

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 09/07/2026.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Isabela Cristina de Oliveira Souza Ferreira

**Implementação de um diagnóstico molecular
confirmatório para o HTLV-1 e HTLV-2 no Hospital das
Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Pesquisa e Desenvolvimento (Biotecnologia Médica).

Orientadora: Profa. Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto

Coorientadora: Profa. Dra. Rosana Antunes da Silveira

**Botucatu
2026**

Isabela Cristina de Oliveira Souza Ferreira

Implementação de um diagnóstico molecular
confirmatório para o HTLV-1 e HTLV-2 no Hospital
das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestra em Pesquisa e
Desenvolvimento (Biotecnologia Médica).

Orientadora: Profa. Dra. Rejane Maria Tommasini Grotto
Coorientadora: Profa. Dra. Rosana Antunes da Silveira.

Botucatu
2026

F383i Ferreira, Isabela Cristina de Oliveira Souza
Implementação de um diagnóstico molecular confirmatório para o HTLV-1 e HTLV-2 no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu / Isabela Cristina de Oliveira Souza Ferreira. -- Botucatu, 2026
128 p. : il., tabs.

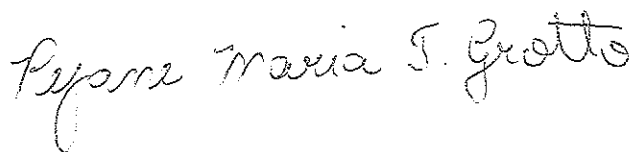
Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina, Botucatu
Orientadora: Rejane Maria Tommasini Grotto
Coorientadora: Rosana Antunes da Silveira

1. Técnicas de diagnóstico molecular. 2. Infecções por HTLV-1. 3. Infecção por HTLV-2. I. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE ISABELA CRISTINA DE OLIVEIRA SOUZA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PESQUISA E DESENVOLVIMENTO (BIOTECNOLOGIA MÉDICA), DA FACULDADE DE MEDICINA - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 09 de janeiro de 2026, às 9h, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de ISABELA CRISTINA DE OLIVEIRA SOUZA, intitulada "Implementação de um diagnóstico molecular confirmatório para a detecção do vírus HTLV no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu ". A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. REJANE MARIA TOMMASINI GROTTTO (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Depto de Proteção Vegetal / UNESP / Câmpus de Botucatu - FCA, Prof. Dr. JOSÉ CARLOS SOUZA TRINDADE FILHO (Participação Virtual) do(a) Depto de Especialidades Cirúrgicas e Anestesiologia / UNESP / Câmpus de Botucatu - FMB, Profa. Dra. MARIA CAROLINA QUARTIM BARBOSA ELIAS-SABBAGA (Participação Virtual) do(a) Depto de Parasitologia / Instituto Butantã de São Paulo, Após a exposição pela mestranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADA . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. REJANE MARIA TOMMASINI GROTTTO



Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pela minha vida, por tudo que tenho e pela oportunidade de concluir o mestrado, e a Nossa Senhora por sempre guiar meu caminho e minha vida.

Aos meus pais, Eliana e Edvaldo, por todo o apoio e incentivo aos meus estudos ao longo de toda minha trajetória acadêmica.

A minha família, principalmente ao meu tio Carlos, por todo apoio, incentivo e ajuda.

Ao meu marido Marcelo, por sempre me incentivar e estar sempre ao meu lado.

Agradeço à minha orientadora Rejane Maria Tommasini Grotto, e à minha coorientadora Rosana Antunes da Silveira, por todos os ensinamentos, paciência e ajuda no desenvolvimento desse projeto. E agradeço a todos os funcionários do LBA (Leonardo e Fabiana) e da rotina de biologia molecular (Gabriela, Maércio, Luiz) por toda a ajuda durante esse trabalho.

Agradeço à Dr^a Maria Gisele Gonçalves, que gentilmente doou os plasmídeos para os testes iniciais.

Agradeço aos meus colegas de pesquisa pelas diversas experiências e aprendizagens ao longo do curso.

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é se não uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

O vírus da leucemia de células T humanas tipo 1 (HTLV-1) foi o primeiro retrovírus associado a câncer em humanos, causando a leucemia de células T do adulto e outras doenças crônicas. Posteriormente, foi descrito o vírus HTLV-2, porém não foi estabelecida uma relação clínica com outras doenças. Com isso, a maioria dos casos da infecção são assintomáticas, dificultando o diagnóstico da doença. No Brasil, a triagem sorológica para o HTLV foi incorporada em 1993 como obrigatória em bolsas de sangue, sendo critério de exclusão em caso de positividade. Em 2009, passou a ser obrigatória também em doadores e receptores de órgãos ou tecidos e, em 2024, foi incluído o rastreamento em gestantes no pré-natal no Sistema único de Saúde (SUS). No Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HCFMB) são efetuados somente os testes sorológicos de triagem, que não são capazes de confirmar e diferenciar os subtipos, sendo recomendável que os resultados positivos na triagem sorológica sejam confirmados para exclusão de possíveis falso-positivos. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver e padronizar um ensaio de PCR em tempo real (qPCR) para a detecção e diferenciação do HTLV-1, HTLV-2, utilizando os genes *POL* e *TAX* como alvos virais e o gene da albumina humana como controle endógeno. Para a validação analítica e a construção da curva padrão foi utilizado um plasmídeo sintético, que permitiu determinar o limite de detecção (LoD), a repetibilidade e a reprodutibilidade. O LoD para o alvo *POL* foi de 100 cópias por reação, e para o gene *TAX*, foi de 25 cópias por reação. A aplicabilidade clínica foi confirmada pela testagem de amostras de pacientes, no qual o ensaio apresentou uma especificidade 100%. Entretanto, a baixa disponibilidade de amostras positivas dificultou a análise completa da sensibilidade. Contudo, os resultados demonstraram a eficácia do método, que atualmente encontra-se em processo de implementação no rol dos exames oferecidos pelo HCFMB.

Palavras chaves: Técnicas de diagnóstico molecular; Infecções por HTLV-1; Infecção por HTLV-2

ABSTRACT

The human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) was the first retrovirus associated with cancer in humans, causing adult T-cell leukemia as well as other chronic diseases. Subsequently, HTLV-2 was described; however, no clear clinical association with other diseases has been established. As a result, most HTLV-2 cases remain asymptomatic, which hinders disease diagnosis. In Brazil, serological screening for HTLV was introduced in 1993 as a mandatory test for all blood donations, being a criterion for exclusion in cases of positivity. In 2009, screening also became mandatory for organ and tissue donors and recipients, and in 2024, prenatal screening for pregnant women was included in the Sistema Único de Saúde (SUS). At the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HCFMB) only serological screening tests are performed, which are not able to confirm infection or differentiate between viral subtypes. However, it is recommended that positive serological results undergo confirmatory in order to exclude possible false positives. As such context, the aim of the present study was to develop and standardize a real-time PCR (qPCR) assay for the detection and differentiation of HTLV-1 and HTLV-2 targeting the viral *pol* and *tax* gene, with the human albumin gene used as an endogenous control. For analytical validation and standard curve construction, a synthetic plasmid was employed, allowing the determination of the limit of detection (LoD), as well as the assessment of repeatability and reproducibility. The LoD was established at 100 copies per reaction for the *pol* target and 25 copies per reaction for the *tax* gene. Clinical applicability was confirmed through the testing of patient samples, in which the assay demonstrated 100% specificity. However, the limited availability of positive samples hindered a complete analysis of sensitivity. Nevertheless, the results demonstrated the effectiveness of the method, which is currently in the process of being implemented among the diagnostic assays offered at HCFMB.

Keywords: Molecular diagnostic techniques; HTLV-1 infections; HTLV-2 infection.

Lista de Figuras

Figura 1: Representação esquemática do HTLV.....	16
Figura 2: Esquema do genoma HTLV-1 e HTLV-2.....	16
Figura 3: Replicação viral do HTLV-1.....	19
Figura 4: Áreas endêmicas para o HTLV-1	20
Figura 5: Gráfico da curva padrão contendo seis pontos de diluição, equação da reta, R^2 e eficiência da reação, com o alvo POL 1	46
Figura 6: Gráfico da curva padrão contendo seis pontos de diluição, equação da reta, R^2 e eficiência da reação, com alvo POL 2	47
Figura 7: Gráfico da curva padrão contendo seis pontos de diluição, equação da reta, R^2 e eficiência da reação, com alvo TAX 1	47
Figura 8: Gráfico da curva padrão contendo seis pontos de diluição, equação da reta, R^2 e eficiência da reação, com alvo TAX 2.....	48

Lista de Tabelas

Tabela 1: Preparo dos primers e probes na forma de ensaio para o gene POL	34
Tabela 2: Preparo dos primers e probes na forma de ensaio para o gene TAX	34
Tabela 3: Protocolo do volume dos reagentes utilizados para o gene POL e albumina para o HTLV-1 e HTLV-2	35
Tabela 4: Protocolo do volume do reagente utilizados para o gene TAX e albumina para HTLV-1 e HTLV-2	35
Tabela 5: Protocolo com o volume dos reagentes utilizados na PCR convencional para o gene TAX do HTLV-1	38
Tabela 6: Protocolo com o volume dos reagentes utilizados na Nested da PCR convencional para o gene TAX do HTLV-1	38
Tabela 7: Protocolo com o volume dos reagentes utilizados na PCR para o gene TAX do HTLV-2	40
Tabela 8: Determinação dos limites de detecção (LOD)	45
Tabela 9: Os parâmetros para cada alvo	46
Tabela 10: Avaliação da precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) em diferentes faixas de concentrações de DNA proviral para HTLV-1.	49
Tabela 11: Avaliação da precisão (repetibilidade e reprodutibilidade) em diferentes faixas de concentrações de DNA proviral para HTLV-2.	50
Tabela 12: Resultados do ensaio de matriz: comparação entre controle(TE) e matriz (amostras negativas para HTLV)	51
Tabela 13: Valores de eficiência, slope e R^2 para o gene POL	51
Tabela 14: Valores de eficiência, slope e R^2 para o gene TAX	52
Tabela 15: Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes do grupo 3	53
Tabela 16: Característica clínicas e epidemiológicas dos pacientes do grupo 4	54

Lista de Quadros

Quadro 1: Primers e sondas utilizados no ensaio multiplex qPCR HTLV para detecção de HTLV-1 e HTLV-2	33
Quadro 2: Modelo de placa de qPCR para detecção de HTLV	36
Quadro 3: Sondas utilizadas para cada gene.....	36
Quadro 4: Primers utilizados no sequenciamento genético do gene <i>TAX</i> do HTLV-1	37
Quadro 5: Primers utilizados no sequenciamento genético do gene <i>TAX</i> do HTLV-2.....	39

Lista de Abreviações e Siglas

AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i> – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
APC	<i>Antigen-Presenting Cells</i> – Células apresentadoras de antígenos
ATLL	<i>Adult T-cell Leukemia/Lymphoma</i> – Leucemia/linfoma de células T do adulto
°C	Graus Celsius
cDNA	Complementary DNA – Ácido desoxirribonucleico complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CLIA	<i>Chemiluminescent Immunoassay</i> – Ensaio de quimiluminescência imunológica
Ct	<i>Cycle threshold</i>
Cy5	Fluoróforo de cianina
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> – Ácido desoxirribonucleico
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> - Ácido etilenodiamio tetra-acético
EIA	<i>Enzyme Immune Assay</i> – Ensaio imunoenzimático
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> – Ensaio de imunoabsorção enzimática
et al.	Em conjunto com
FAM	<i>Fluoróforo 6-carboxi</i> – <i>Hexacarboxy fluorescein</i>
HAM/TSP	HTLV-I-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis – Mielopatia associada ao HTLV-1/Paraparesia Espástica Tropical
HBV	<i>Hepatitis B Virus</i> – Vírus da hepatite B
HCFMB	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu);
HCV	<i>Hepatitis C Virus</i> – Vírus da hepatite C
HEX	<i>Fluoróforo 6-cloro</i> – <i>Hexachloro-Fluorescein</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> – Vírus da imunodeficiência humana
HTLV	<i>Human T-cell Lymphotropic Virus</i> – Vírus linfotrópico de células T humanas
HTLV-1	<i>Human T-cell Lymphotropic Virus type 1</i> – Vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1);
HTLV-2	<i>Human T-cell Lymphotropic Virus type 2</i> – Vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 2
Kb	kilobase
Kit	Conjunto de reagentes
LBA	Laboratório de Biotecnologia Aplicada
LIA	<i>Line Immunoassay</i> – Imunoensaio de linha
LOD	<i>Limit of Detection</i> – Limite de detecção
mL	Mililitros
mg	Miligramas
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Particle Agglutination – Aglutinação em partícula

pb	Pares de bases
Pb	Probe – Sonda
PBL	<i>Peripheral Blood Leukocytes</i> – Leucócitos do sangue periférico
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> – Tampão fosfato-salino
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – Reação em cadeia da polimerase
POP	Procedimento Operacional Padrão
qPCR	<i>Real-time Polymerase Chain Reaction</i> – Reação em cadeia da polimerase em tempo real
qsp	Quantidade suficiente para
SUS	Sistema Único de Saúde
TARV	Terapia antirretroviral
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	Tampão Tris-EDTA
UNIPEX	Unidade de Pesquisa Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu;
WB	Western Blot
µL	Microlitros

Sumário

1.	INTRODUÇÃO	15
1.1	HISTÓRICO E CLASSIFICAÇÃO	15
1.2	TRANSMISSÃO DO HTLV.....	17
1.3	REPLICAÇÃO VIRAL	17
1.4	EPIDEMIOLOGIA	19
1.5	COINFEÇÕES	22
1.6	ASPECTOS CLÍNICOS DA INFECÇÃO PELO HTLV.....	22
1.7	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	24
2.	OBJETIVO GERAL	28
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
3.	METODOLOGIA.....	29
3.1	DESENHO DO ESTUDO.....	29
3.2	ASPECTOS ÉTICOS.....	30
3.3	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	30
3.4	EXTRAÇÃO DO DNA	31
3.5	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (qPCR)	32
3.6	SEQUENCIAMENTO	37
3.7	PLASMÍDEO E A CONSTRUÇÃO DA CURVA.....	41
3.8	ENSAIO DE PRECISÃO	43
3.9	ENSAIO DE MATRIZ.....	44
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
4.	RESULTADOS	45
4.1	SENSIBILIDADE ANALÍTICA: LIMITE MÍNIMO DE DETECÇÃO (LOD) DA qPCR.....	45
4.2	PRECISÃO.....	48
4.3	ENSAIO DE MATRIZ.....	50
4.4	CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DO ESTUDO	52
4.4.1	Grupo 1.....	52
4.4.2	Grupo 2.....	52
4.4.3	Grupo 3.....	53
4.4.4	Grupo 4.....	54
5.	DISCUSSÃO	55
6.	CONCLUSÃO	62
7.	REFERÊNCIAS.....	63

ANEXO 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	74
ANEXO 2 – POP-Procedimento Operacional Padrão.....	77
ANEXO 3 – RELATÓRIO TÉCNICO.....	111

1. INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO E CLASSIFICAÇÃO

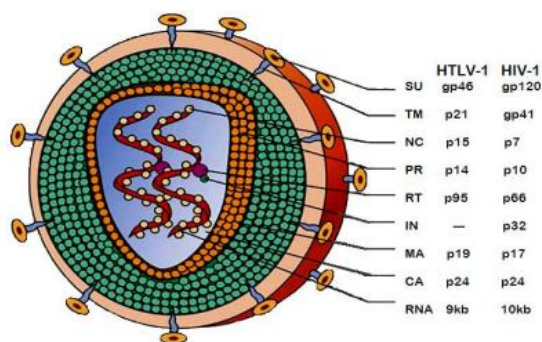
O vírus da leucemia de células T humanas tipo 1 (HTLV-1) foi o primeiro retrovírus associado a câncer em humanos, tendo sido isolado de um paciente com linfoma cutânea de células T ^{1,2}. Além de causar a leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL), o HTLV-1 foi identificado como causador de várias doenças crônicas, como a mielopatia/ paraparesia espástica tropical associada ao HTLV-1(HAM/TSP), a uveíte associada ao HTLV-1 e a dermatite associada ao HTLV ^{3, 4}. Posteriormente, foi descrito o vírus HTLV-2, a partir de um paciente com tricoleucemia de células T ⁵, e os vírus HTLV-3 e HTLV-4 foram encontrados em indivíduos isolados de Camarões na África Central ^{6, 7, 8}.

O HTLV pertence à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirina* e gênero *Deltaretrovirus*, e são considerados retrovírus envelopados complexos por expressarem genes regulatórios e acessórios, além dos genes estruturais e enzimáticos comuns a todos retrovírus ⁹. Os genomas de HTLV-1 e HTLV-2 apresentam aproximadamente 9.000 bases, formato esférica com 110 nanômetros ¹⁰, duas cópias idênticas de RNA fita simples ^{9, 11}, possuindo os genes *GAG*, *POL* e *ENV*, além de uma região próxima à extremidade 3' conhecida como região pX, que possui os genes reguladores *TAX* e *REX* ¹².

As proteínas e enzimas são codificadas por regiões específicas do genoma (Figura 1). O gene *ENV* codifica as proteínas do envelope e transmembranas (gp46 e gp21), o gene *GAG* codifica as proteínas estruturais da matriz (p19), capsídeo (p24) e nucleocapsídeo (p15), enquanto o gene *POL*, está envolvido na codificação das enzimas protease, transcriptase reversa, e integrase que desempenham um papel na síntese do DNA viral a partir do RNA genômico, sendo essenciais para o início e a continuação do ciclo de replicação dos retrovírus, permitindo também a integração do DNA viral no genoma da célula hospedeira. Já o gene *TAX* é responsável pela codificação das proteínas *TAX-1* e *TAX-2*, sintetizadas respectivamente pelos vírus HTLV-1 e HTLV-2. Essas proteínas são fundamentais para a replicação viral, pois a proteína *TAX-1/2* ativa a transcrição do provírus ¹². Na região pX, são

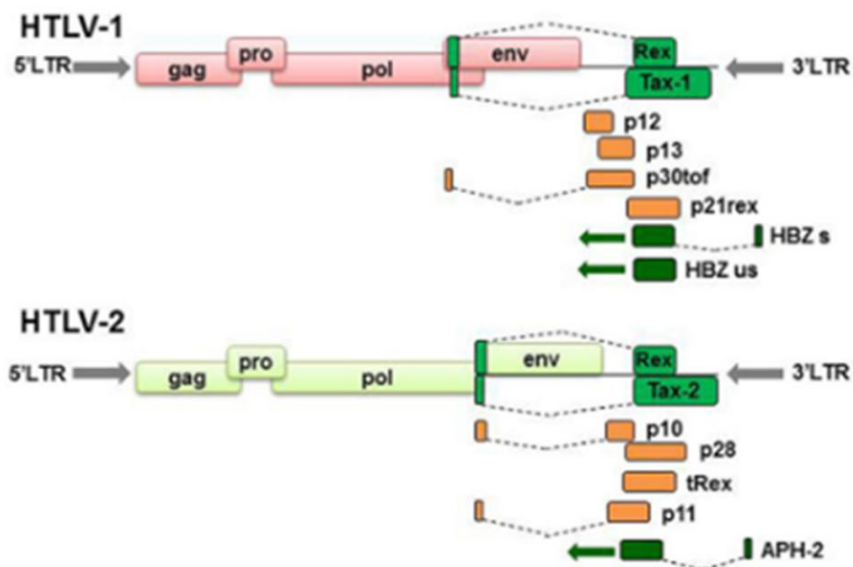
codificadas as proteínas acessórias (p12, p13, p30) que são responsáveis pela sinalização de início e término da transcrição ¹¹. Além disso, na extremidade 3' da região LTR do HTLV-1, o fator HBZ está associado à patogênese da HAM/TSP e da ATLL, atuando na persistência e carga viral ^{13,14} (Figura 2).

Figura 1: Representação esquemática do HTLV



Fonte: https://highered.mheducation.com/sites/dl/free/0071402357/156712/figure172_3.htm.

Figura 2: Esquema do genoma HTLV-1 e HTLV-2



Fonte: Adaptado de ROMANELLI *et al.*, 2013, p. 2

1.2 TRANSMISSÃO DO HTLV

A transmissão do HTLV ocorre tanto horizontalmente como verticalmente, sendo que a transmissão horizontal ocorre por meio da transfusão de sangue e hemoderivados, compartilhamento de agulhas e seringas de usuários de drogas, transplante de órgãos e contato sexual desprotegido. E a transmissão vertical ocorre durante a gestação (da mãe infectada para o filho) ^{16,17}.

A transmissão vertical é considerada importante, com prevalência de 10 a 25% em áreas endêmicas ¹⁴. Essa transmissão pode ocorrer pela placenta, de forma perinatal ou por meio do aleitamento materno ¹⁸. No entanto, a principal via de transmissão é a amamentação, uma vez que o leite de mães soropositivas para o HTLV contém células T infectadas ^{16, 19, 20}. Para prevenir a transmissão vertical, o Ministério da Saúde do Brasil recomenda a interrupção da amamentação em mães com HTLV ^{21, 22}.

A transmissão sexual do HTLV ocorre de forma mais eficiente a partir do homem para a mulher ²³, pois o vírus atravessa a barreira mucosa por meio de lesões na mucosa, infecção local ou transcitose de células epiteliais ²⁴.

A transmissão parenteral pode ocorrer por transfusões de sangue total, hemoderivados, compartilhamento de agulhas e transplante de órgãos. Essa é uma das formas mais eficientes de transmissão, com uma taxa de soroconversão de 44% ^{25, 14}. No entanto, no Brasil, o risco de transmissão parenteral é baixo, devido à sorologia obrigatória para doadores de sangue e órgãos ^{26, 22}.

1.3 REPLICAÇÃO VIRAL

O HTLV-1 e HTLV-2 são os subtipos mais bem estudados, podendo o HTLV-1 infectar preferencialmente células CD4+, além de infectar linfócitos B, células endoteliais, células mieloides, fibroblastos e linfócitos TCD8+ ^{27, 28, 29, 30}, enquanto que o HTLV-2 infecta principalmente T CD8+ ³¹.

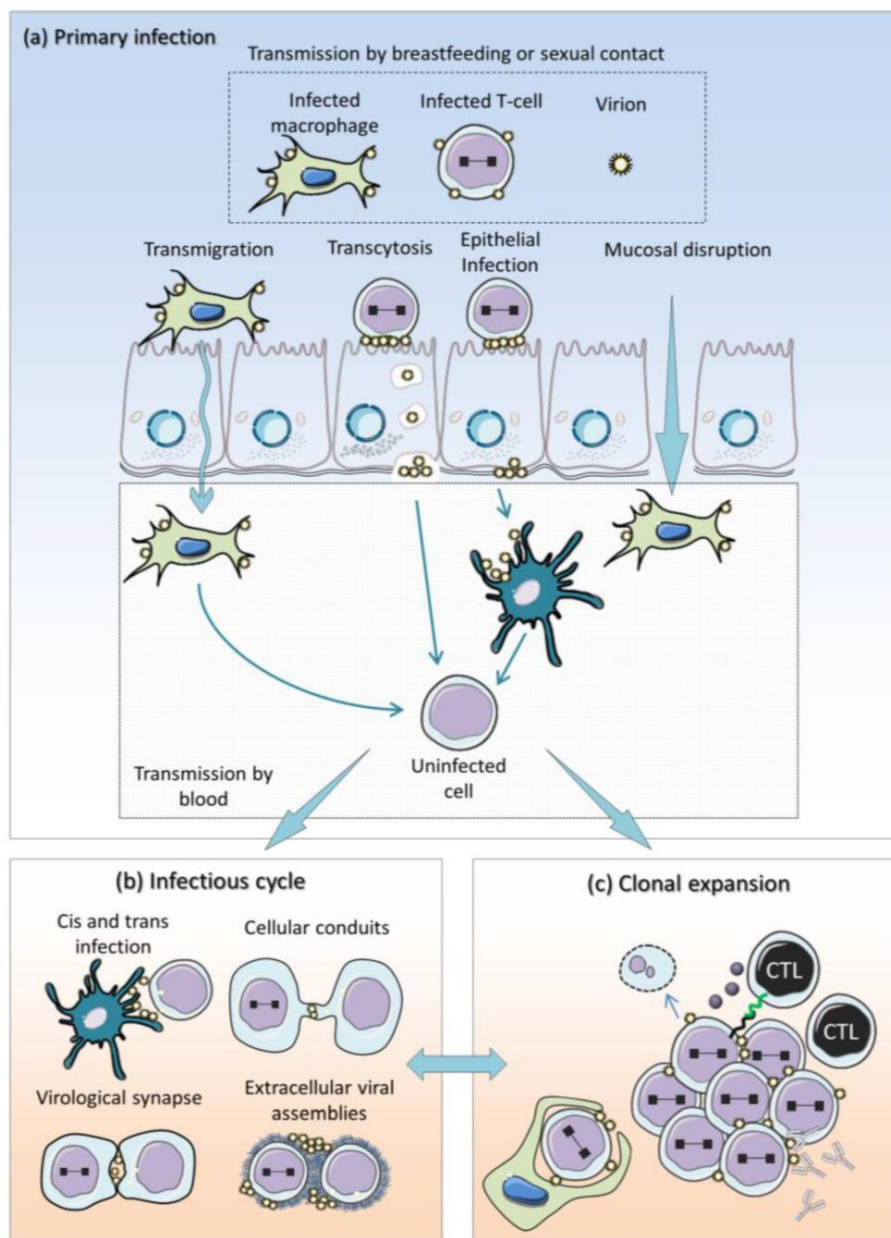
Com exceção da transmissão por sangue, nas vias de transmissão por aleitamento materno ou contato sexual, o HTLV precisa atravessar as barreiras

mucosa oral, gastrointestinal ou cervical, o que pode ocorrer por diferentes mecanismos. Para isso, o vírus utiliza diferentes estratégias, como: transmigração de macrófagos infectados pelo epitélio intacto, a incorporação dos vírions em vesículas, a liberação de partículas virais na superfície de células epiteliais e a entrada de células infectadas em áreas com mucosa danificada ^{16,32}.

Após ultrapassar essa barreira, o HTLV pode infectar diretamente células do sistema imunológico ou utilizar células apresentadoras de antígenos (APCs), como macrófagos e células dendríticas, para disseminação ^{16, 19, 32}. Essas APCs podem ser diretamente infectadas ou mediar a transinfecção, processo pelo qual transferem vírions a outras células suscetíveis. Essa transferência pode ocorrer por vários mecanismos: sinapse virológica ³³, condutores celulares ³⁴ ou conjuntos virais extracelulares ³⁵(Figura 3).

Logo após o estabelecimento da infecção primária, o vírus se replica por meio da transmissão célula a célula, ligando a célula alvo por meio de receptores de superfície celular, como moléculas transportadoras de glicose 1 e proteoglicanos de heparina sulfato 1 ³⁶, sendo necessária a evasão do sistema imunológico para a disseminação ^{16,32}. Esse processo facilita a adsorção do vírus, mediada pela ligação de glicoproteínas aos receptores de membrana dos linfócitos T. Em seguida, ocorre a fusão da membrana viral com a célula hospedeira, permitindo a liberação do cerne viral no citoplasma. Com isso, a transcriptase reversa sintetiza uma fita de DNA complementar (cDNA), que, através da ação da enzima integrase viral, é incorporada ao DNA celular, formando o provírus integrado. A partir do DNA provírus como molde, ocorre a síntese do RNA viral, do RNA genômico e RNA mensageiro que é responsável pela síntese das proteínas do capsídeo e do envelope viral. O RNA viral é empacotado, seguido pela montagem do capsídeo e pelo brotamento do vírus. No final do processo ocorre a maturação, que torna a partícula viral madura e capaz de infectar novas células ^{12, 14}.

Figura 3: Modelo de replicação viral do HTLV-1



Fonte: Adaptado de Carpentier *et al.*, 2015.

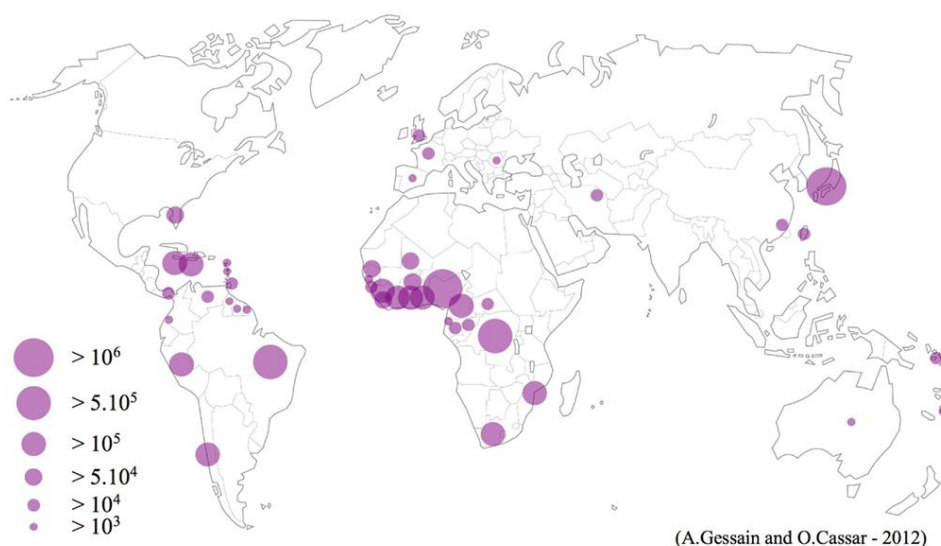
1.4 EPIDEMIOLOGIA

A prevalência do HTLV-1 e HTLV-2 variam conforme a localização geográfica, fatores epidemiológicos e populações específicas, como gestantes, doadores de sangue e indivíduos coinfectados. O HTLV-1 é endêmico na América do Sul, Japão, Caribe, África, além de regiões do Oriente Médio e Melanésia, com uma estimativa entre 15 a 20 milhões de pessoas infectadas

em todo o mundo ^{37,38}. No entanto, esses números baseiam-se em estudos em áreas endêmicas, assim o número de infectados, principalmente assintomáticos, pode ser muito maior. Já o HTLV-2 foi identificado em áreas urbanas das Américas, Europa e Ásia, especialmente entre usuários de drogas e populações indígenas da América Latina ^{12,14, 39}.

O Japão foi uma das primeiras regiões identificadas como endêmicas para o HTLV-1 ⁴⁰. No mesmo período, também foi relatada uma alta soroprevalência do vírus em países da África e da Ásia. Dessa forma, tanto o Japão quanto a África podem ser considerados locais com o maior número de infectados pelo HTLV-1 ³⁹. Na América do Sul, a presença do vírus é significativa ⁴¹. (Figura 4).

Figura 4: Áreas endêmicas para o HTLV-1



Fonte: Gessain e Cassar, 2012

No Brasil estima-se aproximadamente 2,5 milhões de brasileiros infectados pelo HTLV-1, tornando o Brasil o país com o maior número absoluto de indivíduos convivendo com o vírus ^{37, 38}. O HTLV-2 também está presente no país, sendo predominantemente encontrado entre populações indígenas da Amazônia brasileira, o que faz da região uma das maiores áreas endêmicas para o HTLV-2 no mundo ^{41, 42}.

O HTLV-1 foi identificado pela primeira vez na cidade de Campo Grande, em um grupo de imigrantes de japoneses provenientes de uma região

altamente endêmica⁴³. Mais tarde, a infecção pelo HTLV também foi detectada entre povos indígenas brasileiros^{41, 44}.

A partir de 1993, a detecção de HTLV foi incorporada à triagem sorológica obrigatória realizada em bolsas de sangue, sendo, portanto critério de exclusão em caso de positividade²⁶. Essa medida permitiu a realização de estudos sobre a prevalência do vírus, contribuindo no entendimento do vírus¹⁴.

Entre 2012 e 2018, a Unidade Federativa da Bahia implementou a notificação compulsória, resultando no registro de 2.486 casos de infecção pelo vírus. Outros estudos foram realizados em doadores de sangue de 12 estados brasileiros, nos quais foram encontradas taxas mais altas nas regiões Norte e Nordeste, com prevalências de 0,48% na Bahia⁴⁵ e 0,46% no Acre. Especificamente em Salvador, a prevalência na população geral é de aproximadamente 1,48%²³, e nas gestantes a taxa foi de cerca de 1,05%⁴⁶.

Já, na região Sul, as prevalências foram menores, registrando 0,10% em São Paulo e 0,03% em Santa Catarina, demonstrando uma distribuição heterogênea nas taxas de prevalência para HTLV-1/2⁴⁶.

Além disso, estudos realizados na região Central do Brasil, nos estados de Goiás e Mato Grosso do Sul, identificaram uma prevalência de 0,5% do HTLV-1 em assentamentos remanescentes de quilombos^{38, 47}.

A prevalência nas populações vulneráveis também é elevada no Brasil, sendo esse grupo composto por usuários de drogas, profissionais do sexo, parceiros sexuais de portadores de HTLV, pacientes que receberam transfusão sanguíneas antes de 1993, pacientes imunossuprimidos e indivíduos com outras doenças infecciosas, como HIV, HCV e HBV que apresentam prevalência variando de 0,7% a 5,3%^{46, 48, 49}.

No Brasil, a infecção pelo HTLV-1/-2 foi incluída na lista de notificação compulsória para gestante, puérpera e em criança com risco de transmissão vertical. Além disso, a testagem sorológica foi ampliada para gestantes durante o pré-natal em 2024. Essas ações representam avanços na prevenção, com a adoção de estratégias para reduzir a transmissão, permitindo estimar o número de pessoas infectadas e aprimorar o atendimento dessa população^{50,51}.

1.5 COINFEÇÕES

As taxas de coinfeção HIV/HTLV variam geograficamente, seguindo uma distribuição semelhante ao do HTLV-1. As coinfeções atingem principalmente a população mais vulnerável, como os usuários de drogas injetáveis. Na Bahia, 16% dos pacientes com HIV, apresentam coinfeção com o HTLV. A coinfeção do HIV/HTLV-1 acelera a evolução da AIDS, diminuindo a expectativa de vida dos pacientes, enquanto a coinfeção do HIV/HTLV-2 pode oferecer proteção contra a progressão da AIDS ⁵², provavelmente pela produção de citocinas que bloqueiam o correceptor CCR5 do HIV ^{53, 54}, além disso, estudos demonstram que o proteína Tax-2 tem maior capacidade de inibir a replicação do HIV-1 em comparação ao Tax-1 ⁵⁵.

As coinfeções pelos vírus da hepatite B e C ainda estão sendo estudadas cientificamente, apresentando resultados divergentes no caso da coinfeção HCV/HTLV. Estudos realizados no Japão indicaram que pacientes coinfectados por HCV/HTLV-1 apresentam maior ocorrência de lesões hepáticas ⁵⁶. No entanto, em contraste com estudos brasileiros, pacientes coinfectados por HIV-1/HTLV-1/HCV demonstraram menor evolução para lesões hepáticas, demonstrando um possível efeito protetor do HTLV-1. Uma explicação possível para esses resultados divergentes são as diferenças entre as populações estudadas ⁵⁷. Já a coinfeção HIV-1/HTLV-1/HBV ainda é pouco compreendida ⁵⁸.

Consistente com os resultados encontrados na coinfeção HCV/HTLV-1, pacientes coinfectados com HCV/HTLV-2 apresentaram menor carga viral para o HCV em estudos conduzidos em São Paulo. No entanto, nos EUA, pacientes coinfectados por HCV/HIV e HCV/HIV/HTLV-2 apresentaram maior carga viral para o HCV. Essas divergências podem estar relacionadas à origem genética dos pacientes ou aos diferentes subtipos de HTLV-2 que circulam no Brasil e nos EUA ⁵⁷.

1.6 ASPECTOS CLÍNICOS DA INFECÇÃO PELO HTLV

A maioria dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 permanece assintomática; no entanto, entre 5% e 10% desenvolvem manifestações

clínicas⁵⁹. As doenças associadas ao HTLV-1 podem ser inflamatórias, como mielopatia, uveíte, dermatite, conjuntivite, artrite e alveolite; infecciosas, incluindo estrogiloidíase, escabiose, dermatite infectiva e tuberculose; ou neoplásicas¹⁴. As complicações mais graves são HAM/ TSP e o ATLL, geralmente após um período de latência de 20 a 30 anos^{14, 60}. Por outro lado, o HTLV-2 não está associado à alterações hematológicas, mas eventualmente tem sido relacionado à distúrbios neurológicos que se assemelha ao HAM/TSP^{12, 61}. Já o HTLV-3 e o HTLV-4 não apresentam associação com doenças conhecidas⁶².

A HAM/TSP, denominada Mielopatia Associada ao HTLV-1/Paraparesia Espástica Tropical é uma doença inflamatória neurodegenerativa causada pela proliferação e ativação de células T infectadas pelo HTLV-1. Esse processo leva à liberação de citocinas (IL-1, IL-6, IL-15, IFN- γ e TNF- α), quimiocinas (CXCL10 e CXCL9) e à infiltração de células mononucleares, resultam em desmielinização crônica, disfunção axonal e atrofia da medula espinhal. Assim, os sintomas da HAM/TSP incluem enfraquecimento progressivo das extremidades inferiores, dores lombares, incontinência urinária e distúrbios no intestino^{63, 64}. Atualmente, o tratamento clínico disponível é apenas paliativo, não havendo tratamentos curativos⁶⁵.

A Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto (ATLL), caracterizada pela presença de células leucêmicas, que se infiltram em diversos tecidos, como pele, fígado, trato gastrointestinal e pulmões. Além disso, a doença está associada a hipercalcemia e a infecções oportunistas⁵⁹. Geralmente, se manifesta após um período de latência de 20 a 30 anos⁶⁶, sendo que a minoria dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 evolui para ATLL, pois a imunossupressão nesses casos contribui para o surgimento da doença. Assim, o sistema imunológico dos pacientes atua no controle da doença, prevenindo o desenvolvimento da doença⁵⁹.

Pacientes com ATLL em um estado de imunossupressão severa tornam-se altamente vulneráveis a infecções oportunistas. Nos casos mais agressivos, antibióticos são administrados para prevenir complicações infecciosas. Dentre as infecções oportunistas mais comuns estão *Pneumocystis carinii*, *Strongyloides stercoralis*, aspergilose, candidíase e pneumonia por citomegalovírus⁶⁷.

A ATLL é classificada em dois subtipos principais: agressivo e indolente. O tipo agressivo é caracterizado pelo crescimento rápido das células leucêmicas e inclui as formas aguda e linfoma. Já o tipo indolente tem uma progressão mais lenta e abrange as formas crônica e latente ⁶⁸. Os pacientes com a forma agressiva da ATLL apresentam uma sobrevida inferior a um ano, enquanto aqueles com a forma indolente podem evoluir para uma crise blástica após vários anos ⁶⁷.

1.7 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial de HTLV divide-se em testes de triagem e confirmatórios. Os exames de triagem são baseados na detecção de anticorpos contra HTLV-1/2 no plasma ou soro, sendo: reação imunoenzimática (ELISA, *enzyme linked immunosorbent assay* ou EIA, *enzyme immunoassay*), aglutinação de partículas (PA, *particle agglutination*) e quimioluminescência (CLIA, *chemiluminescent assay*). Os testes confirmatórios podem identificar anticorpos: Western Blot (WB) e imunoensaios em linha (LIA, *line immunoassay*). E ainda, testes baseados na amplificação do material genético proviral: reação em cadeia da polimerase (PCR, *polymerase chain reaction*). É recomendável que os resultados positivos na triagem sorológica sejam confirmados para exclusão de possíveis falso-positivos, uma vez que se tratam de testes com alta sensibilidade ¹⁷.

Os testes imunoenzimáticos foram evoluindo ao longo tempo, permitindo uma melhor sensibilidade e especificidade. Os testes de primeira geração utilizavam um lisado viral de HTLV-1 fixado, sendo também aplicados para HTLV-2, porém apresentava baixa sensibilidade. Já os testes de segunda geração incluíram proteínas recombinantes do envelope viral (gp21) e lisado viral de HTLV-2, aumentando a sensibilidade para HTLV-1/2. E os testes de terceira geração, atualmente utilizados, incorporam proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos específicos para HTLV-1/2, melhorando a sensibilidade. Porém, esses testes não permitem diferenciar a infecção por HTLV-1 ou HTLV-2 ^{14, 69, 70}.

O teste de aglutinação de partículas foi um dos primeiros a serem utilizados para diagnosticar o HTLV devido à sua técnica simples e boa sensibilidade. Porém, no Brasil, não é muito utilizado ⁷¹.

Os testes de quimioluminescência (CLIA) em plataformas automatizados têm sido utilizados nos bancos de sangue para triagem sorológica. Esses testes detectam os anticorpos que interagem com micropartículas magnéticas, que são revestidas com peptídeos sintéticos do HTLV-1 (gp46-I) e HTLV-2 (gp46-II), além de proteínas recombinantes do envelope (gp21). Apesar de apresentarem alta sensibilidade, eles podem gerar falso-positivos, principalmente em grupos de baixo risco, como doadores de sangue, gerando a necessidade da realização de testes confirmatórios ^{70, 72 73}.

Os testes confirmatórios são essenciais nos casos de resultado reagente nos testes de triagem. Assim, um dos métodos mais utilizados para essa confirmação é o Western Blot (WB), que consiste na separação de antígenos virais por eletroforese, em seguida, é realizada a leitura das bandas específicas ⁷⁴.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera um resultado positivo quando há reatividade para bandas específicas de proteínas do envelope (g46 e g21 ou gp62/63) e para bandas da região gag (p19, p24 e p53) ⁷⁵. Porém, algumas amostras apresentam reatividade em determinadas bandas, mas não podem ser considerada como positivas, sendo, classificadas como indeterminadas. Esses casos indeterminados não são totalmente compreendidos, acredita-se que alguns indivíduos possam ter uma resposta sorológica inadequada, principalmente em pacientes imunossuprimidos. Além disso, presença de partículas virais defeituosas, mutações e coinfeções podem causar reações cruzadas, dificultando a detecção do HTLV ^{12, 14, 73, 76}.

Para melhorar o diagnóstico, foram adicionadas proteínas recombinantes do envelope (rgp46-I e rgp46-II), permitindo diferenciar o HTLV-1 do HTLV-2. Além disso, o peptídeo recombinante GD21 foi incorporado ao WB na tentativa de reduzir os casos indeterminados (WB 2.4, Genelabs Diagnostics, Singapore). No entanto, devido ao alto custo e à possibilidade de casos inconclusivos, o uso do WB apresenta dificuldades ^{12, 76}.

Outros dois testes podem ser utilizados para a confirmação: a Imunofluorescência Indireta (IFI) e o Imunoensaio em Linha (LIA). A IFI baseia-

se na interação entre os anticorpos da amostra e os antígenos virais fixados em lâminas, apresentando boa sensibilidade e especificidade. No entanto, a interpretação dos resultados pode ser subjetiva, sendo o método utilizado na confirmação de casos com resultados discordantes ^{77, 78}. A LIA utiliza uma membrana de nylon com proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos do HTLV-1/-2, apresentando maior sensibilidade do que o WB e reduz os casos inconclusivos, porém, o alto custo dificulta a sua utilização no Brasil ⁷⁹.

No entanto, devido às limitações de outros métodos e o HTLV se caracterizar como provírus, os testes moleculares fornecem um diagnóstico confirmatório e discriminatório, especialmente em casos indeterminados ^{80,81}. Além disso, as técnicas de PCR apresentam alta sensibilidade e especificidade, e boa reprodutibilidade ⁸². Sendo capaz de diagnosticar a infecção neonatal, uma vez que os anticorpos maternos circulam no recém-nascido durante os primeiros meses de vida ⁸³.

A PCR é um método de amplificação exponencial de sequências específicas do genoma, esse processo ocorre devido à ação de uma enzima polimerase resistente a variações de temperatura. A reação é específica devido a utilização de oligonucleotídeos desenhados para amplificar, uma região alvo no DNA. O resultado da reação é analisado por eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida. Por sua vez, a técnica de PCR em tempo real proporciona um resultado mais rápido e sensível, utilizando o mesmo princípio da PCR convencional, porém a partir do uso de intercalantes de DNA ou sondas fluorescentes que emitem um sinal luminoso durante a amplificação, permitindo a detecção em tempo real pelo equipamento ⁸².

Os testes moleculares empregam primers e/ou sondas específicas para regiões do genoma proviral do HTLV-1/2. O HTLV realiza a transcrição reversa de seu genoma de RNA viral em DNA fita dupla, que se integra ao genômico do hospedeiro, formando o provírus. Esse provírus serve como molde para a produção de novas partículas virais e apresenta a característica de manter o número de cópias longo da infecção crônica, não por meio da liberação de partículas virais livres, mas pela expansão clonal e persistência de clones de células T infectadas ^{84,85}. Por esse motivo o diagnóstico molecular deve ser realizado a partir do DNA proviral. Porém, resultados falso-negativos podem ocorrer devido à extração de DNA ruim, baixa carga proviral ou presença de

partículas defeituosas ou mutadas. No entanto, devido ao menor custo dos testes moleculares em comparação aos testes sorológicos complementares (LIA e WB), recomenda-se a sua utilização inicial, e se necessária a utilização dos testes sorológicos para amostras com resultados inconclusivos ⁷³.

No entanto, não há testes moleculares disponíveis comercialmente para o HTLV, além de uma divergência nos protocolos, regiões do genoma, primers e sondas, plataformas, reagentes e definição de casos positivos ⁷³. Com isso, alguns grupos de pesquisa desenvolveram protocolos para o diagnóstico molecular, para detecção e identificação de HTLV-1/-2 ^{80,81}. Ensaios multiplex quantitativos de PCR em tempo HTLV, visando os genes *POL* e *TAX*, demonstraram viabilidade no diagnóstico e discriminação do HTLV-1 e HTLV-2 ⁸⁰.

Portanto, os testes sorológicos de triagem não diferenciam se a infecção é causada por HTLV-1 ou HTLV-2, sendo necessários testes de elevada especificidade para a diferenciação, principalmente, por doenças como HAM e ATLL causadas pelo HTLV-1 terem alta morbidade e mortalidade ⁴⁶. A implantação de um teste diagnóstico molecular para detecção de HTLV-1 e HTLV-2 no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (HCFMB) possibilitará a confirmação e a definição do tipo viral, proporcionando melhorias no tratamento dos indivíduos infectados. Com tal perspectiva, este trabalho otimizou o teste descrito por Gonçalves *et al.*, (2022), de forma a obter redução de custos em todo o fluxo de trabalho envolvido, adequando-o à necessidade local do HCFMB.

ROSADAS, C. et al. Protocolo Brasileiro para Infecções Sexualmente Transmissíveis 2020: infecção pelo vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV). **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 30, 2021.

VIANA, G. M. C. et al. Seroprevalence of HTLV-1/2 among blood donors in the state of Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 36, p. 50-53, 2014.

YOSHIDA, M.; MIYOSHI, I.; HINUMA, Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 79, n. 6, p. 2031-2035, 1982.

YOSHIKURA, H. et al. Isolation of HTLV derived from Japanese adult T-cell leukemia patients in human diploid fibroblast strain IMR90 and the biological characters of the infected cells. **International Journal of Cancer**, v. 33, p. 745-749, 1984.