e do HTLV-2 entre doadores de sangue, procurando neles definir quais fatores de risco poderiam estar associados à maior patogenicidade do HTLV, uma vez que CV elevadas já haviam sido associadas a um risco aumentado quanto a se desenvolver MAH (MURPHY et al., 2004b). Nesta pesquisa, o HTLV-1 se mostrou responsável por níveis significativamente mais elevados de CV do que o HTLV-2, enquanto que o subtipo 2a se associou com CV mais elevadas quando comparado ao 2b. Tais resultados destacam a necessidade de se avaliar a importância do papel de cada tipo e subtipo do vírus na gênese das doenças a ele associadas, nos diferentes focos populacionais endêmicos distribuídos pelo globo terrestre (MURPHY et al., 2004b).

Em estudo recente realizado na Espanha, Vallejo et al., (2003) relataram dois casos de infecção pelo subtipo HTLV-1a que apresentaram diferentes evoluções clínicas: um paciente com LLTA que não referira ter viajado para áreas endêmicas; e o outro que, tendo desenvolvido um quadro de paraparesia, relatou deslocamento prévio para diversas áreas endêmicas, tais como Américas do Sul e

Central e África do Sul. Os autores destacam, portanto, a necessidade de ter-se conhecimento dos subtipos circulantes naquele país.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- a) Determinar a prevalência de anticorpos para HTLV no Estado do Pará, Brasil, em pacientes portadores de distúrbios neurológicos atendidos na Seção de Virologia (SEVIR) do Instituto Evandro Chagas (IEC), Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), Ministério da Saúde (MS)

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar, por EIE e WB, os percentuais de infecções por HTLV-1, HTLV-2 e das infecções mistas;
- b) Determinar, por métodos de biologia molecular, a prevalência dos tipos de HTLV na população estudada, bem como, esclarecer o tipo de HTLV envolvido em cada um dos casos de infecções mistas e padrões “não tipados” e “indeterminados” por WB.
- c) Determinar a distribuição temporal das infecções simples e mistas, bem como relaciona-las de acordo com sexo, idade e características clínicas.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

4.1.1 Paciente

No período de janeiro de 1996 a dezembro 2005, 353 pacientes com idades entre 9 meses e 79 anos foram encaminhados à SEVIR do Instituto Evandro Chagas (IEC), Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), Ministério da Saúde (MS), por médicos locais, com a finalidade básica de esclarecimento diagnóstico por triagem sorológica para infecção pelo HTLV. Deste total foram selecionados 31 pacientes que apresentaram pelo menos um sinal ou sintoma do Complexo neurológico associado ao HTLV-1 (CNAH) (MARSH et al., 1996) (Quadro 2) no momento da avaliação clínica, e que apresentassem sorologia positiva para os testes de triagem e confirmatório de EIE específico para HTLV-1/2.

A partir desta população (N=353), realizou-se este inquérito epidemiológico retrospectivo transversal, com fins de determinação da prevalência do HTLV entre indivíduos com distúrbios neurológicos e, ainda, visando a esclarecer, por métodos moleculares, os casos de sorologia inconclusiva.

Com o auxílio dos dados sobre os pacientes disponíveis em fichas clínico-epidemiológicas, procurou-se localizá-los por telefone e/ou visitas domiciliares. Aqueles localizados que aceitaram participar do estudo foram convidados a assinar um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A). Em seguida, membros da equipe devidamente identificados coletaram dados adicionais sobre a saúde e o histórico de cada paciente e procederam à coleta do sangue.

Síndrome	Quadro Clínico
PET/MAH*	Fraqueza crônica e progressiva dos membros inferiores, distúrbios esfincterianos, sinais sensoriais objetivos comprometidos ou ausentes, síndrome tetrapiramidal**
Miopatia	Fraqueza muscular proximal, mialgias, reflexos profundos e sensibilidade normais
Doença do neurônio motor	Fraqueza muscular, amiotrofias e síndrome piramidal, miofasciculações, sensibilidade normal
Neuropatia periférica	Fraqueza muscular distal, hipoestesia em luvas e/ou em meias, hipo ou arreflexia profunda
Disautonomia	Hipotensão ortostática, disfunção esfincteriana
Ataxia cerebelar	Tremor de ação, dismetria, assinergia de tronco, nistagmo
Disfunção cognitiva	Alentecimento psicomotor, distúrbios da memória, hipoatenção, distúrbio motor ocular.

Quadro 2 – Complexo neurológico associado ao HTLV-1 (MARSH, 1996).

* Quadros clínicos similares, embora com menor frequência, têm sido descritos em pacientes infectados pelo HTLV-2;

** O diagnóstico de PET/MAH baseia-se na presença de sinais clínicos compatíveis e dados laboratoriais que comprovem a infecção pelo HTLV no sangue e, simultaneamente, no líquido cefalorraquiano.

4.1.2 Critérios de inclusão

Foram incluídos neste estudo pacientes residentes no estado do Pará e/ou internados em instituições de saúde do mesmo estado que apresentassem pelo menos um sinal ou sintoma do CNAH no momento da avaliação clínica, e que apresentassem sorologia positiva para os testes de triagem e confirmatório de EIE específico para HTLV-1/2.

4.1.3 Critérios de exclusão

Foram excluídos deste estudo pacientes não apresentassem quaisquer sinal ou sintoma do CNAH no momento da avaliação clínica, bem como aqueles em quem não se tenha detectado a presença de anticorpos específicos para HTLV-1/2 por testes de triagem e confirmatório de EIE. Da mesma forma, foram excluídos pacientes que, mesmo que tenham sido contemplados nos dois critérios anteriores, fossem residentes e/ou estivessem internados em instituições de saúde fora do estado do Pará, ou, ainda, se não estivessem disponíveis quaisquer dessas informações sobre sua procedência.

4.1.4 Riscos e benefícios

Não houve riscos para os pacientes envolvidos no estudo e o benefício consistiu na confirmação, por métodos de biologia molecular, dos casos de identificação duvidosa do tipo de HTLV por pesquisa de anticorpos específicos pelas técnicas de EIE e *WB*.

4.1.5 Ética

O projeto referente a este estudo foi previamente submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do IEC, SVS, MS, tendo recebido aprovação do mesmo (Anexo B). As amostras de soro testadas compõem um banco de espécimes clínicos já existentes na Seção de Virologia do Instituto Evandro Chagas, enquanto que as de linfócitos só foram colhidas mediante concordância dos pacientes consultados em participar do projeto. Tal concordância foi oficialmente documentada em Termo de Consentimento Livre e Esclarecido devidamente assinado por cada paciente. Toda e quaisquer informações de identificação pessoal do paciente envolvido no estudo foram consideradas confidenciais e, portanto, mantidas sob sigilo, do modo que somente os membros do grupo de pesquisa têm acesso a elas.

4.1.6 Avaliação clínica

Entre janeiro de 1996 e dezembro de 2005, os 353 pacientes envolvidos no estudo foram regularmente encaminhados por médicos locais, entre os quais alguns neurologistas, com indicação clara de pesquisa para HTLV devidamente documentada nas fichas de solicitação médica (Ficha Epidemiológica – **Anexo C**). Tais pacientes foram submetidos a entrevista com um médico (virologista ou clínico), ocasião em que se procedia à anamnese e ao exame físico.

Desses indivíduos foram selecionados 31 que apresentavam um ou mais dos sinais e sintomas contemplados no “Complexo neurológico associado ao HTLV-1” descrito por Marsh (1996), tendo a PET/MAH se destacado como a condição clínica mais comumente encontrada entre os mesmos.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Obtenção das amostras

4.2.1.1 Soro

Para a obtenção dos espécimes de soro, uma amostra de sangue por paciente foi coletada por punção venosa, aproximadamente 5 mililitros (ml), sem a adição de anti-coagulante. O sangue foi centrifugado por dez minutos a 2000 rotações por minuto (rpm) Em seguida retirou-se o soro com o auxílio de micropipeta, acondicionando-o em frasco plástico devidamente identificado, armazenando-o a -20° C até o processamento.

4.2.1.2 Líquido céfalo-raquidiano (LCR)

Eventualmente, amostras de LCR de alguns pacientes foram colhidas pelo médico assistente (entre os quais alguns neurologistas), quando este julgava necessário, e encaminhadas à SEVIR/IEC, devidamente identificadas. Submeteram-

se essas amostras às pesquisas sorológicas específicas (EIE e *WB*), de acordo com requisição médica.

4.2.2 Avaliação Sorológica

4.2.2.1 Ensaio Imunoenzimático (EIE)

Após a avaliação clínica, todos os pacientes encaminhados à SEVIR/IEC tiveram suas amostras de soro e de LCR (estas, quando disponíveis) submetidas à pesquisa de anticorpos por EIE (Ortho®, Raritan, NJ, USA), a princípio em caráter de triagem. Todos os espécimes que reagiram positivamente durante a triagem inicial foram, em seguida, novamente testados em duplicata por EIE.

Cada teste deste ensaio envolve três etapas e é realizado individualmente em orifícios cujas paredes são sensibilizadas com uma combinação de quatro antígenos recombinantes para HTLV-1 e HTLV-2. Estes antígenos, por sua vez, derivam de DNA recombinante de levedura e consistem em quatro seqüências de proteínas virais, quais sejam, envelope do HTLV-1, envelope do HTLV-2, core do HTLV-1 e core do HTLV-2.

4.2.2.2 *Western-Blotting*

As amostras repetidamente reativas foram em seguida confirmadas e tipificadas usando-se um ensaio de *Western-Blotting* recentemente desenvolvido (ZREIN et al., 1998), que inclui antígenos derivados das proteínas imunodominantes de HTLV-1 e HTLV-2. Os antígenos usados constituem-se em proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos altamente purificados e aderidos a membrana de nylon. (INNO-LIATM HTLV 1/2, Immunogenetics N.V., Ghent, Belgium). Com base no princípio do teste descrito pelo fabricante, as bandas correspondentes às duas proteínas do core, codificadas pelo gene GAG (p19 1/2 e p24 1/2), e os

produtos do gene *env*, as glicoproteínas gp46 1/2 (superfície externa do envelope) e gp21 1/2 (proteína transmembrana), são aplicadas como antígenos não-tipo-específicos, para certificar a presença dos anticorpos contra HTLV-1/2. As proteínas recombinantes e os peptídeos sintéticos aplicados para definir a especificidade para cada tipo são: p19-1 do GAG; e gp46-1 do *env* para HTLV-1, e gp46-2 do *env* para HTLV-2. Como controles da qualidade do teste são utilizadas quatro bandas: uma para controle negativo (estreptavidina), e três outras incluindo controles positivos, uma forte (anti-IgG humana), outra moderada (IgG humana) e a terceira fraca (IgG humana).

4.2.3 Separação de Linfócitos

De cada paciente devidamente selecionado para análise molecular, foram colhidos 5 ml de sangue em tubo cilíndrico contendo anti-coagulante, homogeneizando-se a mistura manualmente por inversão, imediatamente após a coleta. A amostra era então centrifugada a 2000 rpm por 10 minutos e o plasma sobrenadante, removido e armazenado à parte. Em seguida a camada leitosa de linfócitos, localizada logo acima das hemácias, era colhida com o auxílio de pipeta Pasteur e depositada em tubo cônico para centrífuga com capacidade para 15 ml, de plástico descartável. No mesmo tubo acrescentavam-se 2 ml de tampão de lavagem (pH 7,2) à amostra, que era invertida manualmente para homogeneização. Acresciam-se dois mililitros de Ficoll-Hypaque diretamente no fundo do tubo, deslocando-se lentamente o PBS com os linfócitos para cima. O conteúdo era centrifugado a 1600 rpm por 15 minutos. Finalmente, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, retirava-se o sobrenadante (tampão), desprezando-o. Em seguida colhia-se cuidadosamente o reduzido anel branco de linfócitos, armazenado-o devidamente

em frasco de plástico apropriado à temperatura de -70°C , ou em nitrogênio líquido até o momento de uso.

4.2.4 Extração do ácido nucléico

A técnica de extração do DNA linfocitário utilizada neste estudo baseia-se na utilização de grânulos magnéticos que também o purificam a partir das amostras concentradas de linfócitos ou plasma. De acordo com o fabricante, as características eletrostáticas da superfície desses grânulos podem ser modificadas de forma controlada com o uso de soluções tamponadas. Em condições de baixo pH, os grânulos adquirem carga positiva, atraindo a cadeia de ácido nucléico, carregada negativamente. Em função da mesma carga, proteínas e outros contaminantes não se ligam aos grânulos, sendo descartados durante a lavagem com solução aquosa tamponada. Para a eluição do ácido nucléico, a carga da superfície dos grânulos é neutralizada pelo aumento do pH para 8,5, utilizando-se uma solução salina própria. O DNA purificado foi eluído em tampão, estando pronto para o uso em técnicas de biologia molecular.

Para a execução da técnica, em um tubo estéril de microcentrífuga com capacidade para 1,5 ml foram adicionados 500 μl do tampão de lise (L12), 5 μl da PROTEINASE K e 20 μl do espécime. A mistura foi suavemente homogeneizada com auxílio da própria pipeta e incubada à temperatura ambiente por 10 minutos. Enquanto isso a mistura de purificação (MP) era preparada com a seguinte constituição para cada amostra: 100 μl do tampão de purificação (N5) e 20 μl da solução de grânulos magnéticos previamente ressuspensas em vortex. Ao final dos 10 minutos de incubação, a MP foi suavemente homogeneizada para ressuspender totalmente os grânulos e 120 μl da mesma foram acrescentados à amostra digerida. A mistura foi homogeneizada e incubada à temperatura ambiente por 1 minuto para

permitir a ligação do DNA aos grânulos magnéticos, seguindo-se o seu depósito no magneto por 1 minuto, ou até que os grânulos formassem uma pelota firmemente aderida à parede do tubo. Sem remover a amostra do contato com o magneto, o sobrenadante foi então cuidadosamente removido e, em seguida, descartado, retirando-se o tubo contendo a pelota de grânulos magnéticos do contato com o magneto. Adicionou-se, em seguida, 500 µl do tampão de lise (L12; SEM a Proteinase K) e 50 µl do tampão de purificação (N5). A mistura foi novamente homogeneizada e incubada à temperatura ambiente por 1 minuto, seguindo-se a sua deposição em contato com o magneto por 1 minuto. Em seguida, sem retirar a amostra do contato com o magneto, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e, em seguida, descartado. O tubo contendo a amostra foi então removido do contato com o magneto e a ele foram adicionados 500 µl do tampão de lavagem (W12), homogeneizando-se suavemente a mistura, que foi mais uma vez depositada em contato com o magneto por 1 minuto. Em seguida, sem remover a amostra do contato com o magneto, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e, depois, descartado. O tubo foi então removido do contato com o magneto e a ele se adicionou 100 µl do tampão de eluição (ES), homogeneizando-se a mistura que foi incubada à temperatura ambiente por 1 minuto e, em seguida, depositada em contato com o magneto por 3 minutos. Sem remover a amostra do contato com o magneto, o sobrenadante, desta vez já contendo o DNA, foi cuidadosamente removido para um tubo estéril de microcentrífuga, e, finalmente, alíquotas de 25 µl foram distribuídas em tubos para microcentrífuga com capacidade para 0,5 ml. Os grânulos magnéticos, uma vez usados, foram então descartados não mais sendo utilizados.

4.2.5 Controle endógeno da Nested-PCR

Para controle endógeno da reação pesquisou-se a presença do gene da β -globina humana, que serviu como controle de DNA genômico para certificação da presença de DNA humano e garantia quanto à qualidade da extração. Para isso, as amostras foram sistematicamente submetidas à PCR com um par de iniciadores específicos para a b-globina, G73 (5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3') e G74 (5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3'), gerando um produto de 268 pb, cuja amplificação excluía a possibilidade de resultado falso-negativo (GREER et al. 1991; RABELO-SANTOS et al., 2003).

Cada reação de amplificação consistia em um volume final de 20 μ l e era constituída dos seguintes reagentes: tampão de reação 1X, dNTP 0,2 mM, $MgCl_2$ 3 mM, oligonucleotídeos 0,5 μ M, enzima Taq 0,04 U. Sendo que o tampão original 10X concentrado tem a seguinte composição: Tris HCl 200 mM (pH 8.4), KCl 500 mM.

A amplificação da seqüência da globina foi realizada em um termociclador automático (MasterCycler Eppendorf AG 22331 Hamburg) e teve início com um primeiro ciclo de 94°C por 5 minutos, 55°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos. A este primeiro ciclo seguiram-se mais 39 ciclos de amplificação de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, correspondendo tais temperaturas, respectivamente, às fases de desnaturação, anelamento e síntese da cadeia. Após o último ciclo, a temperatura de polimerização (72°C) foi estendida por mais 7 minutos.

4.2.6 Nested-PCR

As amostras de linfócitos dos pacientes com sorologia positiva para HTLV por EIE, independentemente dos seus perfis de WB, foram submetidas a uma nested-PCR.

Nesta análise foi utilizado um conjunto de iniciadores capaz de amplificar a região TAX de ambos os tipos de HTLV gerando um produto de 368 pb por Vicente em 2005¹ Os “iniciadores” internos e externos, “senses” e “antisenses”, correspondentes a essa região e usados na análise das amostras encontram-se descritas no quadro 3, com suas respectivas denominações, seqüências nucleotídicas, posição de anelamento e tamanho do produto amplificado em pares de base (pb) por cada par.

Iniciadores		Seqüência Nucleotídica	Posição	Tamanho (pb)
Externos	HTLV F1 (sense)	TCAGCCCAYTTYCCAGG	7321- 7337	590
	HTLV R1 (antisense)	ATTTTRTAKAGKARTTCYTCCA	7892- 7913	
Internos	HTLV F2 (sense)	TGTGTWCARGSCGAYTGGTG	7387- 7406	368
	HTLV R2 (antisense)	GGTGTASABGTTTTGGGGYCGGA	7733- 7755	

Quadro 3 – Iniciadores específicos correspondentes à região TAX de HTLV-1/2, usados na análise das amostras.

Cada reação de amplificação apresentava um volume final de 50 µl e foi constituída dos seguintes reagentes: dNTP 0,4 mM, MgCl₂ 2,5 Mm, tampão de reação 1X, oligonucleotídeos 250 ng, enzima Taq 1.5 U, segundo Vicente, em 2005 (informação verbal)¹

O processo de amplificação foi realizado em um termociclador automático (MasterCycler Eppendorf AG 22331 Hamburg) por 35 ciclos de amplificação, compostos, cada um, de três seqüências de temperatura: desnaturação, anelamento

¹ Comunicação pessoal fornecida pela dra Ana Carolina Vicente, geneticista da FIOCRUZ

e polimerização (94°C por 30 seg, 55°C por 30 seg e 72°C por 1 min). Excepcionalmente, o primeiro ciclo tinha início com a temperatura de desnaturação (94°C) estendendo-se por 2 minutos. No último ciclo, a fase de síntese, também chamada de extensão, a temperatura de 72°C foi estendida por 10 minutos, conforme Vicente, em 2005 (informação verbal).

4.2.7 Visualização dos produtos da nested-PCR

Foram adicionados 3 µl do tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25% + xileno cianol 0,25% + sucrose 40%) a uma alíquota de 10 µl da amostra amplificada. Após homogeneização, esta solução foi submetida à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% em TAE (1,5 g de agarose + 100 ml de tampão TAE 1x + 1 µl de solução de brometo de etídio). A solução de trabalho TAE 1x foi obtida da solução de estoque TAE 50x pH 8,0 (242 g de Tris base + 57,1 ml de ácido acético glacial + 100ml de EDTA 0,5 M). As amostras foram submetidas à eletroforese a 80 voltz por aproximadamente 1 hora. O peso molecular utilizado foi o SmartLadder SFTM (Eurogentec). A visualização das bandas foi realizada em sistema de fotodocumentação de géis com câmara escura, transluminador duplo de 312 nm e luz branca (marca Vilber Lourmat).

4.2.8 PCR em tempo real

A PCR em tempo real se fundamenta em dois princípios: (a) a existência da atividade 5' → 3' exonuclease da *Taq* polimerase e (b) a construção de sondas oligonucleotídicas duplamente marcadas, as quais emitem um sinal fluorescente apenas quando clivadas, com base no princípio da transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET) (GIULIETTI et al., 2001).

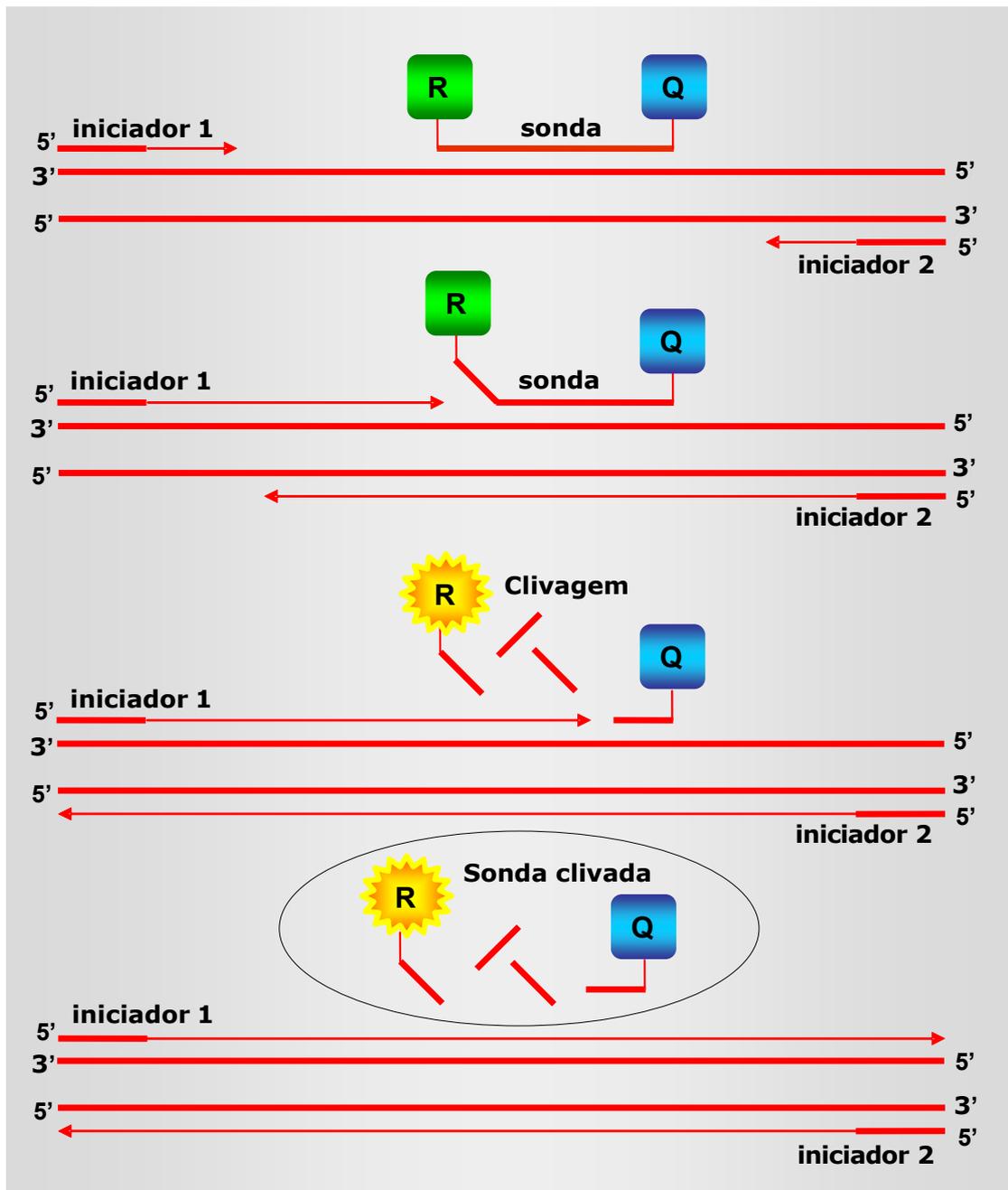


Figura 7 – Representação esquemática da técnica de PCR em Tempo Real. (R), *reporter*, (Q) *quencher*.

Nesta técnica utiliza-se uma sonda marcada com dois fluoróforos: um, *reporter* (FAM; 6-carboxifluoresceína) na extremidade 5', e outro, *quencher* (TAMRA; 6-carboxitetrametilrodamina), na extremidade 3'. No início da reação, a sonda permanece intacta, enquanto que o *quencher* absorve a fluorescência emitida pelo

reporter. Porém, no decorrer do processo da PCR, a sonda é degradada e, com isso, os fluoróforos são separados. Desta forma a emissão do *reporter* deixa de ser transferida para o *quencher* (Figura 7), o que resulta no aumento de emissão da fluorescência do *reporter* (FAM a 518 nm). Esse processo ocorre a cada ciclo e não sofre interferência com o acúmulo exponencial do produto da PCR. O aumento da emissão de fluorescência é lido por um detector em tempo real, durante o curso da reação, sendo consequência direta da amplificação da seqüência alvo durante a PCR. Um *software* gera curvas de amplificação onde são plotados os valores que expressam a degradação da sonda durante a PCR em relação ao número dos ciclos (GIULIETTI et al., 2001).

As 14 amostras de linfócitos obtidas para análise molecular foram submetidas à reação de PCR em tempo real, utilizando-se aparelho ABI Prism[®] 7000 (Applied Biosystems), utilizando o *kit*, do mesmo fabricante, TaqMan[®] DNA Universal Máster Mix. Este consiste em uma “pré-mix” e é composto por todos os componentes necessários à amplificação, exceto os iniciadores e as sondas, incluindo o sistema de descontaminação, UNG (AmpErase[®] urasil N-glicosilase) (ESTES; SEVAL, 2003). Além disso, ainda faziam parte do kit: AmpliTaqGold[®] DNA polimerase, dNTPs (incluindo dUTP), referência passiva 1 (ROX) e, outros componentes tampões otimizadores, de formulação do proprietário.

Nesta fase se utilizou um conjunto de “iniciadores” capaz de amplificar, separadamente, a região não homóloga do gene *pol* do HTLV-1 e a do HTLV-2, executando-se, desta forma a definição do tipo viral. Para controle interno da reação, as amostras foram sistematicamente submetidas à amplificação do gene da albumina humana (LOPES, 2004).

O quadro 4 descreve os “iniciadores” internos e externos, “senses” e “antisenses” usados na análise das amostras, bem como suas respectivas sondas, de acordo com suas denominações, seqüências nucleotídicas, posição de anelamento e tamanho do produto amplificado em pares de base (pb) por cada par.

Cada reação de amplificação apresentava um volume final de 50 µl e era constituída dos seguintes reagentes: 25 µl da Master Mix, 1,5 µl do iniciador sense, 1,5 µl do iniciador anti-sense, 1,5 µl da sonda, 17,5 µl de água e 3 µl de DNA. O processo de amplificação teve início com um ciclo de duas etapas, quais fossem, 2 minutos a 50°C, seguidos de mais 10 minutos a 95°C. Posteriormente, seguiu-se 50 ciclos, compostos, cada um, de duas seqüências de temperatura: 90°C por 50 segundos e 60°C por 1 minuto (LOPES, 2004).

Foram consideradas positivas quanto a presença do DNA pró-viral do HTLV as amostras que formavam a curva de amplificação.

Iniciadores		Seqüência Nucleotídica
HTLV-1	Sense	AACGCTCTAATGGCATTCTTAAAAC
	anti-sense	TCAGGTGGTTGATTGTCCATAGG
	Sonda	6FAM-AGTACTTTACTGACAAACCCGACCTACCC-TAMRA
HTLV-2	Sense	CAAGCATTCTACCCATATAACCATACAA
	anti-sense	GAAGGTTAGGACAGTCTAGTAGATATTTATTTAGTA
	Sonda	6FAM-CAGGCCTGGTTCGAGAGAACCAATG-TAMRA
Albumina	Sense	GACAACAATGCCAGGGAGAGA
	anti-sense	CTGTAATCATCGTCTAGGCTTAAGAGTAA
	Sonda	VIC-ATTGCAAAACCTGTCATGCCACACA-TAMRA

Quadro 4 – Iniciadores específicos correspondentes região não homóloga do gene *pol* do HTLV-1 e a do HTLV-2

4.2.9 Análise estatística dos resultados

Os dados clínico-epidemiológicos dos pacientes envolvidos no estudo foram armazenados em banco de dados, procedendo-se à sua tabulação em planilha eletrônica. As análises estatísticas dos resultados obtidos se processaram com o auxílio do software EPI-INFO, versão 6.0 (Atlanta, GA, USA), utilizando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). A comparação das taxas entre os grupos se procedeu com o teste do qui-quadrado de Mantel-Haenszel de associação, usando-se o teste exato de Fisher quando apropriado.

5 RESULTADOS

Foram selecionados 353 pacientes que haviam sido encaminhados à SEVIR/IEC para esclarecimento sorológico de diagnóstico para o HTLV entre janeiro de 1996 e dezembro de 2005, por conta de quadro clínico que envolvesse um ou mais dos sinais e/ou sintomas contemplados no “Complexo neurológico associado ao HTLV-1”, descrito por Marsh (1996).

Essa população inicial abrangia indivíduos com idades entre nove meses e 79 anos (média aproximadamente igual a 36), e revelou prevalência de anticorpos específicos para o HTLV, pelo método imunoenzimático, igual a 8,8% (31/353). As taxas de prevalência da infecção pelo vírus nos sexos feminino e masculino foram de 10,6% (19/179) e 6,9% (12/174), respectivamente. Entre essas taxas, não se demonstrou diferença estatisticamente significativa pelo teste de Mantel-Haensze ($p=0,22$).

A Figura 8 demonstra a freqüência de positividade para HTLV por EIE a cada ano, ao longo dos dez anos, tendo-se registrado a menor taxa (2,8% – 1/36) em 1998 e a maior (14,6% – 6/41) no último ano do estudo. Observa-se ainda que houve uma tendência ao aumento na demanda, visando ao esclarecimento por diagnóstico laboratorial, chegando a duplicar de 1996 a 2005.

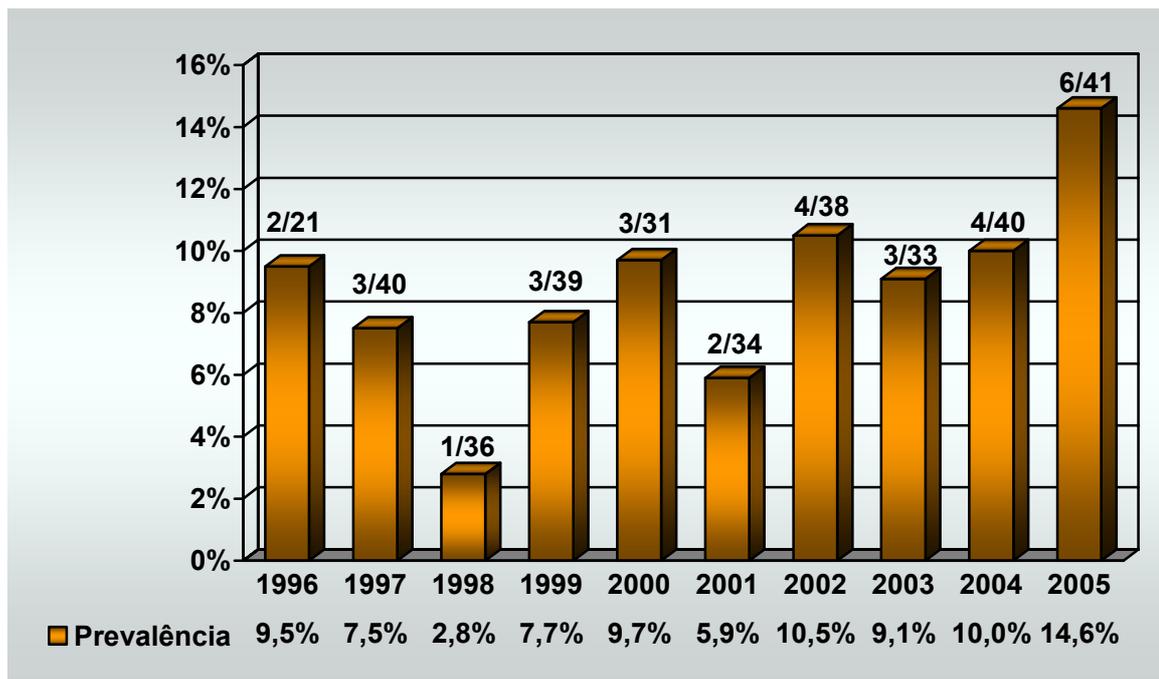


Figura 8 – Frequência anual de positividade para HTLV, por EIE, em pacientes com distúrbios neurológicos no Estado do Pará, janeiro de 1996 a dezembro de 2005.

Dos 31 pacientes que se apresentavam positivos por EIE, apenas 25 puderam ser submetidos ao método de *Western-Blotting* para discriminação sorológica do tipo viral, com os seguintes resultados: 20 (80%) casos de HTLV-1, três (12%) HTLV-2, uma infecção mista (4%) e um resultado indeterminado (4%) (Figura 9).

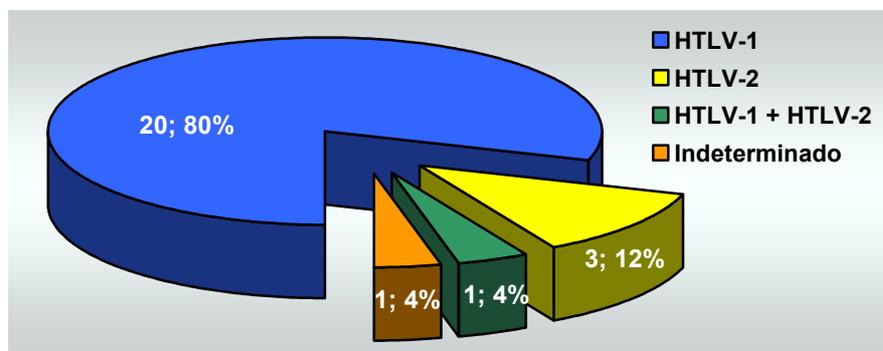


Figura 9 – Distribuição dos tipos de HTLV por *WB* em pacientes com distúrbios neurológicos no Estado do Pará, janeiro de 1996 a dezembro de 2005.

Os diferentes perfis de *WB* entre os pacientes com sorologia positiva por EIE, encontram-se distribuídos de acordo com o sexo na Figura 10 e ao longo do período analisado na Figura 11.

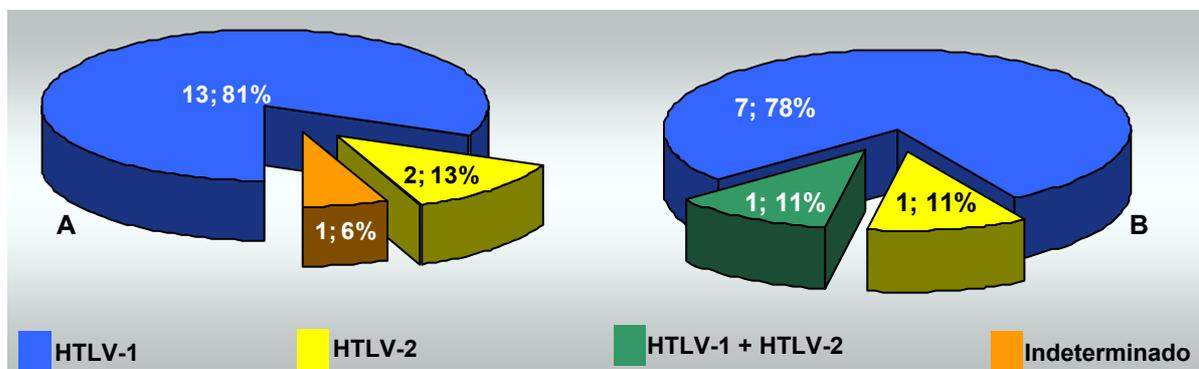


Figura 10 – Distribuição dos tipos de HTLV por *WB*, de acordo com o sexo, em pacientes com distúrbios neurológicos no Estado do Pará, janeiro de 1996 a dezembro de 2005. A) sexo feminino; B) sexo masculino.

Observa-se nos Gráficos A e B da Figura 10, que apesar da maior frequência dos casos positivos entre as mulheres (N=16), comparadas aos homens (N=9), os percentuais de distribuição dos perfis de *WB* são equivalentes entre os dois sexos. Para melhor avaliar essa questão, procurou-se verificar estatisticamente se a ocorrência de um dos dois tipos do vírus estaria associada ao sexo dos pacientes. Para este cálculo foram consideradas apenas as amostras tipadas pelo *WB* como HTLV-1 ou HTLV-2, não se incluindo infecção mista ou perfil indeterminado. Encontrou-se, desta forma, $p=0,73$ pelo teste exato de Fisher, resultado estatisticamente não significativo para a possibilidade de associação entre os tipos virais e um determinado sexo.

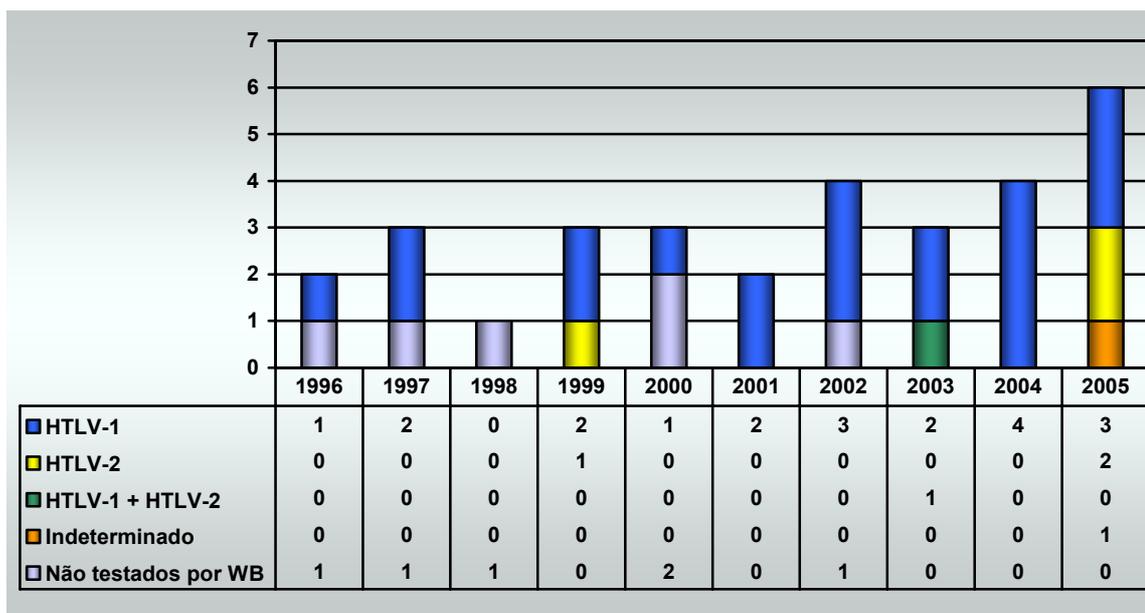


Figura 11 – Caracterização das amostras de *WB* em pacientes com distúrbios neurológicos e com sorologia positiva por EIE no Estado do Pará, janeiro de 1996 a dezembro de 2005.

A Figura 11 representa a distribuição, ao longo dos anos compreendidos no estudo, dos casos positivos para HTLV por EIE, de acordo com sua caracterização por *WB*. Observa-se que o HTLV-1 ocorreu ao longo do referido período, exceto em 1998, alcançando-se a média de dois casos ao ano. Nota-se, ainda, uma tendência ao aumento no número de casos do tipo 1 a partir de 2002, acompanhando a mais expressiva positividade geral, e dela se mostrando concorrer com a maior proporção. Por outro lado, os perfis de *WB* que mereceram atenção ulterior (infecção mista e perfil indeterminado) aparecem em menor número.

Os pacientes envolvidos no estudo encontram-se distribuídos na Tabela 1, de acordo com a presença ou não de anticorpos para HTLV1/2 por EIE, bem como em relação ao sexo e às faixas etárias, exceto 18 deles com o mesmo perfil não incluído na Tabela 1 pela ausência de informações sobre suas idades.

Faixa etária (anos)	Sexo	Positivos	Negativos	Total por sexo	Total geral
0 a 10	F	0	9	9	19
	M	0	10	10	
11 a 20	F	0	17	17	35
	M	0	18	18	
21 a 30	F	3	35	38	73
	M	1	34	35	
31 a 40	F	1	37	38	70
	M	1	31	32	
41 a 50**	F	4	23	27	54
	M	0	27	27	
51 a 60	F	4	19	23	54
	M	3	28	31	
61 a 70	F	5	8	13	24
	M	5	6	11	
71 a 80	F	1	3	4	06
	M	1	1	2	
Total		29	306	335	335

Tabela 1 – Positividade para HTLV por EIE de acordo com a faixa etária, em pacientes com distúrbios neurológicos no Estado do Pará, janeiro de 1996 a dezembro de 2005².

Nota: $p \leq 0,05$.

² 18 pacientes do presente estudo não foram incluídos na tabela 1 pela ausência de informações sobre suas idades.

O Quadro 5 relaciona os 31 pacientes com sorologia positiva para HTLV1/2 por EIE, resumindo as seguintes informações acerca de cada um: sexo, idade, história clínica, duração da doença, mês e ano do primeiro registro na SEVIR/IEC (entrada), situação atual do paciente no estudo e resultado de *WB*. Observa-se que a idade dos 31 pacientes relacionados abrangeu o intervalo de 21 a 79 anos. Tomadas em conjunto, as manifestações de fraqueza (hipotonia) (n=7) e dor (n=9) nos membros inferiores e dificuldade de deambular (n=7) ocorreram em 58% (18/31) dos pacientes que apresentavam anticorpos específicos para HTLV pelo método imunoenzimático. Por outro lado, 48,4% (15/31) desses pacientes apresentaram manifestações de paresia (n=8), parestesia (n=5) e paraplegia (n=3). Destaque-se o caso da paciente 28, se queixou de “dor e dormência nos membros inferiores” e “dor nas articulações das mãos e câimbras nas pernas à noite”, com duração de cerca de 7 anos, caracterizando quadro de mialgia e parestesia crural. Essa paciente revelou-se positiva para HTLV-2 pelo método de *WB* (Figura 12) e, posteriormente, pela PCR em tempo real (Quadro 6), caracterizando um quadro sugestivo de mielopatia crônica associada ao HTLV-2.

Com o auxílio dos dados disponíveis nas fichas clínico-epidemiológicas, a equipe do Laboratório de Retrovírus da SEVIR/IEC procurou re-localizar cada um dos 31 pacientes soropositivos, com o objetivo de se obterem amostras de linfócitos para análise molecular. Entretanto, obteve-se sucesso apenas com 14 daqueles pacientes, pois outros 13 não foram encontrados, dois evoluíram ao óbito antes do contato da equipe e outros dois não concordaram em participar do estudo, mesmo após esclarecimento da importância e ausência de riscos do mesmo.

Paciente	Sexo	Idade	História clínica	Duração da doença	Entrada	Situação à re-localização*	Continua
							WB
1	F	61	Fraqueza e parestesia nas pernas.	~ 2 anos	Mai/96	Não localizado	?
2	F	21	Fraqueza nas pernas e paraparesia crural espástica.	~ 3 anos	Dez/96	Aderiu	1
3	M	54	Parestesia na mão.	?	Jan/97	Não localizado	?
4	F	44	Hipotonia muscular progressiva, mialgia crural e dificuldade para deambular.	~ 1 ano	Abr/97	Não localizado	1
5	F	55	Paraparesia espástica.	?	Nov/97	Não localizado	1
6	F	49	Dor nas pernas.	?	Dez/98	Não localizado	?
7	M	24	Parestesia crural, evoluindo para paraplegia.	~ 3 meses	Mar/99	Não localizado	1
8	F	57	Tontura e fraqueza nas pernas e paresia espástica.	~ 3 anos	Set/99	Aderiu	1
9	M	66	Fraqueza nas pernas (hipotonia)	~ 12 anos	Nov/99	Não localizado	2
10	F	24	Dificuldade para deambular.	~ 2 anos	Jun/00	Óbito	?
11	F	46	Paraparesia crural.	~ 1 ano	Jul/00	Aderiu	1
12	M	79	Dificuldade para deambular.	?	Jul/00	Não aderiu	?
13	M	58	Paraplegia espástica.	~ 8 anos	Out/01	Aderiu	1
14	F	57	Paraparesia espástica.	~ 5 anos	Dez/01	Aderiu	1
15	F	38	Paraparesia crural.	~ 9 meses	Mar/02	Não aderiu	1

Quadro 5 – Características gerais, sinais, sintomas e perfil de WB dos 31 pacientes positivos para HTLV-1/2 por EIE com distúrbios neurológicos no Estado do Pará, janeiro de 1996 a dezembro de 2005.

Paciente	Sexo	Idade	História clínica	Duração da doença	Entrada	Situação à re-localização*	Fim WB
16	M	66	Dor nas pernas e dificuldade de deambular.	?	Mai/02	Não localizado	?
17	F	26	Dificuldade para deambular e mialgia.	~ 1 ano	Ago/02	Não localizado	1
18	M	50	Paralisia crural progressiva.	~ 4 meses	Set/02	Não localizado	1
19	M	DND	Artralgia	~ 5 anos	Jan/03	Não localizado	1
20	F	49	Paraparesia espástica.	6 a 7 anos	Jun/03	Aderiu	1
21	M	67	Paraparesia espástica.	?	Dez/03	Aderiu	1 e 2
22	F	DND	Fraqueza nas pernas (hipotonia)	?	Out/04	Aderiu	1
23	F	56	Fraqueza nas pernas (hipotonia)	~ 4 anos	Out/04	Aderiu	1
24	F	61	Parestesia crural	Alguns meses	Dez/04	Não localizado	1
25	M	60	Dificuldade de deambulação e dor nas pernas.	?	Dez/04	Não localizado	1
26	M	66	Neuropatia a esclarecer.	~ 1 ano	Fev/05	Aderiu	1
27	F	63	Mialgia crural.	?	Fev/05	Aderiu	1
28	F	63	Mialgia e parestesia crurais	~ 7 anos	Mar/05	Aderiu	2
29	F	77	Miagia.	?	Mai/05	Aderiu	?
30	F	66	Mialgia crural.	?	Mai/05	Aderiu	2
31	M	36	Dificuldade para deambular.	?	Jul/05	Óbito	1

* para coleta de linfócitos

? : paciente sem resultado de WB.

A Figura 12 revela o perfil de bandas, por *WB*, de cada um dos 14 pacientes efetivamente analisados e que são discutidas a seguir. Na mesma figura, as fitas denominadas CP e CN representam, respectivamente, o controle positivo para HTLV-1 + HTLV-2 e o controle negativo do teste.

Como se pode verificar na Figura 12, as amostras 02, 08, 11, 13, 14, 20, 22, 23, 26, 27 apresentaram padrão de bandas típico do HTLV-1. Nelas, notam-se as quatro bandas aplicadas como antígeno tipo-não-específico (duas de core p19 1/2 e p24 1/2, e outras duas do envelope, gp46 e gp21 1/2) e observam-se, ainda, aquelas correspondentes às proteínas específicas do core (p19-1) e do envelope (gp46-1), ambas específicas para o tipo 1. A fita correspondente à amostra 28 foi classificada como HTLV-2, pois nela é possível observar com clareza as quatro bandas não específicas para tipo viral (p19 1/2, p24 1/2, gp46 1/2 e gp21 1/2), referentes às proteínas de core e de envelope, bem como, aquela correspondente à glicoproteína gp46-2, exclusiva do tipo 2.

A amostra 29 revela que o paciente desenvolveu anticorpos que reagiram claramente com as bandas correspondentes às proteínas do envelope não específicas para tipo (gp46 1/2 e gp21 1/2), da mesma forma que se pode observar uma reação menos intensa com aquela correspondente à proteína de core p19 1/2, também não-tipo-específica. Na mesma amostra não se observa reação com qualquer das bandas específicas para os tipos 1 (p19-1 e gp46-1) e nem 2 (gp46-2).

O paciente indicado na fita de número 30 exibiu suave reação com duas bandas do envelope inespecíficas para tipo (gp46 1/2 e gp21 1/2) e, apesar de ter reagido de modo bastante fraco com a banda da proteína tipo-inespecífica de core, p19-1/2, revelou também alguma reação com a banda correspondente à glicoproteína gp46-2, específica para o HTLV-2.

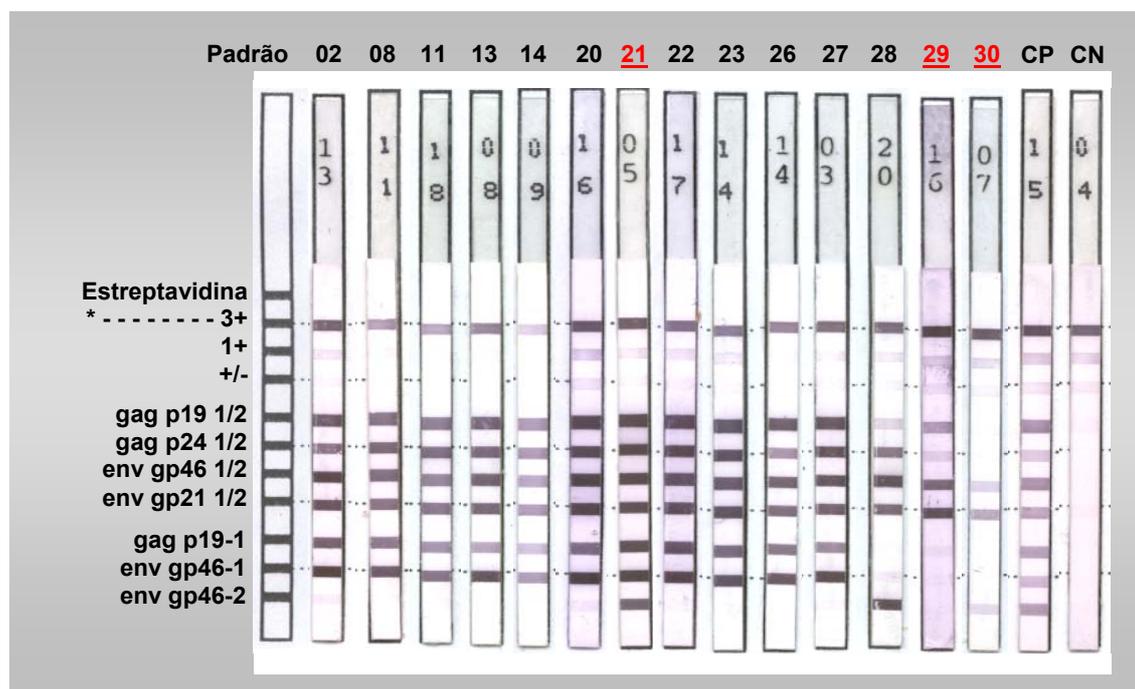


Figura 12 – Perfis de *Western-Blotting* dos 14 pacientes positivos para HTLV por EIE localizados para análise molecular.

Legenda: fitas 02, 08, 11, 13, 14, 20, 22, 23, 26 e 27 (HTLV-1); fitas 28 e 30 (HTLV-2); fita 21 (HTLV-1+HTLV-2); fita 29 (padrão indeterminado); CP (controle positivo para HTLV-1 + HTLV-2); CN (controle negativo).

Todos os 14 espécimes foram submetidos à nested-PCR para pesquisa da região TAX do genoma pró-viral do HTLV sem definição de tipo e, posteriormente, à PCR em tempo real, tendo como alvo a região POL específica para HTLV-1 e HTLV-2.

A Figura 13 mostra a foto de um gel de agarose na qual é possível observar 5 amostras representativas do conjunto de espécimes analisados pelo método da nested-PCR. As amostras foram selecionadas de modo a que melhor pudessem representar o conjunto como um todo e encontram-se dispostas, na seqüência da esquerda para a direita como a seguir:

- Posição 1: paciente 29 (perfil indeterminado por *WB*)
- Posição 2: paciente 30 (perfil HTLV-2 por *WB*)
- Posição 3: paciente 21 (perfil HTLV-1+ HTLV-2 por *WB*)
- Posição 4: paciente 23 (perfil HTLV-1 por *WB*)
- Posição 5: paciente 28 (perfil HTLV-2 por *WB*)
- Posição 7: H₂O
- Posição 8: peso molecular.

As posições 1 e 2 estão ocupadas pelas amostras 29 e 30, respectivamente, ao *WB* ambas classificadas como perfil indeterminado e infecção por HTLV-2. Essas duas amostras revelaram, pela nested-PCR, a presença de uma banda, ainda que de menor intensidade, em relação às três seguintes. Registre-se, ainda, que, em ambas as amostras, a PCR em tempo real não detectou a presença de DNA pró-viral da região POL do HTLV-1, nem do HTLV-2.

As amostras 21, 23 e 28 ocupam, respectivamente, as posições 3, 4 e 5 no gel e estão representadas por três bandas devidamente localizadas entre 300 e 400pb, de acordo com o peso molecular utilizado. Desta forma, pôde-se verificar que houve amplificação do fragmento de 368pb da região TAX de HTLV-1/2 pela nested-PCR, de acordo como esperado. A PCR em tempo real, por sua vez, confirmou os resultados de *WB* das amostras 23 (HTLV-1) e 28 (HTLV-2); por outro lado, para a amostra 21 detectou-se apenas o produto de amplificação da região POL do HTLV-1, não confirmando, desta forma, o diagnóstico sorológico de infecção mista da mesma.

Nas posições 6 e 7 do gel encontram-se, respectivamente, a água, utilizada como controle negativo da reação e o peso molecular. As linhas verdes apontam o tamanho das bandas do peso molecular em pares de base (pb). O peso

molecular utilizado no gel permite a visualização de fragmentos com os tamanhos especificados na figura.

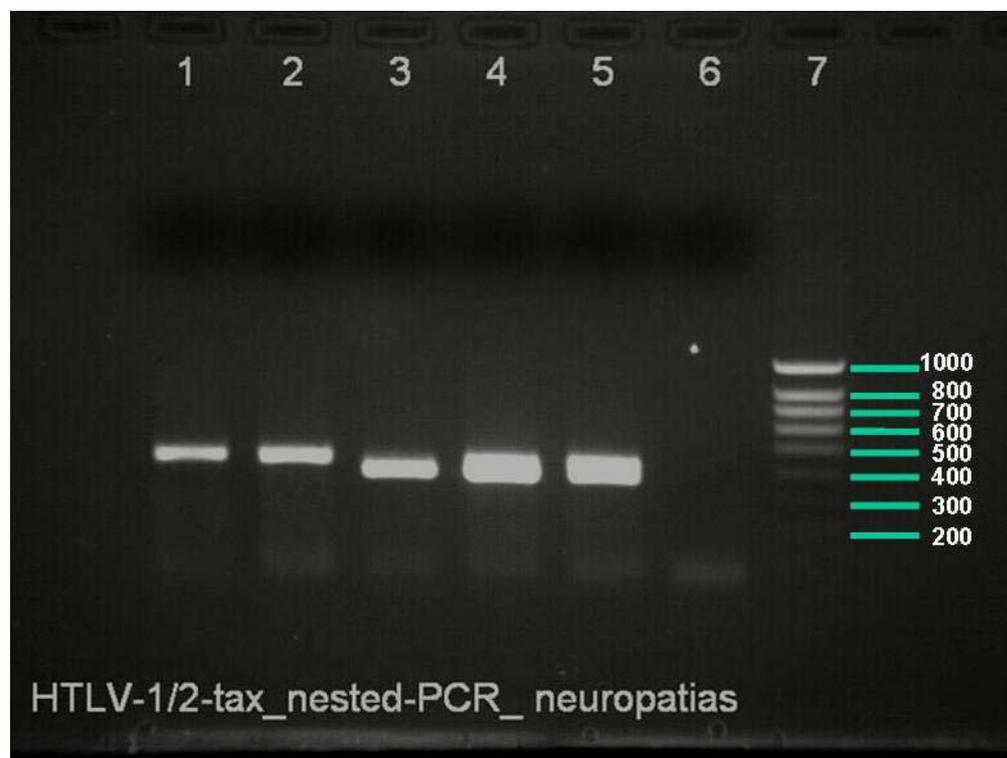


Figura 13 – Gel de agarose mostrando amplificação do fragmento de 368 pb da região TAX de HTLV-1/2. As amostras se encontram distribuídas na seguinte seqüência: 1-paciente 29; 2-paciente 30; 3-paciente 21; 4-paciente 23; 5-paciente 28; 6-H₂O e 7-peso molecular. As linhas verdes apontam o tamanho das bandas do peso molecular em pares de base (pb).

O Quadro 6 exhibe os resultados de cada uma das 14 amostras analisadas, de acordo os métodos empregados, e com destaque para as 3 que exibiram resultados discordantes entre *WB* e a PCR em tempo real. O primeiro método definiu a amostra 21 como infecção mista, ao passo que a PCR em tempo real detectou a presença de DNA pró-viral apenas do HTLV-1. Os espécimes, 29 e 30, por sua vez, classificados por *WB* como perfil indeterminado e HTLV-2, respectivamente, não denotaram níveis detectáveis de produto amplificado pela PCR em tempo real. Comparando-se os resultados de *WB* com aqueles da nested-PCR e da PCR em

tempo real, verificou-se que cerca de 78,6% (11/14) das amostras tipadas por WB revelaram amplificação da região TAX pela nested-PCR e foram confirmadas quanto à tipagem pela PCR em tempo real, denotando especificidade e sensibilidade satisfatórias do método de WB empregado no estudo.

Paciente	Sexo	Idade	EIE	WB	Nested-PCR	RT-PCR* (tipo viral)
02	F	21	POS	1	+	1
08	F	57	POS	1	+	1
11	F	46	POS	1	+	1
13	M	58	POS	1	+	1
14	F	57	POS	1	+	1
20	F	49	POS	1	+	1
<u>21</u>	M	67	POS	<u>1+2</u>	+	<u>1</u>
22	F	?	POS	1	+	1
23	F	56	POS	1	+	1
26	M	66	POS	1	+	1
27	F	63	POS	1	+	1
28	F	63	POS	2	+	2
<u>29</u>	F	77	POS	<u>IND**</u>	-	<u>Indetectável</u>
<u>30</u>	F	66	POS	<u>2</u>	+	<u>Indetectável</u>

Quadro 6 – Características dos 14 pacientes com EIE positivo para HTLV, re-localizados para análise molecular de acordo com sexo, idade e resultados de EIE, WB, nested-PCR e RT-PCR.

Nota: * *Real Time-PCR* (PCR em tempo real)

** perfil indeterminado para WB

6 DISCUSSÃO

O papel do HTLV-1 na gênese da PET/MAH vem sendo registrado com significativa freqüência em diversas regiões do mundo, já sendo reconhecido pela OMS desde 1989. Por outro lado, o caráter patogênico do HTLV-2, apesar de controverso, também tem sido evidenciado, principalmente por relatos da sua associação com quadros de neuropatia, dentre eles, a PET/MAH.

Importantes focos endêmicos mundiais de infecção pelo HTLV estão localizados no Brasil. A importância epidemiológica desse país se deve às elevadas taxas de prevalência de anticorpos específicos para os tipos 1 e 2 do vírus no nordeste brasileiro e entre populações indígenas da Amazônia, respectivamente (SANTOS et al., 1995; BRITES et al., 1997; GOMES et al., 1999; DOURADO *et al.*, 1999; MALONEY et al., 1992; ISHAK et al., 1995; LAURENTINO et al., 2005).

É com importante freqüência que a Seção de Virologia (SEVIR) do Instituto Evandro Chagas, Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), recebe pacientes encaminhados dos mais diversos estabelecimentos de saúde, tais como hospitais, clínicas médicas, bancos de sangue, dentre outros, para a elucidação diagnóstica, mercê da suspeita de infecção pelo HTLV.

Tal fato viabilizou a realização deste inquérito epidemiológico transversal em uma população de indivíduos com distúrbios neurológicos, com vistas ao estudo da sua associação ao HTLV. Destaque-se, ainda, que este parece representar o primeiro estudo a registrar, no Estado do Pará, a análise de uma população com tais

características clínicas, com tamanho amostral da ordem ora apresentada e com abrangência temporal compreendendo uma década.

A prevalência dos anticorpos específicos para HTLV encontrada no presente estudo alcançou 8,8% (31/353), menor do que aquelas descritas por Gomes et al. (1999), de 20,9% (67/320) entre pacientes com doença neurológica crônica e de 50,0% (52/104) entre aqueles com diagnóstico de mielopatia crônica, em Salvador, Bahia. Dentre tais pacientes, tamanha diferença entre as duas taxas pode encontrar justificativa na natureza das instituições onde os estudos foram realizados. O primeiro, conduzido em laboratório de pesquisa voltado ao diagnóstico das infecções virais (IEC), o que conferiu ao exame clínico caráter eminentemente generalista. Por outro lado, no segundo estudo duas clínicas neurológicas locais foram eleitas como fontes para a seleção dos pacientes, daí decorrendo análise mais detalhada e específica, sob o enfoque neurológico, em comparação com a deste trabalho.

É possível, portanto, que uma avaliação mais minuciosa por um médico neurologista dos casos descritos na presente análise pudesse restringir o tamanho amostral e, por conseguinte, aumentar o percentual de positividade sorológica para o HTLV. Não obstante, convém ressaltar que todos os casos incluídos no presente estudo se compatibilizaram com os parâmetros clínicos estabelecidos pelos critérios de Marsh (1996).

Corroborando a maioria das publicações anteriores, a prevalência entre o sexo feminino (10,6% - 19/179) revelou-se maior que no masculino (6,9% - 12/174) (ARAÚJO et al., 1998; DOURADO et al., 1999; RIBEIRO-LIMA et al., 1999). Esse fato pode decorrer da maior eficácia na transmissão por via sexual do homem para a mulher, do que vice-versa (MANNING et al., 1999; BAGHAM et al., 2000).

Observa-se, na Figura 8, que os quatro últimos anos evidenciam menor variação na quantidade de pacientes encaminhados para o esclarecimento sorológico, estabilizando-se na média de 38 por ano. As taxas de positividade neste mesmo período se mantiveram próximas ou maiores que 10% por quatro anos consecutivos, diferentemente dos anos anteriores quando se alternavam com índices menores. O aumento na demanda dos pacientes portadores dos distúrbios neurológicos visando ao esclarecimento por diagnóstico laboratorial, e a aparente tendência a se estabilizar um perfil de prevalência sorológica, pode estar relacionada a um crescente esclarecimento no seio da classe médica. Isso ocorreu nos anos mais recentes, fato refletido pelo maior conscientização acerca dos aspectos clínicos das infecções associadas ao HTLV e da sua importância no diagnóstico diferencial entre as neuropatias.

Como se pode observar na Figura 9, 25 dos 31 pacientes positivos para HTLV por EIE foram submetidos ao ensaio de *Western-Blotting*. Este método, por sua vez, revelou um percentual de positividade do tipo 1 de HTLV (80% - 20/25) cerca de seis vezes maior em relação ao detectado para o tipo 2 (12% - 3/25). Registrou-se, ainda, 1 (4%) caso de infecção mista (HTLV-1 + HTLV-2) e outro (4%) representado por amostra com perfil indeterminado pelo mesmo método. Essa maior prevalência do tipo 1 costuma ser mais comumente encontrada que a do tipo 2 (BRITES et al., 1997; RIBEIRO-LIMA et al., 1999; BARCELLOS et al., 2006), observando-se via de regra o contrário em populações de usuários de drogas intravenosas (MORIMOTO et al., 2005; DE LA FUENTE et al., 2006).

Na Figura 11 observou-se que as amostras que não puderam ser adequadamente tipadas por *WB*, e por isso, tiveram que ser encaminhadas às técnicas de biologia para definição do tipo viral (infecção mista e perfil

indeterminado) aparecem em menor número. Esse fato sugere sensibilidade e especificidade satisfatórias do teste de *WB*, ainda que se considerem as chances de se haver perdido um ou mais desses casos inconclusivos entre as amostras que não puderam ser submetidas ao mesmo.

A Tabela 1 representa a distribuição dos casos positivos para HTLV por EIE, de acordo com sexo e faixa etária. A ausência de positividade entre as idades de 0 a 20 anos indica que a MAH não constituía a causa dos quadros neurológicos que tenham ocasionado a indicação médica para esclarecimento diagnóstico por parte destes pacientes. Estas evidências, portanto, refletem dados da literatura quando se observa que o diagnóstico da MAH costuma ocorrer por volta da quarta década de vida, precedido, comumente, por infecção adquirida na idade adulta, ou seja, por via horizontal (MANNIS et al., 1999; BANGHAM et al., 2000). Por outro lado, pessoas que tenham adquirido a infecção por via vertical tendem a exibir sinais e sintomas relacionados à MAH somente a partir do início da vida adulta, por volta da segunda década de vida. O presente estudo, por sua vez, revela positividade de 5,5% (4/73) nos indivíduos entre 21 e 30 anos de idade, sugerindo a ocorrência de transmissão vertical nessa população. Em tais casos, portanto, espera-se não haver grandes diferenças entre os índices de positividade do sexo masculino para o feminino, uma vez que as condições de exposição à infecção em tese são as mesmas para ambos os sexos tratando da via de transmissão vertical. Apesar de terem sido demonstradas, na referida faixa etária, uma maior prevalência entre as mulheres (7,9% - 3/38) do que entre os homens (2,8% - 1/35), essa diferença não foi considerada estatisticamente significativa ($p=0,34$) pelo teste exato de Fisher. Por outro lado, os pacientes com idade entre 41 e 50 anos apresentaram taxas de prevalência da infecção pelo vírus de 14,8% (4/27) no sexo feminino e de 0% (0/27)

no sexo masculino, caracterizando a única faixa etária na qual se demonstrou, pelo teste exato de Fisher, uma diferença estatisticamente significativa ($p=0,05$) das taxas de prevalência entre os sexos. Pelo contrário, o teste de Mantel-Haensze demonstrou não haver diferença estatisticamente significativa ($p=0,22$) entre as taxas globais de prevalência da infecção pelo vírus em cada sexo.

No presente estudo, há duas situações bastante sugestivas de transmissão vertical. Duas irmãs portadoras do HTLV-1 (fitas 8 e 22 da Figura 12), as quais relataram que sua mãe teria desenvolvido quadro de paraparesia crônica de evolução insidiosa antes de falecer, quadro clínico este, semelhante ao de uma terceira irmã que, até o presente momento, ainda não demonstrou interesse em realizar o esclarecimento diagnóstico (dados não publicados). A par disso, uma paciente (fita 2 da Figura 12) cuja primeira sorologia positiva para HTLV-1 foi realizada aos 21 anos de idade suscitou interesse da sua família no esclarecimento diagnóstico, revelando a presença de anticorpos específicos para o HTLV na mãe da mesma (dados não publicados). Esses dados sugerem que o tempo para o desenvolvimento da doença pode variar, sendo possível que isso esteja diretamente relacionado com o tipo de resposta imune (celular ou humoral) do hospedeiro, bem como com as características estruturais (antigênicas e genéticas) do próprio vírus e a própria carga viral.

Em 1995, Ishak et al. encontraram, em tribos indígenas da Amazônia, taxas de positividade sorológica para HTLV maiores que 20% em crianças indígenas menores de 9 anos de idade, e ainda demonstraram que a chance de infecção pelo HTLV-2 em crianças filhas de mães com sorologia positiva alcançava de 33 a 50%. Posteriormente, demonstraram-se evidências moleculares da transmissão vertical de HTLV-2c também em população indígena na região amazônica (ISHAK et al. 2001).

Mais tarde, analisando três pacientes que apresentavam distúrbios neurológicos, Ishak et al. (2002) detectaram evidências sorológicas da transmissão vertical, de modo que a esposa e o filho de um dos indivíduos também se revelaram positivos à pesquisa de anticorpos para HTLV-1 por EIE e *WB*. Entretanto, como os referidos pacientes eram provenientes da zona rural (dois do Pará e um do Maranhão), o presente estudo parece contribuir com os primeiros relatos de transmissão vertical do HTLV-1 em população urbana da Amazônia.

A Tabela 1 revela, ainda, certa equivalência entre as proporções dos totais de homens e de mulheres ao longo de todas as faixas etárias. Observa-se porém que possível observar que, do grupo de 51 a 60 para a de 61 a 70 anos, há um declínio superior a 40% na quantidade de novos registros, considerando-se ambos os sexos. Subsequentemente, desta faixa para a posterior (de 71 a 80 anos), ocorre ainda nova diminuição, de 25%.

Quando comparadas às do sexo masculino, as taxas de positividade sorológica das mulheres ganham destaque em dois grupos. Nos pacientes compreendidos entre 41 e 50 anos de idade registrou-se 14,8% (4/27) de positividade entre as mulheres, enquanto que nenhum caso de infecção pelo HTLV se detectou por EIE na população masculina. Subsequentemente, entre os pacientes com idades entre 51 e 60 anos, a pesquisa revelou que 17,4% (4/23) das mulheres possuíam anticorpos específicos para o vírus, contra 9,7% (3/31) dos homens.

Estes dados sustentam os obtidos em trabalhos anteriores e embasam a hipótese da transmissão via horizontal no início da vida adulta, com posterior desenvolvimento da doença de forma insidiosa, e estabelecimento do quadro clínico vários anos após se contrair a infecção (MANNNS et al., 1999; BANGHAM et al., 2000). Dentre as formas de transmissão horizontal, o transplante de órgãos a partir

de doadores infectados e o compartilhamento de seringas e/ou agulhas contaminadas têm sido registrados com maior relevância que o contato sexual com parceiro portador do vírus. Relatos de transmissão do HTLV por meio de transfusão sangüínea, por sua vez, têm-se tornado cada vez mais raros, evidenciando a importância do caráter obrigatório da triagem para o HTLV em bancos de sangue como método profilático, principalmente nas regiões endêmicas (DOURADO et al., 1999; ZARRANZ et al., 2003; MORIMOTO et al., 2005; BARCELLOS et al., 2006).

Nos dois últimos grupos etários observou-se uma inversão nas taxas de positividade entre os sexos. No grupo de pacientes com idades entre 61 e 70 anos, as mulheres contribuíram com 38,5% (5/13) e os homens, com 45,5% (5/11); enquanto que, entre os pacientes que se encontravam entre 71 e 80 anos de idade, os casos de sorologia positiva no sexo feminino somaram apenas 25% (1/4), contra 50% (1/2) no masculino. Essa pequena inversão, contudo, parece assumir caráter meramente fortuito.

Na seqüência dos procedimentos laboratoriais, e de acordo com as recomendações do Ministério da Saúde (MS), as amostras com perfil indeterminado por *WB* e a infecção mista deveriam ser esclarecidas por métodos da biologia molecular. Entretanto, como o laboratório só dispunha das amostras de soro (e, eventualmente, LCR) dos pacientes, tornou-se necessário re-localizar os positivos para a coleta de uma nova amostra, a partir da qual se pudessem extrair os linfócitos e armazenar o plasma. Com esse propósito, a equipe do laboratório de Retrovírus da SEVIR/IEC procurou localizar não apenas os dois pacientes com os perfis acima citados, mas também os outros 29 com padrões de *WB* antes caracterizados.

Como apenas 14 dos 31 pacientes originais puderam ser re-localizados e subseqüentemente submetidos à análise molecular, somente os seus perfis de banda por *WB* estão representados da Figura 12.

Todos os 10 espécimes tipados para HTLV-1 por *WB*, assim como a amostra 28, com perfil claro de HTLV-2 pelo mesmo método, revelaram amplificação da região TAX pró-viral pela nested-PCR (Figura 13), e a tipagem pela PCR em tempo real concordou com a obtida pelo *WB* (Quadro 6). Verificou-se, desta forma, uma taxa de concordância de 78,6% (11/14) entre os três métodos ora considerados, denotando especificidade e sensibilidade satisfatórias de *WB* empregado no presente estudo.

Um importante achado deste estudo foi a associação do HTLV-2 a um quadro sugestivo de mielopatia. A paciente 28, por ocasião da anamnese realizada pelo médico da SEVIR/IEC, relatou quadro de mialgia e parestesia crural com duração de cerca de 7 anos, tendo-se queixado de “dor e dormência nos membros inferiores”, e, ainda, “dor nas articulações das mãos e câimbras nas pernas à noite”. Desta forma, é de fundamental importância que se acompanhe essa paciente e que se utilizem todos os recursos diagnósticos disponíveis, sob minuciosa avaliação clínica de neurologista, para melhor esclarecer a questão da associação ou não do HTLV-2 ao seu quadro clínico, procurando avaliar outros possíveis fatores que possam estar envolvidos na etiologia do seu distúrbio neurológico e que possa estar causando algum tipo de viés na avaliação.

Ainda que em menor quantidade do que o HTLV-1, tem sido crescente o número de relatos de casos de indivíduos infectados pelo HTLV-2, exclusivamente ou não, que vêm a desenvolver quadros neurológicos clinicamente compatíveis com a MAH, reforçando a hipótese quanto ao potencial patogênico do HTLV-2 (PETERS

et al., 1999; SILVA et al., 2002; ARAÚJO et al., 2004; MACEDO et al., 2004; ROUCOUX; MURPHY, 2004).

No Brasil, o primeiro caso bem documentado de doença neurodegenerativa associada à infecção pelo HTLV-2 coube a Silva et al. (2002), no Rio de Janeiro. Os autores isolaram o subtipo 2a a partir de uma mulher de 55 anos de idade que apresentava paraparesia espástica e hiperreflexia, com sinais de desmielinização à tomografia computadorizada. Ressalte-se que a paciente apresentou perfil indeterminado para *WB*, vindo a ser esclarecido somente após análise filogenética da região LTR.

Em 1996, Black et al. descreveram o caso de uma mulher de 40 anos de idade, pertencente a comunidade indígena onde o HTLV-2 ocorria em caráter endêmico. Essa indígena sofria de fraqueza muscular acentuada semelhante à paraparesia espástica tropical, porém veio a falecer antes que fosse possível esclarecer adequadamente a natureza de seu quadro clínico.

O primeiro registro de PET/MAH na região amazônica coube a Ishak et al. (2002), e envolveu três pacientes do sexo masculino que apresentavam distúrbios neurológicos compatíveis com a síndrome e revelaram-se positivos para HTLV-1 pelos métodos sorológicos de EIE e *WB*.

Resultados parciais do presente trabalho foram apresentados por Macêdo et al. (2004), nos quais, já se verificavam pacientes com anticorpos específicos para o HTLV-2 que apresentavam quadros de hipotonia, mialgia e espasticidade dos membros inferiores e dificuldade de deambulação (MACEDO et al., 2004). Dessa forma, o relato do caso paciente 28 deste estudo parece ser o primeiro na Amazônia de mielopatia crônica associada ao HTLV-2, comprovada por métodos sorológicos (EIE e *WB*) e moleculares (nested-PCR e PCR em tempo real); estes últimos

embasados na pesquisa de duas regiões genômicas distintas do vírus, quais sejam TAX e POL.

A amostra de número 21 apresentou claramente perfil sorológico de infecção mista por *WB*, com a presença de todas as bandas “tipo-não-específicas” e “tipo-específicas” necessárias para esta classificação. A nested-PCR para esta amostra demonstrou amplificação da região TAX do HTLV (Figura 13), entretanto, a PCR em tempo real confirmou infecção apenas pelo tipo 1 de HTLV, não havendo detecção de DNA pró-viral correspondente à região POL do HTLV-2 (Quadro 6). Este evento possivelmente está relacionado à existência de anticorpos produzidos em resposta à infecção pelo HTLV-1 albergado pelo paciente, mas que estejam reagindo de forma cruzada com a proteína específica do HTLV-2, em função de uma forte semelhança antigênica com o mesmo, pelo menos no que concerne à glicoproteína de superfície, gp46 (ROUCOUX; MURPHY, 2004).

A PCR em tempo real não denotou especificidade para os tipos 1 e 2 de HTLV nas amostras 29 e 30 (Quadro 6). Porém, para ambas observou-se a ocorrência de um produto da amplificação a partir dos iniciadores específicos para a região TAX (Figura 13). Essas evidências podem sugerir a possibilidade da ocorrência de formas defectivas do vírus na população estudada (SOLDAN et al., 1999; CASTRO-COSTA et al., 2001; MOROZOV et al., 2002; RAMIREZ et al., 2003). Entretanto, faz-se necessária uma análise mais profunda dessas amostras, por métodos moleculares mais minuciosos, tais como o seqüenciamento nucleotídico e análise filogenética das mesmas após purificação de seus produtos de amplificação. Ramirez et al. (2003) procuraram amplificar diferentes regiões genômicas do HTLV-1 entre 72 pacientes chilenos com paraparesia espástica progressiva, dos quais 32 com sorologia positiva e 40 soronegativos para HTLV-1. Foram utilizados

“iniciadores” para os genes *ltr 5'*, *tax*, *env/tax*, *pX*, *pol* e *env*. Esses genes foram detectados em todos os pacientes que apresentavam anticorpos específicos para o vírus, enquanto que os produtos dos genes *ltr 5'*, *pol*, *env* e *pX* não se amplificaram por aqueles com sorologia negativa. Dentre esses mesmos pacientes, entretanto, 16 pacientes mostraram-se positivos para o gene *tax* e quatro, para a *env/tax*, sendo que em três desses indivíduos observou-se amplificação de ambas as regiões. Desta forma, Ramirez et al. (2003) demonstraram que, enquanto que todas as amostras com sorologia positiva que foram analisadas apresentavam o genoma completo do provírus, daquelas outras que compreendiam os casos clinicamente muito similares aos soropositivos, apenas o gene *tax* foi amplificado em 42,5% (17/40) dos casos. Tais resultados levaram os autores a considerar a possível presença de uma forma defectiva de provírus do HTLV-1 em alguns pacientes com sorologia negativa e com paraparesia espástica progressiva e sugerem um potencial patogênico para esse provírus defectivo de HTLV-1 (RAMIREZ et al. 2003).

É importante, ainda, considerar a possibilidade de que o paciente 21 esteja realmente infectado pelos dois tipos de HTLV e que, por isso, já tenha desenvolvido resposta imune específica para ambos. Entretanto, como a carga viral do HTLV-2 é especialmente baixa, é possível que o ciclo de replicação viral do mesmo ainda não se tenha estabelecido de uma forma continuada e, por este motivo, o seu ácido nucléico não tenha sido detectado pela RT-PCR. As mesmas suposições poderiam ser feitas também para os pacientes 29 e 30 que, igualmente, apresentaram anticorpos que reagiram com epítomos tipo-não-específicos das regiões GAG e ENV de HTLV, demonstraram amplificação de um fragmento pela nested-PCR com o uso de iniciadores específicos para a região TAX, porém sem terem sido amplificadas para a região POL pelo RT-PCR. De tal forma, faz-se

adequado o acompanhamento desses pacientes, tanto no tocante à clínica de cada um, quanto na coleta periódica de novas amostras de linfócitos para monitoramento sorológico por *WB* e molecular, inclusive por RT-PCR, no intuito de verificar se, com o passar do tempo esses pacientes venham a expressar outras regiões do genoma viral em quaisquer dos referidos métodos diagnósticos.

No tocante à utilização em larga escala das técnicas utilizadas neste estudo, Poiesz et al. (1997) referem que, em termos do custo e da praticidade, as técnicas atuais de PCR para HTLV-1 e HTLV-2 podem ser realizadas em quatro a seis horas, e implicam gastos menores do que os *kits* de *WB* (POIESZ et al., 1997). Desta forma, por se tratarem ambas de técnicas laboratoriais onerosas, o procedimento mais adequado a ser adotado parece ser avaliar a relação custo-benefício de cada uma delas e compará-las entre si.

O MS, por sua vez, recomenda que as amostras definidas por *WB* como “positivas não tipadas”, “positivas para HTLV-1/2” e “indeterminadas para HTLV” sejam submetidas a técnicas de biologia molecular, tais como a PCR e *Restriction Fragment Length Polimorfism (RFLP)*. Isto, visando ao diagnóstico de confirmação e diferencial da infecção pelo HTLV-1 e/ou HTLV-2 (BRASIL, 2003). Constitui-se importante, portanto, procurar monitorar esses casos.

Ainda é necessário esclarecer o papel do HTLV como fator determinante ou predisponente do desenvolvimento, não apenas da LLTA e da MAH, mas também de quaisquer outras condições mórbidas que vêm sendo relacionadas a este patógeno ao longo dos anos. Para isso torna-se necessário aprimorar técnicas da biologia molecular na busca de um protocolo padrão e, ao mesmo tempo, procurar estabelecer padrões de referência para o comportamento epidemiológico do vírus com base em suas características genéticas. Com isso, será possível conhecer

melhor o comportamento epidemiológico do vírus, seus tipos e subtipos entre as várias populações em que circula. Além disso, procurar esclarecer a relação entre: (a) suas variantes genéticas, (b) as manifestações clínicas às quais esteja relacionado e (c) parâmetros geo-bio-demográficos tais como, sexo, idade, localização geográfica, ascendência e HLA.

Os dados obtidos no presente trabalho suscitam preocupação quando se considera a já conhecida carência de informações acerca do HTLV, principalmente no que concerne ao tratamento e à manutenção da qualidade de vida dos portadores que vêm a desenvolver doenças associadas.

Mediante esses fatos, torna-se evidente a relevância de novos estudos que visem a esclarecer a epidemiologia molecular do HTLV na região amazônica, com vistas a conhecer melhor a distribuição dos seus tipos e subtipos, bem como sua interação com o hospedeiro. Os conhecimentos adquiridos nestes campos podem vir a ser muito úteis para se traçarem estratégias quanto à terapêutica, bem como no que concerne à profilaxia para a população em geral e, particularmente, entre grupos de risco. Portanto, convém lembrar também a necessidade, cada vez mais crescente, de se estenderem os estudos de caráter epidemiológico dos grupos específicos para a população em geral.

7 CONCLUSÕES

- * A prevalência dos anticorpos específicos para o HTLV, por EIE foi de 8,8% (31/353) ao longo de dez anos;
- * As taxas de prevalência da infecção pelo vírus nos sexos feminino e masculino foram de 10,6% (19/179) e 6,9% (12/174), respectivamente;
- * Registrou-se a menor taxa (2,8% – 1/36) em 1998 e a maior (14,6% – 6/41) no último ano do estudo (2005);
- * As amostras submetidas ao WB foram caracterizadas como: 80% HTLV-1, 12% HTLV-2, 4% infecção mista e 4% resultado indeterminado;
- * Observou-se, apesar da maior frequência dos casos positivos entre as mulheres (N=19), comparados com os homens (N=12), que os percentuais de distribuição dos perfis de WB são equivalentes entre os dois sexos: HTLV-1 (81% das mulheres e 78% dos homens); HTLV-2 (13% das mulheres e 11% dos homens); um perfil indeterminado entre as mulheres e nenhum entre os homens; e uma infecção mista entre os homens e nenhuma entre as mulheres.
- * Notou-se tendência ao aumento no número de casos de HTLV-1 a partir de 2002, acompanhando a mais expressiva positividade geral, e dela se mostrando concorrer com a maior proporção.
- * O teste de WB demonstrou sensibilidade e especificidade satisfatórias uma vez que caracterizou 88% das amostras em concordância com a PCR em tempo real.
- * Verificou-se que, tomadas em conjunto, as manifestações de fraqueza (hipotonia) (n=7) e dor (n=9) nos membros inferiores e dificuldade de deambular (n=7) ocorreram em 58% (18/31) dos pacientes positivos para HTLV-1/2 por EIE.

- * Observou-se uma paciente, portadora de quadro de mialgia e parestesia crural há cerca de 7 anos, positiva para HTLV-2 por WB e PCR em tempo real, caracterizando um quadro compatível com mielopatia associada ao HTLV-2.
- * Registraram-se indícios de transmissão vertical em dois casos distintos: uma paciente cuja mãe apresentou anticorpos para HTLV-1 por WB e duas irmãs com diagnóstico de HTLV-1 por WB e PCR em tempo real.
- * Verificou-se que 78,6% (11/14) das amostras tipadas por WB foram amplificadas para a região TAX pró-viral pela nested-PCR e foram confirmadas quanto à tipagem pela PCR em tempo real, denotando especificidade e sensibilidade satisfatória do método de WB empregado no estudo.
- * Observou-se a amplificação da região TAX na amostra com perfil de infecção mista por WB confirmada apenas para o tipo 1 de HTLV pela PCR em tempo real.
- * Observou-se que o paciente com perfil indeterminado e um dos casos de HTLV-2 por WB demonstraram amplificação da região TAX pela nested-PCR, porém não da POL pela PCR em tempo real.

8 PERSPECTIVAS

Os resultados deste trabalho demonstram a associação do HTLV-1 e HTLV-2 à ocorrência de distúrbios neurológicos entre indivíduos residentes no Estado do Pará, Região Amazônica. Entretanto, ainda é necessário que se busque melhor caracterizar as amostras virais circulantes nesta população pelo uso de outras técnicas, tais como a digestão por enzimas de restrição de fragmentos amplificados do genoma pro-viral do HTLV, seqüenciamento nucleotídico e análise filogenética. Os conhecimentos gerados sobre a epidemiologia molecular dos seus tipos e subtipos a partir dessas análises mais profundas poderão ser úteis em futuros projetos que visem estratégias de profilaxia e terapêutica da infecção por esse vírus e as doenças a ele associadas. Avaliações clínicas mais rigorosas do ponto de vista neurológico, envolvendo especialista, se fazem justificáveis tendo em vista caracterizar com maior rigor propedêutico a associação entre a ocorrência das infecções por HTLV e a condição mórbida designada mielopatia crônica

REFERÊNCIAS

ARAUJO, A. Q. et al. HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in Brazil: a nationwide survey. **Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology**, v. 19, n. 5, p. 536-541, 1998.

ARAUJO, A; HALL, W. W. Human T-lymphotropic virus type II and neurological disease. **Annals of neurology**, v. 56, n. 1, p. 10-9, 2004.

BANGHAM, C. R. M. HTLV-I Infections. **Journal of Clinical Pathology**, v. 53, p. 581-586, 2000.

BARCELLOS, N. T. et al. Human T lymphotropic virus type I/II infection: prevalence and risk factors in individuals testing for HIV in counseling centers from Southern Brazil. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 33, n. 5, p. 302-306, 2006.

BITTENCOURT, A. L. Vertical Transmission of HTLV-I/II: A Review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 40, n.4 . p. 245-251, 1998.

BLACK, F. L. et al. Twenty-five years of HTLV type II follow-up with a possible case of tropical spastic paraparesis in the Kayapo, a Brazilian Indian tribe. **AIDS Research and Human Retroviruses**. v. 12, n. 17, p. 1623-1627, 1996.

BLATTNER, W. et al. A study of HTLV-I and its associated risk factors in Trinidad and Tobago. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome**, v. 3, n. 11, p. 1102-1108, 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa de DST e AIDS 2003**): Guia de Manejo Clínico do Paciente com HTLV. Brasília, 2003.

BRITES, C. et al. Epidemiological characteristics of HTLV-I and II coinfection in Brazilian subjects infected by HIV-1. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 1, n. 1, p 42 -47, 1997.

CALATTINI, S. et al. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. **Retrovirology**, v. 2, n. 1, p. 30, 2005.

CANN, A. J.; CHEN, I. S. Y. Human T-cell Leukemia Virus Types I and II. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P.M. et al. **Fields Virology**. 3.th. Philadelphia: Lippincott – Raven Publishers, 2001. cap 58. p. 1849-1880.

CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F. et al. Infecção e doença pelos vírus linfotrópicos humanos de células T (HTLV-I/II) no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 5, p. 499-508, 2002.

CASSEB, J.; PENALVA-DE-OLIVEIRA, A. C. The pathogenesis of tropical spastic paraparesis/human T-cell leukemia type I-associated myelopathy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 1395-1401, 2000.

CASTRO-COSTA, C. M.; CARTON, H.; SANTOS, T. J. T. HTLV-I Negative Tropical Spastic Paraparesis: A SCIENTIFIC CHALLENGE. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, v. 59, n. 2-A, p. 289-294, 2001.

CATALAN-SOARES, B. et al. 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**, v. 21, n. 3, p. 926-931, 2005.

COLOMBO, E. et al. HTLV Infection Among Italian Intravenous Drug Users and North African Subjects Detected by the Polymerase Chain Reaction and Serological Methods. **Journal of Medical Virology**, v. 47, p. 10-15, 1995.

DE LA FUENTE, L. et al. HTLV infection among young injection and non-injection heroin users in Spain: prevalence and correlates. **Journal of Clinical Virology**, v 35, n. 3, p. 244-249, 2006.

DONADI, E. A. Como entender a nomenclatura e os mecanismos de associação entre os antígenos e os alelos de histocompatibilidade com as doenças. Simpósio Associação do Sistema HLA com Doenças no Brasil. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 33, n. 1, p. 7-18, 2000.

DOURADO, I. et al. Risk factors for human T cell lymphotropic virus type I among injecting drug users in northeast Brazil: possibly greater efficiency of male to female transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 1, p. 13-18. 1999.

EIRAKU, N. et al. Identification and characterization of a new and distinct molecular subtype of HTLV-II. **Journal of Virology**, v. 70, p. 1481-1492, 1996.

ESTES, M. C; SEVALL, J. S. Multiplex PCR using real time PCR amplification for the rapid detection and quantitation of HTLV-I or II. **Molecular and Cellular Probes**, v. 17, p. 59-68, 2003.

GALLO, D.; DIGGS, J. L.; HANSON, C. V. Evaluation of two Commercial Human T-Cell Lymphotropic Virus Western Blot (Immunoblot) Kits with Problem Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 9, p2046-2049, 1994.

GALLO, R. C. et al. Association of the human type C retrovirus with a subset of adult T-cell cancers. **Cancer Research**, v. 43, n. 8, p. 3892-3899, 1983

GESSAIN, A. et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-1 in patients with tropical spastic paraparesis. **Lancet**, v. 2, n. 8452, p. 407-410, 1985.

GOMES, I. et al. Human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) infection in neurological patients in Salvador, Bahia, Brazil. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 165, n. 1, p. 84-89, 1999.

GREER, C. E. et al. PCR amplification from paraffin-embedded tissues. Effect of fixative and fixation time. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 95, p. 117-124, 1991.

GUILIETTI, A. et al. An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression. **Experimental Hematology**, v. 30, p. 503-512, 2002.

HINO, S. et al. Primary Prevention of HTLV-I in Japan. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 13, p. S199-S203, 1996. Supplement 1.

HINUMA, Y. et al. Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American**, v. 78, p. 6476-6480, 1981.

HJELLE, B. et al. Primary Isolation of Human T-Cell Leucemia-Lymphoma Virus Types I and II: Use for Confirming Infection in Seroindefinite Blood Donors. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 8, p. 2195-2199, 1992.

ISHAK, R. et al. Epidemiological aspects of retrovirus (HTLV) infection among Indian populations in the Amazon Region of Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 4, p. 901-914, 2003.

ISHAK, R. et al. HTLV-I associated myelopathy in the northern region of Brazil (Belém-Pará): serological and clinical features of three cases. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 3, p. 243-246, 2002.

ISHAK, R. et al. Identification of human T-cell lymphotropic virus type IIa infection in the Kayapo, an indigenous population of Brazil. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 11, p. 813-821, 1995.

ISHAK, R. et al. Molecular evidence of mother-to-child transmission of HTLV-IIc in the Kararao Village (Kayapo) in the Amazon region of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 6, p. 519-525, 2001.

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, 1982.

KAZANJI, M; GESSAIN, A. Human T-cell Lymphotropic Virus Types I and II (HTLV-I/II) in French Guiana: Clinical and Molecular Epidemiology. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 5, p. 1227-1240, 2003.

LAL, R. B. et al. Evidence for mother-to-child transmission of human T-cell lymphotropic virus type II. **Journal of Infectious Diseases**, v. 168, p. 586-591, 1993.

LAL, R. B. et al. Sensitivity and Specificity of a Recombinant Transmembrane Glycoprotein (rgp21)-Spiked Western Immunoblot for Serological Confirmation of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type I and II Infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 296-299, 1992.

LAURENTINO R. V. et al. Molecular characterization of human T-cell lymphotropic vírus coinfecting human immunodeficiency vírus 1 infected patients in the Amazon region of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 4, p. 371-376, 2005.

LEUTENEGGER, C. M. et al. Rapid feline Immunodeficiency virus provirus quantitation by polymerase chain reaction using the TaqMan[®] flurogenic real-time detection system. *Journal of Virological Methods* 78(1-2): 105-116, 1999.

LOPES, B. P. T. **Quantificação da carga proviral de HTLV-I/II através da PCR em tempo real e comparação com o teste de ELISA**. 2004. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2004.

MACÊDO, O. et al. Human T-cell lymphotropic virus types I and II infections in a cohort of patients with neurological disorders in Belém, Pará, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n.1, p. 13-17, 2004.

MALONEY, E. M. et al. Endemic human T cell lymphotropic virus type II infection among isolated Brazilian Amerindians. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 166, n. 1, p. 100-107, 1992.

MANNS, A.; HISADA, M.; LA GRENADE, L. Human T-lymphotropic virus type I infection. **Lancet**, v. 353, p. 1951-1958, 1999.

MARSH, B. J. Infectious Complications of Human T-Cell Leukemia / Lymphoma Virus Type I Infection. **Clinical Infectious Disease**, v. 23, p. 138-145, 1996.

MELBYE, M. et al. HTLV-1 infection in a population-based cohort of older persons in Guinea-Bissau, West Africa: risk factors and impact on survival. **International Journal of Cancer**, v. 76, n. 3, p. 293-298, 1998.

MORIMOTO, H. K. et al. Seroprevalence and risk factors for human T cell lymphotropic virus type 1 and 2 infection in human immunodeficiency virus-infected patients attending AIDS referral center health units in Londrina and other communities in Parana, Brazil. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 21, n. 4, p. 256-262, 2005.

MOROZOV, V. A. C. et al. Defective human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) genomes: no evidence in serologically indeterminate german blood donors but new type detected in established cell lines. **Journal of Medical Virology**, v. 66, n. 1, p. 102-106, 2002.

MURPHY, E. L. et al. Higher Human T Lymphotropic Virus (HTLV) Provirus Load Is Associated with HTLV-I versus HTLV-II, with HTLV-II Subtype A versus B, and with Male Sex and a History of Blood Transfusion. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 190, n. 3, p. 504-510, 2004b.

MURPHY, E. L. et al. Respiratory and Urinary Tract Infections, Arthritis, and Asthma Associated with HTLV-I and HTLV-II. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, p. 109-116, 2004a.

MURPHY, E. L. et al. Sexual transmission of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I). **Annals of Internal Medicine**, v. 111, n. 7, p. 555-560, 1989.

MURPHY, E. L. The Clinical Epidemiology of Human T-Lymphotropic Virus Type II (HTLV-II). **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, v. 13, p. S1, 1996. Supplement 1.

MIYOSHI, I et al. Human B cell, T cell and null cell leukaemic celllines derived from acute lymphoblastic leukaemias, **Nature**, v. 267, p. 843-844, 1977.

NAKAUCHI, C. M. et al. Prevalence of Human T Cell Leukemia Virus-I (HTLV-I) Antibody Among Populations Living in the Amazon Region of Brazil (Preliminary Report). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85, n. 1, p. 29-33, 1990.

NAKAUCHI, C. M. et al. Prevalência de Anticorpos para o Vírus da Leucemia Humana de Células T (HTLV) em Pacientes Cancerosos na Região Amazônica (Nota Prévia). **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 35 n. 3/4, p. 34-38, 1989.

NAKAUCHI, C. M. et al. Antibody to Human T-Lymphotropic Virus in a Patient with Guillain-Barré Syndrome (Case Report). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, n. 4, p. 329-331, 1991.

NAKAUCHI, C. M. et al. Prevalence of HTLV Antibody Among Two Distinct Ethnic Groups Inhabiting the Amazon Region of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, n. 4, p. 323-328, 1992.

OSAME, M. et al. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. **Lancet**, v. 1, p. 1031-1032, 1986.

PARDI, D. et al. Identification and Characterization of an Extended Tax Protein in Human T-Cell Lymphotropic Virus Type II Subtype b Isolates. **Journal of Virology**, v. 67, n. 12, p. 7663-7667, 1993.

PETERS, A. A. et al. An Apparent Case of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type II (HTLV-II)-Associated Neurological Disease: a Clinical, Molecular, and phylogenetic characterization. **Journal of Clinical Virology**, v. 14, p. 37-50, 1999.

POIESZ, B. J. et al. Comparative Performances of Enzyme-Linked Immunosorbent, Western Blot, and Polymerase Chain Reaction Assays for Human T-Lymphotropic Virus Type II Infection that is Endemic Among Indians of the Gran Chaco Region of South American. **Transfusion**, v. 37, p. 52-59, 1997.

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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American**, v. 77, p. 7415-7419, 1980.

RABELO-SANTOS, S. H. et al. Human Papillomavirus Prevalence among Women with Cervical Intraepithelial Neoplasia III and Invasive Cervical Cancer from Goiânia, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 2, p. 181-184, 2003.

RAMIREZ, E. et al. Defective human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) provirus in seronegative tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM) patients. **Virus research**, v. 91, n. 2, p. 231-239, 2003.

REPORT from the Scientific Group on HTLV-I Infection and its Associated Diseases, convened by the Regional Office for the Western Pacific of the World Health Organization in Kagoshima, Japan, 10 – 15 December 1988. **Weekly Epidemiological Record.**, v. 49, p. 382-383. 1989.

RIBAS, J. G. R.; DE MELO, G. C. N. Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, p. 4, p. 377-384, 2002.

RIBEIRO-LIMA, T. V. et al. Anticorpos para HTLV-I e HTLV-II entre doadores de sangue em Belém, Brasil. **Revista Paraense de Medicina**, v. 13, n. 4, p. 8-13, 1999.

ROMANOS, M. T. V.; SANTOS, N. O. S.; MIRANDA, M. M. F. S. Viroses Oncogênicas. In: SANTOS, N. O. S.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução à Virologia Humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. cap. 15, p. 199-204.

ROUCOUX, D. F; MURPHY, E. L. The Epidemiology and Disease Outcomes of Human T-Lymphotropic Virus Type II. **AIDS Reviews**, v. 6, p. 144-54, 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATS, T. **Molecular Cloning: Laboratory Manuals**. 2nd. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANCHEZ-PALACIOS, C. et al. Seroprevalence and risk factors for human T-cell lymphotropic virus (HTLV-I) infection among ethnically and geographically diverse Peruvian women. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 7, n. 2, p. 132-137, 2003.

SANTOS, J. et al. Seroprevalence of HIV, HTLV-I/II and other perinatally-transmitted pathogens in Salvador, Bahia. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 37, n. 4, p. 343-348, 1995.

SANTOS, T. J. T. et al. Western Blot Seroindefinite Individuals for Human T-lymphotropic Virus 1/2 (HTLV-1/2) in Fortaleza (Brazil): A Serological and Molecular Diagnostic and Epidemiological Approach. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 7, n. 3, p. 202-209, 2003.

SILVA, E. A. et al. HTLV-II infection associated with a chronic neurodegenerative disease: clinical and molecular analysis. **Journal of Medical Virology**, v. 66, p. 253-257, 2002.

SOLDAN, S. S. A et al. HTLV-I/II Seroindefinite Western Blot Reactivity in a Cohort of Patients with Neurological Disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 180, p. 685-694, 1999.

SWITZER, W. M. et al. Phylogenetic relationship and geographical distribution of multiple human T-cell lymphotropic virus type II subtypes. **Journal of Virology**, v. 69, n. 2, p. 624-632, 1995.

UCHIYAMA, T. et al. Adult T-cell leukemia: clinical and hematological features of 16 cases. **Blood**, v. 50, p. 481-492, 1977.

VALLEJO, A. F et al. Cosmopolitan HTLV-Ia subtype among Spanish native patients. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 19, n. 7, p. 609-611, 2003.

VANDAMME, A. M. et al. African origin of human T-lymphotropic virus type 2 (HTLV-2) supported by a potential new HTLV-IIc subtype in Congolese Bambuti Efe Pygmies. **Journal of Virology**, v. 72, p. 4327-4340, 1998.

VERONESI, R. HTLV e Doenças Associadas. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. cap. 26. p. 422-445.

ZANINOVIC, V.; BIOJO, R.; BARRETO, P. Paraparesia espástica del pacífico. **Colombia Medica**, v. 12, p. 111-117, 1981.

ZANINOVIC, V. Tropical Spastic Paraparesis: evidence for etiological role of human T-cell lymphotropic virus type I in endemic foci in Jamaica and Columbia. **Annals of Neurology**, v. 22, p. 116-117, 1987.

ZANINOVIC, V. Possible etiologies for tropical spastic paraparesis and human T lymphotropic vírus I-associated myelopathy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 1-12, 2004.

ZARRANZ IMIRIZALDU, J. J. et al. Post-transplantation HTLV-1 myelopathy in three recipients from a single donor. **Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, v. 74, p. 1080-1084, 2003.

ZREIN, M. et. al. Assessment of a new immunoassay for serological confirmation and discrimination of human T-cell lymphotropic virus infections. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 5, p. 45-49, 1998.

ANEXOS

ANEXO A: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo de consentimento livre e esclarecido

O vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV), é um vírus que ataca um grupo específico de células do sangue, as quais são chamadas "linfócitos T". Esse vírus tem sido geralmente associado a duas doenças: uma forma de leucemia e a uma mielopatia. A leucemia é uma doença que altera a forma e o número das células brancas do sangue. A mielopatia, por sua vez, é uma grave inflamação nas células do Sistema Nervoso, e que pode fazer o paciente perder, ao longo do tempo, a sensibilidade nas pernas e a capacidade de andar, podendo ocorrer, ainda, impotência sexual e dificuldade ou incapacidade em prender (segurar) a urina e as fezes.

Os dados produzidos a partir deste estudo ajudarão a compreender melhor o comportamento deste vírus (HTLV) entre as pessoas por ele infectadas e sua associação com doenças do Sistema Nervoso.

Se, depois de ler este documento, você não tiver qualquer dúvida e concordar em participar deste estudo, você será convidado a assinar este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Em seguida, você deverá responder a algumas perguntas sobre a sua história de saúde. Essas informações serão usadas para avaliar os resultados deste estudo. Um membro de nossa equipe, devidamente identificado, fará, então, a coleta de cinco mililitros de sangue que será usado nos exames laboratoriais. Todo material usado nesta coleta será descartável.

Sua participação neste estudo é voluntária e você poderá se recusar a participar do mesmo a qualquer momento, sem que isto implique qualquer penalidade.

Todas e quaisquer informações de **IDENTIFICAÇÃO PESSOAL** sua, no estudo, serão consideradas confidenciais. Tais informações serão mantidas sob sigilo, do modo que somente os membros do grupo de estudo terão acesso a elas.

Não haverá riscos para os pacientes envolvidos no estudo. O benefício do estudo será a identificação do tipo de HTLV, de forma que você e o médico que lhe assiste serão informados quanto ao resultado e sobre o risco de desenvolver doenças associadas ao vírus.

Eu, _____

(nome e sobrenome do paciente participante do estudo)

Declaro ter lido e entendido as informações acima dispostas sobre o estudo aqui referido e concordo, por minha livre e espontânea vontade, em participar do mesmo, concordo em ceder o material necessário para os exames laboratoriais. Concordo, ainda, em fornecer informações sobre minha pessoa, que constarão em uma ficha epidemiológica, desde que minha identidade seja mantida sob as condições de sigilo acima referidas.

Endereço do participante: _____

Números de telefone do Participante:

Belém, _____ de _____ de 20____.

Assinatura

Nota 1: sua assinatura neste documento não isenta a equipe do projeto, sob hipótese alguma, das responsabilidades que assumiu ao desenvolver o estudo. A qualquer momento, você terá direito a fazer perguntas sobre o estudo. Para esclarecer suas dúvidas, você poderá entrar em contato a equipe de estudo, procurando o Dr. Alexandre da Costa Linhares (pesquisador responsável) ou a biomédica Telma Vitorina Ribeiro Lima (pesquisadora auxiliar) pelos telefones (91) 3214-2007, (91) 3214-2011, (91) 8114-1793, no Instituto Evandro Chagas, BR 316, Km 07, s/n, CEP 67030-000, Jaderlândia, Ananideua, Pará.

Nota 2: este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Evandro Chagas (IEC), sob a coordenação do Dr. Manoel do Carmo Pereira Soares, situado à Av. Almirante Barroso, nº 492, CEP 66093020, Bairro Marco, Belém, Pará, Brasil. Telefone/fax (91) 3202-4670.

**ANEXO B: CARTA DE ACEITE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO IEC,
SVS, MS**



**Carta de nº 002/2006
Protocolo CEP/IEC - Nº 031/2005
CAAE: 0010.0.072.000-05**

Belém, 13 de janeiro de 2006.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Projeto: “Caracterização sorológica e molecular de amostras de HTLV em pacientes com distúrbios neurológicos em Belém, Pará, Brasil (1996-2004).”

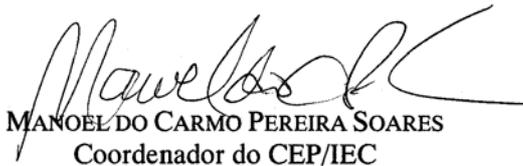
Pesquisador Responsável: ALEXANDRE DA COSTA LINHARES

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Evandro Chagas/SVS/MS, em sua reunião ordinária realizada em 10/01/2006, cientificamos que o referido projeto de pesquisa foi considerado **aprovado**.

Recomenda-se ao coordenador que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto, inclusive, as fichas preenchidas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Este CEP se incumbirá dos procedimentos de acompanhamento preconizados pela Resolução 196/96 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde.

Relatório Final - deverá ser elaborado um consolidado, incluindo os resultados finais da pesquisa, em um prazo máximo de 60 (sessenta) dias, após a finalização da mesma.



MANOEL DO CARMO PEREIRA SOARES
Coordenador do CEP/IEC

ANEXO C: FICHA EPIDEMIOLÓGICA



MS – SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE
INSTITUTO EVANDRO CHAGAS
FICHA CLINICO – EPIDEMIOLÓGICA



Data ____/____/____		C.I. _____		Reg. _____	
Nome _____					
Responsável _____					
Nascimento ____/____/____		Sexo ____	1. M 2. F		Est. Civil _____
Profissão _____		Naturalidade _____		Procedência _____	
Residência _____					
Cidade _____		Estado _____		Fone () _____	
Médico _____			Fone() _____		

SINAIS/SINTOMAS (1) SIM (2) NÃO

	INÍCIO	FIM		INICIO	FIM
Adenopatia ()	___/___/___	___/___/___	Febre ()	___/___/___	___/___/___
Anorexia ()	___/___/___	___/___/___	Fotofobia ()	___/___/___	___/___/___
Artralgia ()	___/___/___	___/___/___	Hiperemia conjutiva ()	___/___/___	___/___/___
Astenia ()	___/___/___	___/___/___	Ictericici ()	___/___/___	___/___/___
Calafrio ()	___/___/___	___/___/___	Mialgia ()	___/___/___	___/___/___
Cefaléia ()	___/___/___	___/___/___	Náuseas ()	___/___/___	___/___/___
Conjutivite ()	___/___/___	___/___/___	Palidez ()	___/___/___	___/___/___
Coriza ()	___/___/___	___/___/___	Prurido ()	___/___/___	___/___/___
Dor abdominal ()	___/___/___	___/___/___	Rash cutâneo ()	___/___/___	___/___/___
Dor gargante ()	___/___/___	___/___/___	Tonteira ()	___/___/___	___/___/___
Dor retrobitária ()	___/___/___	___/___/___	Tosse ()	___/___/___	___/___/___
Diarréia ()	___/___/___	___/___/___	Tumefação ()	___/___/___	___/___/___
Edema palpebral ()	___/___/___	___/___/___	Vômitos ()	___/___/___	___/___/___

OBS: _____

<p>EXAME FÍSICO (1) SIM (2) NÃO</p> <p style="text-align: right;">Alterações _____</p> <p>Pele e mucosas:</p> <ul style="list-style-type: none"> * Exantema _____ • Eritematoso _____ • Macular _____ • Papular _____ • Máculo-papular _____ • Máculo-pápulo-vesicular _____ • Pustuloso _____ • Crostoso _____ • Hemorrágico _____ * Palidez _____ * Icterícia _____ * Cianose _____ * Turgor↓ _____ <p>Cardio-pulmonar:</p> <p>* Arritmia _____</p> <p>* Sopro _____</p> <p>PA: _____ mmHg FC: _____ bpm FR: _____ mpm</p> <p>Digestivo:</p> <p>* Globoso _____</p> <p>* Circ. Colateral _____</p> <p>* Tenso _____</p> <p>* Doloroso _____</p> <p>Sist. Nervoso/músculo-esquelético:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Sinais de irritação menígea _____ • Alterações neuro-motoras _____ * Paresia _____ * Paralisia _____ 	<p style="text-align: right;">ALTERAÇÕES (1) SIM (2) NÃO</p> <p style="text-align: right;">Alterações _____</p> <p>Cavidade oral</p> <ul style="list-style-type: none"> * Hiperemia orofaringe _____ * Exsudato _____ * Enantema _____ * Gengivostomatite _____ <ul style="list-style-type: none"> • Ulcerada _____ • Vesicular _____ * Hipertrofia de tonsilas _____ * Manchas de Koplick _____ <p>* Murmúrio vesicular: _____</p> <p>* Ruídos adventícios: _____</p> <p>Alterações _____</p> <ul style="list-style-type: none"> * Tumoração _____ * Ascite _____ * Hérnia _____ <p>Cabeça:</p> <p>Alterações _____</p> <ul style="list-style-type: none"> • Microcefalia _____ • Macrocefalia _____ • Fontanela abaulada _____ • Fontanela deprimida _____ • Fontanela fechada _____
--	---

ANEXO C: FICHA EPIDEMIOLÓGICA

Órgãos dos Sentidos:

- | | | | | | |
|----------------------------|------------------|-------------------|------------------|--------------------------------|------------------|
| Olhos: | Alterações _____ | Ouvidos: | Alterações _____ | Fossas nasais: | Alterações _____ |
| • Ptose palpebral _____ | | • Hiperemia _____ | | • Coriza _____ | |
| • Estrabismo _____ | | • Otorréia _____ | | • Secreção mucopurulenta _____ | |
| • Nistágmo _____ | | | | • Epistaxe _____ | |
| • Hiperemia _____ | | | | | |
| • Sec. Mucopurulenta _____ | | | | | |
| • Catarata _____ | | | | | |

Linfáticos/glândulas

- | | | | | | |
|---------------------|------------------|------------------------|-------------------|-----------------------|---------------|
| • Adenopatia _____ | *cervical _____ | *retro-auricular _____ | Alterações | *sub-mandibular _____ | *axilar _____ |
| | *Occipital _____ | *pré-auricular _____ | *inguinal _____ | | |
| • Parotidite: _____ | | | | | |

Gênio-urinário:

- Alterações _____
- Lesões (verrucosas _____/eritemato-vésico-ulceradas _____)
 - Corrimentos (uretrais _____/vaginais _____)
 - Orquite _____

OBS: _____

ESPÉCIME	DATA	EXAME		RESULTADO	
		1.SIM	Amostra 1		Amostra2
Soro(1)	____/____/____	Rubéola	_____	_____	_____
Soro(2)	____/____/____	Sarampo	_____	_____	_____
Plasma(1)	____/____/____	EBV	_____	_____	_____
Sg tota(1)	____/____/____	CMV	_____	_____	_____
Sg total(2)	____/____/____	HHV6	_____	_____	_____
Swab lesão	____/____/____	Parvo B19	_____	_____	_____
Swab garganta	____/____/____	Cocsackie	_____	_____	_____
Swab córnea/conj	____/____/____	Echo	_____	_____	_____
Swab retal	____/____/____	Polio	_____	_____	_____
Swab colo uterino	____/____/____	HSV1/2	_____	_____	_____
Swab nasal	____/____/____	V.zooster	_____	_____	_____
Esfregaço lesão	____/____/____	Rota	_____	_____	_____
ANF	____/____/____	Astro	_____	_____	_____
Lavado garg.	____/____/____	Adeno ent.	_____	_____	_____
Saliva	____/____/____	Caxumba	_____	_____	_____
Líquido peric.	____/____/____	Influenza	_____	_____	_____
Líquido pleural	____/____/____	Parainfluenza	_____	_____	_____
Líquido sinovial	____/____/____	Adeno	_____	_____	_____
Líquido de vesícula	____/____/____	VRS	_____	_____	_____
Urina	____/____/____	Papiloma	_____	_____	_____
Fezes(1)	____/____/____	HTLV 1/2	_____	_____	_____
Fezes(2)	____/____/____	HIV	_____	_____	_____
Frag. Biópsia	____/____/____				
LCR	____/____/____				

Outros: _____

Médico(a): _____

DIAGNÓSTICO FINAL: _____

Médico(a): _____