



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROLOGIA  
MESTRADO EM NEUROLOGIA

**LUIZ CLÁUDIO PEREIRA RIBEIRO**

**AVALIAÇÃO DO TESTE *WESTERN BLOT* PARA ANÁLISE DO LÍQUIDO  
CEFALORRAQUIANO NA MIELOPATIA ASSOCIADA AO HTLV-1 /  
PARAPRESIA ESPÁSTICA TROPICAL**

RIO DE JANEIRO  
2009

**LUIZ CLÁUDIO PEREIRA RIBEIRO**

**AVALIAÇÃO DO TESTE *WESTERN BLOT* PARA ANÁLISE DO LÍQUIDO  
CEFALORRAQUIANO NA MIELOPATIA ASSOCIADA AO HTLV-1 /  
PARAPRESIA ESPÁSTICA TROPICAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurologia, área de concentração Neurociências.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marzia Puccioni-Sohler

RIO DE JANEIRO  
2009

616.8  
R484a

Ribeiro, Luiz Claudio Pereira,  
Avaliação do teste *western blot* para análise do líquido cefalorraquiano na mielopatia associada ao HTLV-1 / paraparesia espástica tropical. / Luiz Claudio Pereira Ribeiro - Rio de Janeiro, 2009.

84 f.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marzia Puccioni-Sohler.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Mestrado em Neurologia, 2009.

1. Líquido cefalorraquiano. 2. HAM/TSP. 3. HTLV-1. 4. síntese intratecal. 5. *western blot*. I. Puccioni-Sohler, Marzia. II. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. III. Título.

**LUIZ CLÁUDIO PEREIRA RIBEIRO**

**AVALIAÇÃO DO TESTE *WESTERN BLOT* PARA ANÁLISE DO LÍQUIDO  
CEFALORRAQUIANO NA MIELOPATIA ASSOCIADA AO HTLV-I /  
PARAPRESIA ESPÁSTICA TROPICAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurologia, área de concentração Neurociências.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marzia Puccioni-Sohler  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

---

Prof. Dr. Adilson José de Almeida  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina Paulo Vicente  
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

A Deus meu criador, Jane minha esposa e  
a nossa filha Luiza.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de deixar registrado aqui meus agradecimentos a todos aqueles que incentivaram e colaboraram para a realização desta dissertação e, especialmente, para:

- Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marzia Puccioni-Sohler, pela orientação, confiança, seriedade, sensibilidade e estímulo para a conclusão deste estudo;
- Prof. Dr. Carlos Alberto Morais de Sá, pela oportunidade, incentivo e confiança;
- Prof. Dr. Fernando Samuel Sion, pela estrutura, apoio, incentivo e confiança;
- Prof. Dr. Adilson José de Almeida, pelo apoio e incentivo;
- Prof. Dr. Fernando Raphael de Almeida Ferry, pelo apoio, incentivo e amizade;
- Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regina Maria Papais Alvarenga, coordenadora da Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Neurologia e ao Corpo Docente do Curso de Mestrado em Neurologia do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da UNIRIO, pelos ensinamentos transmitidos;
- Dr<sup>a</sup>. Silvia Maia Farias de Carvalho e equipe do Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti (HEMORIO), pelo apoio ao desenvolvimento da pesquisa;
- Cássia Cristina Alves Gonçalves, pelo incentivo e especial colaboração na execução deste trabalho;
- Rosângela de Souza Kalil, pelo incentivo e amizade;
- Márcia Shublaq, pelo companheirismo e amizade;
- Derliane Oliveira, pela atenção e colaboração;
- Luiz Eduardo da Cruz Veiga, pela eficiência, atenção e colaboração;
- Drs. Carlos Otávio Brandão, Ricardo Canuto e a bióloga Celina de Oliveira, e a equipe do Laboratório Neurolife, pela colaboração e atenção;
- Equipe do Laboratório de Pesquisa em Imunologia e Aids da Clínica Médica B, do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (HUGG), pelo carinho, incentivo e amizade;

- Funcionários do Laboratório de Líquido Cefalorraquidiano do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) pela colaboração, incentivo e amizade;
- Colegas do Curso de Mestrado em Neurologia do CCBS da UNIRIO, pelo companheirismo;
- Médicos e funcionários do ambulatório de Neuroinfecção do HUGG, pelo atendimento dos pacientes e coleta do Líquido cefalorraquiano;
- Pacientes pela participação;
- Minha sogra, pelo apoio, carinho e incentivo;
- Meus pais, pelos ensinamentos que me permitiram chegar até aqui;
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Programa de Apoio à Pós-Graduação (PROAP), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

É melhor tentar e falhar,  
que preocupar-se e ver a vida passar.

É melhor tentar, ainda que em vão,  
que sentar-se fazendo nada até o final.

Eu prefiro na chuva caminhar,  
que em dias frios em casa me esconder.

Prefiro ser feliz embora louco,  
que em conformidade viver.

**Martin Luther King**

## RESUMO

O vírus T-linfotrófico humano tipo 1 (HTLV-1) está associado a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL) e a uma doença neurológica crônica incapacitante, a mielopatia associada ao HTLV-1 ou paraparesia espástica tropical (HAM/TSP). Em 1988, com base nos estudos de Osame e colaboradores, a Organização Mundial de Saúde estabeleceu critérios clínicos e laboratoriais para o diagnóstico de HAM/TSP. O diagnóstico laboratorial baseia-se na detecção de anticorpos anti-HTLV-1 no soro e líquido cefalorraquiano (LCR). Na análise do LCR, é importante a demonstração da síntese intratecal de anticorpos anti-HTLV-1 em pacientes com HAM/TSP, pois representa evidência conclusiva da resposta imune contra o HTLV-1 no sistema nervoso central. O objetivo deste estudo foi avaliar o teste *western blot* (WB), previamente adaptado para demonstração da síntese intratecal de anticorpos contra as proteínas do HTLV-1, como apoio ao diagnóstico da HAM/TSP. Foram estudadas amostras pareadas de LCR e soro (diluído para mesma concentração de IgG do LCR) selecionadas de 14 pacientes atendidos no ambulatório de Neuroinfecção do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (HUGG) com diagnóstico de HAM/TSP, além de 16 pacientes com outras doenças neurológicas e sorologia negativa para HTLV-1. Os pacientes foram triados por ELISA e confirmados pelo WB no soro. As amostras foram submetidas ao teste WB para HTLV-1 (HTLV-BLOT 2.4) e a presença de bandas reativas mais intensas no LCR do que no soro ou visualizadas unicamente no LCR foi considerada indicativa de síntese intratecal de anticorpos contra proteínas do HTLV-1. Todas as 14 amostras pareadas (soro e LCR) de pacientes com HAM/TSP apresentaram evidências de síntese intratecal dirigida contra pelo menos uma proteína do HTLV-1. Com relação aos pacientes com outras doenças neurológicas, não foram observadas bandas reagentes para HTLV-1 nas 16 amostras pareadas estudadas. O teste apresentou sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo de 100%. A síntese intratecal de anticorpos anti-HTLV-1 ocorreu principalmente contra as proteínas *env* (GD21 e rgp46-I) e *gag* (p24), por meio da demonstração de bandas específicas em 93% (13/14) dos pacientes, quando analisadas isoladamente. Foi observada a concordância entre os resultados obtidos da avaliação de um par de LCR e soro de paciente com HAM/TSP realizada em condições diferentes, sugerindo a reprodutibilidade do teste. Este foi o primeiro estudo da literatura médica que avaliou o teste WB para pesquisar a síntese intratecal de anticorpos contra proteínas do HTLV-1 em pacientes com HAM/TSP. Por apresentar elevadas sensibilidade e especificidade, o teste demonstrou ser um instrumento útil como apoio laboratorial ao diagnóstico da HAM/TSP. A exemplo do critério de positividade do teste WB no soro, os autores sugerem a demonstração de síntese intratecal de anticorpos contra duas proteínas virais (*env* e *gag*) como confirmatório para o diagnóstico laboratorial da HAM/TSP. Palavras-chave: Líquido cefalorraquiano. HAM/TSP. HTLV-1. síntese intratecal. *western blot*.

## ABSTRACT

Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is associated with adult T-cell leukemia (ATL) and with a chronic neurological disease, HTLV-1 – associated myelopathy or Tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). In 1988, based on studies of Osame and colleagues, the World Health Organization established the clinical and laboratory criteria for the diagnosis of HAM/TSP. The laboratory diagnosis is based on detection of antibodies anti-HTLV-1 in serum and cerebrospinal fluid (CSF). It is important to demonstrate the synthesis of intrathecal antibodies anti-HTLV-1 while analyzing the CSF from individuals with HAM/TSP, since it represents a conclusive evidence of the immune response against HTLV-1 in the CNS. The objective of this study was to evaluate the test western blot previously adapted to demonstrate intrathecal synthesis of antibodies against the proteins of HTLV-1, as a support for the diagnosis of HAM/TSP. Paired CSF and serum samples (diluted to the same IgG concentration of the CSF) were selected from 14 HTLV-1 seropositive patients followed up at the outpatient Neuroinfection Unit of the Gaffrée & Guinle University Hospital (HUGG) diagnosed as having HAM/TSP. In addition, samples from 16 patients with other neurological diseases presenting negative serology for HTLV-1 were also analyzed. All were screened for the presence of HTLV-1 antibodies by ELISA and western blot in serum. The intrathecal synthesis of specific antibodies was evaluated by western blot (HTLV-BLOT 2.4). The presence of reactive bands more intense in CSF than in serum, or bands visualized only in the CSF was considered indicative of intrathecal synthesis of antibodies against HTLV-1 proteins. All 14 paired (serum and CSF) samples from patients with HAM/TSP presented evidence of intrathecal synthesis directed against at least one viral protein of HTLV-1. Concerning patients with other neurological diseases, no reactive bands were observed in the 16 paired samples studied. The test presented sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of 100%. Intrathecal synthesis antibodies anti-HTLV-1 were mainly against the *env* (GD21 and RGP46-I) and *gag* (p24) proteins, by demonstrating specific bands in 93% (13/14) of the patients, when analyzed individually. Reproducibility was obtained by testing the samples of a patient with HAM/TSP in another Laboratory, with same results in the CSF. This was the first study in the medical literature which evaluated the WB in search for intrathecal synthesis of antibodies against HTLV-1 proteins in patients with HAM/TSP. Due to its high sensitivity and specificity, the test demonstrated to be a useful tool as a laboratory support in the diagnosis of HAM/TSP. Likewise the criteria of positivity by using WB in serum, the authors suggest the demonstration of intrathecal synthesis of antibodies against two viral proteins (*env* and *gag*) as for confirmatory laboratory diagnosis of HAM/TSP.

*Key words:* Cerebrospinal fluid. HAM/TSP. HTLV-1. intrathecal synthesis. western blot.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Representação esquemática da estrutura da partícula do HTLV-1 .....	17
Figura 2	Organização genômica do HTLV-1 .....	17
Figura 3	Papel das glicoproteínas do envelope (gp 46 e gp 21) do HTLV-1 na adsorção a superfície e internalização na célula hospedeira.....	19
Figura 4	Representação esquemática do ciclo replicativo do HTLV-1 .....	19
Figura 5	Distribuição do HTLV-1 no mundo .....	21
Figura 6	Distribuição do HTLV-1 no Brasil .....	23
Quadro 1	Testes utilizados para o diagnóstico da infecção pelo HTLV-1 ...	27
Figura 7	Seqüência da reação do ensaio imunoenzimático .....	28
Figura 8	Reação de aglutinação de partículas .....	29
Figura 9	Seqüência da imunofluorescência indireta .....	30
Figura 10	Seqüência esquemática da reação do <i>Western blot</i> .....	31
Figura 11	Exemplo de resultados de <i>Western blot</i> .....	32
Quadro 2	Diagnóstico de HAM/TSP segundo recomendações da OMS, 1989 .....	38
Figura 12	Diagrama de quocientes, segundo Reiber and Felgenhauer (1987) .....	40
Figura 13	Bandas IgG oligoclonais .....	41

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características demográficas da população estudada.....	47
Tabela 2	Valores do fator de diluição do soro para a mesma concentração de IgG do LCR dos pacientes estudados (n = 32).	49
Tabela 3	Freqüência de resultados do teste <i>Western blot</i> (síntese intratecal contra uma proteína do HTLV-1 como critério de positividade) na amostra estudada (n = 30) .....	54
Tabela 4	Desempenho do teste <i>Western blot</i> (síntese intratecal contra uma proteína do HTLV-1 como critério de positividade) na amostra estudada (n = 30) .....	55
Tabela 5	Freqüência de resultados do teste <i>Western blot</i> (síntese intratecal contra uma proteína <i>gag</i> e uma <i>env</i> do HTLV-1 como critério de positividade) na amostra estudada (n = 30) .....	55
Tabela 6	Desempenho do teste <i>Western blot</i> (síntese intratecal contra uma proteína <i>gag</i> e uma <i>env</i> do HTLV-1 como critério de positividade) na amostra estudada (n = 30) .....	55
Tabela 7	Freqüência da síntese intratecal de anticorpo contra diferentes proteínas virais do HTLV-1 .....	56
Tabela 8	Freqüência da síntese intratecal de anticorpos anti-GD21, anti-p24 e anti-rgp46-I do HTLV-1 isoladas ou em combinação .....	57
Tabela 9	Comparação do padrão de <i>Western Blot</i> para HTLV-1 em soro e LCR da amostra HAM14, realizada no Laboratório do HUGG e no Laboratório do HEMORIO .....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP	Aglutinação de partículas
ATL	<i>Adult T-cell leukemia/lymphoma</i> ou leucemia/linfoma de células T do adulto
ATLV	<i>Adult T-cell leukemia/lymphoma virus</i> ou vírus da leucemia/linfoma de células T do adulto
CCBS	Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
CDC	<i>Centers for disease control and prevention</i> ou Centro para prevenção e controle de doenças
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DNA	<i>Desoxiribonucleic acid</i> ou ácido desoxirribonucleico
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> ou ensaio imunoenzimático
EM	Esclerose múltipla
Env	Envelope
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> ou agência de alimentos e medicamentos
FIE	Focalização isoelétrica
GP	Glicoproteína
Gag	Região genômica do grupo antigênico
HAM	<i>HTLV-1 – associated myelopathy</i> ou mielopatia associada ao HTLV-1
HAM/TSP	<i>HTLV-1 – associated myelopathy / tropical spastic paraparesis</i> ou mielopatia associada ao HTLV-1 / paraparesia espástica tropical
HEMORIO	Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> ou vírus da imunodeficiência humana
HLA	<i>Human leucocyte antigen</i> ou antígeno leucocitário humano
HTLV-I	<i>Human T-cell lymphotropic virus type I</i> ou vírus linfotrópico de células T humanas tipo I
HTLV-1	<i>Human T-lymphotropic virus type 1</i> ou vírus T-linfotrópico humano tipo 1

HUCFF	Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
HUGG	Hospital Universitário Gaffrée e Guinle
ICTV	<i>International Committee on Taxonomimy of Viruses</i> ou Comitê Internacional sobre Taxonomia de Vírus
IFI	Imunofluorescência indireta
IgG	Imunoglobulina do tipo G
IgM	Imunoglobulina do tipo M
LCR	Líquido cefalorraquiano
LTR	<i>Long terminal repeats</i> ou seqüências repetidas longas
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> ou complexo principal de histocompatibilidade
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> ou reação em cadeia da polimerase
Pol	Polimerase
Q alb	Quociente de albumina
<i>Rex</i>	<i>Regulator of expression</i> ou gene regulador de expressão
RGP	<i>Recombinant glycoprotein</i> ou glicoproteína recombinante
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> ou ácido ribonucleico
RIPA	Radioimunoprecipitação
SNC	Sistema nervoso central
<i>Tax</i>	<i>Transactivator</i> ou gene de transativação
TSP	<i>Tropical spastic paraparesis</i> ou paraparesia espástica tropical
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro (Universidade do Brasil)
UNIRIO	Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo
WB	<i>Western blot</i>

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1	ASPECTOS HISTÓRICOS .....	15
1.2	CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA, ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO HTLV-1 .....	16
1.3	MECANISMOS DE REPLICAÇÃO DO HTLV-1 .....	18
1.4	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO HTLV-1 .....	20
1.5	VIAS DE TRANSMISSÃO .....	25
1.6	MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO .....	26
1.6.1	<b>Ensaio imunoenzimático</b> .....	28
1.6.2	<b>Aglutinação de partícula</b> .....	28
1.6.3	<b>Imunofluorescência indireta</b> .....	29
1.6.4	<b>Western blot</b> .....	30
1.6.5	<b>Radioimunoprecipitação</b> .....	32
1.6.6	<b>Reação em cadeia da polimerase</b> .....	33
1.7	DOENÇAS ASSOCIADAS AO HTLV-1 .....	34
1.7.1	<b>Leucemia/linfoma de célula T do adulto</b> .....	35
1.7.2	<b>Mielopatia associada ao HTLV-1/ Paraparesia espástica tropical ...</b>	35
1.8	PATOGÊNESE DA HAM/TSP .....	37
1.9	CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DA HAM/TSP .....	37
1.10	ANÁLISE DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO NA HAM/TSP .....	39
1.10.1	<b>Avaliação da Barreira Hemato-liquórica</b> .....	39
1.10.2	<b>Síntese Intratecal de IgG Total</b> .....	39
1.10.3	<b>Síntese Intratecal de Anticorpos Específicos</b> .....	41
1.10.4	<b>Características do LCR na HAM/TSP</b> .....	42
2	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	44
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	45
3.1	OBJETIVO GERAL .....	45
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	45
4	<b>METODOLOGIA</b> .....	46
4.1	DESENHO DO ESTUDO .....	46
4.2	TESTE UTILIZADO .....	46
4.3	LOCAL DO ESTUDO E ASPECTOS ÉTICOS .....	46
4.4	PACIENTES .....	46

4.4.1	<b>Critérios de inclusão</b> .....	48
4.4.2	<b>Critérios de exclusão para ambos os grupos</b> .....	48
4.5	<b>PROTOCOLO DO TESTE</b> .....	48
4.5.1	<b>Preparação das amostras biológicas</b> .....	49
4.5.2	<b>Preparação dos reagentes do teste WB (de acordo com as instruções do fabricante)</b> .....	50
4.5.3	<b>Procedimento do teste WB</b> .....	50
4.5.4	<b>Interpretação dos resultados</b> .....	52
4.5.5	<b>Desempenho do teste</b> .....	52
4.5.6	<b>Freqüência da síntese intratecal de anticorpo contra diferentes proteínas virais do HTLV-1</b> .....	52
4.5.7	<b>Reprodutibilidade</b> .....	53
4.5.8	<b>Diluição adicional das amostras de soro e LCR (HAM13)</b> .....	53
5	<b>RESULTADOS</b> .....	54
5.1	DESEMPENHO DO TESTE .....	54
5.2	FREQÜÊNCIA DA SÍNTESE INTRATECAL DE ANTICORPOS CONTRA DIFERENTES PROTEÍNAS VIRAIS DO HTLV-1 .....	56
5.3	FREQÜÊNCIA DA SÍNTESE INTRATECAL DE ANTICORPOS COTRA AS PROTEÍNAS MAIS ANTIGÊNICAS ISOLADAS OU EM COMBINAÇÃO .....	56
5.4	REPRODUTIBILIDADE .....	57
5.5	DILUIÇÃO ADICIONAL DAS AMOSTRAS DE SORO E LCR (HAM13) .....	58
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	59
7	<b>CONCLUSÕES</b> .....	66
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	67
	APÊNDICE A - Procedimento do teste de WB nº 01 .....	78
	APÊNDICE B - Procedimento do teste de WB nº 02 .....	79
	APÊNDICE C - Procedimento do teste de WB nº 03 .....	80
	APÊNDICE D - Procedimento do teste de WB nº 04 .....	81
	APÊNDICE E - Procedimento do teste WB HAM14 (HEMORIO) .....	82
	APÊNDICE F - Procedimento do teste WB HAM13 (HEMORIO) .....	83
	ANEXO A - Carta de aprovação do CEP-HUGG .....	84

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 ASPECTOS HISTÓRICOS

Takatsuki e outros (1977) descreveram uma doença linfoproliferativa altamente agressiva e prevalente no Japão como leucemia/linfoma de células T do adulto (*Adult T-cell leukemia/lymphoma* ou ATL). Por sua distribuição geográfica restrita a certas regiões do sul do Japão, propuseram que um vírus poderia ser o agente causal desta enfermidade (TAKATSUKI et al., 1977; UCHIYAMA et al., 1977).

Nos Estados Unidos da América (EUA), Poiesz e outros (1980) descreveram o primeiro retrovírus humano, então denominado vírus linfotrópico de células T humanas tipo I (*Human T-cell lymphotropic virus type I* ou HTLV-I), sendo isolado de células de paciente portador de linfoma cutâneo de células T, de evolução agressiva e semelhante ao anteriormente descrito por Takatsuki e outros (1977). Em 1982, no Japão, foi descrito um retrovírus isolado de células de pacientes com ATL, chamado vírus da leucemia/linfoma de células T do adulto (*Adult T-cell leukemia/lymphoma virus* ou ATLV) (YOSHIDA et al., 1984). Através da análise por sequenciamento completo do genoma dos dois retrovírus, ficou estabelecido que ambos eram idênticos, sendo consenso denominá-lo unicamente de HTLV-I (SEIKI et al., 1983).

Em 1985, anticorpos anti-HTLV-I foram encontrados no soro de 59% dos pacientes da Martinica que apresentavam uma síndrome denominada paraparesia espástica tropical (*Tropical spastic paraparesis* ou TSP) (GESSAIN et al., 1985). Esta associação foi também observada por Osame e outros (1986) no Japão, que demonstraram a presença de anticorpos anti-HTLV-I em amostras de soro e líquido cefalorraquiano (LCR) de seis pacientes que apresentavam paraparesia espástica lentamente progressiva associada a distúrbios urinários e sensitivos, denominada mielopatia associada ao HTLV-I (*HTLV-I-associated myelopathy* ou HAM) (OSAME et al., 1986). A TSP e a HAM apresentavam as mesmas características clínicas e patológicas e, desde 1988, recomenda-se a utilização do termo HAM/TSP (WHO, 1989).

## 1.2 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA, ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO HTLV-1

Por apresentar papel patogênico no desenvolvimento da leucemia/linfoma de células T humanas, o HTLV-1 foi reconhecido como vírus da leucemia de células T humanas tipo 1 (*Human T-cell leukemia virus type 1* ou HTLV-1) (LAIRMORE; FRANCHINI, 2007). Atualmente, de acordo com o Comitê Internacional sobre Taxonomia de Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses* ou ICTV), o HTLV-1 é descrito como vírus T-linfotrópico humano tipo 1 (*Human T-lymphotropic virus type 1* ou HTLV-1) e está classificado como membro da família *Retroviridae*, subfamília *Oncovirinae*. Os vírions são esféricos e têm diâmetro de aproximadamente 100 nm. O genoma viral é formado por duas fitas simples idênticas de RNA dentro de um nucleocapsídeo icosaédrico envolto por uma membrana lipoprotéica (ICTV, 2009).

O genoma proviral do HTLV-1 possui 9.032 pares de bases. Sua estrutura genética é similar àquela dos demais retrovírus, possui os genes *gag* (grupo antigênico), *pol* (polimerase) e *env* (envelope), além de uma seqüência próxima a extremidade 3' conhecida como região *pX*, que contém os genes reguladores *tax* e *rex*, flanqueados por seqüências terminais longas repetidas (LTR). A região *gag* é inicialmente traduzida em uma proteína precursora (p53) que sofre clivagem pela protease viral originando as proteínas que correspondem a matriz (p19), ao capsídeo (p24) e ao nucleocapsídeo (p15). A região *pol* contém a informação genética para a produção da transcriptase reversa, RNase H e integrase. A região *env* tem como produto de tradução uma proteína glicosilada de 61 a 69 kDa que é clivada em duas proteínas, a gp46 de superfície e gp21 transmembrana. A região *pX* desempenha importante papel na leucemogênese e na regulação da expressão viral, e codifica as proteínas p40<sup>Tax</sup>, p27<sup>Rex</sup> e p21<sup>Rex</sup>. A p40<sup>Tax</sup> é uma fosfoproteína nuclear que age na transativação gênica e tem efeito positivo sobre a replicação viral. A p27<sup>Rex</sup> é uma proteína nucleolar que participa na regulação da expressão viral em nível pós-transcricional. O papel da proteína p21<sup>Rex</sup> permanece desconhecido. Duas LTR localizadas nas extremidades 5' e 3' do genoma proviral contém o promotor da

transcrição viral e outros elementos reguladores (Figuras 1 e 2) (FRANCHINI, 1995; CANN; CHEN, 1996).

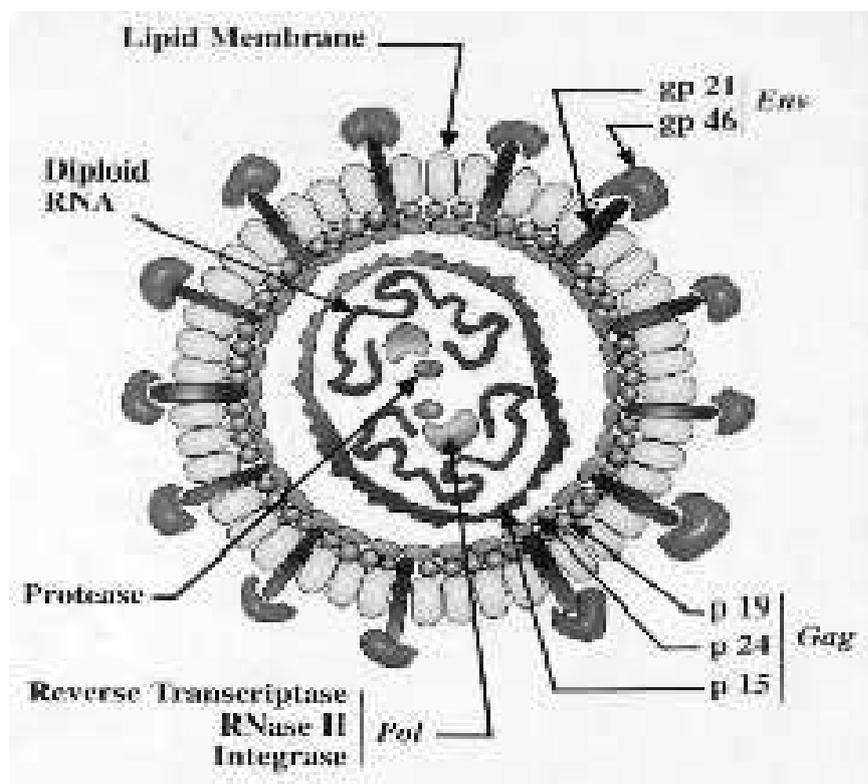


Figura 1: Representação esquemática da estrutura da partícula do HTLV-1. Disponível em: <http://www.aupec.univalle.edu.com>. [Acesso em: 18 set. 2008]

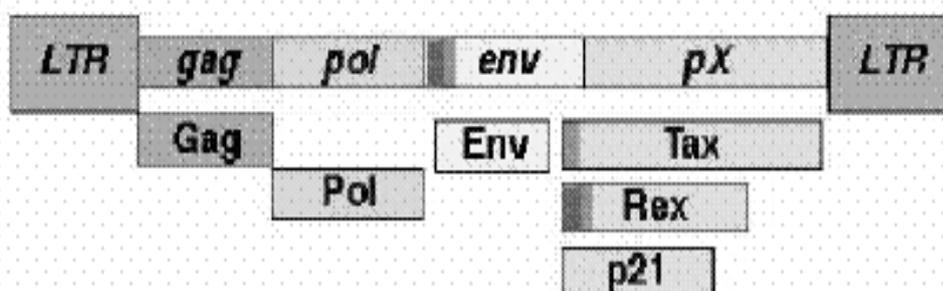


Figura 2: Organização genômica do HTLV-1. Disponível em: <http://www.ims.u-tokyo.ac.jp>. [Acesso em: 18 set. 2008]

### 1.3 MECANISMOS DE REPLICAÇÃO DO HTLV-1

O HTLV-1 tem como principais alvos de infecção as células T, particularmente os linfócitos T CD4+ (VERONESI, 1997). Seu ciclo de replicação, comum a todos os retrovírus, ocorre em duas fases. A primeira fase é iniciada com a ligação entre as glicoproteínas do envelope viral e receptores, ainda desconhecidos, presentes na superfície da célula hospedeira. O envoltório do vírus funde-se com a membrana plasmática celular liberando o nucleocapsídeo no citoplasma da célula. Por ação da transcriptase reversa viral, o RNA viral sofre transcrição reversa, produzindo DNA de fita dupla. A dupla fita de DNA linear é dirigida para o núcleo onde a integrase viral catalisa a integração do DNA viral ao genoma da célula hospedeira, na forma de provírus. Estas etapas são executadas pelas proteínas contidas no vírion infectante. A segunda fase consiste na síntese e processamento do genoma e das proteínas virais, utilizando-se componentes moleculares da célula hospedeira e, em determinados processos, utilizando-se produtos específicos dos genes virais. A montagem das partículas virais se inicia com a associação das proteínas codificadas pelos genes *gag* e *gag-pol* ao genoma viral, resultando na formação do nucleocapsídeo, ligação com a membrana da célula e posterior liberação de novas partículas virais por brotamento (VARMUS; SWANSTROM, 1982) (Figuras 3 e 4). Esta estratégia parece ser fundamental para manter a capacidade dos retrovírus em induzir infecção e doenças latentes crônicas durante toda a vida (VERONESI, 1997). Os dados até agora disponíveis sugerem que o HTLV-1 é um vírus com baixa atividade replicativa e que a propagação *in vivo* ocorre mais devido a expansão clonal das células infectadas, via mitose, do que via transcrição reversa (WATTEL et al., 1995; CIMARELLI et al., 1996).

## Papel do Envelope na Infecção da Célula Hospedeira

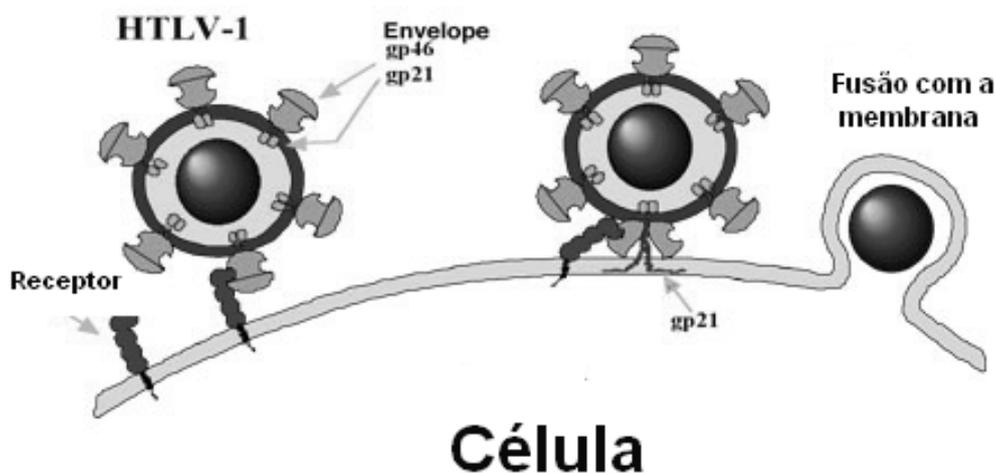


Figura 3: Papel das glicoproteínas do envelope (gp 46 e gp 21) do HTLV-1 na adsorção a superfície e internalização na célula hospedeira. Disponível em: <http://www.dundee.ac.uk/biomedres/images/brighty2.jpg>. [Acesso em: 18 set. 2008]

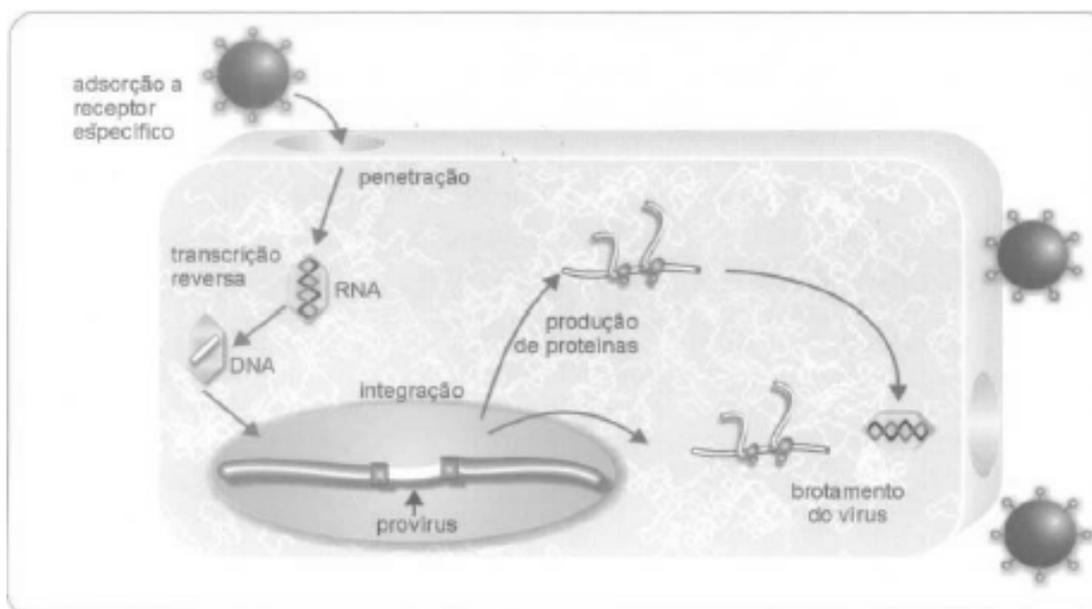


Figura 4: Representação esquemática do ciclo replicativo do HTLV-1. Disponível em: [http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cd08\\_08.pdf](http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cd08_08.pdf). [Acesso em: 18 set. 2008]

#### 1.4 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DO HTLV-1

A infecção pelo HTLV-1 caracteriza-se por: agrupamento em áreas geográficas definidas no mundo; variação espacial das taxas de soroprevalência, dentro de áreas de prevalência reconhecidamente elevadas; aumento da soroprevalência com a idade e soroprevalência mais elevada em mulheres, principalmente após os 40 anos (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002).

O HTLV-1 é endêmico no Japão, Caribe, na África, Melanésia e América do Sul. Embora o número exato de indivíduos infectados não seja conhecido, estima-se que existam 15-20 milhões de pessoas vivendo infectadas pelo HTLV-1 em todo o mundo (de THÉ; KAZANJI, 1996).

No Japão, em um grande estudo soroepidemiológico para detectar anticorpos anti-HTLV-1, foram testados soros de adultos originários de 15 regiões diferentes sendo observada alta prevalência (6 a 37%) em sete regiões, uma no norte e as demais no sudoeste do Japão. Em outro estudo, em 3978 amostras de indivíduos saudáveis de Okinawa, a soroprevalência total para HTLV-1 foi de 15,3%, variando de ilha para ilha. Hateruma teve a mais alta prevalência (21,2%) e Taketomi (6,2%) a mais baixa (HINUMA et al., 1982; KAJIYAMA et al., 1986).

No Caribe, soroprevalência de 5 a 8% tem sido encontrada na população da Jamaica, Trinidad-Tobago, Barbados e Haiti. Estudo realizado em 13.260 jamaicanos oriundos de diversas partes da ilha mostrou que a infecção pelo HTLV-1 naquela região está fortemente associada a idade e ao sexo. A soroprevalência variou de 1,7% (10 a 19 anos) a 9,1% (>70 anos) nos homens e de 1,9% (10 a 19 anos) a 17,4% (>70 anos) nas mulheres (BLATTNER et al., 1990; MURPHY et al., 1991).

Na África, estudo realizado na Costa do Marfim revelou soroprevalência de 1,8% para HTLV-1 em adultos da população geral (VERDIER et al., 1989), sendo esta taxa semelhante às observadas em outras regiões, onde a soroprevalência foi

de 3,9% no Gabão, 1,7% no Kenya, 1,6% na Libéria, 2,6% na Nigéria, 1,2% no Senegal e 3,2% no Zaire (HUNSMANN et al., 1984).

Na Melanésia, soroprevalência de 14% foi encontrada entre os Hagahai, na Papua Nova Guiné (YANAGIHARA et al., 1990).

Na América do Sul, em estudo envolvendo 670 indivíduos de populações residentes na região da costa sul da Colômbia, a soroprevalência da infecção pelo HTLV-1 variou de 0,9 a 4,3% dependendo do grupo populacional estudado e também da idade e do sexo. Indivíduos com idade acima de 40 anos apresentaram maior soroprevalência (6,2%) que indivíduos mais jovens (1%), e nas mulheres a soropositividade (3,3%) foi maior que nos homens (1%) (MALONEY et al., 1989). Na Bolívia, foi encontrada prevalência de 11 a 21% na população descendente de japoneses provenientes de áreas de alta endemicidade no Japão (TSUGANE et al., 1988). Na Argentina, estudos de prevalência em doadores de sangue registraram taxa geral variando de 0,04 a 0,1% (BIGLIONE et al., 1999), porém em doadores da região de Jujui, os dados demonstraram prevalência de 0,8% (BIGLIONE et al., 1997) (figura 5).

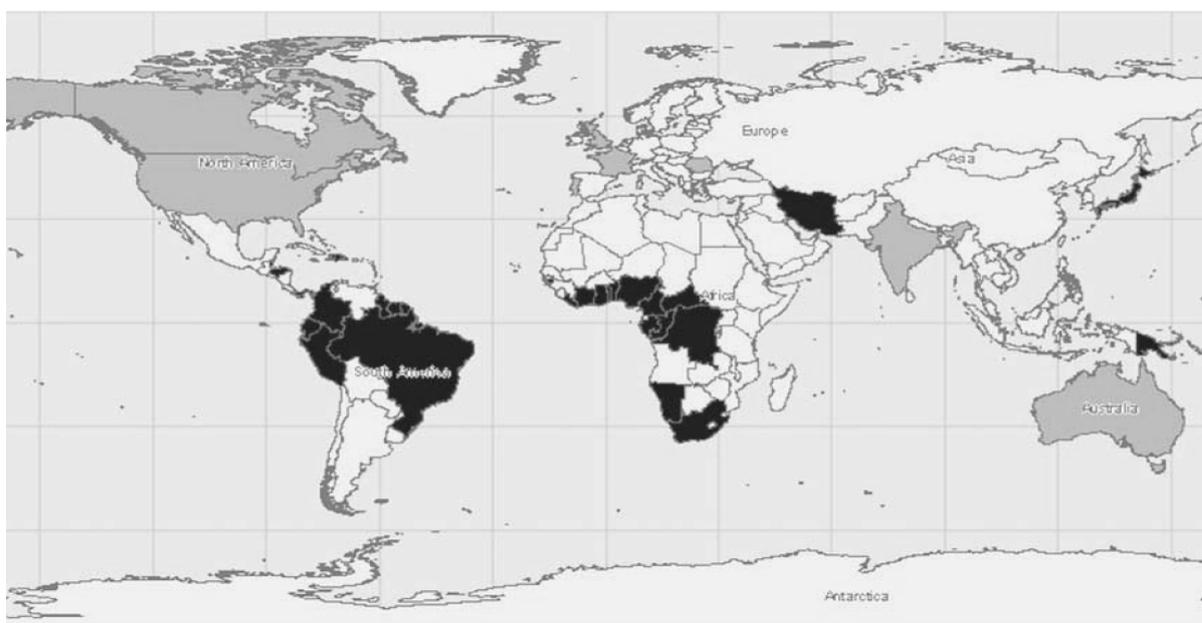


Figura 5: Distribuição do HTLV-1 no mundo. Em preto, as regiões com prevalências entre 1 e 5%. Em cinza, as regiões com prevalências abaixo de 1%. Fonte: PROIETTI et al., 2005

No Brasil, o HTLV-1 foi inicialmente descrito por Kitagawa e outros (1986), em uma comunidade de imigrantes japoneses oriundos de Okinawa, no sul do Japão, residentes em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, onde foi encontrada soroprevalência de 10,4%. Também foram estudados 51 imigrantes japoneses em São Paulo, não provenientes de Okinawa, sendo todos negativos (KITAGAWA et al., 1986). Soroprevalência de 0,42% foi observada em pré-doadores de sangue no Rio de Janeiro (LEE et al., 1989). Estudos realizados em populações de risco dos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo, demonstraram soroprevalência variando de 1% em prostitutas da zona rural a 13% em hemofílicos do Rio de Janeiro (CORTES et al., 1989). Estudos sobre a soroprevalência de anticorpos anti-HTLV-1 em doadores de sangue de várias cidades das diferentes regiões geográficas brasileiras demonstraram que a prevalência da infecção varia nessas regiões, sendo 0,08% em Manaus e Florianópolis; 0,33% - 0,82% no Recife e 0,33% - 0,44% no Rio de Janeiro. Salvador, na Bahia (1,35% - 1,80%), e Belém, no Pará (1,61%), foram as cidades com maiores prevalências da infecção pelo HTLV-1 (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002) (figura 6).

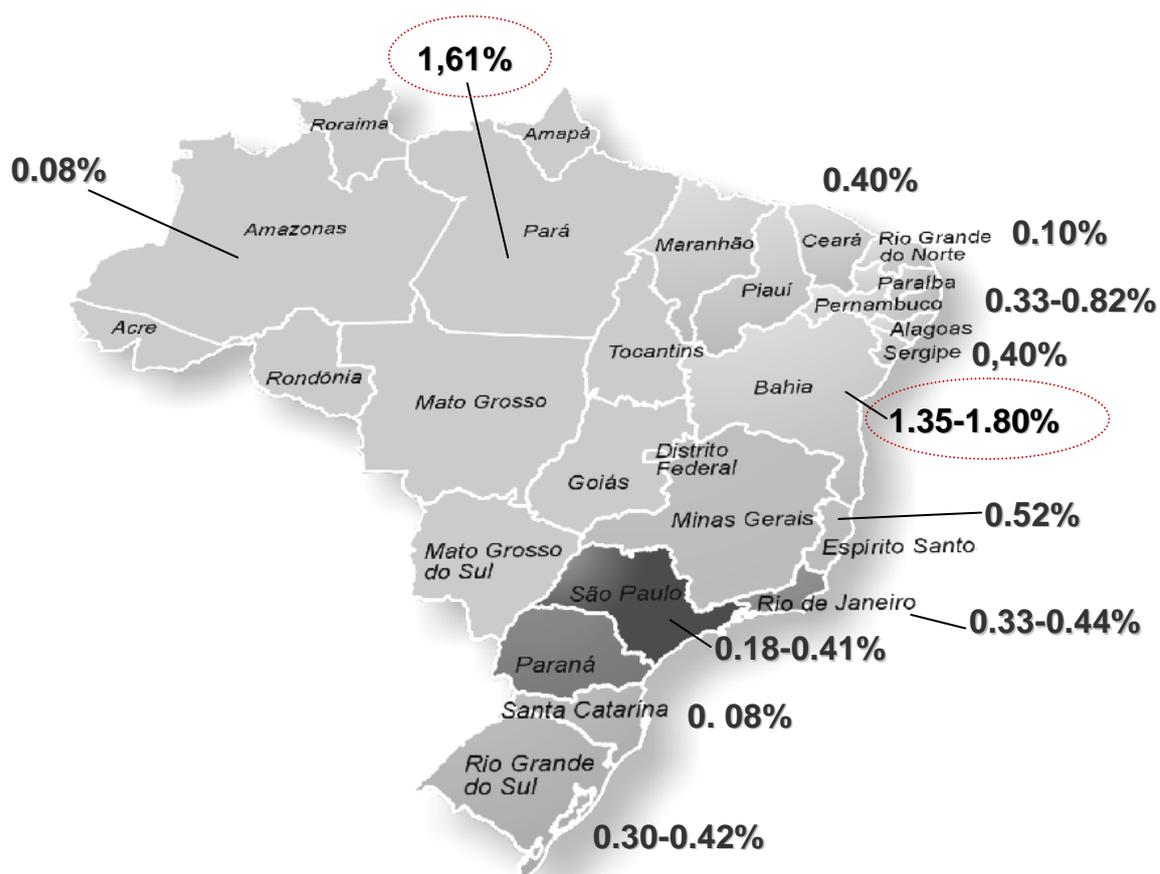


Figura 6: Distribuição do HTLV-1 no Brasil. Disponível em: [http://www.abneuro.org/html/porta/aulas/han-belo\\_horizonte.ppt](http://www.abneuro.org/html/porta/aulas/han-belo_horizonte.ppt). [Acesso em: 20 nov. 2008]

O primeiro artigo no Brasil sobre HAM/TSP foi publicado por Costa e outros (1989), questionando a sua possível origem viral. Esse estudo foi realizado no Ceará com 10 pacientes de 21 a 59 anos, de raça negra, discreto predomínio de mulheres, e quadro clínico compatível com os critérios descritos por Román e outros, (1985) para estabelecer o diagnóstico de HAM/TSP. Entretanto, os pacientes descritos nesse estudo não foram testados para marcadores sorológicos da infecção pelo HTLV-1 naquele período (COSTA et al., 1989).

Neste mesmo ano, Castro e outros (1989) publicaram trabalho onde foram estudados 16 pacientes com mielopatia crônica de causa indeterminada e 13 pacientes com esclerose múltipla. A pesquisa de anticorpos anti-HTLV-1 revelou seis pacientes (37,5%) positivos para HTLV-1 no primeiro grupo e um (7,6%) no

segundo. Essa foi a primeira evidência da associação da infecção pelo HTLV-1 com neuropatias de caráter paraparético no Brasil.

Em São Paulo, foi realizado estudo visando a detecção de anticorpos anti-HTLV-1 no soro e LCR de 150 pacientes com distúrbios neurológicos, particularmente mielopatias. Os pacientes foram considerados em três grupos de acordo com a possível relação entre a doença e presença de anticorpos anti-HTLV-1: ausência de risco (grupo-controle); grupo de risco ocasional; e grupo de risco possível constituído de 56 pacientes com paraparesia ou paraplegia de etiologia não esclarecida. Esse último grupo apresentou taxa de positividade de 55,4% para anticorpos anti-HTLV-1 (SPINA-FRANÇA et al., 1990).

Na Bahia, Moreno-Carvalho e outros (1992) realizaram estudo para avaliar a soroprevalência da infecção pelo HTLV-1 e sua associação com a TSP. Os autores observaram 16 casos com sorologia positiva para HTLV-1 em 28 pacientes com TSP, assim como em três cônjuges de pacientes com TSP. Dentre 36 casos de outras doenças neurológicas com envolvimento de pernas, apenas um foi anti-HTLV-1 positivo. Anticorpos anti-HTLV-1 não foram detectados em 26 pacientes que sofriam de dores de cabeça e em 96 indivíduos saudáveis. Os demais casos incluíram: cinco positivos em 64 prisioneiros, um positivo em 99 mulheres grávidas e dois positivos em 15 pré-doadores de sangue anti-HIV positivos. A soroprevalência da infecção pelo HTLV-1 no grupo estudado foi de 7,63% (28/367), sendo mais elevada em mulheres (13/14) que em homens (3/14) com TSP.

No Rio de Janeiro, a partir de um caso de HAM/TSP, quatro gerações de uma família de raça negra, proveniente do estado da Bahia, foram estudadas quanto a infecção pelo HTLV-1 e sua associação com manifestações neurológicas. Trinta e dois indivíduos foram testados e a infecção foi detectada em oito (25%). Dentre os infectados, três apresentavam HAM/TSP e quatro, distúrbios neurológicos subclínicos (CAVALCANTI et al., 1993).

## 1.5 VIAS DE TRANSMISSÃO

A transmissão do HTLV-1 ocorre por via vertical (da mãe para o filho), via parenteral (transfusão sanguínea e uso de materiais perfuro-cortantes contaminados) e via horizontal (contato sexual) (WHO, 1989; MANNS; HISADA; LA GRENADE, 1999). Essas formas de transmissão são semelhantes àsquelas do HIV, entretanto, a transmissão do HTLV-1 é menos eficiente que a do HIV em virtude de estar estritamente ligada à célula (KAMIHIRA et al., 1987).

A transmissão via vertical ocorre possivelmente de três maneiras: infecção via transplacentária, contaminação via canal da parturiente durante o parto e pela amamentação (SUGIYAMA et al., 1986).

A transmissão via parenteral ocorre através da transfusão de sangue contaminado e seus derivados. No Japão, estudos mostraram que transfusão de componentes celulares infectados pelo HTLV-1, principalmente sangue total, concentrado de hemácias e plaquetas, resultaram em taxa de infecção de 64% (OKOCHI et al., 1984). Dentre os componentes celulares aquele que apresentou maior risco de transmissão foi o concentrado de plaquetas, possivelmente porque tal produto seja mais facilmente contaminado com linfócitos (DONEGAN, 1989).

A transmissão via horizontal acontece entre parceiros sexuais infectados e parece ser mais eficiente do homem para a mulher do que o inverso. Entende-se que a infecção adquirida através da atividade sexual seja resultado dos linfócitos infectados presentes no sêmen. Este tipo de contaminação ocorre principalmente na atividade sexual repetida entre homem e mulher. Estudos conduzidos no Japão indicaram que a probabilidade de transmissão do homem para a mulher é de 60,8% contra 0,4% de transmissão da mulher para o homem após 10 anos de relacionamento sexual (KAJIYAMA et al., 1986). Fatores de risco para transmissão sexual homem-mulher do HTLV-1 foram avaliados em doadores de sangue soropositivos e suas parceiras de longa duração. Os principais fatores associados a transmissão foram: duração do relacionamento, altos títulos de anticorpos anti-HTLV-1/2 e carga viral elevada (KAPLAN et al., 1996).

## 1.6 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

A infecção pelo HTLV-1 induz o hospedeiro a uma resposta imune, com produção de anticorpos dirigidos contra uma variedade de proteínas virais. O diagnóstico sorológico da infecção baseia-se na detecção desses anticorpos. Os primeiros ensaios desenvolvidos para pesquisa de anticorpos anti-HTLV-1 não apresentavam especificidade adequada, por causa da dificuldade inerente a separação de antígenos virais de proteínas celulares. Com a necessidade da testagem em pré-doadores de sangue, foram desenvolvidos vários testes comerciais para triagem após aperfeiçoamento da sua sensibilidade e especificidade. Em 1988, foram licenciados pela Agência reguladora de alimentos e medicamentos (*Food and Drug Administration* ou FDA) dos EUA, produtos para ensaios imunoenzimáticos (*Enzyme Linked immunosorbent assay* ou ELISA) de três fabricantes: Abbott Laboratories, Dupont/Biotech e Cellular Products Inc. para testagem em pré-doadores de sangue (WILLIAMS; FANG; SANDLER, 1990).

Os ELISA para detecção de anticorpos anti-HTLV-1/2 são métodos eficientes em inquéritos soropidemiológicos e na triagem de pré-doadores de sangue. Ocasionalmente, um resultado positivo para detecção de anticorpos anti-HTLV-1/2 por meio de ELISA pode ser devido a presença de anticorpos inespecíficos circulantes, não relacionados à infecção por esses vírus. Dessa forma, testes adicionais devem ser realizados em amostras repetidamente positivas por ELISA para confirmação sorológica (ANDERSON et al, 1989).

A questão da confirmação sorológica da infecção pelo HTLV-1 foi objeto de estudo de um grupo de trabalho do FDA, com representantes de laboratórios de referência nesta área. Após comparação de resultados obtidos individualmente nesses laboratórios, utilizando-se um amplo painel representativo de soros, o grupo de trabalho concordou que a confirmação sorológica da infecção pelo HTLV-1 requeria a presença de anticorpos dirigidos contra as proteínas virais codificadas pelos genes *gag* (p24) e *env* (gp46 ou gp61). Soros sem reatividade para essas bandas virais foram considerados negativos, enquanto que soros com reatividade

parcial, mas não enquadrados nos critérios de positividade, foram considerados indeterminados (ANDERSON et al., 1990).

Para o diagnóstico sorológico da infecção, segundo critérios da OMS, são realizados testes de triagem (ELISA e aglutinação de partículas) e confirmatórios (*Western blot*, radioimunoprecipitação e Imunofluorescência indireta) (OSAME, 1990) (Quadro 1).

Para a etapa de triagem são utilizados os testes sorológicos, que detectam indiretamente o agente viral, isto é, visam à detecção de anticorpos contra o vírus (ELISA ou aglutinação de partículas). Os antígenos mais comumente utilizados nos testes disponíveis no mercado são aqueles encontrados no lisado viral do HTLV-1 e HTLV-2, além das proteínas recombinantes derivadas dos genes virais *env* e *gag*. Para confirmação da infecção, utiliza-se geralmente o teste *Western blot* (WB). Além de confirmar a infecção, é necessário discriminar se a mesma está sendo causada pelo HTLV-1 ou HTLV-2. Como os vírus possuem alto grau de similaridade genética entre si, é necessário enriquecer os testes com antígenos recombinantes específicos de cada vírus. O teste de imunofluorescência indireta (IFI) não é comercializado, o que limita a sua utilização. Em alguns casos, torna-se impossível a confirmação e a discriminação entre as infecções pelo HTLV-1 e HTLV-2 através do WB. Utilizam-se, nesses casos, os testes para detecção do genoma viral (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002).

Teste	Categoria
Teste imunoenzimático	triagem
Agglutinação de partículas (látex ou gelatina)	triagem
Imunofluorescência indireta	confirmatório
<i>Western blot</i>	confirmatório
Radioimunoprecipitação	confirmatório
Reação em cadeia da polimerase (PCR)	confirmatório

Quadro 1: Testes utilizados para o diagnóstico da infecção pelo HTLV-1

### 1.6.1 Ensaio imunoenzimático

O ELISA é um ensaio no qual são utilizados antígenos virais obtidos de cultura de células infectadas pelo HTLV-1 para sensibilizar a fase sólida. As amostras e os controles são incubados com os antígenos e eventuais anticorpos presentes nas amostras se ligam especificamente, formando o complexo imune ligado à fase sólida. A seguir, é colocada antiglobulina humana conjugada a enzima que se ligará especificamente ao complexo antígeno-anticorpo da fase sólida, caso este esteja presente. A reação é revelada pela adição do substrato, com desenvolvimento de cor nas reações positivas, proporcional a quantidade de anticorpos anti-HTLV 1/2 presentes nas amostras (TAGUSHI et al, 1983) (Figura 7).

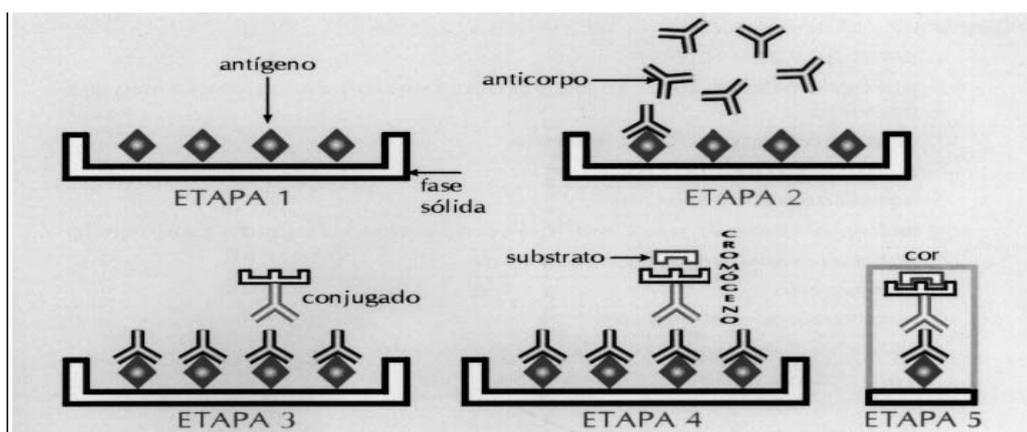


Figura 7: Seqüência da reação do ensaio imunoenzimático. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cd08\\_08.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cd08_08.pdf). [Acesso em: 29 dez. 2008]

### 1.6.2 Aglutinação de partículas

O método de aglutinação de partícula (AP) baseia-se no princípio da aglutinação indireta. Os antígenos virais parcialmente purificados, obtidos a partir de cultura de células, são adsorvidos às partículas de gelatina e os anticorpos anti-HTLV presentes na amostra reagem com esses antígenos, provocando a aglutinação das partículas (Figura 8). A reação é realizada em placas de microtitulação, utilizando-se como controle partículas não sensibilizadas. Com o uso de

partículas de gelatina com antígenos virais purificados adsorvidos como agentes sensibilizantes podem ser eliminadas as reações inespecíficas que, ocasionalmente, ocorrem em certas amostras. Nesse ultimo caso, essas amostras são adsorvidas com partículas não sensibilizadas e o teste é, então, repetido (IKEDA et al., 1984).

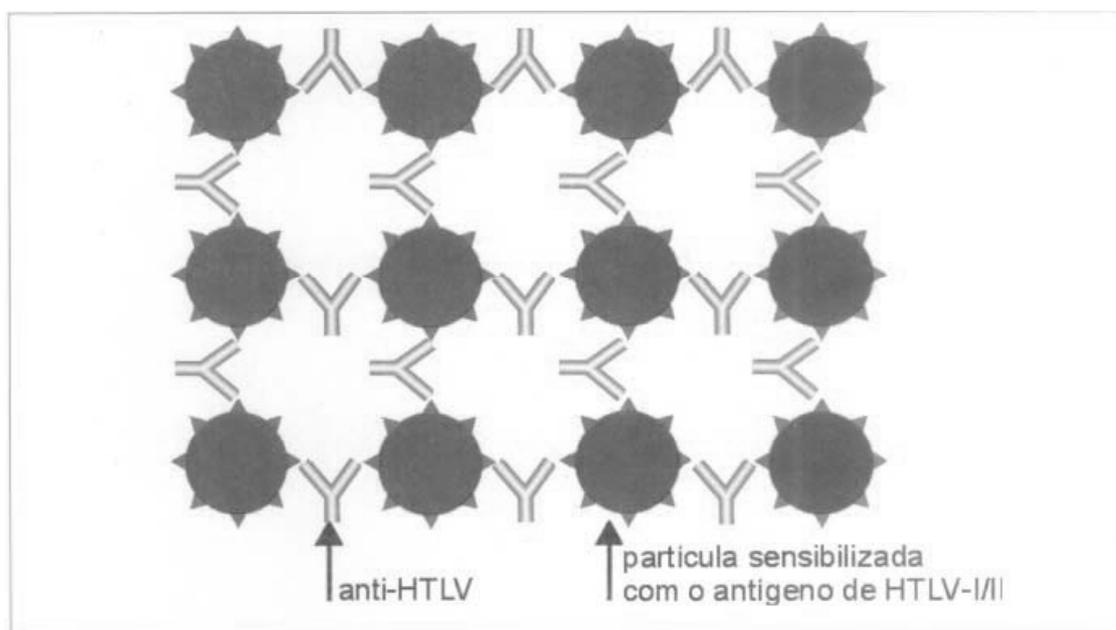


Figura 8: Reação de aglutinação de partículas. Disponível em: [URL:http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cd08\\_08.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cd08_08.pdf). [Acesso em: 29 dez. 2008]

### 1.6.3 Imunofluorescência indireta

Um dos primeiros ensaios desenvolvidos para pesquisa de anticorpos anti-HTLV-1 foi a imunofluorescência indireta (IFI) e tem sido usado para estudos de soroprevalência, principalmente no Japão, em conjunto com AP (HINUMA et al., 1981).

De acordo com a técnica de IFI, para a detecção de anticorpos anti-HTLV, células de linhagem MT-1 ou MT-2 infectadas com HTLV-1, ou MOT com HTLV-2, isto é, expressando antígenos virais, e células não infectadas são fixadas em lâminas que são incubadas com o soro a ser testado. Se a amostra em questão contiver anticorpos anti-HTLV, esses se ligarão aos antígenos virais presentes nas

células infectadas. A reação é revelada pela adição de antiglobulina humana conjugada ao isotiocianato de fluoresceína e evidenciada com o auxílio do microscópio de fluorescência (Figura 9). Uma reação positiva caracteriza-se pela visualização de fluorescência nas células infectadas. A observação de fluorescência em células não infectadas é indicativa de inespecificidade, em decorrência da presença de anticorpos contra estruturas celulares em algumas amostras (MERINO, 1992).

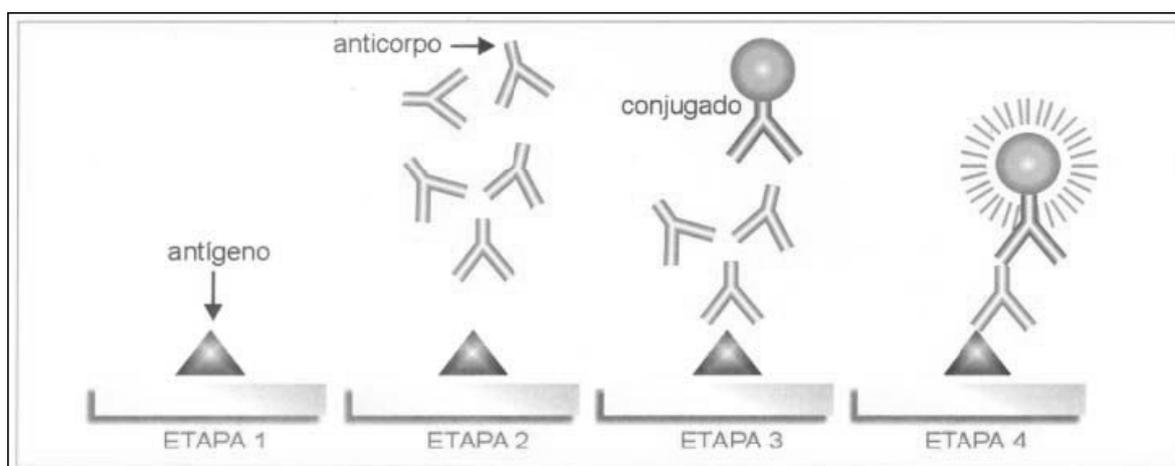


Figura 9: Seqüência da imunofluorescência indireta. Disponível em: [URL:http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cd08\\_08.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cd08_08.pdf). [Acesso em: 29 dez. 2008]

#### 1.6.4 *Western blot*

O princípio do teste WB para detecção de anticorpos anti-HTLV-1 e anti-HTLV-2 consiste no fato de que os polipeptídeos virais nativos do HTLV-1 são fracionados de acordo com o peso molecular por eletroforese em gel de poliácridamida em presença de dodecil sulfato de sódio. Os polipeptídeos separados são, então, transferidos eletroforeticamente do gel para uma membrana de nitrocelulose. A membrana contendo as proteínas do vírus é lavada, bloqueada e cortada em tiras. Na prática diagnóstica, o teste inicia-se com a incubação dos soros sobre as fitas, sendo a reação antígeno-anticorpo revelada pela adição de uma antiglobulina humana conjugada a uma enzima e do respectivo substrato (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979) (figura 10).

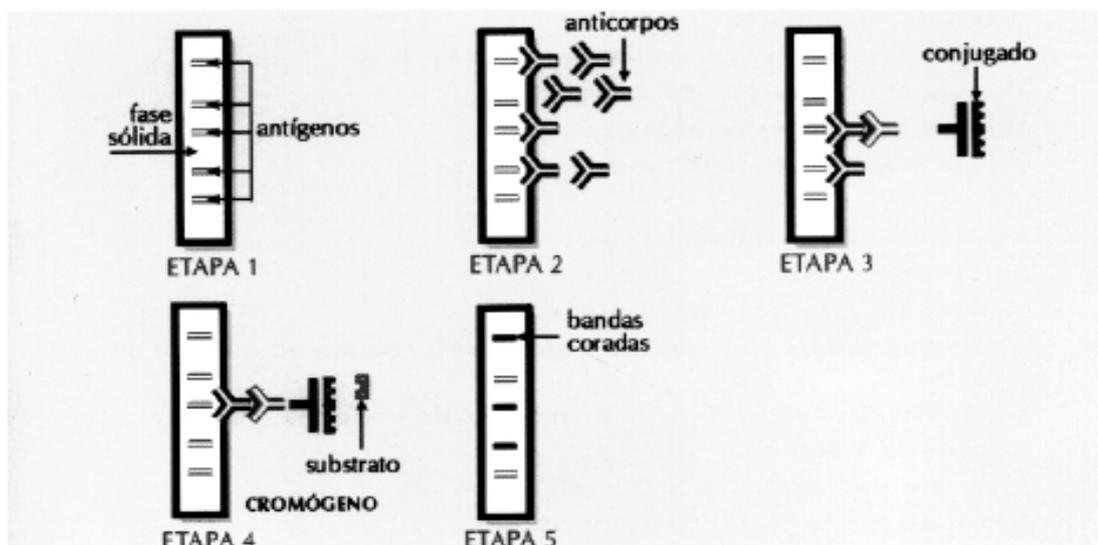


Figura 10: Sequência esquemática da reação do *Western blot*. Disponível em: [URL:http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cd08\\_08.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cd08_08.pdf). [Acesso em: 29 dez. 2008]

O teste WB (HTLV BLOT 2.4) foi desenvolvido para confirmação e diferenciação sorológica entre o HTLV-1 e HTLV-2. Fitas de nitrocelulose contendo proteínas virais nativas e proteínas recombinantes específicas são utilizadas neste ensaio, como as proteínas codificadas pelo gene *gag* (p19, p24, p26, p28, p32, p36, p53) e *env* (GD21, gp21, gp46, rgp46-I, rgp46-II). A interpretação do WB é feita pela análise da ausência ou presença de anticorpos contra proteínas virais, revelados no teste como bandas, comparando a intensidade das mesmas com a do controle positivo. São adotados os seguintes critérios: a) negativo: ausência de bandas; b) positivo: presença de pelo menos uma proteína do *env* mais a proteína p24 do *gag*; c) indeterminado: presença de bandas, mas que não se enquadram no critério de positividade (CDC, 1993). As amostras que apresentarem o padrão de positividade são determinadas como HTLV-1 ou HTLV-2 dependendo da sua reatividade com as proteínas recombinantes do gene *env* rgp46-I ou rgp46-II, respectivamente (GALLO; DIGGS; HANSON, 1994).

Na figura 11 é apresentado um exemplo de resultados do WB para HTLV-1 e HTLV-2.

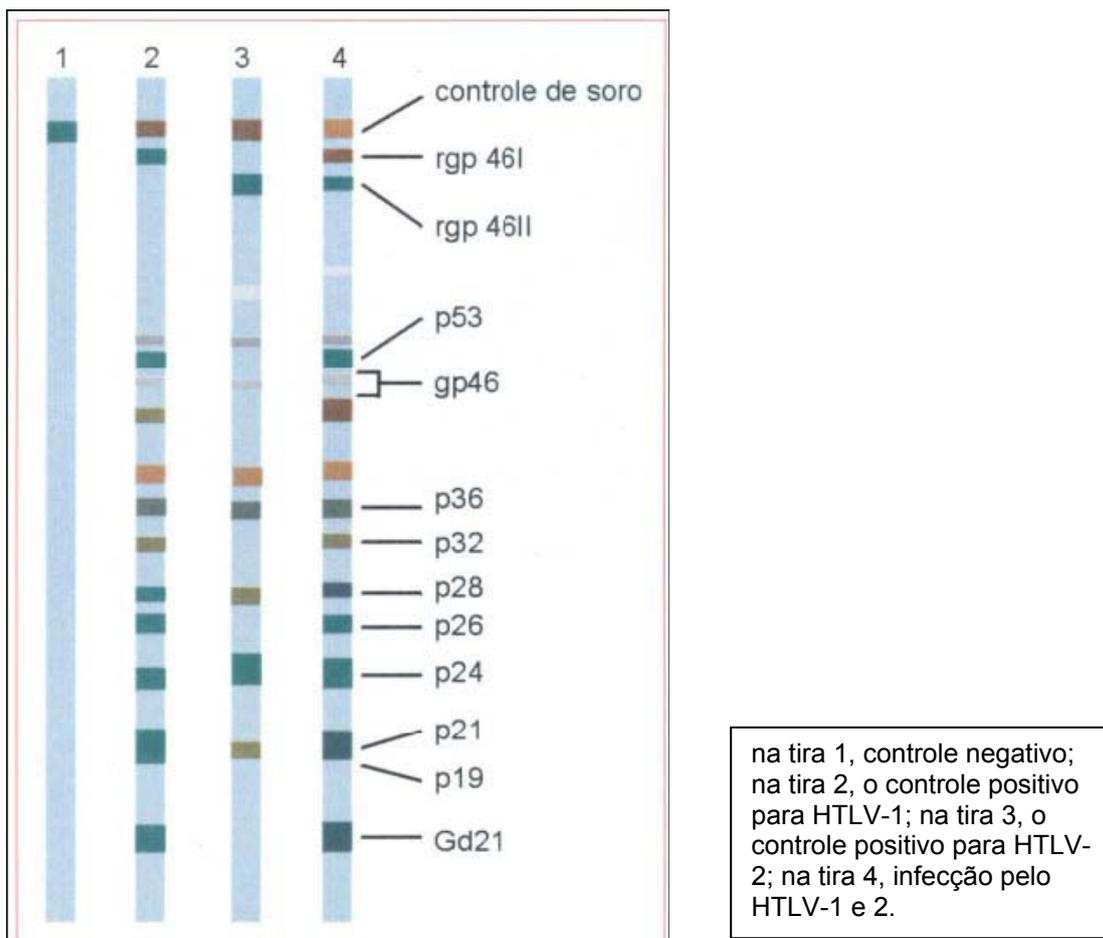


Figura 11: Exemplo de resultados de *Western blot*. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cd08\\_08.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cd08_08.pdf). [Acesso em: 29 dez. 2008]

### 1.6.5 Radioimunoprecipitação

A radioimunoprecipitação (RIPA) é uma técnica nas quais células infectadas com o HTLV-1 em sua fase *log* de crescimento são expostas a isótopos radioativos ( $^{35}\text{S}$ -Met), de modo a se obter um lisado celular solúvel que contém proteínas virais radiomarcadas. Os lisados celulares são colocados frente ao soro a ser testado pré-adsorvido a pérolas de Sepharose revestidas de proteína A. Os imunoprecipitados formados são eluídos e as proteínas virais são separadas por eletroforese em gel de poliácridamida contendo dodecilsulfato de sódio, e a revelação da reação é feita por autorradiografia. A RIPA é utilizada como teste confirmatório no soro, e apresenta alta sensibilidade para detecção de anticorpos direcionados contra as glicoproteínas do envelope (gp46 e gp61). Entretanto, a confirmação pela RIPA é inviável em áreas

onde o HTLV-1 é endêmico, por causa da sua complexidade e alto custo (HARTLEY et al., 1990; DEFER et al., 1995).

#### 1.6.6 Reação em cadeia da polimerase

A técnica da reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction* ou PCR) foi desenvolvida em 1986 e possui ampla aplicação em biologia molecular. O princípio da PCR baseia-se no mecanismo natural de duplicação do material genético, que ocorre sempre que uma célula se divide em duas novas. Ela é fundamentada na síntese enzimática de uma seqüência específica de DNA, usando dois iniciadores ou “*primers*” complementares a fita de DNA molde em regiões que flanqueiam o segmento a ser amplificado. Nesse processo, o DNA é desnaturado a temperatura de 94-96 °C, o que promove a separação da fita dupla em duas fitas simples e complementares de DNA. Esta fase é chamada de “desnaturação”. Os iniciadores hibridizam a temperatura de 37-65°C em seus segmentos complementares na fita de DNA molde desnaturada, fazendo o anelamento. A DNA polimerase é capaz de reconhecer esta fita dupla e deslizar sobre a fita produzindo a duplicação da fita-molde e promovendo a sua extensão. Estas três etapas constituem um ciclo e a repetição desse ciclo resulta em um acúmulo exponencial de fragmentos específicos, que tem a porção 5’ dos iniciadores como término. O acúmulo do material amplificado é exponencial, pois o produto sintetizado em um ciclo servirá como molde no ciclo subsequente, o que duplica a quantidade de DNA a cada ciclo. A síntese exponencial de DNA é determinada pela fórmula:  $(2^n - 2n)x$ , onde n é o número de ciclos, 2n é o produto primário e secundário com comprimento indeterminado, e x é igual ao número de cópias originais de DNA molde (SAIKI, 1988).

## 1.7 DOENÇAS ASSOCIADAS AO HTLV-1

Dentre as doenças etiologicamente associadas a infecção pelo HTLV-1, destacam-se a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL) (TAKATSUKI et al., 1977; UCHIYAMA et al., 1977) e a mielopatia associada ao HTLV-1/ paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) (GESSAIN et al, 1985).

Outras síndromes clínicas foram também descritas como manifestações da infecção pelo HTLV-1, dentre as quais: uveíte (MOCHIZUKI et al., 1996), polimiosite (MORGAN et al., 1989), artropatias e síndrome de Sjögren (NISHIOKA, 1996), dermatite infectiva associada ao HTLV-1 e outras dermatoses (LA GRENADE, 1996).

As diversas manifestações clínicas podem estar associadas ao tipo e a magnitude da resposta imune do hospedeiro frente aos antígenos do HTLV-1 e do sítio ou órgão no qual a reação inflamatória predominantemente ocorre. Contudo, o elemento chave em determinar a expansão policlonal das células T (doenças não-malignas) *versus* expansão monoclonal destas células (doenças neoplásicas) ainda não está bem estabelecido (WATTEL et al., 1995)

ATL e/ou HAM/TSP desenvolvem-se em uma pequena proporção de indivíduos infectados pelo HTLV-1. Cerca de 98% dos portadores permanecem assintomáticos (OKOCHI et al., 1984). Estudo mostrou que grande percentual da população japonesa é infectada pelo vírus, porém, o risco estimado para desenvolver ATL nestes portadores é de 2 a 4%, enquanto o risco para desenvolvimento de mielopatias é 0,25% durante toda a vida (KAPLAN et al., 1990).

Desde que os vírus isolados dos linfócitos de pacientes com ATL ou HAM/TSP são idênticos, fatores próprios do hospedeiro, incluindo o sistema antígeno leucocitário humano (*Human leukocyte antigen* ou HLA), devem ser importantes para determinar as manifestações da infecção. Pacientes com HAM/TSP apresentam intensa resposta imune aos antígenos do HTLV-1. Essa resposta está associada com determinado haplótipo de HLA e pode ser

demonstrada pela alta concentração de anticorpos contra o vírus no soro e LCR (SONODA et al., 1992).

### **1.7.1 Leucemia/linfoma de células T do adulto**

A leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL) foi descrita pela primeira vez por Takatsuki e outros (1977). Com base na classificação da OMS (2008) para neoplasias dos tecidos linfóide e hematopoético, a ATL é descrita como neoplasia de células T maduras (JAFFE et al, 2008). A principal distinção da ATL das demais doenças linfoproliferativas está na sua associação etiológica com o HTLV-1. Evidências dessa associação foram obtidas a partir da demonstração da integração monoclonal de DNA proviral nas células leucêmicas, sugerindo que o desenvolvimento da ATL foi resultado da transformação maligna de células previamente infectadas com HTLV-1 (YOSHIDA et al., 1984; BENNET et al., 1989).

### **1.7.2 Mielopatia associada ao HTLV-1 / Paraparesia espástica tropical**

Na década de 60, Montgomery e outros (1964) analisaram casos de paralisia atáxica e espástica, na Jamaica, que foram denominados de neuropatia jamaicana.

Posteriormente, Mani K.S., Mani A.J. and Montgomery (1969) publicaram 33 casos de uma condição de paraplegia espástica no sul da Índia. Essa condição ocorria em adultos, era de início gradual e caracterizava-se clinicamente por paraplegia progressiva. Pela primeira vez na literatura mundial foi dado o nome de “paraplegia espástica tropical” com a proposta de uma possível etiologia tóxica ou viral.

Na década de 80, observou-se um maior interesse por essa condição patológica. Zaninovic, Biojo y Barreto (1981) descreveram, na Colômbia, uma síndrome que consistia de distúrbios de marcha e espasticidade e a denominaram

de paraparesia espástica do Pacífico. Román e outros (1985) relataram 50 casos de paralisia espástica, também na Colômbia. No mesmo ano, na Martinica, Gessain e outros (1985) identificaram a presença de anticorpos anti-HTLV-1 em 10 de 17 pacientes com essa síndrome neurológica.

A soropositividade para HTLV-1 foi, posteriormente, demonstrada nos pacientes da Colômbia e Jamaica (RODGERS-JOHNSON et al., 1985). No Japão, esta síndrome recebeu a denominação de mielopatia associada ao HTLV-1 (HAM) (OSAME et al., 1986), e foi reconhecida como sendo a mesma doença que a paraparesia espástica tropical (TSP) (WHO, 1989).

A HAM/TSP é uma doença inflamatória crônica do sistema nervoso central (SNC). Caracteriza-se pelo acometimento da medula espinhal, principalmente torácica. Como consequência, surgem: fraqueza lentamente progressiva associada a dormência nos membros inferiores, dor lombar e retenção ou incontinência urinária (LINK et al., 1989; OSAME, 1990). A presença de anticorpos anti-HTLV-1 no LCR é característica da doença (OSAME et al., 1986; GESSAIN et al., 1988). Pode manifestar-se entre 20 e 70 anos de idade (McFARLIN; BLATTNER, 1991). Excepcionalmente, é observada em crianças (WHO, 1989). Além disso, é mais freqüente em mulheres do que em homens, na razão de 2,5 a 3:1. O grau de espasticidade é o principal fator limitante da marcha (NAKAGAWA et al., 1995). O exame neurológico revela paraparesia espástica associada a sinais piramidais como hiperreflexia, sinal de Babinski, clono e sinal de Hoffman (OSAME et al., 1997).

As alterações sensitivas nem sempre acompanham o quadro motor, embora o relato de disestesias e parestesias ao longo dos membros inferiores e, predominantemente, distais seja freqüente. A dor na região dorso-lombar constitui também sintoma comum, associada, muitas vezes, aos dermatômos acometidos ou manifestando-se com raquialgia ou dor segmentar. Lesões do cerebelo e do segundo neurônio motor foram descritas. Metade dos pacientes tornam-se limitados a cadeira de rodas em torno de 10 anos (CARTIER et al., 1997).

## 1.8 PATOGÊNESE DA HAM/TSP

A neuropatologia da HAM/TSP foi investigada e forneceu evidências de que os mecanismos imunomediados estão envolvidos no curso da doença. É importante que o quadro clínico, os dados neurorradiológicos e os achados neuropatológicos sejam correlacionados nestes pacientes. Descrições patológicas em materiais de autópsia de pacientes com HAM/TSP indicaram que a doença afeta a medula espinhal, predominantemente no nível torácico. Pode haver perda de mielina e axônios na coluna lateral e essas lesões são associadas com infiltração de linfócitos na região perivascular e no parênquima, com presença de macrófagos, proliferação de astrócitos e gliose (WU et al., 1993; LEVIN; JACOBSON, 1997).

No início da doença, os linfócitos são abundantes, com números iguais de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. Os linfócitos B e os macrófagos estão presentes em áreas com lesão no parênquima. No curso da doença, há poucas células inflamatórias, e estas são quase exclusivamente células T CD8<sup>+</sup> (LEVIN; JACOBSON, 1997). Estudos demonstraram que linfócitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos circulantes reagem contra proteínas do HTLV-1 de modo restrito ao complexo principal de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex* ou MHC) classe I (HLA-A2) em pacientes com mielopatias associadas ao HTLV-1, mas não reagem com as mesmas proteínas em portadores saudáveis ou pacientes com ATL. Entretanto, no LCR de pacientes com HAM/TSP, uma alta proporção de células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas para células infectadas pelo HTLV-1 são encontradas (JACOBSON et al., 1992).

## 1.9 CRITÉRIOS PARA O DIAGNÓSTICO DA HAM/TSP

O diagnóstico de HAM/TSP em pacientes infectados pelo HTLV-1 baseia-se em critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde em 1989 (Quadro 2).

#### Principais manifestações neurológicas

- Paraparesia espástica crônica, a qual progride lentamente, algumas vezes permanecendo estável após progressão inicial.
- Fraqueza de membros inferiores, de predomínio proximal.
- Incontinência urinária é geralmente um aspecto inicial, enquanto a constipação ocorre mais tardiamente; impotência ou diminuição da libido é comum.
- Sintomas sensitivos como sensação de formigamento e queimação são mais proeminentes do que os sinais físicos objetivos.
- Dor lombar com irradiação para as pernas é comum.
- Sensação de vibração é freqüentemente prejudicada, enquanto a propriocepção está menos freqüentemente afetada.
- Hiperreflexia de membros inferiores com clono e sinal de Babinski.
- Reflexo mandibular exaltado em alguns pacientes.

#### Achados neurológicos menos freqüentes

- Sinais cerebelares; atrofia óptica; surdez; nistagmo; outros déficits de nervos cranianos; tremor de mãos; ausência ou diminuição do reflexo Aquileu.
- Convulsões, disfunção cognitiva, demência ou alteração da consciência são manifestações raras.

#### Outras manifestações neurológicas, que podem estar associadas com HAM/TSP

- Atrofia muscular; fasciculações (raro); polimiosite, neuropatia periférica; polirradiculoneurite; neuropatia craniana; meningite; encefalopatia.
- Alveolite pulmonar; uveíte; síndrome de Sjögren; artropatia; vasculite; ictiose; crioglobulinemia; gamopatia monoclonal; leucemia/ linfoma de células T do adulto.

#### Diagnóstico laboratorial

- Presença de anticorpos anti HTLV-1 ou antígenos virais no sangue e LCR.
- LCR pode mostrar leve pleocitose.
- Linfócitos lobulados podem estar presentes no sangue e/ou no LCR.
- Aumento leve ou moderado de proteínas pode estar presente no LCR.
- Isolamento viral quando possível do sangue e/ou do LCR.

Quadro 2: Diagnóstico de HAM/TSP segundo recomendações da OMS, 1989

## 1.10 ANÁLISE DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO NA HAM/TSP

O exame do LCR é um método de extrema importância para o diagnóstico e acompanhamento evolutivo de diversas afecções do SNC (síndromes de origem vascular, síndromes inflamatórias, síndromes tumorais, síndrome de Guillain-Barré) (JEFFERY; BANGHAM, 1996).

A análise do LCR deve incluir, além da rotina básica (contagem de células, dosagem de glicose e de proteínas), a avaliação da barreira hemato-liquórica, a pesquisa da síntese intratecal de IgG total e de anticorpos específicos contra o HTLV-1 (PUCCIONI-SOHLER, 2008).

### 1.10.1 Avaliação da Barreira Hemato-liquórica

O estudo da relação entre a concentração de albumina no LCR e soro, ou seja, do quociente de albumina LCR/soro (Q Alb), permite a avaliação da função da barreira hemato-liquórica (V.R.Q Alb  $\leq 8 \times 10^{-3}$ ) (DEISENHAMMER, 2006).

$$Q \text{ Alb} = \text{albumina (LCR)} / \text{albumina (soro)} \times 10^{-3}$$

### 1.10.2 Síntese Intratecal de IgG Total

A síntese intratecal de IgG total é determinada quantitativamente através do índice de IgG [Q IgG (LCR/soro)/Q Albumina (LCR/soro)] com V.R. Índice de IgG  $\leq 0,7$ , ou pelo diagrama de quocientes, segundo Reiber and Felgenhauer (1987) (figura 12). Estas medidas baseiam-se na relação entre o quociente da concentração de IgG e o de albumina.

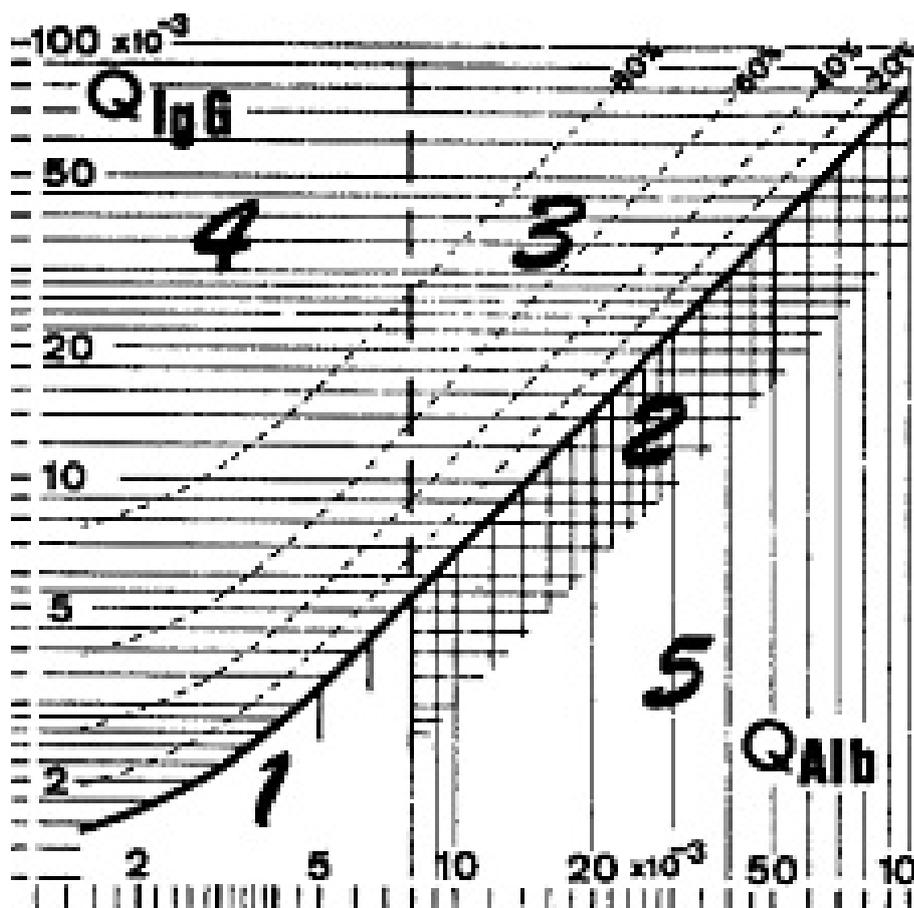


Figura 12: Diagrama de quocientes, segundo Reiber and Felgenhauer, 1987. Quociente limite – 0mg/L de síntese local de anticorpo. A síntese local para valores acima da linha limite é avaliada em mg/l. A linha pontilhada apresenta os valores IgG (log) em % da concentração de IgG no LCR. 1. Normal; 2. Disfunção da barreira hemato-LCR; 3. Síntese intratecal de IgG + disfunção da barreira hemato-LCR; 4. Síntese intratecal de IgG

Outro teste utilizado para verificação da síntese intratecal de IgG consiste na pesquisa de bandas oligoclonais no LCR em paralelo ao soro, pelo método qualitativo de focalização isoeletrica (FIE) (figura 13).

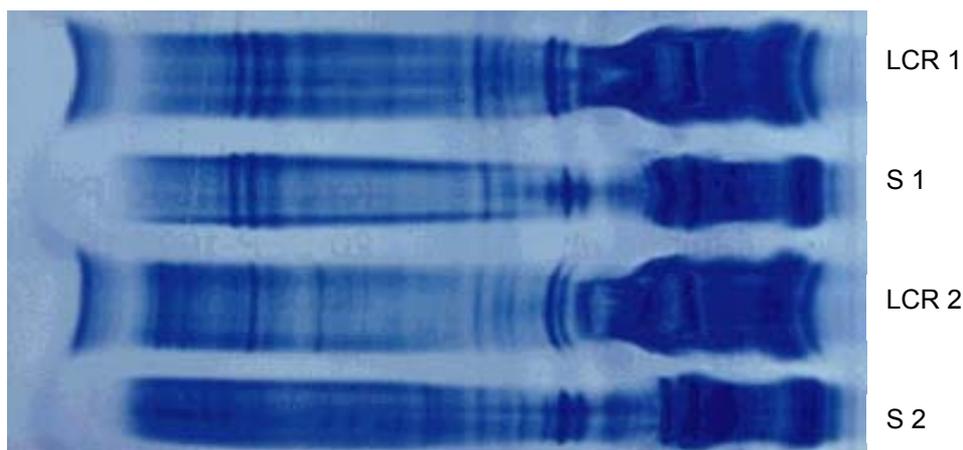


Figura 13: Bandas IgG oligoclonais. LCR, líquido cefalorraquiano; S, soro; Caso 1 – bandas adicionais no LCR; Caso 2 – bandas restritas ao LCR. Síntese intratecal de IgG

Esse método apresenta sensibilidade superior aos métodos quantitativos (índice de IgG e diagrama de quociente). As bandas representam frações oligoclonais de IgG sintetizadas no SNC por linfócitos localizados próximos as áreas de desmielinização, em resposta a presença contínua de um antígeno único e altamente específico. Os padrões de bandas encontrados são: 1. Ausência de bandas – LCR normal; 2. Bandas oligoclonais restritas ao LCR – síntese local; 3. Bandas oligoclonais restritas ao LCR e com adicionais bandas idênticas no LCR e soro – síntese local; 4. Bandas oligoclonais idênticas no LCR e soro; 5. Bandas monoclonais no LCR e soro (DEISENHAMMER, 2006).

### 1.10.3 Síntese Intratecal de Anticorpos Específicos

A demonstração da síntese intratecal de anticorpos específicos contribui para dar suporte ao diagnóstico das enfermidades neurológicas, diferenciando a fração de anticorpos sintetizados no SNC (PUCCIONI-SOHLER et al., 1999).

O índice de anticorpo específico (*Antibody index* ou AI) consiste na relação entre o quociente LCR/soro da concentração do anticorpo específico (analisado por ELISA) e o quociente LCR/soro da concentração de albumina ou imunoglobulina, dependendo da função da barreira hemato-LCR. AI maior ou igual a 1,5 é indicativo de síntese intratecal de anticorpo específico. Esta pode, também, ser determinada

pela comparação entre amostras de LCR e soro diluído para a mesma concentração de IgG do LCR, por meio de métodos qualitativos como *imunoblot*, RIPA e FIE (PUCCIONI-SOHLER, 2008).

#### 1.10.4 Características do LCR na HAM/TSP

Este se caracteriza pela presença de reação inflamatória, tais como: leve pleocitose ( $> 4$  células/mm<sup>3</sup>), sendo que 1% dos linfócitos apresenta aspecto atípico semelhante ao encontrado no sangue periférico e LCR de pacientes com ATL, denominados de “*flowers cells*” (OSAME, 1990); concentração de glicose normal (2/3 da glicemia); moderada hiperproteinorraquia; leve disfunção da barreira hemato-liquórica; síntese intratecal de IgG (elevado índice de IgG e/ou presença de banda IgG oligoclonal no LCR não encontrada no soro) (SPINA-FRANÇA et al., 1990).

No LCR, os anticorpos anti-HTLV-1 podem ser evidenciados através da demonstração da:

1. Presença de anticorpos específicos: ELISA, AP ou WB. Análise isolada do LCR.
2. Produção intratecal de anticorpo anti-HTLV-1: AI, RIPA, FIE ou *imunoblot*. Análise em paralelo do LCR e soro, com a mesma metodologia.

A demonstração de anticorpos específicos no LCR não permite determinar se estes são produzidos no SNC ou provém do sangue pela passagem através da barreira hemato-liquórica (McLEAN; RUDGE; THOMPSON, 1989; KITZE et al., 1995; PUCCIONI-SOHLER; KITZE; FELGENHAUHER, 1995). Para tanto, faz-se necessário correlacionar os valores do LCR ao soro, considerando a função da barreira hemato-liquórica. O AI é um método quantitativo utilizado para demonstrar a síntese intratecal de anticorpos anti-HTLV-1. Com base no teste de AI para HTLV-1 (ELISA “*in house*”), síntese intratecal de anticorpos contra HTLV-1 ocorreu em 85% dos pacientes (17/20) com HAM/TSP (PUCCIONI-SOHLER et al., 1995). Puccioni-Sohler e outros (2001) calcularam o AI para HTLV-1, adaptando um teste de ELISA comercial e obtiveram freqüência de 83% em outra população de pacientes (60/72)

com HAM/TSP. RIPA (KITZE et al., 1995) e imunofocalização (GESSAIN et al., 1988; GRIMALDI et al., 1988) são métodos qualitativos, também utilizados para avaliação de síntese intratecal de anticorpos anti-HTLV-1 (PUCCIONI-SOHLER, 2008).

Trabalho prévio adaptou o teste WB para avaliação de síntese intratecal de anticorpo específico contra as proteínas *gag* e *env* do HTLV-1. O protocolo do teste foi repetido cinco vezes em dias diferentes, sendo obtido o mesmo padrão de resultado em todas as repetições. Foi demonstrada a síntese intratecal de anticorpos anti-*gag* e anti-*env* do HTLV-1 por meio do teste WB (método qualitativo) em uma paciente com diagnóstico de HAM/TSP. Na análise por WB, usando concentração iguais de IgG no LCR e soro, diluições realizadas de 1:2 e 1:4 mostraram que bandas das proteínas *gag* (p24) e *env* (gp21, rgp46-I e GD21) apresentavam impregnação mais intensa no LCR do que no soro correspondente (GONÇALVES, 2007).

## 2 JUSTIFICATIVA

A demonstração da síntese intratecal de anticorpos específicos contribuiu para a maior acurácia no diagnóstico de uma variedade de doenças neurológicas, permitindo discriminar a fração de anticorpos provenientes do sangue daquelas sintetizadas no SNC (REIBER; FELGENHAUER, 1987). Entretanto, novas pesquisas serão necessárias no sentido de elucidar o papel destes anticorpos na patogênese e no diagnóstico da HAM/TSP.

O diagnóstico da HAM/TSP baseia-se em critérios clínicos e laboratoriais. A confirmação laboratorial consiste na demonstração de anticorpos anti-HTLV-1 no LCR. A demonstração desses anticorpos é pouco específica, pois pode ser verificada no LCR de pacientes com infecção pelo HTLV-1 sem HAM/TSP (PUCCIONI-SOHLER et al., 2001). A avaliação da síntese intratecal de anticorpo específico tem demonstrado ser um critério útil no diagnóstico neurológico pela sua elevada sensibilidade e especificidade (REIBER; FELGENHAUER, 1987).

A demonstração da síntese intratecal de anticorpo anti-HTLV-1 reflete a reação imune dirigida contra esse agente viral (PUCCIONI-SOHLER et al., 1999), e representa o parâmetro mais sensível da reação inflamatória que ocorre no SNC (PUCCIONI-SOHLER et al., 2001).

Conforme revisão da literatura, observamos a carência de testes e padronização para pesquisa de síntese intratecal de anticorpos específicos produzidos no LCR contra o HTLV-1. Para análise da resposta inflamatória específica no LCR é necessária a demonstração dessa produção local de anticorpos. O teste WB é usualmente utilizado como teste confirmatório no soro. Por ser um teste de pesquisa de anticorpos específicos pode contribuir para demonstração da síntese intratecal desses anticorpos, permitindo identificar contra quais proteínas virais está sendo produzida a resposta imune local, e assim, podendo representar uma importante ferramenta no diagnóstico da HAM/TSP.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o teste *Western Blot*, validado para pesquisa de anticorpos anti-HTLV-1 no soro, para demonstração da síntese intratecal de anticorpos anti-HTLV-1, como apoio no diagnóstico da HAM/TSP.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a sensibilidade e a especificidade do teste *Western blot* para demonstração da síntese intratecal de anticorpos anti-HTLV-1;
- Determinar o valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) do teste *Western blot* para demonstração da síntese intratecal de anticorpos anti-HTLV-1;
- Identificar contra quais proteínas virais está sendo produzida a resposta imune no SNC;
- Observar a reprodutibilidade do teste em uma amostra pareada de LCR e soro de paciente com HAM/TSP, realizado em dois locais distintos.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de estudo descritivo com delineamento transversal.

### 4.2 TESTE UTILIZADO

Para a detecção de anticorpos anti-HTLV-1 no soro e LCR, foi utilizado o teste WB (HTLV-BLOT 2.4, MP Diagnostics, MP Biomedicals Asia Pacific Pte Ltd. Cingapura), de acordo com as instruções do fabricante.

### 4.3 LOCAL DO ESTUDO E ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Imunologia e Aids do HUGG/UNIRIO em colaboração com o Laboratório de LCR do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho/ Universidade Federal do Rio de Janeiro – Universidade do Brasil (HUCFF/UFRJ), analisado e aprovado de acordo com a Resolução CNS nº 196/96, pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HUGG (Projeto nº 70/2007, MEMO CEP/HUGG/Nº013/2008) (Anexo A).

### 4.4 PACIENTES

Foram analisadas amostras residuais de um grupo de pacientes com HAM/TSP constituído por 14 pacientes, sendo seis do sexo masculino e oito do sexo

feminino, com idade entre 40 e 74 anos e mediana de 54 anos; e amostras residuais de um grupo de pacientes sem HAM/TSP (com outras doenças neurológicas) constituído por 16 pacientes, sendo oito do sexo masculino e oito do sexo feminino, com idade entre 19 e 77 anos e mediana de 41 anos (Tabela 1).

Tabela 1: Características demográficas da população estudada

Grupo de pacientes	nº Casos	SEXO		IDADE
		M	F	Mediana (Percentil)
HAM/TSP*	14	6 (43%)	8 (57%)	54 (40 - 74)
Outras doenças neurológicas	16	8 (50%)	8 (50%)	41 (19 - 77)

\*HAM/TSP, Mielopatia associada ao HTLV-1/ Paraparesia espástica tropical.

Das 16 amostras selecionadas de pacientes com HAM/TSP, duas foram excluídas da análise após revisão dos resultados (HAM09 e HAM11), a primeira por ter sido obtida após acidente de punção durante a coleta do LCR e a segunda por não obedecer aos critérios para diagnóstico de HAM/TSP.

Foram analisadas amostras pareadas de LCR e soro, selecionadas de 14 pacientes (Grupo 1) com diagnóstico de HAM/TSP atendidos no ambulatório de Neuroinfecção do HUGG e de 16 pacientes (Grupo 2) sem HAM/TSP, porém, com outras doenças neurológicas (Esclerose Múltipla, n = 5; três, Neurite Óptica, n = 3; Mielopatia de etiologia desconhecida, n = 2; Polineuropatia Sensitivo Motora, n = 1; Neurotuberculose, n = 1; Cerebelite pós viral, n = 1; Papilite, n = 1; Neuropatia, n = 1; Neurotoxoplasmose, n = 1), que realizaram exame de LCR como rotina para investigação diagnóstica, cujas amostras residuais foram armazenadas nos laboratórios de LCR do HUCFF - UFRJ e Laboratório Neurolife, de janeiro de 2005 a fevereiro de 2008.

#### 4.4.1 Critérios de inclusão

##### Grupo 1 – Pacientes com HAM/TSP

- Preencher os critérios de HAM/TSP;
- Paciente atendido no ambulatório de neuroinfecção do HUGG;
- Ter realizado exame completo de LCR;
- Ter volume mínimo de 1ml de LCR e soro estocados em freezer a -20°C.

##### Grupo 2 – Pacientes sem HAM/TSP (com outras doenças neurológicas)

- Não Preencher os critérios de HAM/TSP;
- Paciente atendido no ambulatório de neuroinfecção do HUGG ou que realizaram exame de LCR no laboratório Neurolife;
- Ter realizado exame completo de LCR;
- Ter volume mínimo de 1ml de LCR e soro estocados em freezer a -20°C.

#### 4.4.2 Critérios de exclusão para ambos os grupos

- Ter sofrido acidente de punção liquórica;
- Ter sífilis;
- Ter Infecção pelo HIV-1;
- Ter doença auto-imune, distúrbios tireoidianos, carência de vitamina B12;
- Ter síndromes compressivas da medula espinhal.

#### 4.5 PROTOCOLO DO TESTE

Foram realizadas quatro rotinas contendo cada uma oito pares de LCR e soro (diluído pra mesma concentração de IgG do LCR), um controle positivo e um controle negativo para HTLV-1 (Apêndices A, B, C e D).

#### 4.5.1 Preparação das amostras biológicas

Diluição do soro para a mesma concentração de IgG do LCR:

Com o objetivo de analisar amostras idênticas e, conseqüentemente, avaliar a origem da resposta imune, dividimos o resultado da concentração de IgG do soro sobre o LCR, para encontrar o fator de diluição que foi aplicado ao soro. As amostras de soro foram diluídas com a solução-tampão para *blotting* (Tabela 2).

As amostras de LCR e soro (diluído para mesma concentração de IgG do LCR) foram submetidas ao teste WB na diluição de 1:2, com solução-tampão para *blotting*, conforme protocolo previamente estabelecido (GONÇALVES, 2007).

Tabela 2: Valores do fator de diluição do soro para a mesma concentração de IgG do LCR dos pacientes estudados (n = 32)

HAM/TSP*	Fator de diluição	Outras doenças neurológicas	Fator de diluição
HAM01	68x	C01	572x
HAM02	237x	C02	353x
HAM03	483x	C03	362x
HAM04	264x	C04	177x
HAM05	307x	C05	600x
HAM06	198x	C06	550x
HAM07	299x	C07	304x
HAM08	160x	C08	417x
HAM09	108x	C09	667x
HAM10	185x	C10	600x
HAM11	344x	C11	379x
HAM12	277x	C12	310x
HAM13	515x	C13	183x
HAM14	113x	C14	820x
HAM15	174x	C15	270x
HAM16	392x	C16	636x

\*HAM/TSP, Mielopatia associada ao HTLV-1/ Paraparesia espástica tropical.

#### 4.5.2 Preparação dos reagentes do teste WB (de acordo com as instruções do fabricante)

##### a. Solução de Tampão de Lavagem Diluída:

- Diluir um volume de solução tampão para 19 volumes de água grau reagente.

##### b. Solução Tampão para *Blotting*:

- Reconstituir o frasco de tampão estoque liofilizado com 100 ml de água grau reagente, que se mantém estável durante 6 semanas se conservada entre 2°C e 8°C;
- Após reconstituição, adicionar 1 g de pó para *blotting* (leite desnatado) para cada 20 ml de solução tampão estoque reconstituída;

##### c. Solução de Conjugado de Trabalho:

- Diluir o conjugado a 1:1000 em solução tampão para blotting.

##### d. Solução de Substrato:

- Fornecida pronta para uso.

#### 4.5.3 Procedimento do teste WB

1. Com o auxílio de uma pinça, retiramos cuidadosamente o número necessário de tiras do tubo e as colocamos em cada poço com a face numerada voltada para cima. Incluímos tiras para o Controle Reativo e Não-reativo do HTLV-1;
2. Adicionamos 2 ml de solução tampão de lavagem diluída em cada poço;

3. Incubamos as fitas durante 5 minutos a temperatura ambiente ( $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) sobre uma plataforma oscilante (velocidade de 10 a 14 oscilações por minuto). Removemos a solução-tampão por aspiração;
4. Adicionamos 2 ml de solução- tampão para *blotting* em cada poço;
5. Adicionamos 20 $\mu\text{l}$  de cada amostra do paciente e de controle nos poços apropriados;
6. Cobrimos a bandeja com tampa fornecida pelo fabricante e incubamos durante 1 hora a temperatura ambiente ( $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) na plataforma oscilante;
7. Retiramos cuidadosamente a tampa, evitando salpicos ou misturar as amostras. Inclinaamos a bandeja para aspirar a mistura dos poços. Trocamos as ponteiros de aspiração entre as aplicações das amostras para evitar contaminação cruzada;
8. Lavamos cada fita 3 vezes com 2 ml de solução-tampão de lavagem diluída deixando-as imersas durante 5 minutos sobre a plataforma oscilante entre cada lavagem;
9. Adicionamos 2 ml de solução de conjugado de trabalho em cada poço;
10. Cobrimos a bandeja e incubamos durante 1 hora a temperatura ambiente ( $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) na plataforma oscilante;
11. Aspiramos o conjugado dos poços. Lavamos como na etapa 8;
12. Adicionamos 2 ml de solução de substrato em cada poço;
13. Cobrimos a bandeja e incubamos durante 15 minutos na plataforma oscilante;
14. Aspiramos o substrato e enxaguamos as tiras pelo menos três vezes com água grau reagente para interromper a reação;

15. Usamos a pinça para retirar cuidadosamente as tiras e colocá-las sobre toalhas de papel. Cobrimos as toalhas de papel e secamos, ou deixamos as fitas secarem nos poços da bandeja;

16. Montamos as fitas sobre folha de papel branco não absorvente (A4). Não aplicamos fita adesiva sobre as bandas reveladas. Observamos as bandas e interpretamos os resultados.

#### **4.5.4 Interpretação dos resultados**

Segundo os princípios de testes qualitativos de avaliação de síntese intratecal de imunoglobulinas, a presença de bandas mais intensas ou somente no LCR é consistente com a produção local de anticorpos anti-HTLV-1 no SNC.

#### **4.5.5 Desempenho do teste**

Procedemos a análise dos dados inseridos em uma tabela de contingência 2x2 para determinar os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) do teste (WB) estudado.

#### **4.5.6 Frequência da síntese intratecal de anticorpo contra diferentes proteínas do HTLV-1**

A frequência da síntese intratecal de anticorpos contra cada proteína viral antigênica foi determinada, para demonstrar quais anticorpos podem ser usados como marcadores para o diagnóstico da HAM/TSP.

#### **4.5.7 Reprodutibilidade**

Para avaliarmos a reprodutibilidade, enviamos uma amostra de soro e uma de LCR de paciente com HAM/TSP (HAM14), para que fosse avaliada a síntese intratecal de anticorpos anti-HTLV-1 no Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti (HEMORIO) utilizando a mesma metodologia (Apêndice E).

#### **4.5.8 Diluição adicional das amostras de soro e LCR (HAM13)**

As amostras pareadas de soro e LCR (HAM13) apresentaram bandas com coloração muito intensa no soro (diluído para mesma concentração de IgG do LCR) e LCR diluídos 1:2, sendo evidenciada síntese intratecal dirigida apenas contra gp46-I, o que implicou em diluições adicionais (Apêndice F).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 DESEMPENHO DO TESTE

Dos 14 pares de amostras (LCR e soro) de pacientes com HAM/TSP, todos apresentaram evidências de síntese intratecal dirigida contra pelo menos uma das proteínas virais (GD21, p24, rgp46-I), e 13 apresentaram evidências de síntese intratecal dirigida contra as proteínas virais do *env* (GD21) e do *gag* (p24). Um paciente apresentou bandas no soro e LCR com coloração muito intensa, apresentando síntese intratecal dirigida apenas contra rgp46-I, sendo necessárias diluições adicionais. Dos 16 pares de amostras de pacientes com outras doenças neurológicas, nenhum apresentou bandas reagentes para HTLV-1.

Na tabela 3 foram registrados os resultados do teste WB, tendo como critério de positividade para síntese intratecal de anticorpos a presença de banda mais intensa no LCR do que no soro ou presente apenas no LCR contra pelo menos uma proteína do HTLV-1, na amostra estudada.

Tabela 3: Freqüência de resultados do teste *Western blot* (síntese intratecal contra uma proteína do HTLV-1 como critério de positividade) na amostra estudada (n = 30)

MÉTODO	DIAGNÓSTICO DE HAM/TSP*	
	POSITIVO	NEGATIVO
<i>Western blot</i>		
POSITIVO	14 (100%)	0 (0%)
NEGATIVO	0 (0%)	16 (100%)
TOTAL	14 (100%)	16 (100%)

\* HAM/TSP, Mielopatia associada ao HTLV-1/ Paraparesia espástica tropical.

Na tabela 4 foram apresentados os valores de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN do teste *Western blot* para pesquisa de síntese intratecal de anticorpo anti HTLV-1, tendo como critério de positividade para síntese intratecal de anticorpos a presença de banda mais intensa no LCR do que no soro ou presente apenas no LCR contra pelo menos uma proteína do HTLV-1, na amostra estudada.

Tabela 4: Desempenho do teste *Western blot* (síntese intratecal contra uma proteína do HTLV-1 como critério de positividade) na amostra estudada (n = 30)

	<i>Western blot</i>	IC 95%*
Sensibilidade	100%	76,82 a 100
Especificidade	100%	79,42 a 100
Valor preditivo positivo	100%	76,82 a 100
Valor preditivo negativo	100%	79,42 a 100

\*IC 95%, intervalo de confiança de 95%.

Na tabela 5 foram registrados os resultados do teste WB, tendo como critério de positividade para síntese intratecal de anticorpos a presença de banda mais intensa no LCR do que no soro ou presente apenas no LCR contra pelo menos uma proteína *gag* e uma *env* do HTLV-1, na amostra estudada.

Tabela 5: Frequência de resultados do teste *Western blot* (síntese intratecal contra uma proteína *gag* e uma *env* do HTLV-1 como critério de positividade) na amostra estudada (n = 30)

MÉTODO	DIAGNÓSTICO DE HAM/TSP*	
	POSITIVO	NEGATIVO
<i>Western blot</i>		
POSITIVO	13 (93%)	0 (0%)
NEGATIVO	1 (7%)	16 (100%)
TOTAL	14 (100%)	16 (100%)

\* HAM/TSP, Mielopatia associada ao HTLV-1/ Paraparesia espástica tropical.

Na tabela 6 foram apresentados os valores de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN do teste *Western blot* para pesquisa de síntese intratecal de anticorpo anti HTLV-1, tendo como critério de positividade para síntese intratecal de anticorpos a presença de banda mais intensa no LCR do que no soro ou presente apenas no LCR contra pelo menos uma proteína *gag* e uma *env* do HTLV-1, na amostra estudada.

Tabela 6: Desempenho do teste *Western blot* (síntese intratecal contra uma proteína *gag* e uma *env* do HTLV-1 como critério de positividade) na amostra estudada (n = 30)

	<i>Western blot</i>	IC 95%*
Sensibilidade	92,86%	66,11 a 99,82
Especificidade	100%	79,42 a 100
Valor preditivo positivo	100%	75,31 a 100
Valor preditivo negativo	94,12%	71,33 a 99,85

\*IC 95%, intervalo de confiança de 95%.

## 5.2 FREQUÊNCIA DA SÍNTESE INTRATECAL DE ANTICORPOS CONTRA DIFERENTES PROTEÍNAS DO HTLV-1

Com o emprego do WB como ferramenta diagnóstica, demonstramos que a síntese intratecal de anticorpos ocorre, principalmente, contra as proteínas *env* (GD21 e RGP46-I) e *gag* (p24), sendo detectadas em cerca de 93% (13/14) dos pacientes com HAM/TSP e em nenhum dos controles quando analisadas isoladamente.

Tabela 7: Frequência da síntese intratecal de anticorpo contra diferentes proteínas do HTLV-1.

<i>Western blot</i> (bandas específicas)	Amostra (n = 14)	Frequência (%)
GD21	13	93
p24	13	93
rgp46-I	13	93
gp46	11	79
p19/gp21	10	77
p28	10	71
p36	10	71
p26	9	64
p53	8	57
p32	7	50

## 5.3 FREQUÊNCIA DA SÍNTESE INTRATECAL DE ANTICORPOS CONTRA AS PROTEÍNAS MAIS ANTIGÊNICAS, ISOLADAS OU EM COMBINAÇÃO

A detecção simultânea da síntese intratecal de anticorpos contra as proteínas GD21, rgp46-I e p24 foi observada em 86% (12/14) dos pacientes, em 7% (1/14) contra a GD21 e a p24, e em 7% (1/14) contra a RGP46-I isolada.

Tabela 8: Freqüência da síntese intratecal de anticorpos anti-GD21, anti-p24 e anti-rgp46-I do HTLV-1, isoladas ou em combinação

<i>Western blot</i> (bandas específicas)	Amostras (n = 14)	Freqüência (%)
GD21, rgp46-I e p24	12	86
GD21 e p24	1	7
rgp46-I isolada	1	7
GD21 e rgp46-I	0	0
rgp46-I e p24	0	0
GD21 isolada	0	0
P24 isolada	0	0

#### 5.4 REPRODUTIBILIDADE

A comparação dos resultados obtidos da avaliação de uma amostra pareada de LCR e soro de paciente com HAM/TSP nos dois ensaios demonstrou concordância, utilizando o mesmo protocolo em condições diferentes (local, técnico, equipamentos, lote e data).

A análise do soro revelou concordância na demonstração de bandas reagentes em 80% (8/10) da amostra estudada nos dois laboratórios, sendo discordantes para GD21 (positiva no HUGG e negativa no HEMORIO) e para p53 (negativa no HUGG e positiva no HEMORIO). A análise do LCR e da síntese intratecal de anticorpos revelou concordância de 100% (10/10).

Tabela 9: Comparação do padrão de *Western Blot* para HTLV-1 em soro e LCR da amostra HAM14, realizada no Laboratório do HUGG e no Laboratório do HEMORIO

<i>Western Blot</i> (bandas)	Resultado* (Laboratório do HUGG)			Resultado* (Laboratório do HEMORIO)		
	Soro	LCR	Síntese	Soro	LCR	Síntese
GD 21	+	++	+	-	++	+
p 19/gp 21	+	++	+	+	++	+
p 24	+	++	+	+	++	+
p 26	+	++	+	+	++	+
p 28	+	++	+	+	++	+
p 32	+	++	+	+	++	+
p 36	+	++	+	+	++	+
gp 46	-	++	+	-	++	+
p 53	-	++	+	+	++	+
rgp 46 – I	+	++	+	+	++	+

\*Expressão dos resultados: - ausência de banda; +, presença de banda; ++, banda mais intensa. HUGG, Hospital Universitário Gaffrée e Guinle; HEMORIO, Instituto de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti; LCR, Líquido cefalorraquiano.

## 5.5 DILUIÇÃO ADICIONAL DAS AMOSTRAS DE SORO E LCR (HAM13)

Amostras de LCR e soro foram enviadas ao HEMORIO e submetidas ao WB nas diluições de 1/2 e 1/4. Com a diluição de 1/2, o mesmo resultado encontrado no HUGG foi observado. Com a diluição de 1/4 a síntese intratecal de anticorpo anti-p53 (*gag*) e rgp46-I (*env*) do HTLV-1 foi evidenciada, sugerindo síntese intratecal contra outras proteínas virais (Apêndice F).

## 6 DISCUSSÃO

Estudos sobre a análise do LCR em pacientes com HAM/TSP mostraram alterações similares (banda oligoclonal, síntese intratecal de IgG) a outras doenças inflamatórias crônicas do SNC, como esclerose múltipla (EM) (OSAME et al., 1987; GESSIAN et al., 1988; LINK et al., 1989). Não existe consenso sobre o método de detecção de anticorpos anti-HTLV-1 no LCR em pacientes com HAM/TSP (NAKAMURA et al., 1991). É importante estabelecer a origem desses anticorpos, ou seja, se os anticorpos atravessaram a barreira hemato-liquórica, ou se foram produzidos dentro do SNC. Para demonstrar a síntese intratecal de anticorpo específico, métodos como FIE, *imunoblot*, ELISA e RIPA já foram usados. Os métodos utilizados para pesquisa de síntese intratecal de IgG total tais como índice de IgG total ou pesquisa de banda IgG oligoclonal total, embora capazes de demonstrar atividade inflamatória no SNC, não são capazes de provar que esta atividade é dirigida contra o HTLV-1. A pesquisa de síntese intratecal de anticorpos específicos constitui forte evidência da presença da reação imune contra o HTLV-1 no SNC (PUCCIONI-SOHLER et al., 1999).

Osame e outros (1987) analisaram a presença de anticorpos anti-HTLV-1 no LCR e soro de seis pacientes com HAM/TSP por meio de diferentes metodologias. O teste AP foi aplicado inicialmente no LCR e soro dos seis pacientes para dosar títulos de anticorpos anti-HTLV-1, com resultado positivo em todas as amostras. Os autores realizaram também o teste ELISA em todas as amostras e o critério de positividade incluiu absorvância  $> 0,06$  no soro e  $> 0,04$  no LCR. Todas as amostras foram positivas, com absorvâncias variando de 0,046 a 0,388. A análise por WB usando células MT2 confirmou a presença dos anticorpos anti-HTLV-1 em soro e LCR, com visualização das bandas p24 e p32 características no LCR de todos os pacientes estudados. A hipótese sobre associação entre a infecção pelo HTLV-1 e a mielopatia baseou-se nos seguintes achados: 1. Presença de altos títulos de anticorpos anti-HTLV-1 no soro e LCR, confirmados pelo WB; 2. Padrões de IgG específica no LCR com bandas características (WB) nos seis pacientes com HAM/TSP. Os autores demonstraram a presença de anticorpos anti-HTLV-1 no LCR, porém não identificaram se estes anticorpos foram produzidos no SNC.

Ceroni e outros (1988) analisaram soro e LCR de seis pacientes com HAM/TSP quanto à síntese intratecal de anticorpos anti-HTLV-1, pelo índice de anticorpo para HTLV-1, baseado na relação linear entre a concentração de anticorpos anti-HTLV-1 e da concentração de albumina no soro e LCR. Tal síntese foi demonstrada em todos os pacientes estudados. Estudaram três pares de soro e LCR e dois outros LCR, de acordo com o método de DÖRRIES & TER MEULEN (1984), quanto a presença de banda IgG oligoclonal específica do HTLV-1, observando nos pares um padrão da banda IgG oligoclonal no LCR, não encontrado no soro, compatível com síntese intratecal de anticorpo anti-HTLV-1. As duas amostras não pareadas de LCR também mostraram banda IgG oligoclonal específica. Duas amostras de LCR de um mesmo paciente obtidas com intervalo de seis meses foram analisadas em paralelo e mostraram o mesmo padrão de banda oligoclonal específica, sugerindo que os dados dão suporte ao envolvimento do HTLV-1 na patogênese da HAM/TSP. Os autores também demonstraram a síntese intratecal de anticorpo anti-HTLV-1 em seis pacientes com HAM/TSP, através do índice de anticorpo para HTLV-1. Em três desses, confirmaram esse achado através da detecção de bandas oligoclonais específicas do HTLV-1 no LCR e não encontradas no soro correspondente. Entretanto, não citaram quais as proteínas virais encontradas pelo método qualitativo utilizado, a FIE. Em nosso estudo, além de demonstrarmos a síntese intratecal de anticorpos específicos pela adaptação do método qualitativo WB, discriminamos contra quais proteínas do vírus a síntese intratecal ocorre em maior número de casos, assim como a ausência de resposta específica nos controles.

Grimaldi e outros (1988) demonstraram a presença de bandas oligoclonais no LCR (não evidenciadas no soro) de cinco pacientes com HAM/TSP, utilizando o método de FIE com coloração pela prata. Após a FIE, houve imunofixação em gel com anti-IgG humana específica para proteína p24 do HTLV-1. O anticorpo anti-p24 no LCR apresentava ponto de distribuição isoelétrica diferente do visto na amostra pareada de soro, indicando síntese local de anticorpo anti-p24 no SNC em todos os pacientes com HAM/TSP. Os autores concluíram que a banda oligoclonal presente no LCR de pacientes com HAM/TSP correspondia a atividade de anticorpo anti-p24, sugerindo a presença de infecção ativa pelo HTLV-1 no SNC. Em nosso estudo, encontramos síntese intratecal de anticorpo anti-p24 em 93% (13/14) dos pacientes

com HAM/TSP.

Gessain e outros (1988) investigaram amostras pareadas de soro e LCR de 19 pacientes com HAM/TSP. Anticorpos foram detectados por ELISA e confirmados por WB. Para a determinação dos títulos de anticorpos anti-HTLV-1 por ELISA, os autores utilizaram diluição serial em duplicata, no soro variando de 1:100 a 1:8000 e no LCR de 1:2 a 1:320, observando resultado positivo em todas as amostras estudadas. Para confirmação com WB, o soro foi diluído 1:200 e o LCR 1:20. Com WB, todos os soros foram reativos para p19, p24, p26, p28, p32, p36 e Pr53. No LCR, a reatividade contra o HTLV-1 foi principalmente direcionada para proteína p24, mas também em menor proporção para p19, p32, p36 e Pr53. Em todos os casos, se uma banda estava presente no LCR também estava presente no soro correspondente. Quatro pacientes que tiveram baixos títulos de anticorpos no LCR com ELISA, com WB claramente exibiram as bandas p19 e p24. A síntese intratecal de anticorpos anti-HTLV-1 foi demonstrada pelo aumento no índice de anticorpo anti-HTLV-1 / albumina (razão linear entre a concentração de anticorpos anti-HTLV-1 no LCR e soro divididos pela razão da concentração de albumina no LCR e soro), utilizando como ponto de corte valor igual a 2, em 16 dos 19 pacientes com HAM/TSP. Por meio desse método quantitativo foi possível demonstrar a síntese intratecal de anticorpo anti-HTLV-1 em 84% dos pacientes com HAM/TSP. Em nosso estudo, utilizamos um método qualitativo, o WB, o qual demonstrou síntese intratecal de anticorpos anti-HTLV-1 em 100% dos pacientes com HAM/TSP, assim como produção intratecal de anticorpos contra diferentes proteínas virais (*gag* e *env*).

Estudo realizado por Link e outros (1989), com amostras pareadas de LCR e soro com concentração de IgG ajustadas para 60mg/l, em 22 pacientes com HAM/TSP, investigou a presença de bandas oligoclonais de anticorpos anti-HTLV-1 através da FIE, seguido pelo *imunoblot*. Do grupo total, 19/22 (86,4%) pacientes apresentaram bandas oligoclonais de anticorpos anti-HTLV-1 no LCR e/ou soro. Dependendo da presença de banda no LCR comparado com o soro, os padrões observados foram divididos em três categorias: 1. Bandas oligoclonais de anticorpos anti-HTLV-1 exclusivas no LCR foram encontradas em cinco (26,3%) pacientes; 2. Nove (47,4%) pacientes apresentaram bandas oligoclonais de anticorpos anti-HTLV-1 no LCR, sendo que uma ou mais bandas também foram encontradas em

correspondência no soro; 3. Os cinco (26,3%) pacientes restantes apresentaram bandas oligoclonais de anticorpos anti-HTLV-1 idênticas no LCR e soro. Bandas oligoclonais de anticorpos anti-HTLV-1 exclusivas no LCR foram observadas em 14/19 (73,7%) dos pacientes testados, representando síntese intratecal de anticorpos anti-HTLV-1.

Amostras pareadas de LCR e soro de sete pacientes foram estudados por McLean e outros (1989). A pesquisa de bandas oligoclonais IgM e IgG específicas contra o HTLV-1 foi realizada com *imunoblot*. Cinco pacientes apresentaram bandas IgM negativas e IgG positivas no LCR e 2 pacientes apresentaram bandas IgM positivas e IgG negativas no LCR. Bandas oligoclonais IgM e IgG específicas contra o HTLV-1 não foram observadas no soro destes pacientes. Bandas oligoclonais específicas contra o HTLV-1 exclusivas no LCR representam uma prova da síntese intratecal de anticorpos anti-HTLV-1.

McKendall, Oas e Laimore (1991) revelaram, através do estudo de LCR e soro por *imunoblot*, reatividade para p19, p24, p53, gp46 ou gp68 do HTLV-1 em três pacientes com HAM/TSP. Além disso, amostras de LCR e soro de dois pacientes foram diluídos para igual concentração de IgG, e por *imunoblot* revelou maior intensidade da banda p24 no LCR em relação ao soro. Este achado demonstrou a produção intratecal de IgG anti-p24 do HTLV-1. Em nosso estudo, utilizando o WB demonstramos a produção intratecal de anticorpos anti-HTLV-1 contra diversas proteínas virais, evidenciando quais as proteínas com maior potencial antigênico.

Puccioni-Sohler e outros (1995) estudaram 20 casos de HAM/TSP e observaram a presença de síntese intratecal de anticorpo anti-HTLV-1 pelo método do índice de anticorpo específico (AI) em 85% (17/20) dos pacientes com HAM/TSP, utilizando como base um teste ELISA “*in house*” para HTLV-1. Utilizando a mesma série de pacientes, Kitze e outros (1995) demonstraram, com a RIPA, a presença de bandas típicas das proteínas *env* (gp 68) e *gag* (p24) do HTLV-1 nas amostras de LCR e soro de todos os pacientes. Para a análise da síntese intratecal de anticorpo específico por meio da RIPA, amostras de LCR e soro foram diluídas para igual concentração de IgG. Em seis pares de LCR e soro (30%), as bandas p24 e gp68

apresentaram precipitação mais intensa no LCR do que no soro correspondente, indicando síntese intratecal de anticorpos específicos nesses pacientes. Este estudo demonstrou que a síntese intratecal de anticorpos na HAM/TSP é dirigida contra os antígenos *env* e *gag* do HTLV-1. Porém, a RIPA encontra-se em desuso devido ao uso de radioatividade. Por outro lado, o teste WB é um teste comercial de fácil execução e foi capaz de evidenciar a síntese intratecal, discriminando as proteínas virais com maior sensibilidade em relação ao estudo de Kitze e outros (1995). Em nosso estudo, anticorpos anti-GD21, anti-p24 e anti-rgp46-I foram observados respectivamente em 93% (13/14) dos pacientes.

Kitze e outros (1996) investigaram a síntese intratecal de anticorpo específico pelo cálculo do índice de anticorpo específico (AI) para HTLV-1, utilizando o método ELISA para determinar a concentração de anticorpo peptídeo específico (painel de 16 peptídeos sintéticos) em 39 pacientes com HAM/TSP definida; 6 pacientes com HAM/TSP possível; e 15 pacientes portadores do HTLV-1 e sem sintomas clínicos de HAM/TSP. A síntese intratecal de anticorpos contra peptídeos específicos foi observada em 79 % dos pacientes com HAM/TSP, mas também em 20% dos pacientes sem HAM/TSP. O estudo revelou a reação dirigida contra proteínas *gag* (p19 100-130) e *env* (gp21 458-488, gp46 175-199 e 288-317) em cerca de 50% dos pacientes com HAM/TSP. O método utilizado demonstrou as proteínas virais que induziram a resposta imune no SNC. Mas, por sua complexidade não é possível sua aplicação na prática laboratorial, ficando seu uso restrito a pesquisa. Em nosso estudo a síntese intratecal de anti-p19/gp21 e anti-gp46 foram observadas em 77% (10/14) e 79% (11/14) dos pacientes estudados respectivamente, sendo a síntese intratecal de anti-GD21, anti-p24 ou anti-rgp-46-I observada em 93% (13/14) dos pacientes estudados.

Puccioni-Sohler e outros (2001) avaliaram o diagnóstico laboratorial da HAM/TSP utilizando três grupos de pacientes: grupo 1 - 72 pacientes com HAM/TSP; grupo 2 - 27 pacientes soropositivos para HTLV-1 com outras doenças neurológicas e grupo 3 - 13 pacientes com Esclerose Múltipla (EM). A síntese intratecal de anticorpos anti-HTLV-1 foi demonstrada, pelo método quantitativo do índice de anticorpo específico (AI) para HTLV-1 (REIBER; FELGENHAUER, 1987), com base no teste ELISA disponível comercialmente, em 83% (60/72) dos pacientes

do grupo 1, em 11% (3/27) dos pacientes do grupo 2 e em nenhum dos pacientes do grupo 3. O método apresentou sensibilidade de 83%, especificidade de 89%, VPP de 95% e VPN de 65% para o diagnóstico de HAM/TSP. Os autores propuseram a criação de um algoritmo para o diagnóstico laboratorial da HAM/TSP, incluindo o teste ELISA para detecção de anticorpos anti-HTLV-1 no LCR, AI para HTLV-1, pesquisa do DNA do HTLV-1 no LCR e pesquisa de banda IgG oligoclonal no LCR. Com a execução do algoritmo proposto, os autores relataram sensibilidade de 96%, especificidade de 100% , VPP de 100% e VPN de 92%. Dessa forma, a utilização do algoritmo melhorou a acurácia no diagnóstico laboratorial da HAM/TSP.

São poucas as metodologias propostas para estudo da síntese intratecal de anticorpos anti-HTLV-1 em pacientes com HAM/TSP. Na maioria dos estudos realizados, observamos o pequeno tamanho amostral e a falta de definição dos valores de sensibilidade e especificidade dos métodos utilizados. Somente um estudo possuía análise do método do índice de anticorpo específico (REIBER; FELGENHAUER, 1987), com determinação de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN para o diagnóstico da HAM/TSP, sendo necessária a combinação de métodos para aumentar a acurácia no diagnóstico laboratorial da HAM/TSP (PUCCIONI-SOHLER et al., 2001).

A literatura demonstrou a síntese intratecal contra proteínas *gag* (p19, p24) e *env* (gp21, gp46, gp68) por meio de métodos como a FIE, *imunoblot* e RIPA. Por meio do teste WB utilizado em nosso estudo, avaliamos a síntese intratecal de anticorpos anti-*gag* (p19, p24, p26, p28, p32, p36, p53) e anti-*env* (GD21, gp21, gp46, rgp46-I), permitindo demonstrar maior número de proteínas virais com potencial antigênico no SNC.

Em relação aos métodos qualitativos utilizados para avaliação de síntese intratecal de anticorpo específico, a RIPA tem limitações por utilizar radioatividade e ter custo elevado, sendo seu uso restrito a pesquisa. O uso da FIE “*in house*” para determinação de anticorpo específico precisa de validação e definição de sensibilidade e especificidade para ser usado como teste diagnóstico. Não houve registro do uso do teste WB com este fim.

A pesquisa de síntese intratecal de anticorpos contra HTLV-1 realizada com o WB foi de fácil execução, sendo necessária apenas a diluição do soro para a mesma concentração de IgG do LCR, seguida da diluição do LCR e soro (diluído para mesma concentração de IgG do LCR) na razão de 1:2 com solução-tampão para *blotting*. O teste foi, então, realizado como proposto pelo fabricante com soro e LCR pareados diluídos a 1:2. O desempenho mostrou-se adequado, com elevadas sensibilidade e especificidade, além de ser capaz de discriminar as proteínas virais envolvidas na resposta imune com maior reatividade no LCR.

O teste de WB demonstrou ser um instrumento útil para investigação da síntese intratecal de anticorpos anti-HTLV-1 em pacientes com HAM/TSP. A síntese intratecal de anticorpos anti-HTLV-1 foi evidenciada em 100% (14/14) dos pacientes estudados, e em nenhum dos pacientes soronegativos para HTLV-1 com outras doenças neurológicas. Além disso, o teste apresentou sensibilidade, especificidade, VPP e VPN de (100%), adequados para uso no auxílio diagnóstico da HAM/TSP.

## 7 CONCLUSÕES

Este foi o primeiro estudo da literatura médica que utilizou o teste *Western blot* para avaliação de síntese intratecal de anticorpos anti-HTLV-1 na HAM/TSP.

O teste *Western blot* apresentou excelentes sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da HAM/TSP.

Os valores preditivo positivo e preditivo negativo do teste *western blot* também foram considerados excelentes para o diagnóstico da HAM/TSP.

A síntese intratecal de anticorpos anti-HTLV-1 foi evidenciada por meio do *Western blot*, principalmente, para as proteínas *env* (GD21 e rgp46-I) e *gag* (p24).

A concordância entre os resultados obtidos da avaliação de uma amostra pareada de LCR e soro de paciente com HAM/TSP realizado em dois locais distintos foi observada, sugerindo a reprodutibilidade do teste.

A exemplo do critério de positividade do teste WB no soro, os autores sugerem a demonstração de síntese intratecal de anticorpos contra duas proteínas virais (*env* e *gag*) como teste confirmatório para HAM/TSP.

## REFERÊNCIAS

ANDERSON, D.W.; EPSTEIN, J.S.; LEE, T.H.; LAIRMORE, M.D.; SAXINGER, C.; KALYANARAMAN, V.S.; SLAMON, D.; PARKS, W.; POIESZ, B.J.; PIERIK, L.T. Serological confirmation of human T-lymphotropic virus type I infection in healthy blood and plasma donors. *Blood*. v. 74, n. 7, p. 2585-2591, 1989.

ANDERSON, D.W.; EPSTEIN, J.S.; PIERIK, L.T. et al. Development by the public health service of criteria for serological confirmation of HTLV-I/II infections. In: Blattner, W.A., *Human Retrovirology: HTLV*, Raven Press, New York, p. 391-396, 1990.

Anônimo. Guidelines for counselling persons infected with human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) and type II (HTLV-II). Center for Disease Control and Prevention and the U.S.P.H.S. Working Group. *Ann Intern Med*. v. 118, n. 6, p. 448-454, 1993.

BENNET, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.T.; FLANDRIN, G.; GALTON, D.A.; GRALNICK, H.R.; SULTAN, C. Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukemias. French-American-British (FAB) Cooperative Group. *J Clin Pathol*. v. 42, n.6, p. 567-584, 1989.

BIGLIONE, M.; PIZARRO, M.; CRESPO, O.; SEVERICH, I.; MARTÍNEZ PERALTA, L.; LIBONATTI, O.; MERCEDES AVILA, M.; ASTARLOA, L. High prevalence of HTLV-I infection in Argentinian blood donors: a new HTLV-I-endemic area? *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. v. 20, n. 1, p. 101-102, 1999.

BIGLIONE, M.; PIZARRO, M.; DEVITO, C.; GOMEZ, A.; SEVERICH, I.; MARTINEZ PERALTA, L. High prevalence of human T-cell leukaemia/lymphoma virus infection among blood-donors in Jujuy, northwest Argentina. In: 8<sup>a</sup> International Conference on Human Retrovirology: HTLV; 1997 June 9-13; Rio de Janeiro, Brazil.

BLATTNER, W.A.; SAXINGER, C.; RIEDEL, D.; HULL, B.; TAYLOR, G.; CLEGHORN, F.; GALLO, R.; BLUMBERG, B.; BARTHOLOMEW, C. A study of HTLV-I and its associated risk factors in Trinidad and Tobago. *J Acquir Immune Defic Syndr*. v. 3, n. 11, p.1102-1108, 1990.

CANN, A.J.; CHEN, I.S.Y. Human T-cell leukemia virus type I and II. In: Fields, B.N. et al. (eds). *Fields Virology*. 3<sup>rd</sup> edition. Raven Press: Philadelphia, v. 2, p. 1849-1880, 1996.

CARNEIRO-PROIETTI, A.B.; RIBAS, J.G.; CATALAN-SOARES, B.C.; MARTINS, M.L.; BRITO-MELO, G.E.; MARTINS-FILHO, O.A.; PINHEIRO, S.R.; ARAÚJO, A. de Q.; GALVÃO-CASTRO, B.; de OLIVEIRA, M.S.; GUEDES, A.C.; PROIETTI, F.A. Infecção e doença pelos vírus linfotrópicos humanos de células T (HTLV-I/II) no Brasil. *Rev Soc Bras de Med Trop.* v. 35, n. 5, p. 499-508, 2002.

CARTIER, L.M.; CEA, J.G.; VERGARA, C.; ARAYA, F.; BORN, P. Clinical and neuropathological study of six patients with spastic paraparesis associated with HTLV-I : an axomyelinic degeneration of the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol.* v. 56, n. 4, p. 403-413, 1997.

CASTRO, L.H.; CHAVES, C.J.; CALLEGARO, D.; NÓBREGA, J.P.; SCAFF, M. HTLV-I associated myelopathy in Brazil: a preliminary report. *Arq Neuropsiquiatr.* v. 47, n. 4, p. 501-502, 1989.

CAVALCANTI, M.; FERREIRA JÚNIOR, O.; PUCCIONI, M.; NOVIS, S.; SCHECHTER, M. HTLV-I-associated neurologic manifestation in four generations of a Brazilian family. *J Acquir Immune Defic Syndr.* v. 6, n. 2, p. 213-217, 1993.

CERONI, M.; PICCARDO, P.; RODGERS-JOHNSON, P.; MORA, C.; ASHER, D.M.; GAJDUSEK, D.C.; GIBBS, C.J. Jr. Intrathecal synthesis of IgG antibodies to HTLV-I supports an etiological role for HTLV-I in tropical spastic paraparesis. *Ann Neurol.* v. 23, p. 188-191, 1988. Suppl.

CIMARELLI, A.; DUCLOS, C.A.; GESSAIN, A.; CASOLI, C. ; BERTAZZONI, U. Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type II in patients with high proviral load. *Virology.* v. 223, n. 2, p. 362-364, 1996.

CORTES, E.; DETELS, R.,; ABOULAFIA, D.; LI, X.L.; MOUDGIL, T.; ALAM, M.; BONECKER, C.; GONZAGA, A.; OYAFUSO, L.; TONDO, M. HIV-1, HIV-2 and HTLV-I in high-risk groups in Brazil. *N Engl J Med.* v. 320, n. 15, p. 953-958, 1989.

COSTA, C.M.; SALGUEIRO, M.R.; CARTON, H.; DO VALE, O.C.; DE ARRUDA, A.M. Tropical spastic paraparesis in Northeastern Brazil. *Arq Neuropsiquiatr.* v. 47, n. 2, p. 134-138, 1989

de THÉ, G.; KAZANJI, M. An HTLV-I/II vaccine: from animal models to clinical trials? *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* v. 13, p. 191-198, 1996. Suppl 1.

DEFER, C.; COSTE, J.; DESCAMPS, F.; VOISIN, S.; LEMAIRE, J.M.; MANIEZ, M.; COUROUCE, A.M. Contribution of polymerase chain reaction and radioimmunoprecipitation assay in the confirmation of human T-lymphotropic virus infection in French blood donors. Retrovirus Study Group of the French Society of Blood Transfusion. *Transfusion*. v. 35, n. 7, p. 596-600, 1995.

DEISENHAMMER, F.; BARTOS, A.; EGG, R.; GILHUS, N.E.; GIOVANNONI, G.; RAUER, S.; SELLEBJERG, F.; EFNS TASK FORCE. Guidelines on routine cerebrospinal fluid analysis. Report from an EFNS task force. *Eur J Neurol*. v. 13, n. 9, p. 913-922, 2006.

DONEGAN, E.; Transfusion Safety Study (TSS) Group. Comparison of HTLV/II with HIV-1 transmission by component type and shelf storage before administration (Abstract). *Transfusion*. v. 29, p. 38, 1989. Suppl.

DÖRRIES, R.; TER MEULEN, V. Detection and identification of virus-specific oligoclonal IgG in unconcentrated cerebrospinal fluid by immunoblot technique. *J Neuroimmunol*. v. 7, n. 2-3, p. 77-89, 1984.

FRANCHINI, G. Molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I infection. *Blood*. v. 86, n. 10, p. 3619-3639, 1995.

GALLO, D.; DIGGS, J.L.; HANSON, C.V. Evaluation of two commercial human T-cell lymphotropic virus western blot (immunoblot) kits with problem specimens. *J Clin Microbiol*. v. 32, n. 9, p. 2046-2049, 1994.

GESSAIN, A.; BARIN, F.; VERNANT, J.C.; GOUT, O.; MAURS, L.; CALENDER, A.; de THÉ, G. Antibodies to human T-lymphotropic virus type I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet*. v. 2, n. 8452, p. 407-410, 1985.

GESSAIN, A.; CAUDIE, C.; GOUT, O.; VERNANT, J.C.; MAURS, L.; GIORDANO, C.; MALONE, G.; TOURNIER-LASSERVE, E.; ESSEX, M.; de-THÉ, G. Intrathecal synthesis of antibodies to human T lymphotropic virus type I and the presence of IgG oligoclonal bands in the cerebrospinal fluid of patients with endemic tropical spastic paraparesis. *J Infect Dis*. v. 157, n. 6, p. 1226-1234, 1988.

GONÇALVES, C.C.A. Avaliação e adaptação do teste *western blot* para análise do líquido cefalorraquiano na mielopatia associada ao HTLV-I / paraparesia espástica tropical. 92 f. Dissertação (Mestrado em Neurologia) – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

GRIMALDI, L.M.; ROOS, R.P.; DEVARE, S.G.; CASEY, J.M.; MARUO, Y.; HAMADA, T.; TASHIRO, K. HTLV-I-associated myelopathy: oligoclonal immunoglobulin bands contain anti-HTLV-I p24 antibody. *Ann Neurol.* v. 24, n. 6, p. 727-731, 1988.

HARTLEY, T.M.; KHABBAZ, R.F.; CANNON, R.O.; KAPLAN, J.E.; LAIRMORE, M.D. Characterization of antibody reactivity to human T-cell lymphotropic virus types I and II using immunoblot and radioimmunoprecipitation assays. *J Clin Microbiol.* v. 28, n. 4, p. 646-650, 1990.

HINUMA, Y.; KOMODA, H.; CHOSA, T.; KONDO, T.; KOHAKURA, M.; TAKENAKA, T.; KIKUCHI, M.; ICHIMARU, M.; YUNOKI, K.; SATO, I.; MATSUO, R.; TAKIUCHI, Y.; UCHINO, H.; HANAOKA, M. Antibodies to Adult T-cell leukemia-virus-associated antigen (ATLA) in sera from patients with ATL and controls in Japan: a nation-wide sero-epidemiologic study. *Int J Cancer.* v. 29, n. 6, p. 631-635, 1982.

HINUMA, Y.; NAGATA, K.; HANAOKA, M.; NAKAI, M.; MATSUMOTO, T.; KINOSHITA, K.I.; SHIRAKAWA, S.; MIYOSHI, I. Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v. 78, n. 10, p. 6476-6480, 1981.

HUNSMANN, G.; BAYER, H.; SCHNEIDER, J.; SCHMITZ, H.; KERN, P.; DIETRICH, M.; BÜTTNER, D.W.; GOUDEAU, A.M.; KULKARNI, G.; FLEMING, A.F. Antibodies to ATLV/HTLV-1 in África. *Med Microbiol Immunol.* v. 173, n. 3, p. 167-170, 1984.

IKEDA, M.; FUJINO, R.; MATSUI, T.; YOSHIDA, T.; KOMODA, H.; IMAI, J. A new agglutination test for serum antibodies to adult T-cell leukemia virus. *Gann.* v. 75, n. 10, p. 845-848, 1984.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Disponível em: <http://www.ictvonline.org>. [Acesso em: 18 fev. 2009].

JACOBSON, S.; McFARLIN, D.E.; ROBINSON, S.; VOSKUHL, R.; MARTIN, R.; BREWAH, A.; NEWELL, A.J.; KOENIG, S. HTLV-I specific cytotoxic T lymphocytes in the cerebrospinal fluid of patients with HTLV-I-associated neurological disease. *Ann Neurol.* v. 32, n. 5, p. 651-657, 1992.

JAFFE, E.S.; HARRIS, N.L.; STEIN, H.; ISAACSON, PG. Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood.* v. 112, n. 12, p. 4384-4399, 2008.

JEFFERY, K.J.M.; BANGHAM, C.R.M. Recent advances in the laboratory diagnosis of central nervous system infections. *Curr Opin Infect Dis.* v. 9, n. 2, p. 132-137, 1996.

KAJIYAMA, W.; KASHIWAGI, S.; NOMURA, H.; IKEMATSU, H.; HAYASHI, J.; IKEMATSU, W. Seroepidemiologic study of antibody to adult T-cell leukemia virus in Okinawa, Japan. *Ann J Epidemiol.* v. 123, n. 1, p. 41-47, 1986.

KAMIHIRA, S.; NAKASIMA, S.; OYAKAWA, Y.; MORIUTI, Y.; ICHIMARU, M.; OKUDA, H.; KANAMURA, M.; OOTA, T. Transmission of human T-cell lymphotropic virus type I by blood transfusion before and after mass screening of sera from seropositive donors. *Vox Sang.* v. 52, n. 1-2, p. 43-44, 1987.

KAPLAN, J.E.; KHABBAZ, R.F.; MURPHY, E.L.; HERMANSEN, S.; ROBERTS, C.; LAL, R.; HENEINE, W.; WRIGHT, D.; MATIJAS, L.; THOMSON, R.; RUDOLPH, D.; SWITZER, W.M.; KLEINMAN, S.; BUSCH, M.; SCHREIBER, G.B. Male-to-female transmission of human T-cell lymphotropic virus types I and II: association with viral load. Retrovirus epidemiology donor study group. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* v. 12, n. 2, p. 193-201, 1996.

KAPLAN, J.E.; OSAME, M.; KUBOTA, H.; IGATA, A.; NISHITANI, H.; MAEDA, Y.; KHABBAZ, R.F.; JANSSEN, R.S. The risk of development of HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* v. 3, n. 11, p. 1096-1101, 1990.

KITAGAWA, T.; FUJISHITA, M.; TAGUCHI, H.; MIYOSHI, I.; TADOKORO, H. Antibodies to HTLV-I in Japanese immigrants in Brazil. *JAMA.* v. 256, n. 17, p. 2342, 1986.

KITZE, B.; PUCCIONI-SOHLER, M.; SCHÄFFNER, J.; RIECKMANN, P.; WEBER, T.; FELGENHAUER, K.; BODEMER, W. Specificity of intrathecal IgG synthesis for HTLV-I core and envelope proteins in HAM/TSP. *Acta Neurol Scand.* v. 92, n. 3, p. 213-217, 1995.

KITZE, B.; USUKU, K.; IZUMO, S.; NAKAMURA, M.; SHIRAKI, H.; IJICHI, S.; YASHIKI, S.; FUJIYOSHI, T.; SONODA, S.; OSAME, M. Diversity of intrathecal antibody synthesis against HTLV-I and its relation to HTLV-I associated myelopathy. *J Neurol.* v. 243, n. 5, p. 393-400, 1996.

LA GRENADE, L. HTLV-I-associated infective dermatitis: past, present, and future. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* v. 13, p. 46-49, 1996. Suppl 1.

LAIMORE, M.D.; FRANCHINI, G. Human T-cell Leukemia Virus Types 1 and 2. In: Knipe, D.N.; Howley, P.M. *Fields Virology*. 5<sup>nd</sup>. Philadelphia, USA: Wolters Kluwer, 2007. chapter 56, p. 2071-2105.

LEE, H.; SWANSON, P.; SHORTY, V.S.; ZACK, J.A.; ROSENBLATT, J.D.; CHEN, I.S. High rate of HTLV-II infection in seropositive i. v. Drug abusers in New Orleans. *Science*. v. 244, n. 4903, p. 471-475, 1989.

LEVIN, M.C.; JACOBSON, S. HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP): a chronic progressive neurologic disease associated with immunologically mediated damage to the central nervous system. *J Neurovirol*. v. 3, n. 2, p. 126-140, 1997.

LINK, H.; CRUZ, M.; GESSAIN, A.; GOUT, O.; de THÉ, G.; KAM-HANSEN, S. Chronic progressive myelopathy associated with HTLV-I: oligoclonal IgG and anti-HTLV-I IgG antibodies in cerebrospinal fluid and serum. *Neurology*. v. 39, n. 12, p. 1566-1571, 1989.

MALONEY, E.M.; RAMIREZ, H.; LEVIN, A.; BLATTNER, W.A. A survey of human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) in south-western Colombia. *Int J Cancer*. v. 44, n. 3, p. 419-423, 1989.

MANI, K.S.; MANI, A.J.; MONTGOMERY, R.D. A spastic paraplegic syndrome in South India. *J Neurol Sci*. v. 9, n. 1, p. 179-199, 1969.

MANNS, A.; HISADA, M.; LA GRENADE, L. Human T-lymphotropic virus type infection. *Lancet*. v. 353, n. 9168, p. 1951-1958, 1999.

McFARLIN, D.E.; BLATTNER, W.A. Non-Aids retroviral infections in humans. *Annu Rev Med*. v. 42, p. 97-105, 1991.

McKENDALL, R.R.; OAS, J.; LAIMORE, M.D. HTLV-I-associated myelopathy endemic in Texas-born residents and isolation of virus from CSF cells. *Neurology*. v. 41, n.6, p. 831-836, 1991.

McLEAN, B.N.; RUDGE, P.; THOMPSON, E.J. Viral specific IgG and IgM antibodies in the CSF of patients with tropical spastic paraparesis. *J Neurol*. v. 236, n. 6, p. 351-352, 1989.

MERINO, N.V. Diagnóstico serológico del HTLV-I. In: Zaninovic, V.; Galindo, J.; Blank, A. *Enfermedades asociadas con el virus HTLV-I*. 1. ed. XYZ, Cali, Colombia. p. 14-15, 1992.

MOCHIZUKI, M.; ONO, A.; IKEDA, E.; HIKITA, N.; WATANABE, T.; YAMAGUCHI, K.; SAGAWA, K.; ITO, K. HTLV-I uveitis. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. v. 13, p. 50-56, 1996. Suppl 1.

MONTGOMERY, R.D.; CRUICKSHANK, E.K.; ROBERTSON, W.B.; McMENEMEY, W.H. Clinical and pathological observation on Jamaican neuropathy: a report of 206 cases. *Brain*. v. 87, p. 425-462, 1964.

MORENO-CARVALHO, O.A.; SANTOS, J.I.; DI CREDICO, G.; GALVÃO-CASTRO, B. Evidence of preferential female prevalence of HTLV-I associated tropical spastic paraparesis in Bahia-Brazil. *Arq Neuropsiquiatr*. v. 50, n. 2, p.183-188, 1992.

MORGAN, O.S.; RODGERS-JOHNSON, P.; MORA, C.; CHAR, G. HTLV-I and polymyositis in Jamaica. *Lancet*. v. 2, n. 8673, p. 1184-1187, 1989.

MURPHY, E.L.; FIGUEROA, J.P.; GIBBS, W.N.; HOLDING-COBHAM, M.; CRANSTON, B.; MALLEY, K.; BODNER, A.J.; ALEXANDER, S.S.; BLATTNER, W.A. Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) seroprevalence in Jamaica. I. Demographic determinants. *Am J Epidemiol*. v.133, n. 11, p. 1114-1124, 1991.

NAKAGAWA, M.; IZUMO, S.; IJICHI, S.; KUBOTA, H.; ARIMURA, K.; KAWABATA, M.; OSAME, M. HTLV-I associated myelopathy: analysis of 213 patients based on clinical features and laboratory findings. *J Neurovirol*. v. 1, n. 1, p. 50-61, 1995.

NAKAMURA, M.; KUROKI, M.; KIRA, J.; ITOYAMA, Y.; SHIRAKI, H.; KURODA, N.; WASHITANI, Y.; NAKANO, S.; NAGAFUCHI, S.; ANZAI, K. et al. Elevated antibodies to synthetic peptides of HTLV-I envelope transmembrane glycoproteins in patients with HAM/TSP. *J Neuroimmunol*. v. 35, n. 1-3, p. 167-177, 1991.

NISHIOKA, K. HTLV-I arthropathy and Sjögren syndrome. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. v. 13, p. 57-62, 1996. Suppl.

OKOCHI, K.; SATO, H.; HINUMA, Y. A retrospective study on transmission of adult T-cell leukemia virus by blood transfusion: seroconversion in recipients. *Vox Sang*. v. 46, n. 5, p. 245-253, 1984.

OSAME, M. Review of WHO Kagoshima meeting and diagnostic guidelines for HAM/TSP. In: Blattner, W.A., *Human Retrovirology: HTLV*. New York: Raven Press. p.191-197, 1990.

OSAME, M.; MATSUMOTO, M.; USUKU, K.; IZUMO, S.; IJICHI, N.; AMITANI, H.; TARA, M.; IGATA, A. Chronic progressive myelopathy associated with elevated antibodies to human T-lymphotropic virus type I and adult T-cell leukemialike cells. *Ann neurol.* v. 21, n. 2, p. 117-122, 1987.

OSAME, M.; NAKAGAWA, M.; UMEHARA, F.; IJICHI, S.; MORITOYO, T.; HIGUCHI, I.; USUKU, K.; ARIMURA, K.; IZUMO, S. Recent studies on the epidemiology, clinical features and pathogenic mechanisms of HTLV-I associated myelopathy (HAM/TSP) and other diseases associated to HTLV. *J Neurovirol.* v. 3, p. 50-51, 1997. Suppl 1.

OSAME, M.; USUKU, K.; IZUMO, S.; IJICHI, N.; AMITANI, H.; IGATA, A.; MATSUMOTO, M.; TARA, M. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet.* v. 1, n. 8488, p. 1031-1032, 1986.

POIESZ, B.J.; RUSCETTI, F.W.; GAZDAR, A.F.; BUNN, P.A.; MINNA, J.D.; GALLO, R.C. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v. 77, n. 12, p. 7415-7419, 1980.

PROIETTI, F.A.; CARNEIRO-PROIETTI, A.B.; CATALAN-SOARES, B.C.; MURPHY, E.L. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene.* v. 24, n. 39, p. 6058-6068, 2005.

PUCCIONI-SOHLER, M. Diagnóstico de Neuroinfecção: com abordagem dos exames do líquido cefalorraquidiano e neuroimagem. Rio de Janeiro: Rubio, 2008.

PUCCIONI-SOHLER, M.; KITZE, B.; FELGENHAUER, K. HTLV-I associated myelopathy in patients from Brazil and Iran: neurological manifestations and cerebrospinal fluid findings. *Arq Neuropsiquiatr.* v. 53, n. 2, p. 213-217, 1995.

PUCCIONI-SOHLER, M.; RIOS, M.; BIANCO, C.; ZHU, S.W.; OLIVEIRA, C.; NOVIS, S.A.; POMBO-DE-OLIVEIRA, M.S. An inverse correlation of HTLV-I viral load in CSF and intrathecal synthesis of HTLV-I antibodies in TSP/HAM. *Neurology.* v. 53, n. 6, p. 1335-1339, 1999.

PUCCIONI-SOHLER, M.; RIOS, M.; CARVALHO, S.M.; GONÇALVES, R.R.; OLIVEIRA, C.; CORREA, R.B.; NOVIS, S.; de OLIVEIRA, M.S.; BIANCO, C. Diagnosis of HAM/TSP based on CSF proviral HTLV-I DNA and HTLV-I antibody index. *Neurology*. v. 57, n. 4, p. 725-727, 2001.

REIBER, H.; FELGENHAUER, K. Protein transfer at the blood cerebrospinal fluid barrier and the quantification of the humoral immune response within the central nervous system. *Clin Chem Acta*. v. 163, n. 3, p. 319-328, 1987.

RODGERS-JOHNSON, P.; GAJDUSEK, D.C.; MORGAN, O.S.; ZANINOVIC, V.; SARIN, P.S.; GRAHAM, D.S. HTLV-I and HTLV-III antibodies and tropical spastic paraparesis. *Lancet*. v. 2, n. 8466, p. 1247-1248, 1985.

ROMÁN, G.C.; ROMÁN, L.N.; SPENCER, P.S.; SCHOENBERG, B.S. Tropical spastic paraparesis: a neuroepidemiological study in Colombia. *Ann Neurol*. v. 17, n. 4, p. 361-365, 1985.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. v. 239, n. 4839, p. 487-491, 1988.

SEIKE, M.; HATTORI, S.; HIRAYAMA, Y.; YOSHIDA, M. Human adult T-cell leukemia virus: Complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v. 80, n. 12, p. 3618-3622, 1983.

SONODA, S.; YASHIKI, S.; FUJIYOSHI, T. Immunogenetics factors involved in the pathogenesis of adult T-cell leukemia and HTLV-I associated myelopathy. In: Takatsuki, K.; Hinuma, Y.; Yoshida, M. Advances in adult T-cell leukemia and HTLV-I research. *Gann Monograph Cancer Research*. v. 39, p. 81-93, 1992.

SPINA-FRANÇA, A.; LIVRAMENTO, J.A.; MACHADO, L.R.; GOMES, H.R.; VIANNA, L.S.; CASTRO, L.H.; NÓBREGA, J.P.; BACHESCHI, L.A. HTLV-I antibodies in serum and cerebrospinal fluid in tropical spastic paraparesis in Brazil. *Arq Neuropsiquiatr*. v. 48, n. 4, p. 441-447, 1990.

SUGIYAMA, H.; DOI, H.; YAMAGUCHI, K.; TSUJI, Y.; MIYAMOTO, T.; HINO, S. Significance of postnatal mother-to-child transmission of human T-lymphotropic virus type-I on the development of adult T-cell leukemia/lymphoma. *J Med Virol*. v. 20, n. 3, p. 253-260, 1986.

TAGUSHI, H.; SAWADA, T.; FUJISHITA, M.; MORIMOTO, T.; NIIYA, K.; MIYOSHI, I. Enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies to adult T-cell leukemia associated antigen. *Gann*. v. 74, n. 2, p. 185-187, 1983.

TAKATSUKI, K.; UCHIYAMA, T.; SAGAWA, K.; YODOI, J. Adult T-cell leukemia in Japan. In; Seno, S.; Takaku, F.; Irino, S. Eds. *Topics in Hematology*. Amsterdam : *Excepta Medica*. p. 73-77, 1977.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electroferetic tranfer of protein from polyacrilamyde gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci. U S A*. v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

TSUGANE, S.; WATANABE, S.; SUGIMURA, H.; OTSU, T.; TOBINAI, K.; SHIMOYAMA, M.; NANRI, S.; ISHII, H. Infectious states of human T lymphotropic virus type I and hepatitis B virus among Japanese immigrants in the Republic of Bolivia. *Am J Epidemiol*. v. 128, n. 5, p. 1153-1161, 1988.

UCHIYAMA, T.; YODOI, J.; SAGAWA, K.; TAKATSUKI, K.; UCHINO, H. Adult T-cell leukemia : clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood*. v. 50, n. 3, p. 481-492, 1977.

VARMUS, H.; SWANSTRON, R. Replication of retroviruses. In: Weiss, R. et al. *RNA tumor viruses*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. p. 369.  
VERDIER, M.; DENIS, F.; SANGARÉ, A.; BARIN, F.; GERSHY-DAMET, G.; REY, J.L.; SORO, B.; LÉONARD, G.; MOUNIER, M.; HUGON, J. Prevalence of antibody to human T leukemia virus type 1 (HTLV-1) in population of Ivory Coast, West Africa. *J Infect Dis*. v. 160, n. 3, p. 363-369, 1989.

VERONESI, R. HTLV e Doenças associadas. In: Veronesi, R. *Tratado de Infectologia*. São Paulo: Atheneu, 1997. p. 400-422.

WATTEL, E.; CAVROIS, M. ; GESSAIN, A.; WAIN-HOBSON, S. Clonal expansion of infected cells: a way of life for HTLV-I. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. v. 13, p. 92-99, 1996. Suppl.

WATTEL, E.; VARTANIAN, J.P.; PANNETIER, C.; WAIN-HOBSON, S. Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type I-infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. *J Virol*. v. 69, n. 5, p. 2863-2868, 1995.

WHO (World Heath Organization) WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL RECORD. Virus diseases: Human T-lymphotropic virus type I. HTLV-I. Rec.; International: WHO. v. 49, p. 382-383, 1989.

WILLIAMS, A.E.; FANG, C.T.; SANDLER, S.G. HTLV-I/II and blood transfusion In the United States. In: Blattner, W.A. *Human Retrovirology: HTLV*. Raven Press, New York, p. 249-362, 1990.

WU, E.; DICKSON, D.W.; JACOBSON, S.; RAINE, C.S. Neuroaxonal dystrophy in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: neuropathologic and neuroimmunologic correlations. *Acta Neuropathol.* v. 86, n. 3, p. 224-235, 1993.

YANAGIHARA, R.; JENKINS, C.L.; ALEXANDER, S.S.; MORA, C.A.; GARRUTO, R.M. Human T lymphotropic virus type I infection in Papua New Guinea: high prevalence among the Hagahai confirmed by western analysis. *J Infect Dis.* v. 162, n. 3, p. 649-654, 1990.

YOSHIDA, M.; SEIKI, M.; YAMAGUCHI, K.; TAKATSUKI, K. Monoclonal integration of human T-cell leukemia provirus in all primary tumors of adult T-cell leukemia suggests causative role of human T-cell virus in the disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v. 81, n. 8, p. 2534-2537, 1984.

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

APÊNDICE A - Procedimento do teste WB nº 01

Protocolo de pesquisa de Anti-HTLV-I – Western Blot

Kit: HTLV Blot 2.4      Lote: AK7003      Validade: 01 JUL 08

Operator: WIZ/CASSIA      Data: 08.05.08

Número da tira	ID	Tipo de amostra	Diluição	resultado	Tiras
01		CN			1
02		CPI			2
03	HAM01	SORO=[LCR]	1:2		3
04	HAM01	LCR	1:2		4
05	HAM02	SORO=[LCR]	1:2		5
06	HAM02	LCR	1:2		6
07	HAM03	SORO=[LCR]	1:2		7
08	HAM03	LCR	1:2		8
09	HAM04	SORO=[LCR]	1:2		9
10	HAM04	LCR	1:2		10
11	C01	SORO=[LCR]	1:2		11
12	C01	LCR	1:2		12
13	C02	SORO=[LCR]	1:2		13
14	C02	LCR	1:2		14
15	C03	SORO=[LCR]	1:2		15
16	C03	LCR	1:2		16
17	C04	SORO=[LCR]	1:2		17
18	C04	LCR	1:2		18

APÊNDICE B - Procedimento do teste WB nº 02

Protocolo de pesquisa de Anti-HTLV-I – Western Blot

Kit: HTLV Blot 2.4 Lote: 11080-056 (A127003) Validade: JUL/08

Operador: LV12/CASSIA Data: 14/05/08

Número da tira	ID	Tipo de amostra	Diluição	resultado	Tiras
01		CN			
02		CPI			
03	HAM05	SORO=[LCR]	1:2		
04	HAM05	LCR	1:2		
05	HAM06	SORO=[LCR]	1:2		
06	HAM06	LCR	1:2		
07	HAM07	SORO=[LCR]	1:2		
08	HAM07	LCR	1:2		
09	HAM08	SORO=[LCR]	1:2		
10	HAM08	LCR	1:2		
11	C05	SORO=[LCR]	1:2		
12	C05	LCR	1:2		
13	C06	SORO=[LCR]	1:2		
14	C06	LCR	1:2		
15	C07	SORO=[LCR]	1:2		
16	C07	LCR	1:2		
17	C08	SORO=[LCR]	1:2		
18	C08	LCR	1:2		



APÊNDICE D - Procedimento do teste WB nº 04

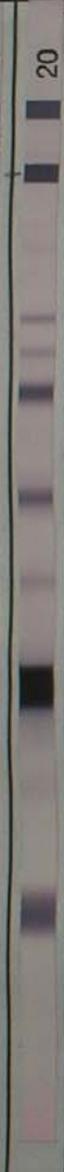
Protocolo de pesquisa de Anti-HTLV-I – Western Blot

Kit: HTLV Blot 2.4 Lote: PK7003 Validade: JUL.08

Operador: LUÍZ/CASSIA Data: 30.06.08

Número da tira	ID	Tipo de amostra	Diluição	resultado	Tiras
01		CN			
02		CPI			
03	HAM13	SORO=[LCR]	1:2		
04	HAM13	LCR	1:2		
05	HAM14	SORO=[LCR]	1:2		
06	HAM14	LCR	1:2		
07	HAM15	SORO=[LCR]	1:2		
08	HAM15	LCR	1:2		
09	HAM16	SORO=[LCR]	1:2		
10	HAM16	LCR	1:2		
11	C13	SORO=[LCR]	1:2		
12	C13	LCR	1:2		
13	C14	SORO=[LCR]	1:2		
14	C14	LCR	1:2		
15	C15	SORO=[LCR]	1:2		
16	C15	LCR	1:2		
17	C16	SORO=[LCR]	1:2		
18	C16	LCR	1:2		

## APÊNDICE E - Procedimento do teste WB HAM14 (HEMORIO)

19.		19	controle Reactivo
20.		20	CONTROLE POSITIVO
21.		21	CONTROLE NEGATIVO
22.		22	1515640
23.		23	1531525
24.		24	1531954
25.		25	1536195
26.		26	1539622
27.		27	1539785
28.		28	1539852
29.		29	1539859
30.		30	1539865
31.		31	1539916
32.		32	1540183
33.		33	1540188
34.		34	1540505
35.		35	SORO 112
36.		36	LÍQUOR 112
Nº			



## ANEXO A - Carta de aprovação do CEP-HUGG



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO GAFFRÉE E GUINLE  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

MEMO CEP/HUGG / N° 013 / 2008

Rio de Janeiro, 24 de janeiro de 2008

À

**Ilm<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marzia Puccioni Sohler**

*Pesquisadora responsável*

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, em reunião realizada em 24 de janeiro de 2008, o projeto "*Aplicabilidade de novos testes imunológicos no líquido cefalorraquidiano para o diagnóstico da doença neurológica associada à infecção pelo HTLV-1*", de número 70/2007 - CEP/HUGG, foi analisado e **APROVADO**, de acordo com a Resolução CNS n° 196/96.

Informamos que, de acordo com a Resolução CNS n° 196/96, cabe ao pesquisador apresentar ao CEP/HUGG os **relatórios parciais (semestrais) e final** do projeto aprovado.

Atenciosamente,

**Prof. Dr. Pedro Eder Portari Filho**  
Coordenador do CEP/HUGG