INGRID OLAH DO NASCIMENTO

**Diversidade molecular do envelope e carga proviral do vírus
linfotrópico de células T humanas tipo 2 (HTLV-2) em
amostras indeterminadas pelo teste Western - Blot**

**Dissertação de mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina da Universidade
de São Paulo, para a obtenção do título
de Mestre em Ciências**

**Área de Concentração: Fisiopatologia
Experimental**

**Orientador: Prof. Dr. Jorge Simão do
Rosário Casseb**

**São Paulo
2010**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Nascimento, Ingrid Olah do

Diversidade molecular do envelope e carga proviral do vírus linfotrópico de células T humanas tipo 2 (HTLV-2) em amostras indeterminadas pelo teste Western – Blot / Ingrid Olah. -- São Paulo, 2010.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental.

Orientador: Jorge Simão do Rosário Casseb.

Descritores: 1.Vírus 2 linfotrópico T humano 2.Reação em cadeia da polimerase 3.Carga viral 4.WB indeterminado

USP/FM/SBD-023/10

INGRID OLAH DO NASCIMENTO

**Diversidade molecular do envelope e carga proviral do vírus
linfotrópico de células T humanas tipo 2 (HTLV-2) em
amostras indeterminadas pelo teste Western - Blot**

**Dissertação de mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina da Universidade
de São Paulo, para a obtenção do título
de Mestre em Ciências**

**Área de Concentração: Fisiopatologia
Experimental
Orientador: Prof. Dr. Jorge Simão do
Rosário Casseb**

**São Paulo
2010**

Dedicatória

*Dedico este trabalho, que foi uma realização pessoal
a três pessoas que partiram desta vida,
mas que sempre ficarão em meu coração,
Vó Rosa, Vô Carlos e a meu pai Luiz.
Como gostaria de ter vocês ao meu lado, dando
o carinho que recebi aos meus dois príncipes.
Amo vocês para sempre.*

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradecer a Deus, por me proporcionar estar aqui, realizando um sonho.

Segundo aos pacientes, que permitem que façamos todas as pesquisas, em busca de uma melhora a eles.

Meu agradecimento para o Prof. Dr. Jorge Casseb, por ter me acolhido no laboratório, mesmo não tendo experiência. Por me agüentar durante seis anos, obrigada pelo carinho e compreensão.

Ao Dr. Alberto Duarte, por permitir desenvolver meus projetos de estudo no Laboratório de Investigação Médica – LIM56.

A Patrícia Montanheiro, que me levou ao LIM, por me ensinar e acompanhar durante este tempo todo.

A Ligia Maria, que foi uma super mãe, puxando minha orelha quando necessário e o principal, me dando suporte a tudo que necessitei.

A todos do grupo Imunovirologia, Fernando Augusto, Lia Bárbara, Fabio Cabral e Grazielle Freitas pelo carinho e amizade, obrigada e também pela paciência.

Adriana de Brito, que foi uma pessoa que aprendi a gostar e que hoje é uma grande amiga, além disso, me ajudar a escrever este trabalho, e sempre sendo crítica.

A todos os amigos do laboratório, como Leia, Rafael , Paula, Camila, Daniela Cardeal, Soraya, Nelson, Rosana, Noemia, Rosangela que no decorrer dos anos aprendi a gostar e admirar.

A duas pessoas muito especiais Silvinha e Adriana, pessoas simples, porém, muito amigas e preocupadas. Adoro muito vocês.

A todos os amigos da secretaria que me auxiliam sempre que precisei.

Dois seres muito importantes na minha vida, pessoas essas pelas quais hoje vivo e respiro, Luiz Henrique e João Vitor, amores incondicionais, amo vocês mais que o infinito. Hoje sei o sentido da vida, sou uma pessoa melhor, cada dia que vejo vocês dormindo me apaixona mais.

Ricardo, pessoa esta que um dia perdi, mas Deus resolver nos dar uma segunda chance. Sou completamente feliz ao seu lado. Obrigada por me amar e por ter me dado a oportunidade de ser mãe. Te amo. Meu amigo, companheiro, namorado, filho e amor.

Minha mãe, mulher que batalhou para nos criar, companheira, amiga. Minha irmã Gabrielle, após anos de brigas, hoje sei que a amo muito, que preciso dela ao meu lado para enfrentar qualquer coisa e que junto com meu cunhado Luciano está me dando a oportunidade de ser tia.

Vó Rosa, mulher que amei e amo pro resto da minha vida, esta me criou e me ensinou a ser gente, com toda a sua simplicidade, amor, carinho. Ser iluminado e abençoado.

A todos os meus tios e tias, Claudete, Almiro, Vera, Benê, Sueli, Jorge, Janete, Odair, Leonilda, Sonia, Marquinhos e Marcos, e em especial a minha tia Rita, pois sem ela não teria terminado minha faculdade e não estaria aqui defendendo o mestrado, muito obrigada, sem vocês não seria nada, porque minha família é tudo.

Meus primos, amo muito vocês, Vanessa, Almir, Letícia, Carol, Kleber, Kauê, Rodrigo, Matheus, Laís, André Luiz, Jéferson, Luciana, Patrícia, Kátia e Ritinha.

Olah I. *Diversidade molecular do envelope e carga proviral do vírus linfotrópico de células T humanas tipo 2 (HTLV-2) em amostras indeterminadas pelo teste Western – Blot* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

O Vírus Linfotrópico de Células T Humanas do tipo 2 (HTLV-2) é considerado pouco patogênico, mas o diagnóstico sorológico é importante para aconselhamento e acompanhamento. Os testes confirmatórios mais utilizados são o Western-Blot (WB) e a reação em cadeia de polimerase (PCR). Entretanto, em populações de alto risco como usuários de drogas intravenosas e a população indígena, cerca de 50% dos resultados indeterminados pelo WB resultaram como positivos para a infecção do HTLV-2, quando testadas pela PCR. Uma hipótese para a insensibilidade do teste WB utilizado no Brasil seria pelo uso de proteínas recombinantes procedentes de cepas que não circulam em nosso país. Outra possibilidade é o nível de imunossupressão, que pode acarretar uma menor produção de anticorpos anti-HTLV-2 circulantes. A carga proviral do HTLV-2 pode ser também um fator da pouca estimulação do sistema imune, o que resulta baixa quantidade de anticorpos circulantes. Este estudo testou três hipóteses e os resultados mostraram uma alta homologia na região do envelope viral quando alinhada com a sequência de aminoácidos da proteína K55 utilizada no WB, independente do perfil do teste. A carga proviral do HTLV-2, assim como o estado de imunossupressão dos pacientes não foi importante para perfis indeterminados do Western-Blot.

Descritores: 1. Vírus 2 linfotrópico T humano (HTLV-2) 2. Reação em cadeia da polimerase 3. Carga viral 4. WB indeterminado.

Olah I. Molecular diversity of the envelope and proviral load cell lymphotropic virus human T-cell type 2 (HTLV-2) in the test samples indeterminate Western-Blot [dissertation].

Despite the human T-cell lymphotropic virus type 2 (HTLV-2) is considered low pathogenic, the serological diagnosis is important for counseling and monitoring. The most used confirmatory tests are Western Blot (WB) and PCR. However, in high-risk populations, about 50% of the indeterminate WB results when tested by PCR, in our study, confirmed the presence of HTLV-2. A hypothesis for the insensitivity of the WB used in Brazil would be the use of recombinant proteins from strains that do not circulate in our country. Another possibility is the level of immunosuppression, which may lead to lower production of anti-HTLV-2 circulating. The viral load of HTLV-2 can also be a factor of little stimulation of the immune system, resulting low amount of antibodies. This study tested the three hypothesis and we showed that high homology in the region of immunogenic viral envelope when aligned with the sequence of amino acids of the protein K55 (HTLV-2) of WB kit, the proviral load and immunessuppression state were not important for inconclusive WB profiles.

Descriptors: 1. Human T-cell lymphotropic virus type 2 (HTLV-2) 2. Polymerase chain reaction 3. Viral load 4. indeterminate WB

LISTA DE ABREVIações, SÍMBOLOS E SIGLAS

° C	grau Celsius
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i> – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CD	Classe de diferenciação
CD4	Classe de diferenciação 4
CD8	Classe de diferenciação 8
Cels	Células
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CMN	Células mononucleares
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Deoxinucleosídeo-trifosfato
EIA	Ensaio imunoenzimático
ELISA	Ensaio imunoenzimático
<i>Env</i>	Gene do envelope viral
Et al	E colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
<i>Gag</i>	Gene do core viral
Gp	Glicoproteína
Gp21	Glicoproteína 21
Gp46	Glicoproteína 46
HC/FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCV	Vírus da hepatite C
HIV-1	Human Immunodeficiency Virus Type 1
HTLV	Vírus Linfotrópico de Células T Humana
HTLV-1	Vírus Linfotrópico de Células T Humana Tipo 1
HTLV-2	Vírus Linfotrópico de Células T Humana Tipo 2
IIER	Instituto de Infectologia “Emílio Ribas”
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i> – Longas repetições terminais

Pb	Pares de bases
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PCR nested	Reação em cadeia de polimerase com iniciadores aninhados
Pol	Gene da polimerase
RNA	Ácido ribonucléico
RNase	Livre (sem) de RNA
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
UDI	Usuário de drogas intravenosas
USP	Universidade de São Paulo
WB	"Western-blot"
μ	Micro
μg	Microgramas
μL	Microlitro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
Nm	Nanômetro
Pmol	Picomoles
rpm	Rotações por minuto

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Seqüência de nucleotídeos utilizados para a PCR nested	17
Tabela 2 -	Seqüência de nucleotídeos utilizados para a reação de sequenciamento	18
Tabela 3 -	Características demográficas e imunológicas de indivíduos infectados pelo HTLV-2	23
Tabela 4 -	Reatividade sorologica do Western-Blot em 27 amostras de indivíduos infectados pelo HTLV-2	25

LISTA DE FIGURAS

Figuras

Figura 1 -	Revelação da reação em cadeia da polimerase (PCR nested) do envelope do HTLV-2.	24
Figura 2 -	Comparação das seqüências das amostras positivas e indeterminadas pelo WB com a seqüência da proteína K55 e uma seqüência consenso.	24

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	01
2	OBJETIVOS	09
2.1	<i>Objetivo Geral</i>	09
2.2	<i>Objetivos Específicos</i>	09
3	CASUÍSTICA	10
3.1	<i>Aspectos Éticos</i>	11
3.2	<i>Critérios de Inclusão</i>	11
3.3	<i>Critérios de Exclusão</i>	11
3.4	<i>Tamanho das Amostras</i>	11
4	MÉTODOS	12
4.1	<i>Teste sorológico de triagem</i>	12
4.2	<i>Teste sorológico confirmatório</i>	12
4.3	<i>Algoritmo para diagnóstico sorológico de HTLV-1/2</i>	14
4.4	<i>Expressão de linfócitos T CD4+ e T CD8+ do sangue periférico por citometria de fluxo, realizado pelo serviço de rotina do LIM-56</i>	14
4.5	<i>Extração de DNA</i>	15
4.6	<i>PCR Nested (PCR em duas etapas) para amplificação da região do envelope viral</i>	16
4.7	<i>Sequenciamento</i>	17
4.8	<i>Quantificação da Carga Viral do DNA de HTLV-2</i>	19
4.9	<i>Análise Estatística</i>	20
5	RESULTADOS	21
6	DISCUSSÃO	26
7	CONCLUSÕES	30
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
9	ANEXOS	35

1. INTRODUÇÃO

O vírus linfotrópico de células T humana tipo 1 (HTLV-1) foi o primeiro retrovírus humano descoberto em 1980 (POIESZ, et al., 1980). Posteriormente, em 1982 foi isolado um segundo tipo viral do HTLV, sendo classificado como HTLV-2 (KALAYNARAMAN, et al., 1982)

O HTLV-1 e HTLV-2 são complexos retrovírus que apresentam a mesma organização genômica e com 65 a 70% de similaridades nucleotídicas (VANDAMME, et al., 2000).

O vírus HTLV-2 apresenta-se com aproximadamente 100 nm de diâmetro e composto por 8952 nucleotídeos. A porção estrutural do deste vírus, é formada pela região LTR e pelos genes *gag*, *pol* e *env*. E com maior importância, os genes regulatórios *tax* e *rex* (GREENE, et al., 1990).

A região LTR apresenta 763 nucleotídeos, com vários domínios funcionais, atuando como um promotor, ativador e finalizador de transcrição. As seqüências da região LTR do HTLV-1 e do HTLV-2 apresentam pequena homologia, exceto pelos nucleotídeos localizados nos domínios funcionais (GREENE, et al., 1990).

O gene *gag* do HTLV-2 codifica três proteínas estruturais: a proteína da matriz (p19), a proteína do capsídeo (p24) e a proteína do nucleocapsídeo

(p15), essas proteínas apresentam 55%, 68% e 85% de homologia, respectivamente, com as proteínas correspondentes do HTLV-1 (GREENE, et al., 1990).

O gene *pol*, localizado entre os nucleotídeos 2239 e 5184, podem codificar 982 aminoácidos e sua homologia com o gene *pol* do HTLV-1 é de 61% (GREENE, et al., 1990).

O gene *tax* interage com diferentes reguladores da proliferação celular, podendo alterar o controle da progressão do ciclo celular, alguns estudos indicam que a atividade regulatória da proteína *tax* é fundamental para o desenvolvimento de doenças relacionadas ao vírus HTLV-1. Entretanto, para o HTLV-2, esta relação ainda está pouco esclarecida, com apenas relatos de portadores do vírus HTLV-2 com quadros brandos de doenças neurológicas ou maior incidência de infecções (ORLAND et al. 2003). É muito provável que a patogênese do HTLV-1 esteja relacionada à capacidade da atividade da proteína *tax-1*. De fato, alguns trabalhos demonstraram que a *tax* do HTLV-1 possui um domínio regulatório e que a proteína *tax-2* não possui. Deste modo, este domínio tem importante papel para recrutar e organizar proteínas importantes, envolvidas na sinalização celular e na comunicação célula a célula por polarização (BANGHAM, 2003).

O gene *env*, localizado entre os nucleotídeos 5180 e 6637, codifica 486 aminoácidos (GREENE, et al., 1990). Duas glicoproteínas são codificadas

por este gene, a gp46 e gp21, ambas presentes na porção externa do vírus, (WAZIRI, et al., 2000). A gp46 apresenta epítomos imunodominantes para a indução de anticorpos (TANAKA et al., 2001; TANAKA et al., 1994) e a gp21 é responsável pela fusão viral (WILSON et al. 2001). Estudos mostraram que estas duas glicoproteínas implicam na maturação do envelope e no reconhecimento dos anticorpos (GESSAIN, et al., 2000). Desta forma, a diversidade genética no envelope viral poderia acarretar em variações antigênicas no epítomo imunodominante, que pode afetar a ligação dos anticorpos e a sensibilidade do ensaio diagnóstico (XIE, et al., 2005).

Em trabalhos recentes, Xie e colaboradores em 2005, mostraram que o gene *env* é o principal determinante das diferenças distintas na transformação do tropismo celular entre os vírus HTLV-1 e HTLV-2, mas observaram que as oncoproteínas *tax* e *rex* não conferiram diferença nesta transformação do tropismo. Contudo, observou-se que a interação entre o *env* viral e receptores celulares, medeiam a entrada viral em tipos celulares específicos, além de modular o meio intracelular após entrada na célula.

Em 1983, foram introduzidos testes sorológicos para detecção de anticorpos anti-HTLV-1 (ROBERT-GUROFF, et al., 1982). A utilização destes testes permitiu por meio de inquéritos epidemiológicos (CLARK, et al., 1985) a observação de altos índices de anticorpos anti-HTLV-1 em indivíduos nas ilhas do sudoeste do Japão, onde a prevalência destes

anticorpos era maior que 30% nas pessoas acima de 40 anos (ROBERT-GUROFF, et al., 1982).

No Brasil, a partir de 1993, foram introduzidos os testes sorológicos para detecção de anticorpos anti-HTLV-1/2 em bancos de sangue. A partir de então, verificaram elevada taxa na prevalência de anticorpos anti-HTLV-1 e anti-HTLV-2 em doadores de banco de sangue nas cidades do Rio de Janeiro e São Paulo. Esta taxa foi pelo menos três vezes maior do que a encontrada para o vírus da imunodeficiência humana do tipo 1 (HIV-1) (FERREIRA, et al., 1995; DE ARAÚJO, et al., 1994).

Vários estudos, inclusive no Brasil, revelaram a necessidade de testes confirmatórios mais específicos. Em Fortaleza, um grupo de pacientes soro-indeterminados mostrou que apenas uma pequena porcentagem foram determinados como positivos para HTLV-1/2, após análise por PCR e WB (SANTOS et al., 2003). MANGANO, et al. (2004), observou que amostras soro-indeterminadas em testes confirmatórios para HTLV-1 e 2 por meio WB, identificaram que as amostras foram determinadas 20% para HTLV-1, 8% para HTLV-2, 11% negativos e a maioria das amostras permaneceram indeterminadas (61%).

Apesar de a homologia genômica indicar uma elevada reatividade sorológica cruzada entre o HTLV-1 e o HTLV-2, estudos indicam a necessidade do desenvolvimento de reagentes que possibilitam identificar

com maior sensibilidade, a soro-positividade dos indivíduos infectados pelo HTLV-2. De fato, testes que utilizaram somente lisado viral do HTLV-1, não apresentaram a sensibilidade suficiente para detectar anticorpos contra o HTLV-2 (WAZIRI, et al., 2000; ZEHENDER, et al., 1997; ZEHENDER, et al., 1996; DE ARAÚJO, et al., 1998).

A presença de cepas divergentes de HTLV-2 pode ser responsável pelos casos de resultados falso-negativos nos testes imunoenzimáticos (ELISA). Testes diagnósticos que utilizam lisado viral do HTLV-1 e do HTLV-2, assim como algumas proteínas recombinantes têm sido avaliadas e estão disponíveis comercialmente (WAZIRI, et al., 2000). A imunofluorescência indireta (IFA) mostrou ser ótimo teste para detectar infecção pelo HTLV-2 nas amostras brasileiras determinadas negativas pelo ELISA (CASSEB, et al., 1997a).

ZEHENDER, et al. (1997) observaram que a detecção de anticorpos anti-HTLV-2 em usuários de drogas endovenosas infectados pelo HIV-1 na Itália, foram soronegativos no ELISA, entretanto 26% desses pacientes foram positivos no seqüenciamento para HTLV-2. Entre os UDIV com Aids em São Paulo, cerca de 30-40% foram detectados positivos para HTLV-1/2 (DE ARAÚJO, et al., 1994). CASSEB, et al. (1997a), utilizando ELISA de menor sensibilidade para HTLV-2, demonstraram que a infecção pelo HTLV-1 teve predomínio entre os indivíduos estudados. Entretanto, o uso de imunofluorescência permitiu observar um predomínio de infecção pelo

HTLV-2 nessa população (70%), enquanto infecção pelo HTLV-1 foi encontrada em 30% dos pacientes (CASSEB, et al., 1997b).

Estudo prévio realizado na Espanha mostrou que a quantidade de células T CD4⁺ nos indivíduos infectados pelo HTLV-2 afetou a sensibilidade do ELISA, mas não afetou a sensibilidade do WB. Indivíduos com células T CD4⁺ acima de 500 células/mm³ foram positivos no ensaio diagnóstico ELISA e WB. Entretanto, os indivíduos com células T CD4⁺ abaixo de 500 células/mm³ não foram reativos no ELISA, necessitando de ensaios confirmatório de PCR. Pode-se considerar que a imunossupressão celular é fator importante, podendo resultar em amostras soro-indeterminados, possivelmente pela menor produção de anticorpos anti-HTLV-2 circulantes (BASSANI, et al. 2006). Estudo recente em nosso laboratório revelou que 50% dos resultados identificados pelo WB foram determinados HTLV-2 positivos pela PCR e seqüenciamento (NOVOA, et al., 2007).

O vírus HTLV-2 é geneticamente mais estável que outros vírus RNA (SALEMI, et al., 1999), com número de ciclos replicativos e frequência de mutações relativamente baixas. A existência de uma elevada variação na carga proviral nas células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) em indivíduos usuários de droga (CIMARELLI, et al., 1995). Porém, este achado contradiz a afirmação de que o vírus apresenta baixa replicação viral (SALEMI, et al., 1999).

A elevada estabilidade genômica do HTLV-2 poderia ser explicada considerando que, em alguns indivíduos a carga proviral é muito baixa, sugerindo uma lenta replicação viral, enquanto que nos pacientes com alta carga proviral, a replicação poderia ser, principalmente, pela expansão clonal de células infectadas, via mitose e principalmente durante a transcrição reversa (WATTEL, et al., 1995).

A diversidade genética leva à variações antigênicas no epítopo imunodominante que pode afetar a ligação dos anticorpos e afetar a sensibilidade do ensaio diagnóstico. Isto explica uma das razões pela baixa sensibilidade do WB, que devido ao fato de usar de proteínas recombinantes de cepas circulantes em outros países, pode implicar em resultado soro-indeterminados no WB devido a possível variabilidade genética discordante das amostras brasileiras. Deste modo, existe a necessidade da caracterização da região imunodominante do envelope viral circulante nos indivíduos portadores de HTLV-2 em São Paulo.

Apesar do nível de imunossupressão não ter afetado a sensibilidade do teste de WB, para detecção de anticorpos anti-HTLV-2, como mostrado por BASSANI, et al. 2006, devermos avaliar a hipótese de que a imunossupressão celular pode resultar em soro-indeterminados, pela menor produção de anticorpos anti-HTLV-2 circulantes.

Resultados preliminares obtidos em nosso laboratório revelaram que as nossas seqüências se alinharam com a proteína MTA4 (HTLV-1), usada no kit de WB. Por esta razão, é necessário estudar o grau de homologia da proteína K55, usada no kit de WB disponível comercialmente no Brasil, responsável pela caracterização de indivíduos soro-reativos para o HTLV-2.

Portanto, o estudo da variabilidade genética do HTLV-2 é fundamental para melhorar os testes sorológico de HTLV-2 e diagnóstico das amostras que resultam como indeterminadas pelo WB.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar fatores que podem estar associados à presença de resultados indeterminados do Western-Blot em indivíduos infectados pelo HTLV-2.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a contagem de células T CD4+ e T CD8+, que pode acarretar em uma menor produção de anticorpos anti-HTLV-2;
2. Avaliar a carga proviral de pacientes com o vírus HTLV-2, sabendo que pouca estimulação do sistema imune, pode resultar em baixa quantidade de anticorpos;
3. Analisar a diversidade genética de uma determinada região do envelope viral do HTLV-2, pareando com a proteína K55 (RGP-49II).

3. CASUÍSTICA

No período entre julho de 1997 a maio de 2009, 615 indivíduos procuraram o Serviço de Ambulatório de HTLV do Instituto de Infectologia “Emílio Ribas”, em São Paulo. Para avaliar a possibilidade de infecção pelo vírus HTLV. Utilizando o algoritmo publicado anteriormente (Novoa, et al. 2008), 104 indivíduos foram confirmados positivos para o vírus HTLV-2 nos últimos 12 anos.

Para este estudo, selecionamos 29 amostras que preencheram todos os critérios para a infecção pelo HTLV-2 e 21 amostras de indivíduos que foram indeterminados pelo WB. Todos os indivíduos foram também testados para HCV e HIV utilizando os testes de rotina IIER ou do banco de sangue.

O Projeto de Pesquisa foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética Médica e Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto de Infectologia “Emilio Ribas”. Após o participante concordar e assinar o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) 51/07, os indivíduos completaram o acompanhamento clínico e teve suas provas de confirmação diagnóstica realizadas, segundo prévia do protocolo idealizado para o presente estudo. Neste momento, as amostras de PBMC foram separadas e armazenadas.

Os plasmas foram analisados para detecção da presença de anticorpos anti-HTLV-1/2 através do método de ELISA (HTLV-I/HTLV-2 capture test EIA, Ortho Diagnostics, EUA), e Western-Blot (WB) (HTLV WB 2.4, DBL, Singapura) realizados no laboratório do “Instituto de Infectologia Emilio Ribas” (BRODINE, et al., 1993). As amostras

consideradas positivas para HTLV-2 e indeterminadas pelo WB 2.4 foram posteriormente amplificadas pela técnica de PCR e submetidas à análise de nucleotídeos através da técnica de seqüenciamento.

3.1 Aspectos Éticos: Somente aqueles pacientes que assinaram o termo de consentimento livre esclarecido, participaram deste estudo e em nenhum momento esses dados foram divulgados.

3.2 Critérios de inclusão: Indivíduos adultos, acima de 18 anos de idade, com diagnóstico de infecção retroviral confirmados pelo teste de ELISA e confirmados como positivo e/ou indeterminado pelo Western Blot (WB).

3.3 Critérios de exclusão: Mulheres grávidas, pacientes em uso de imunossupressores, portadores de insuficiência renal ou hepática, neoplasias ou doenças auto-imunes.

3.4 Tamanho da amostra: Baseados em estudos prévios, testamos as hipóteses com os seguintes grupos e números de voluntários recrutados:

4. MÉTODOS

4.1 TESTE SOROLÓGICO DE TRIAGEM

Para a realizar a triagem sorológica de detecção de anticorpos anti-HTLV-1/2, foram utilizados ensaios *in vitro* empregando a metodologia de enzimaímunoensaio (ELISA) de microplaca qualitativa. Foram utilizados dois *kits* comerciais com características antigênicas distintas. Ambos foram realizados de acordo com as instruções dos fabricantes.

- **ELISA 1: ORTHO HTLV-1/2 Ab – Capture ELISA Test System** é um ensaio imunossorbente ligado à enzima que detecta anticorpos específicos utilizando quatro antígenos recombinantes. Eles correspondem a quatro seqüências das proteínas virais: envelope e core do HTLV-1, envelope e core do HTLV-2.
- **ELISA 2: MUREX HTLV-1+2, Abbott Murex, Singapura** é um ensaio imunossorbente ligado à enzima cuja fase sólida é revestida com peptídeos sintéticos de uma proteína imunodominante do envelope do HTLV-1 e do HTLV-2 e uma proteína recombinante da transmembrana do HTLV-2.

4.2 TESTE SOROLÓGICO CONFIRMATÓRIO

As amostras de soro que se mostraram repetidamente reagentes para HTLV-1/2, discordantes e ou indeterminados aos testes de triagem, foram

submetidas a seguir aos testes confirmatórios, utilizando a metodologia de *Western Blot* (HTLV BLOT 2.4, Abbott Murex, Singapura).

Nesta técnica foi empregado um *kit* comercial que compreende o lisado viral total, acrescentando não só do antígeno recombinante correspondente à proteína transmembrana, comum aos dois retrovírus, mas ainda de peptídeos outros correspondentes a epitopos distintos, derivados da porção central da glicoproteína externa do envelope viral (gp46) que são específicos para cada tipo do vírus: MTA-1(ou rgp46-I), específico para HTLV-1 e K-55 (ou rgp46-II), específico para HTLV-2 e mais a GD21, uma proteína recombinante também do envelope e comum aos dois vírus.

A interpretação dos resultados das reações baseou-se nas normas estabelecidas pelo fabricante:

- Ausência de quaisquer bandas de reatividade aos antígenos virais → soronegativo;
- Reatividade a proteína do GAG (p19 ou p24) e duas do ENV (GD21 e rgp46-I) → soropositivo para HTLV-1;
- Reatividade a proteína do GAG (p19 ou p24) e duas do ENV (GD21 e rgp46-II) → soropositivo para HTLV-2;
- Reatividade a proteína do GAG (p19 ou p24) e uma do ENV (GD21) → soropositivo para HTLV;
- Reatividade com padrão diverso ao considerado soropositivo → indeterminado.

4.3 ALGORITMO PARA DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE HTLV-1/2

Para melhor caracterização das amostras de soro, o teste ELISA foi repetido em duplicata em todos os casos que apresentaram resultados reagentes (acima do limiar de reatividade) ou da zona considerada cinzenta, que definimos ser uma variação de 20% abaixo ou acima do limiar de reatividade. Tais repetições foram feitas para descartarmos possíveis falhas técnicas.

4.4 EXPRESSÃO DE LINFÓCITOS T CD4+ E T CD8+ DO SANGUE PERIFÉRICO POR CITOMETRIA DE FLUXO, REALIZADO PELO SERVIÇO DE ROTINA DO LIM-56

O sangue periférico de cada indivíduo foi coletado em tubo contendo EDTA e homogeneizado durante 5 minutos. A determinação do número total de leucócitos foi realizada em contador hematológico automático (Cell-Dyn 1400, ABBOTT Diagnostics Division, Illinois, USA).

Em todos os tubos, cada um com seus respectivos anticorpos e amostra, foram homogeneizados em agitador automático em velocidade baixa e incubados à temperatura de 4°C por 45 minutos, no escuro. Após a incubação, foi realizada lise das hemácias em aparelho Multi-Q-Prep (Beckman Coulter, Miami, USA). Após a lise, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo Epics XL-MCL – Coulter (Beckman Coulter, Miami, USA). A aquisição dos eventos e análise dos resultados foram realizados com o auxílio do programa Coulter Epics XL Flow Cytometer System II. As

populações de linfócitos em estudo foram determinadas a partir da população de linfócitos e monócitos definidos por tamanho e granulosidade. A partir da região dos linfócitos, foi selecionada a população de linfócitos marcada com anti-CD3 humano e anti-CD4 humano ou anti-CD3 humano e anti-CD8 humano. Sendo analisados, no total, 10.000 eventos na região de linfócitos T CD4⁺ ou T CD8⁺.

4.5 EXTRAÇÃO DE DNA

As amostras consideradas positivas e indeterminadas pela técnica de WB e confirmadas pela PCR genérica, foram submetidas a um processo de extração de DNA pelo kit comercialmente disponível (GFX Genomic Blood DNA Purification, Amersham Pharmacia Biotech, Inc, Piscataway, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA foi extraído de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e padronizado para 2×10^6 células. Foi adicionado 500 µl de solução de extração (Extraction Solution), deixando por 10 minutos à temperatura ambiente. O conteúdo foi transferido para colunas de sílica e centrifugado a 680 xg por 3 minutos, descartando-se o tubo coletor. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes. Acrescenta-se 500µl solução de lavagem (Wash Solution), centrifugando a 1020 xg por 5 minutos. A coluna foi transferida para tubos cônicos de 1,5 ml, identificados e adicionou-se 70µl de água aquecida previamente a 70°C, deixando aproximadamente por 15 minutos a temperatura ambiente. Após

centrifugação a 600 xg por 3 minutos, o DNA genômico foi armazenado em freezer -20°C.

4.6 PCR NESTED (PCR EM DUAS ETAPAS) PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO DO ENVELOPE VIRAL

Após a extração do DNA genômico, as amostras amplificaram uma região do envelope viral do vírus HTLV, através de uma técnica de PCR nested. Para o volume final de 50µl contendo 0.2 mM de dNTPs, 2mM MgCl₂, 0.01 µmol de cada primer, 0.5 U Taq DNA Polimerase (Amersham Pharmacia Biotech, New Jersey, EUA) em tampão 1X (10 mM Tris-HCl e 50 mM KCl) e água deionizada. Uma reação contendo todos os componentes acima citados e sem DNA foi incluída em todas as amplificações como controle negativo, sendo controle positivo o DNA de amostras sabidamente positivas com o vírus HTLV. As condições de ciclagem da PCR iniciaram-se por 4 minutos a 94 °C para desnaturação, seguida de 30 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94 °C; 1 minuto de anelamento a 56 °C e 2 minutos a 72 °C para extensão, seguido de um ultimo passo de 10 minutos a 72 °C para a extensão final. A primeira etapa utilizou-se os primers denominados E_FR_S e E_FR_AS, para a segunda etapa foi realizada sob as mesmas condições, porém, com a troca dos primers iniciador E_SR_S e E_SR_AS. O produto amplificado foi observado em eletroforese em gel de agarose 2%, TBE 1X, corado com brometo de etídio 0,03µg/mL. As bandas do material amplificado foram comparadas ao padrão de peso molecular *Low DNA Ladder* (Invitrogen, Califórnia, USA).

Os primers utilizados foram desenhados a partir de uma cepa consenso utilizando o programa Primer 3 (versão 0.4) (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), que fornece uma lista de possíveis primers e após o alinhamento, optamos por aqueles com melhor amplificação. Um produto com 1000 pb foi amplificado e usado para o seqüenciamento direto (tabela 1 e 2).

Tabela 1. Seqüência de nucleotídeos utilizados para a PCR nested

E_FR_S	GCTACAATGCCCCTACTTGG (Forward Primer)
E_FR_AS	CCTATGGGAGGAATGTGAGC (Reverse Primer)
E_SR_S	GTCTCCAGTCCATCCTGGAA (Forward Primer)
E_SR_AS	CAGGGGCCAAACAATATGAC (Reverse Primer)

4.7 SEQUENCIAMENTO

Os produtos das amostras da PCR analisadas foram purificadas por meio kit disponível (QIAquick PCR Purification, Qiagen, Valencia, Califórnia), a fim de retirar o excesso de iniciadores e dNTPs da reação, seguindo as instruções do fabricante.

Para a reação de sequenciamento (``Cicle sequencing``) foi preparada a solução de reagentes na concentração de 100 ng de produto de PCR, 0.0005 μ mol de cada iniciador, 8 μ l de dideoxiribonucleotídeos fluorescentes (Big dye terminators, Perkin Elmer Cetus, Emerville, CA, EUA) e água para completar o volume final de 10 μ l. Posteriormente, a reação foi submetida a 25 ciclos de amplificação a 96°C por 10 segundos para a abertura das fitas de DNA, 50°C por 5 segundos para o anelamento dos iniciadores e 60°C por 4 minutos para a atuação da enzima polimerase. A purificação do produto da reação de sequenciamento foi realizada por meio de isopropanol – etanol, para retirada do excesso de dideoxiribonucleotídeos fluorescentes.

Tabela 2. Sequência de nucleotídeos utilizados para a reação de sequenciamento

E_seq1_as	ATGGAGATGTTGGGGGTGTA (Forward Primer)
E_seq1_s	TACACCCCCAACATCTCCAT (Reverse Primer)
E_seq2_as	TGACTATGGCCTGGGTAAGG (Forward Primer)
E_seq2_s	CCTTACCCAGGCCATAGTCA (Reverse Primer)

A todo o conteúdo do produto da reação de seqüenciamento foram adicionados 80 μ L de isopropanol 70%, que foram agitados e incubados à

temperatura ambiente por 15 minutos. Foram centrifugados por 45 minutos a 1105 xg, removendo-se, depois, todo o sobrenadante. Foram colocados 100µL de etanol 70%, misturados por inversão e centrifugados por 20 minutos a 1105 xg. Com todo o sobrenadante foi retirado e repetido o procedimento anterior.

Após o descarte do sobrenadante, o material centrifugado foi secado por aproximadamente uma hora a temperatura ambiente, Após este procedimento, os “pellets” foram armazenados a -20°C. Para realizar a corrida eletroforética, os “pellets” foram ressuspensos e, 6 µl da solução de formamida – dextran na concentração de 5:1.

As amostras foram corridas em um seqüenciador automático de DNA (Applied Biosystems-377, Perkin Elmer, Foster city, CA, USA) e analisadas por meio do programa “Sequence Navigator” (Perkin Elmer, Foster city, CA, EUA). As seqüências obtidas foram analisadas e comparadas a uma seqüência consenso da região do envelope viral e da proteína K55 (RGP-II) do kit Western-Blot.

4.8 QUANTIFICAÇÃO DA CARGA VIRAL DO DNA DE HTLV-2

A PCR em tempo real foi realizada utilizando probes, uma marcada com FAM, na posição 5' (linha) e uma segunda probe como a fluorescência TAMRA, da 3' (linha). Para quantificar o gene humano da albumina, os primers utilizados foram: Alb-S (5'-GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT-3'),

Alb-AS (5'- AAACATCATGGGAGCTGCT GGTT-3') e a probe Alb TaqMan (5' - FAM-CCTGTCATGCCCCACACAAATCTCTCC-TAMRA-3'), como descrito previamente por MIYOSHI, et al, 2000.

A quantificação do DNA da albumina foi utilizada em paralelo com outras amostras, a fim determinar a quantidade de DNA celular presente e como uma referência de agentes endógenos para normalizar as variações, devido às diferenças na contagem de PBMC ou na extração do DNA. O protocolo foi realizado de acordo com os dados publicados por DEHEE, et al., 2002. A quantidade de DNA proviral de HTLV-2 foi calculada seguindo a fórmula: número de cópias de HTLV-2 (Px) por 2×10^6 CMN = [(número de cópias de Px)/(número de cópias de Albumina / 2)] x 2×10^6 .

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para analisar os resultados obtidos pela densidade óptica (DO) do aparelho, transferimos os valores para o programa “Prisma 3.0”. Utilizamos os testes “T test anoway” e Teste não-paramétrico de “Mann-Whitney”. Quando o valor de “p” foi < que 0,05, a análise foi considerada estatisticamente significativa.

5. RESULTADOS

Um total de 50 indivíduos confirmados como HTLV-2 positivos, através da técnica da PCR e RFLP, foi avaliado neste estudo. Destes, 29 pacientes eram HTLV-2 e 21 indeterminados por WB. Portanto, 50 pacientes infectados pelo HTLV-2 foram encontrados nesta coorte.

A classificação etária variou de 20 a 59 anos, com média de 41 anos para o grupo positivo e 38 anos para o grupo indeterminado pelo WB. Entre o grupo com WB positivo, 14 eram do sexo feminino e 15 do sexo masculino, no grupo indeterminado nove indivíduos eram do sexo feminino e 12 do sexo masculino (tabela 3). Trinta e um foram confirmados como UDI, 14 tiveram transmissão heterossexual, duas mulheres tinham um parceiro sexual UDI, houve um caso de transmissão vertical, uma foi receptor de transfusão de sangue e um homem homossexual.

Os pacientes do grupo indeterminado apresentaram grande positividade para o vírus da Hepatite C (HCV), quando comparados ao grupo positivo ($p=0,04$). Ao analisar a prevalência do HIV-1 observamos que ambos os grupos apresentam similaridade na co-infecção.

A tabela 3 apresenta os dados demográficos e imunológicos de cada grupo estudado. A mediana da contagem de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ foi semelhante, quando analisados pelo método Kruskal-Wallis (443 vs 608 cells/mm³, e 781 vs 746 cells/mm³, WB positivo e WB indeterminados, respectivamente).

A quantificação da carga proviral do HTLV-2, indicou que no grupo positivo 13 indivíduos apresentaram níveis abaixo do limite de detecção. No grupo indeterminado, de 17 amostras, seis resultaram em positivas com 12 – 30 cópias/ 10^4 de células, desta forma, podemos concluir que o grupo inconclusivo ($p=0,02$) (tabela 3) apresenta maior detecção de carga viral, porém esses valores são extremamente baixos comparados a detecção do HTLV-1, HIV-1 e HCV.

Após a confirmação da infecção pelo HTLV-2 através dos testes sorológicos, realizamos os testes moleculares, utilizando a técnica da PCR nested da região do envelope viral. Cinquenta amostras foram analisadas e resultaram como positivas para a PCR nested, apresentando 1000 pares de base. Destas, cinquenta amostras, foram separadas 21 amostras com padrão positivo na técnica de WB e 29 apresentaram padrão indeterminado (figura 1).

A figura 2 apresenta a diversidade genética do envelope do HTLV-2. Vinte e sete amostras foram submetidas à técnica de sequenciamento direto do DNA proviral na região envelope. Estas amostras foram alinhadas e comparadas com uma sequência de origem africana (Y13051AFRICA) obtida do GeneBank e com a proteína K55 presente no WB 2.4 que é específica para o HTLV-2. Após editar as sequências, identificamos a troca de um aminoácido Serina (S) por uma Prolina (P) em vinte amostras sequenciadas. Destas, 12 eram do grupo com WB indeterminado e oito amostras do grupo positivo. As demais sete amostras (quatro eram de pacientes com WB positivo e três de pacientes indeterminados pelo WB) não

continham a troca do aminoácido Serina, ou como encontrada na proteína K55. Entretanto, a presença desta alteração não foi significativa ($p = 0,7$) em relação ao padrão do WB.

A tabela 4 demonstra que as amostras reagiram principalmente com as bandas rgp46-II e p24, observamos que não existe um padrão para considerarmos um resultado de inconclusivo pelo WB.

Tabela 3. Características demográficas e imunológicas de indivíduos infectados pelo HTLV-2

Variavel	HTLV-2 Positiva WB (n= 29)	HTLV Indeterminado WB (n=21)	Total (n=50)	Valor P
Genero Mulher / Homem	14/15	9/12	23/27	NS
Idade Media, anos	41	38	40	NS
Celulas T CD4⁺ , Mediana, cells/mm ³ (percentil 25% - 75%)	443 188 - 663	608 227 - 941	476 190-899	NS
Celulas T CD8⁺ Mediana, cells/mm ³ (percentil 25% - 75%)	781 551 - 1044	746 473 - 1288	781 500-1166	NS
HCV (n. %)	8 (28)	12 (57)	20 (40)	0.04
HIV (n. %)	18 (62)	14 (67)	32 (64)	NS
Carga proviral HTLV-2 n. % > 10 copias/10 ⁶ PBMC	0/13 (0)	6/17 (35)	6/30	0.02

NOTA. NS: analise estatística não significante;

1000 pb

100pb 01 02 03 04 05 06 07 C(-) C(+)

					160	170	180	190	200	210
445		AMTLL	VDAPGYDPLW	FITSEPTQPP	PT P PPLVHDS	DLEHVLTPST	SWTTKILKFIQ			
82		AMTLL	VDAPGYDPLW	FITSEPTQPP	PT P PPLVHDS	DLEHVLTPST	SWTTKILKFIQ			
81		AMTLL	VDAPGYDPLW	FITSEPTQPP	PT P PPLVHDS	DLEHVLTPST	SWTTKILKFIQ			
274		AMTLL	VDAPGYDPLW	FITSEPTQPP	PT P PPLVHDS	DLEHVLTPST	SWTTKILKFIQ			
80		AMTLL	VDAPGYDPLW	FITSEPTQPP	PT P PPLVHDS	DLEHVLTPST	SWTTKILKFIQ			
302		-MTLL	VDAPGYDPLW	FITSEPTQPP	PT P PPLVHDS	DLEHVLTPST	SWTTKILKFIQ			
317		-MTLL	VDAPGYDPLW	FITSEPTQPP	PT P PPLVHDS	DLEHVLTPST	SWTTKILKFIQ			
307		-MTLL	VDAPGYDPLW	FITSEPTQPP	PT P PPLVHDS	DLEHVLTPST	SWTTKILKFIQ			
265		-MTLL	VDAPGYDPLW	FITSEPTQPP	PT P PPLVHDS	DLEHVLTPST	SWTTKILKFIQ			
285		-MTLL	VDAPGYDPLW	FITSEPTQPP	PT P PPLVHDS	DLEHVLTPST	SWTTKILKFIQ			
395		-MTLL	VDAPGYDPLW	FITSEPTQPP	PT P PPLVHDS	DLEHVLTPST	SWTTKILKFIQ			
35		AMTLL	VDAPGYDPLW	FITSEPTQPP	PT P PPLVHDS	DLEHVLTPST	SWTTKILKFIQ			
K55	HTLV-2	-----	-DAPGYDPLW	FITSEPTQPP	PT S PPLVHDS	DLEHVLTPST	SWTTK-----			
Y13051	AFRICA	-MTLL	VDAPGYDPLW	FITSEPTQPP	PT P PPLVHDS	DLEHVLTPST	SWTTKMLKFIQ			
334		----L	VDAPGYDPLW	FITSEPTQPP	PT S PPLVHDS	DLEHVLTPST	SWT-----			
346		----L	VDAPGYDPLW	FITSEPTQPP	PT S PPLVHDS	DLEHVLTPST	SWT-----			
352		----L	VDAPGYDPLW	FITSEPTQPP	PT S PPLVHDS	DLEHVLTPST	SWT-----			
369		----	--APGYDPLW	FITSEPTQPP	PT S PPLVHDS	DLEHVLTPST	SWT-----			
391		--L	VDAPGYDPLW	FITSEPTQPP	PT S PPLVHDS	DLEHVLTPST	SWT-----			
116		----L	VDAPGYDPLW	FITSEPTQPP	PT S PPLVHDS	DLEHVLTPST	SWT-----			
351		-	-DAPGYDPLW	FITSEPTQPP	PT S PPLVHDS	DLEHVLTPST	SWTTKI-----			

Tabela 4. Reatividade sorologica do Western-Blot em 27 amostras de indivíduos infectados pelo HTLV-2

Amostra	Padrão do WB 2.4 Profile
321/334	GD 21, GP 21, p24fr
35	GD 21, p19,p24
82/158/307/317/335	GD 21, p24
193	GD 21fr, p53fr, P28fr
361	rgp 46-lfr, p24,p19,GD21
415	rgp 46-lfr, GD 21
472	rgp46-II, GD 21
116	rgp46-II, gp21, p24
101	rgp46-II, P28, P24
346/350	rgp46-IIlfr
80/95/274/285/394/539	rgp46-II, P24
81/302/265	rgp46-II, p24fr, p19
Total: 25	

Nota: Em duas amostras, as bandas não foram descritas no prontuário médico.

6. DISCUSSÃO

Estudamos cinqüenta amostras de indivíduos infectados pelo vírus HTLV-2 em nosso grupo na cidade de São Paulo. Não foi observada nenhuma correlação entre as contagens de células T e carga proviral nos indivíduos com perfis indeterminados pelo WB, porém a detecção viral somente foi realizada em 30 amostras. A infecção pelo HTLV-2 produz uma baixa taxa de replicação e segundo o estudo de Montanheiro et al. (2008), não houve detecção de vírus ou carga viral quando analisado pelas células do sangue periférico (CMN). HTLV-2 é geneticamente mais estável do que outros vírus RNA (Salemi, et al., 1999), com o número relativamente baixo de ciclos de replicação e, portanto, uma frequência de mutações. CIMARELLI, et al. (1995) demonstraram a existência de uma grande variação na carga proviral em PBMCs de indivíduos usuários de drogas.

A alta estabilidade genética do HTLV-2 pode ser explicada considerando que alguns indivíduos mantenham uma baixa carga proviral, sugerindo uma lenta replicação viral, enquanto que em pacientes com alta carga proviral, a replicação pode ser, principalmente, pela expansão clonal de células infectadas, através da multiplicação de células, e especialmente durante a transcrição reversa (WATTEL, et al., 1995). MURPHY, et al. (2004) mostraram que a carga proviral foi significativamente maior nos pacientes infectados pelo HTLV-1 em comparação com os infectados pelo HTLV-2. Nos indivíduos com infecção crônica a carga proviral pode ser

relacionada com a quantidade de inoculo e com a via de transmissão. Alta carga proviral de HTLV-2 foi relacionada com a infecção por transfusão de sangue e de baixa carga proviral estava relacionada à infecção através de transmissão sexual. Apesar destas constatações, existe a necessidade de aprofundar a compreensão da imunopatogenia e características moleculares do vírus HTLV-2, devido aos poucos estudos relacionados com a carga proviral HTLV-2.

Neste estudo, observamos outro ponto relevante, à possibilidade de imunossupressão ser a responsável pelos resultados indeterminados pelo WB. Um estudo, realizado na Espanha, mostrou que o número de células T CD4 afetou a sensibilidade da EIA, mas não alterou a sensibilidade da WB (Bassani et al. 2006). É possível considerar que o sistema imune é um fator importante e podem resultar as amostras de soro em indeterminado, possivelmente pela menor produção de anticorpos anti-HTLV-2 (Bassini et al, 2006). No entanto, nossos resultados indicam que a contagem células T não influenciou na presença dos resultados indeterminados, mesmo em indivíduos infectados pelo HIV-1.

Gallo et al. (1994) constataram que o teste de WB tinha uma sensibilidade de 68%, com fracas bandas nos resultados de HTLV-2 positivos e uma especificidade de 70% com os negativos. Apesar de que todos os positivos reagiram com rgp21, a presença do antígeno p24 no kit não foi suficientemente para reagir com todos os aspectos positivos e 11

amostras de HTLV-2 reagiram com a proteína do envelope (Gallo et AL. 1994). Nesse estudo, uma vez que todas as amostras positivas reagiram com rgp21, que é o antígeno mais sensível na WB kit, assim as amostras que não reagiam com esta proteína eram consideradas negativas, independentemente de outras bandas. Isso teria aumentado a especificidade deste HTLV WB 2.4 para 86%. Eles concluíram que os resultados indeterminados pelo WB eram causados pela falta de sensibilidade e especificidade dos antígenos de HTLV-2 presentes no WB e má interpretação dos critérios, e não por variações das amostras (Gallo et al. 1994).

Também se estudou a diversidade do envelope viral, na tentativa de justificar a causa dos indeterminados WB. Nós encontramos uma troca de um determinado aminoácido, sendo este a prolina pela serina na região do envelope na posição 184, sendo utilizada como referência uma amostra Africano retirada do GeneBank. No entanto, esta mutação foi observada em pacientes com resultado positivo e inconclusivo pelo WB (Lal et al. 1994). Não realizamos análises filogenéticas destas seqüências, mas a referência estirpe utilizada aqui, da África, pode indicar que a mutação está presente, pelo menos, 1 / 3 das amostras. Na verdade, ambas as seqüências foram encontradas em nossas amostras, em conjunto, estes achados, podemos especular que as duas seqüências estão circulando em São Paulo: uma da África e outra que circula nos Estados Unidos e na Europa. Portanto, uma vez que ambas as seqüências estão presentes

independentemente no perfil do WB, estudos adicionais devem ser realizados para encontrar o porque dos resultados indeterminado pelo WB ocorrem.

Em conclusão, não observamos correlação entre o estado do sistema imunológico, carga proviral do HTLV-2 ou a diversidade do envelope em relação a proteína K55 usada no WB disponível comercialmente. Deste modo, acreditamos que o kit de WB apenas disponível no mercado é provavelmente mais preciso para detectar anticorpos do vírus HTLV-1, e alguma melhoria para a detecção do HTLV-2 deve ser exercida na próxima geração deste kit, especialmente entre as populações de alto risco.

7. CONCLUSÕES

1. Não houve diferença entre gênero e média dos indivíduos infectados pelo HTLV-2 independente do perfil do WB apresentado;
2. Não observamos correlação entre o número de células T CD4+ e CD8+ e padrão de WB;
3. Carga proviral do HTLV-2 foi associada aos indivíduos com WB inconclusivo;
4. Apesar do padrão de WB inconclusivo mais observado ser o rgp46-II e p24, vários outros foram notados;
5. Notamos a ocorrência da troca do aminoácido Prolina por Serina na região do envelope na posição 184 em ambos pacientes que apresentaram resultados positivos ou indeterminados por WB.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANGHAM, CR. The immune control and cell-to-cell spread of human T-lymphotropic virus type 1. J Gen Virol, v. 84, p.3177-89. 2003.

BASSANI, S.; TORO, C.; JIMENEZ, V.; RODES, B.; SORIANO, V. Can the level of immunosuppression in human immunodeficiency virus-infected patients affect the reliability of human T-cell lymphotropic virus type 2 serological diagnosis? Clin Vaccine Immunol, v. 13, n.1, p.160-1. 2006

BRODINE, SK.; KAIME, EM.; ROBERTS, C.; TURNICKY, RP.; LAL, RB. Simultaneous confirmation and differentiation of human T-lymphotropic virus types I and II infection by modified western blot containing recombinant envelope glycoproteins. Transfusion, v.33, n.11, p.925-9. 1993.

CASSEB, J.; SOUZA, T.; PIERRE-LIMA, M.T.; YEH, E.; HENDRY, R.M.; GALLO, D. Testing problems in diagnosing HTLV infection among injection drug users (IDU) with AIDS in São Paulo City, Brazil. AIDS Res. Human Retrov, v. 13, p.1639-1641. 1997. (a)

CASSEB, J.; SALOMÃO, S.; HONG, MA.; CATERINO-DE-ARAUJO, A.; DUARTE, A.J.S. Prevalence of HTLV-I and HTLV-II antibodies among HIV-1-asymptomatic patients in São Paulo, Brazil. Rev Inst Med Tropical de São Paulo, v.39, p. 213-215. 1997. (b)

CIMARELLI, A.; DUCLOS, CA.; GESSAIN, A.; CATTANEO, E.; CASOLI, C.; BIGLIONE, M.; MAUCLERE, P.; BERTOZZONI, U. Quantification of HTLV-2 proviral copies by competitive polymerase chain reaction in peripheral blood mononuclear cells of Italian injecting drug users, Central Africans and Amerindians. J. Acquir. Immune Defic. Syndrome, v.10, p.198-204. 1995.

CLARK, J.W.; ROBERT-GUROFF, M.; IKEHARA, O.; HANZAN, E.; BLATTNER, W.A. The human T-cell leukemia/lymphoma virus type-I (HTLV-I) in Okinawa. Cancer Res, v.45, p. 2849-52. 1985.

DE ARAUJO, A.C; CASSEB, J.; NEITZERT, E.; DE SOUZA, M.L.; MAMMANO, F.; DEL MISTRO, A.; DE ROSSI, A.; CHIECO-BIANCHI, L. HTLV-I and HTLV-II infections among HIV-1 seropositive patients in São Paulo, Brazil. J Epidemiol, v.10, p.165-171. 1994.

DE-ARAUJO, A.; SANTOS-FORTUNA, E.; MELEIRO, M.C.Z.; SULEIMAN, J.; CALABRÓ, M.L.; FAVERO, A.; DE ROSSI, A.; CHIECO-BIANCHI L. Sensitivity of two enzyme-linked immunosorbent assay tests in relation to

Western Blot in detecting human T-cell lymphotropic virus types I and II infection among HIV-1 infected patients from São Paulo, Brazil. Diagn Microbiol Infect. Dis, v.30, p. 173-182. 1998.

DEHEE A, CESAIRE R, DESIRE N . Quantitation of HTLV-I proviral load by a Taiman real- time PCR assay. J Virol Methods, v.102, p.37-51. 2002.

FERREIRA, O.C.; VAZ, R.S.; CARVALHO, M.B.; GUERRA, C. Human T-lymphotropic virus type I and type II infections and correlation with risk factors in blood donors from São Paulo Blood. Transfusion, v. 35, p. 258-263. 1995.

GALLO D, DIGGS JL, HANSON CV.. Evaluation of two commercial human T-cell lymphotropic virus Western Blot (Immunoblot) kits with problem specimens. J. Clinical Microbiology, v.32, p.2046-9. 1994.

GESSAIN A, MAHIEUX R. A virus called HTLV-1. Virological and molecular aspects. Presse Med, v. 23, n. 29, p.2228-32. 2000.

GREENE, W.C.; BALLARD, D.W.; BOHNLEIN, E.; RIMSKY, L.T.; HANLY, S.M.; KIM, J.H.; MALIM, M.H.; CULLEN, B.R. The trans-regulatory proteins of HTLV-I: Analysis of *tax* and *rex*. Human Retrovirology, p.35-43, 1990.

KALAYNARAMAN, V.S.; SARNGADHARAN, M.G.; ROBERT-GUROFF, M.; MIYOSHI, M.; GOLDE, D.; GALLO, R.C. A new type of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy leukemia. Science, v.218, p. 571-3. 1982.

LAL RB, OWEN SM, RUDOPH D, LEVINE PH. Sequence variation within the immunodominant epitope-coding region from the external glycoprotein of human T lymphotropic virus type II in isolates from Seminole Indians. J Infect Dis, v.169, p.407-11. 1994.

LOWIS GW, SHEREMATA WA, MINAGAR A. Epidemiologic features of HTLV-II: serologic and molecular evidence. Ann Epidemiol, v.12, n.1, p.46-66. 2002.

MANGANO AM, REMESAR M, DEL POZO A, SEN L. Human T lymphotropic virus types I and II proviral sequences in Argentinian blood donors with indeterminate Western blot patterns. J Med Virol, v.74, n.2, p.323-7. 2004.

MIYOSHI I, KUBONISHI I, YOSHIMOTO S, ET AL. Type C virus particles in a cord T-cell line derived by co-cultivating normal human cord leukocytes and human leukaemic T cells. Nature, v.294, p.770-1. 2000.

MONTANHEIRO P, OLAH I, FUKUMORI LMI, SMID J, OLIVEIRA ACP, KANZAKI LIB, MARCONDES LAF, DUARTE AJS, CASSEB J. Low DNA HTLV-2 proviral load among women in São Paulo City. Virus Research, v.135, p.22-5. 2008.

MURPHY, EL.; LEE, TH.; CHAFETS, D.; NASS, CC.; WANG, B.; LOUGHLIN, K.; SMITH D. Higher human T lymphotropic virus (HTLV) provirus load is associated with HTLV-I versus HTLV-II, with HTLV-II subtype A versus B, and with male sex and a history of blood transfusion. J Infect Dis, v.191, n.8, p.1383-5. 2004.

NOVOA, P.;PENALVA, AC.; POSADA VERGARA, MP.;DUARTE, AJ.; CASSEB, J. Molecular characterization of human T-cell lymphotropic virus type 2 (HTLV-II) from people living in urban areas of São Paulo city: evidence of multiple subtypes circulation. J Med Virol, v.79, n.2, p.182-7. 2007

ORLAND JR, ENGSTROM J, FRIDEY J, SACHER RA, SMITH JW, NASS C, GARRATTY, G.; NEWMAN, B.; SMITH, D.; WANG, B.; LOUGHLIN, K.; MURPHY, EL. Prevalence and clinical features of HTLV neurologic disease in the HTLV Outcomes Study. Neurology, v.61, p.1588-94. 2003.

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, v. 77, p. 7415-19. 1980.

POIESZ, B.J.; RUSCETTI, F.W.; REITZ, R.F.; BUNN, D.A.; MINNA, J.D.; GALLO, R.C. Isolation of a new type C retrovirus (HTLV) in primary uncultured cells of a patient with Sézary T-cell leukemia. Nature, v. 294, p. 268-271. 1981.

ROBERT-GUROFF, M.; NAKAO, Y.; ITO, Y.; SLISKI, A.; GALLO, R.C. Natural antibodies to human retrovirus HTLV in a cluster of Japanese patients with adult T-cell leukemia. Science, v. 215, p. 975-978. 1982.

SALEMI, M.; VANDAMME, A-M.; DESMYTER, J.; CASOLI, C.; BERTAZZONI, U. The origin and evolution of human T-cell lymphotropic virus type 2 (HTLV-2) and the relationship with its replication strategy. Elsevier, v. 234, p.11-21. 1999.

SANTOS, TDE.; COSTA, CM.; GOUBAU, P.; VANDAMME, AM.; DESMYTER, J.; VAN DOREN, S.; MOTA, RM.; DE CASTRO COSTA, FB.; OLIVEIRA, AC.; BARRETO, V.; GOMES, AF.; CARNEIRO-PROIETTI, AB.; DE BRUIN, VM.; DE SOUSA, FC.; ORIA, RB. Western blot

seroindeterminate individuals for human T-lymphotropic virus I/II (HTLV-I/II) in Fortaleza (Brazil): a serological and molecular diagnostic and epidemiological approach. Braz J Infect Dis, v.7, n.3, p.202-9. 2003.

TANAKA, Y.; TANAKA, R.; HOSHINO, H. Identification of a novel neutralization epitope on envelope gp46 antigen of human T-cell-leukemia virus-type-II (HTLV-II). Int. J. Cancer, v.59, p.655-60. 1994.

TANAKA Y, TANAKA R, HOSHINO H. Identification of a novel neutralization epitope on envelope gp46 antigen of human T-cell-leukemia virus-type-II (HTLV-II). J Biol Chem, v.28, p49466-75. 2001.

VANDAMME AM.; BERTAZZONI U, SALEMI M. Evolutionary strategies of human T-cell lymphotropic virus type II. Gene, v. 30, p.171-80. 2000.

XIE, L.; GREEN, PL. Envelope Is a Major Determinant of the Distinct In Vitro Cellular Transformation Tropism of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. Journal of Virology, v. 79, p. 14536-45. 2005.

WATTEL E, VARTANAIN JP, PANNETIER C. Clonal expansion of HTLV-I infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. J Virol, v. 69, p.2863-8. 1995.

WAZIRI A, SOLDAN SS, GRAF MD, NAGLE J, JACOBSON S. Characterization and sequencing of prototypic human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) from an HTLV-1/2 seroindeterminate patient. J Virol, v. 74, n.5, p.2178-85. 2000.

WILSON KA, MAERZ AL, POUMBOURIOS P. Evidence that the transmembrane domain proximal region of the human T-cell leukemia virus type 1 fusion glycoprotein gp2 1 has distinct roles in the prefusion and fusion-activated states. J Biol Chem, v. 28, p.49466-75. 2001.

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. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), v. 79, p. 2031-35. 1982.

ZEHENDER, G.; GIROTTI, M.; DE MADDALENA, C.; FRANCISCO, G.; MORONI, M.; GALLI, M. HTLV infection in ELISA-negative blood donors. AIDS Res Hum Retroviruses, v.12, p. 737-740. 1996.

ZEHENDER, G.; DE MADDALENA, C.; GIANOTTO, M.; CAVALLI, B.; SANTAMBROGIO, S.; ORSO, M.; MORONI, M.; GALLI, M. High prevalence of false-negative anti-HTLV type I/II enzyme-linked immunosorbent assay results in HIV type 1-positive patients. AIDS Res. Hum. Retroviruses, v.13, p. 1141-1146. 1997.

9. ANEXOS

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
INSTITUTO DE INFECTOLOGIA EMILIO RIBAS
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
PROTOCOLO Nº 51/07

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1.	NOME	DO	PACIENTE
.....			
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº :		SEXO : .M ☐ F	
☐			
DATA NASCIMENTO:/...../.....			
ENDEREÇO		Nº.....	APTO:
BAIRRO:		CIDADE	
CEP:.....		TELEFONE:	DDD (.....)
.....			
2.	RESPONSÁVEL		LEGAL
.....			
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)			
.....			
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :		SEXO: M ☐ F	
☐			
DATA NASCIMENTO.:/...../.....			
ENDEREÇO:		Nº	APTO:
BAIRRO:.....		CIDADE:	
CEP:		TELEFONE:	DDD
(.....)			

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: DIVERSIDADE MOLECULAR DO ENVELOPE E CARGA PROVIRAL DO VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS TIPO 2 (HTLV-2) EM AMOSTRAS INDETERMINADAS PELO TESTE WESTERN-BLOT

PESQUISADOR: JORGE CASSEB
CARGO/FUNÇÃO: MÉDICO

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL : 67217

UNIDADE DO ESTUDO: Ambulatório de HTLV – Instituto de Infectologia Emílio Ribas

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

SEM RISCO ☐

RISCO MÍNIMO X

RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐

RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 24 meses

II - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

Título Resumido do Estudo: **Protocolo Diversidade Genética do Envelope Viral**

INTRODUÇÃO

Você está sendo convidado a participar desta pesquisa porque está infectado com o vírus Linfotrópico de Células T Humanas do tipo 2 (HTLV-2). Este estudo visa avaliar a hipótese de que haja uma insensibilidade nos kits de Western-Blot. O médico responsável por este estudo neste local é Dr. Jorge Casseb. Antes que você decida se deseja participar, gostaríamos que conhecesse o estudo. Este estudo é uma colaboração entre o Laboratório de Investigação em Dermatologia e Imunodeficiências - LIM/56 Faculdade de Medicina USP e Instituto de Infectologia Emílio Ribas.

Este é um termo de consentimento livre e esclarecido e contém informações sobre o estudo. A equipe do estudo conversará com você sobre estas informações. Sinta-se à vontade para fazer perguntas a qualquer momento. Caso concorde em participar, será solicitado que assine este termo de consentimento. Você receberá uma cópia assinada deste termo de consentimento.

POR QUE ESTÁ SENDO FEITO O ESTUDO?

Na população de alto risco, cerca da metade dos resultados são indeterminados pelo WB. O estudo da variabilidade genética permitirá a identificação da região do envelope viral. Por esta razão, será realizado este estudo para melhorar os testes sorológicos para a identificação do vírus HTLV.

INFORMAÇÕES NA TRIAGEM

Informações Pessoais: Serão solicitadas algumas informações de identificação pessoal (nome, sobrenome, data de nascimento, estado de nascimento e endereço). Estas informações serão mantidas em sigilo e não serão publicadas ou reveladas sem o seu consentimento.

COLETA DE SANGUE

Haverá uma coleta de sangue, com dois tubos (5 mL) e um com Heparina (10 mL) de sangue periférico. Cerca de um copinho de cafezinho.

POR QUANTO TEMPO VOU PARTICIPAR DO ESTUDO?

Você fará um exame de sangue, deverá participar do estudo por até dois anos, dependendo de quando entrar no mesmo.

QUAIS SÃO OS RISCOS DE PARTICIPAR DO ESTUDO?

A coleta de sangue será feita apenas para este estudo e em nada influenciará no seu tratamento; não vai lhe causar nenhum problema, exceto o pequeno incômodo de dor no momento da coleta (introdução da agulha para retirada do sangue).

HÁ BENEFÍCIOS POR PARTICIPAR DESTE ESTUDO?

Possivelmente não receberá nenhum benefício por fazer parte deste estudo. As informações obtidas poderão ajudar a outras pessoas que tenham o HTLV.

QUE OUTRAS OPÇÕES EU TENHO ALÉM DESTE ESTUDO?

Ao invés de participar deste estudo, você tem o direito de receber tratamento gratuito na rede pública de saúde. Caso você decida não participar do estudo, isto em nada afetará o seu direito a receber tratamento na rede pública de saúde. A equipe do estudo conversará com você essa e outras opções disponíveis. Você também tem o direito de optar por não receber tratamento. A equipe do estudo conversará com você sobre os possíveis riscos desta opção.

O QUE GARANTE A CONFIDENCIALIDADE?

Em todo momento sua privacidade será protegida. O seu nome ou quaisquer outros dados, que possam identificá-lo, não serão colocados em qualquer publicação ou comunicação sobre o estudo.

O seu prontuário médico poderá ser revisto pelo Comitê Ética em Pesquisas da nossa instituição, por profissionais médicos e pelos coordenadores do estudo, respeitando-se a legislação brasileira vigente. Por outro lado, nada o impede de fornecer informações sobre você mesmo e sobre a sua participação no estudo para outras pessoas, caso você deseje.

Apenas poderão ter acesso aos dados do seu prontuário pessoas que forem indicadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto de Infectologia Emilio Ribas, pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), pelos coordenadores do estudo, e pela equipe do estudo. Por outro lado, nada o impede de fornecer informações sobre você mesmo e sobre a sua participação no estudo para outras pessoas, caso você deseje.

QUAIS SÃO OS CUSTOS DE PARTICIPAR DO ESTUDO

Você não terá qualquer despesa por participar do estudo. Todos os procedimentos e os testes que são necessários para o estudo serão pagos por nós.

O QUE ACONTECERÁ SE EU SOFRER ALGUM DANO POR PARTICIPAR DO ESTUDO

Os participantes deste estudo que vierem a sofrer danos previstos ou não no termo de consentimento, resultantes dos procedimentos do estudo, têm direito à assistência médica integral. Assim, se você sofrer algum dano diretamente associado à sua participação no estudo, você receberá tratamento médico apropriado oferecido pela equipe do estudo, sem qualquer custo para você.

Você não estará renunciando ou abrindo mão de qualquer direito legal de obter indenização por danos eventuais ao assinar este termo de consentimento.

Caso tenha alguma dúvida ou questão sobre seus direitos como participante deste estudo, você poderá procurar o Comitê de Ética em Pesquisa pelo telefone: 3896-1406.

QUAIS SÃO OS MEUS DIREITOS COMO PARTICIPANTE DO ESTUDO?

Participar do estudo é um ato inteiramente voluntário. Você pode preferir não participar do estudo ou abandoná-lo a qualquer momento. Você será tratado da mesma forma, independentemente de sua decisão.

Nós prestaremos todos os serviços clínicos e profissionais de diagnóstico e de laboratório que fizerem parte do estudo, sem que isso incorra em custo algum para você. Você deve continuar recebendo seus remédios, inclusive os medicamentos anti-HTLV e os necessários para prevenir ou tratar infecções relacionadas ao HTLV, como normalmente vem fazendo.

Nós lhe comunicaremos sobre novas informações deste ou de outros estudos que possam afetar sua saúde, bem-estar ou vontade de continuar participando deste estudo. Quando o estudo terminar, nós lhe informaremos os resultados.

O QUE EU FAÇO CASO TENHA PERGUNTAS OU PROBLEMAS?

Para perguntas sobre este estudo ou sobre danos relacionados com a pesquisa, favor contatar:

Ingrid Olah do Nascimento (Pesquisadora Principal) ou Dr. Jorge Casseb (Coordenador do Estudo), fone: 3061-7194.

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Instituto de Infectologia Emílio Ribas, Av. Dr. Arnaldo, 165, São Paulo, SP; Telefone: 3896 -1406.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Ingrid Olah do Nascimento – Laboratório de Investigação em Dermatologia e Imunodeficiências - LIM/56
Av. Enéas de Carvalho Aguiar, 500, prédio IMT II, 3º andar, tel.: (11) 3061-7499/7457;
FAX: (11) 3081-7190 Cep 05403-907

Jorge Casseb – Laboratório de Investigação em Dermatologia e Imunodeficiências - LIM/56
Av. Enéas de Carvalho Aguiar, 500, prédio IMT II, 3º andar, tel: (11) 3061-7499/7457;
FAX: (11) 3081-7190 Cep 05403 - 907

VII - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido:

Título do protocolo:

DIVERSIDADE MOLECULAR DO ENVELOPE E CARGA PROVIRAL DO VÍRUS LINFOTRÓFICO DE CÉLULAS T HUMANAS TIPO 2 (HTLV-2) EM AMOSTRAS INDETERMINADAS PELO TESTE WESTERN-BLOT

Título Resumido do Estudo: **Protocolo Diversidade Genética do Envelope Viral do HTLV-2**

Eu, _____, li (ou ouvi a leitura sobre) as informações contidas neste termo de consentimento. Compreendo os possíveis riscos e benefícios do estudo e os outros tratamentos disponíveis para minha doença. Tive oportunidade de fazer perguntas e recebi respostas satisfatórias para todas as minhas perguntas.

Tenho liberdade de me retirar do estudo a qualquer momento, por qualquer razão, sem que a minha decisão de desistir afete meus direitos a cuidados médicos futuros. Concordo em seguir as instruções do médico responsável pelo estudo, e eu comunicarei imediatamente a ele caso eu sinta qualquer sintoma inesperado ou incomum. Ao assinar este documento, não estou abrindo mão de meus direitos legais. Uma cópia assinada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará em meu poder.

Meu consentimento em participar deste estudo é voluntário.

Nome do (a) voluntário(a) em letra de forma

Assinatura do(a) voluntário(a)

Nome da pessoa que obteve o Consentimento em letra de forma

Assinatura da pessoa que obteve o Consentimento

Data: ____/____/____

ANEXO II

De: "virology@bellsouth.net" <virology@bellsouth.net>

Para: jorge_casseb@yahoo.com.br; j31@hotmail.com

Enviadas: Quarta-feira, 4 de Novembro de 2009 13:16:50

Assunto: Journal of Medical Virology - Decision on Manuscript ID JMV-09-1321.R2

Dear Dr. Casseb,

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Neither molecular diversity of the envelope, immunosuppression status, nor proviral load causes indeterminate HTLV Western-blot profiles in samples from human T-cell lymphotropic virus type 2 (HTLV-2)-infected individuals." in its current form for publication in Journal of Medical Virology. The comments of the referee(s) who reviewed your manuscript are included at the bottom of this letter.

A signed copyright transfer agreement is needed for publication. If you have not already provided one you should do so immediately. You can access the copyright transfer agreement at <http://www.wiley.com/go/ctaus>

You will receive your typeset proofs in due course.

Thank you for your fine contribution.

Kind regards,

Dr. Brian Mahy
US Editor, Journal of Medical Virology
virology@bellsouth.net

04-Nov-2009

Neither molecular diversity of the envelope, immunosuppression status, nor proviral load causes indeterminate HTLV Western-blot profiles in samples from human T-cell lymphotropic virus type 2 (HTLV-2)-infected individuals.

Ingrid Olah¹, Ligia M. I. Fukumori¹, Jerusa Smid², Augusto César Penalva de Oliveira², Alberto J.S. Duarte¹, Jorge Casseb^{1,2,3}.

¹ Laboratory of Dermatology and Immunology, São Paulo University Medical School, Sao Paulo, Brazil; ² HTLV outpatient clinic, Institute of Infectious Diseases "Emilio Ribas", SP, Brazil; ³ Institute of Tropical Medicine at Sao Paulo University

E-mail address: jcasseb@usp.br (J. Casseb)

ABSTRACT

Although human T-cell lymphotropic virus type 2 (HTLV-2) is considered of low pathogenicity, serological diagnosis is important for counseling and monitoring. The confirmatory tests most used are Western blot (WB) and PCR. However, in high-risk populations, about 50% of the indeterminate WB were HTLV-2 positives by PCR. The insensitivity of the WB might be due to the use of recombinant proteins of strains that do not circulate in our country. Another possibility may be a high level of immunosuppression, which could lead to low production of virus, resulting in low stimulation of antibody. We found one mutation, proline to serine in the envelope region in the position 184, presented at least 1/3 of the samples, independent the indeterminate WB profile. In conclusion, we found no correlation of immune state, HTLV-2 proviral load, or env diversity in the K55 region and WB indeterminate results. We believe that the only WB kit available in the market is probably more accurate to detect HTLV-1 antibodies, and some improvement for HTLV-2 detection should be done in the future, especially among high-risk population.

Key words: HTLV-2, Western-blot, PCR in real time, proviral load of HTLV-2.

INTRODUCTION

Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and type 2 (HTLV-2) are complex retroviruses that have the same genomic organization and 65 - 70% of nucleotide similarities [Poiesz et al, 1980; Kalaynaraman et al 1982; Lowis et al, 2002]. Although the role of HTLV-2 infection in human disease has yet to be clearly defined, there is accumulating evidence that it may be associated with a spectrum of neurological and bacterial susceptibilities [Hall et al, 1996; Orland Jr, et al, 2003]. HTLV-2 infection has been shown to be endemic among intravenous drug users (IVDU) in parts of North America, Europe and Southeast Asia [Fukushima et al, 1998; Zela et al, 1993] and in a number of Amerindian populations [Biglione et al, 1993; Black et al, 1994; Duenas-Barajas et al, 1993; Ferrer et al, 1993]. In Brazil, a strain of HTLV-2 different than the standard 2a and 2b strains was found in IVDU in Sao Paulo and among Kaiapos Indians [Hall et al, 1994; Ishak et al, 1995; Eiraku et al, 1996, De Araujo et al, 1998].

Despite high homology and serological cross-reactivity between HTLV-1 and HTLV-2, studies indicate the necessity of developing reagents that enable type-specific identification [Brodine et al, 1993; Rudolph DL, Lal RB, 2003]. Tests that used only lysate of HTLV-1 virus did not show sufficient sensitivity for detecting antibodies against HTLV-2 [Waziri et al, 2000; Zehender et al, 1997]. A recent study in our laboratory found that 50% of samples from a high-risk population identified by WB as indeterminate were HTLV-2 by PCR [Novoa et al, 2007].

Genetic diversity can lead to changes in the antigenic immunodominant epitope, which may affect the binding of antibodies and the sensitivity of diagnostic tests [Ishak et al, 2006]. For this reason, we studied the degree of homology of the protein K55 in a commercially available WB kit used worldwide as a confirmatory test.

SUBJECTS AND METHODS

All patients in the study attended the Institute of Infectious Diseases "Emilio Ribas" (IIER). The HTLV unit is made up of a multi disciplinary team, including infectious disease specialists, neurologists, a physical therapist and dentists. A total of 615 individuals had been seen in the HTLV out-clinic at Emilio Ribas from July 1997 to March 2009. Using our algorithm published previously (Novoa, et al. 2008), 104 HTLV-2-infected subjects were disclosed in the last 12 years. For this study, we randomly chose 29 samples that filled the full criteria for HTLV-2

infection and 21 samples from individuals who were indeterminate WB. All the subjects were also tested by HCV (Abbott AxSYM® Antibody to Hepatitis C Virus, Abbott Laboratories, Inc., Abbott Park, Illinois, USA) and HIV serostatus using routine testing from IIER (Abbott AxSYM® Antibody to HIV, Abbott Laboratories, Inc., Abbott Park, Illinois, USA) following by IFA (Biomanguinhos, Fiocruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) to HIV confirmation or from the blank blood when they referred to the HTLV out-clinic. Written informed consent was obtained from each patient prior to collection of any blood specimens, and the study had the approval of the Ethical Committee Board (protocol number 51/07).

Serological Assays: Serum samples were screened for the presence of antibodies to HTLV-1 and HTLV-2 using two commercially available EIA assays: HTLV-1/HTLV-2 Ab Capture ELISA (Ortho Diagnostics, Raritan, NJ, USA) which contains recombinant HTLV-1 and HTLV-2 envelope and core proteins for both coating and detection, and GE 80/81 Assay (Murex Diagnostics, Dartford, UK). Tests were performed according to the directions of the manufacturer. All specimens that were reactive for either EIA were confirmed by WB (HTLV Blot 2.4, Diagnostic Biotechnology - DBL, Singapore). Seropositivity was interpreted according to the stringent criteria in the manufacturer's instructions. A WB sample was scored as HTLV-1 positive only if reactive to at least one gag protein (p19 or p24) and two env proteins (rgp46-I and GD21). It was scored as HTLV-2 positive if p19 or p24 and rgp46-II and GD 21 bands were identified, and was HTLV positive but untypeable if only p24, p19 and GD21 bands were observed. It was considered indeterminate if any other band patterns were present. Negative samples were those that did not exhibit any band.

Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) separation

PBMCs were collected in heparinized tubes and isolated using Ficoll-Hypaque density gradients (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA). The cells were washed, adjusted to 2×10^6 cells/ml in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum, and grown with or without 2.5 ug/ml of phytohemagglutinin (PHA) at 37 °C, 5% CO₂ for 24 hours. The supernatant fluids were harvested and stored at -70 °C for the performance of the assays.

Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) Analysis: The PBMCs were separated using the Ficoll-Hypaque gradient method and cryopreserved at -70 °C. Genomic DNA was extracted using the GFX genomic blood DNA purification Kit

(Amersham Pharmacia Biotech, Piscaway, NJ). Nested PCR was performed on positive and indeterminate WB samples to confirm the presence of HTLV.

Tax Region: To differentiate HTLV-1 and HTLV-2 infections, RFLP analysis of amplified product of a *Tax* region was carried out as previously described [Eiraku et al, 1996], using primers specific for this region of both HTLV-1 and HTLV-2 genomes. The beta-globin gene was studied to ensure that all extracted DNAs were amplifiable using primers PC04 and GH20 [Mahieux et al, 2000].

After the amplification of *tax* sequences, restriction enzyme digestion of the nested *tax* PCR product with endonucleases *Taq I* and *Sau 3A* was performed. Five μ l of second round products were digested in a 20 μ l mix containing 10 units of the restriction enzyme and 2 μ l of the 10x reaction buffer. *Sau 3A* digests were incubated for 90 min at 37 °C and *Taq I* digests were incubated for 90 min at 65 °C. The restriction site for the enzyme *Taq I* (T/CGA) is present in the amplified product of HTLV-2, generating two 69 bp and 53 bp bands (6 bp bands not visible), and it cuts the HTLV-1 products to yield 122 bp bands (6 bp bands are not visible). The endonuclease *Sau 3A* fails to cut the HTLV-2 products, but cuts the HTLV-1 products to generate distinct 104 bp and 24 bp bands and are visualized by electrophoresis on a 4% agarose gel.

Env region: When the samples were disclosed to be positive for HTLV-2, HTLV or indeterminate by WB, additional amplification from 2 millions of PBMC to the *env* region was done using the following primers showed in table 1. These primers were designed from a consensus strain using the Primer 3 Program (v. 0.4.0) (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), which provides a list of possible primers, and after the alignment, we chose those with better amplification and expect fragment size. A product with 1000 pb was amplified and used for direct sequencing.

Nucleotide sequencing and amino acid analysis: Direct DNA sequencing was performed on 50 HTLV-2 samples. PCR products amplified from the *env* region were purified using the Promega (Madison, WI) Wizard PCR prep system and sequenced in a Perkin-Elmer ABI Prism DNA 3100 Sequencer using Taq FS dye terminator cycle sequencing (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, California, USA). The same PCR inner primers were used in the sequencing reactions. DNA sequences were translated from the DNA sequence and then analyzed. Multiple sequence alignment for the *env* region of the studied samples together with related

sequences in the GeneBank/EMBL database were further edited in the DNA Star program. Aligned sequences were used in Bioedit software (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA) and the amino acid (AA) sequences were compared to the K55 protein.

Real Time PCR for HTLV-2 proviral load quantification

The forward and reverse primers used for HTLV-2 DNA quantification were selected using the Oligo (Version 4, National Biosciences, Plymouth, Minn.) and Primer Express (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA) software programs and checked by a search on the GenBank. The probe carried a 5' reporter dye FAM (6-carboxy fluorescein) and a 3' quencher dye TAMRA (6-carboxy tetramethyl rhodamine). For quantitation of the human albumin gene, the primers Alb-S (5'-GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT-3') and Alb-AS (5'-AAACTCATGGGAGCTGCT GGT-3') and the Alb TaqMan probe (5'-FAM-CCTGTCATGCCCCACACAAATCTC TCC-TAMRA-3') were used, as described previously [Dehee et al. 2002]. Albumin DNA quantification was performed in parallel on all samples in order to determine the amount of cellular DNA present and was used as an endogenous reference to normalize variations due to differences in PBMC count or DNA extraction. The protocol was done in accordance to previous published data, and the sensitivity was 10 copies/10⁴ PBMC [Montanheiro et al. 2005].

Antibodies for flow cytometry analysis

Flow cytometry analyses were performed with fresh blood samples, using a Coulter® EPICS® XL-MCL™ Flow Cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). To determine the CD4⁺ and CD8⁺ T cells expression, total lymphocytes were first identified by forward and side scatter, and the 10000 cells were then gated for CD4⁺ or CD8⁺ cells using monoclonal antibodies (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA).

Statistical analysis

Possible differences in patient characteristics or laboratory values among the four groups were evaluated with two-way Mann-Whitney's test or chi-square test when appropriate. In both cases P values <0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

A total of 50 HTLV-2-infected subjects identified by PCR and RFLP were evaluated in this study, where 29 patients were HTLV-2 and 21 were indeterminate by WB. Therefore, 50 HTLV-2-infected subjects were found in this cohort. There were 34 men and 16 women, with a mean age of 40 (range 19 to 55 years old). Thirty-one were IVDU, 14 had heterosexual transmission, two women had an IVDU sexual partner, there was one case of vertical transmission, one was a blood transfusion recipient, and one was one homosexual man. Co-infection with HCV and HIV was observed in 24 (48%) patients, 12 (24%) were HIV only, and two were HCV only.

Table 2 shows the demographical data of the subjects. The mean age was 40 years-old (range 20 to 59 years of age), 23 were men, the median of CD4⁺ and CD8⁺ cell counts were similar, 443 vs 608 cells/mm³ and 781 vs 746 cells/mm³, for the positive WB and indeterminate WB, respectively). Demonstrable HTLV-2 proviral load was more often present in the WB inclusive group ($p=0.02$). HCV infection was more common in the indeterminate WB group ($p=0.04$), but HIV status was similar in both groups.

Table 3 demonstrates the WB profile noted among the indeterminate WB profiles. The majority of the samples displayed the rgp46-IIweak, P24 bands, but there is no usual pattern for the indeterminate sera.

Figure 1 depicts the amino acids (AA) sequences of the K55 protein studied in 27 subjects. The Serine was replaced by Proline in the 184 position of the envelope protein in 20 samples (12 from indeterminate WB profiles and eight among positive WB profiles). However, no replacement was also seen some subjects in seven samples (four positive and three indeterminate WB). Thus, the presence this change was not significant regarding the indeterminate WB profile ($p=0.7$).

DISCUSSION

We studied fifty samples from HTLV-2-infected subjects from our cohort in Sao Paulo city, Brazil. We noted no correlation between T cell counts and HTLV-2 proviral load among those with indeterminate WB profiles, although viral detection was only performed on 30 specimens. In fact, HTLV-2 infection produces a low replication rate, and in one study, no virus was detected in the PBMCs of the majority of patients [Montanheiro et al. 2008]. HTLV-2 is genetically more stable than other RNA viruses [Salemi, et al., 1999], with a relatively low

number of replication cycles and therefore, a frequency of mutations. Cimarelli, et al. (1995) demonstrated the existence of a high variation in proviral load in PBMCs in individuals who used drugs. The high genetic stability of HTLV-2 could be explained considering that in some individuals the proviral load is very low, suggesting a slow viral replication, whereas in patients with high proviral load, replication could be, mainly, by clonal expansion of infected cells, via cell multiplication (mitosis) and especially during the reverse transcription [Wattel, et al., 1995]. Murphy, et al. (2004) showed that the proviral load was significantly higher in patients infected by HTLV-1 compared with HTLV-2. In individuals with chronic infection the proviral load may be related to the quantity of the infecting inoculum and the route of transmission. High proviral load of HTLV-2 was related to infection by blood transfusion and low proviral load was related to infection via sexual transmission. Despite these findings, there is a need to deepen the understanding of immunopathogenesis and molecular characteristics of HTLV-2, because of few studies related to proviral load of HTLV-2.

Another point seen in our study was the possibility of immunosuppression to be responsible for the indeterminate WB. One study, conducted in Spain, showed that the number of CD4⁺ T cells affected the EIA sensitivity, but did not affect the sensitivity of the WB [Bassani et al. 2006]. It is possible to consider that the immune system is an important factor and may result in indeterminate serum samples, possibly by the lower production of anti-HTLV-2 antibodies [Bassani et al, 2006]. However, our results indicated that T cells count did not influence the presence of indeterminate WB, even in HIV-1-infected subjects.

Gallo et al. found that the WB kit had a sensitivity of 68% with weak HTLV-2 positives and a specificity of 70% with negatives. Although all positives reacted with rgp21, the p24 antigen in the kit was not strong enough to react with all positives and 11 HTLV-2 specimens reacted nonspecifically with the HTLV-1env protein. Since all positives react with rgp21, which is the most sensitive antigen in the WB kit, they recommended that specimens not reacting with this protein be called negative, regardless of other bands. This would have increased the specificity of the HTLV WB 2.4 kit to 86%. They concluded that the indeterminate WB are caused by lack of sensitivity and specificity of the WB antigen and poor interpretation criteria, not by variances of the specimens [Gallo et al. 1994].

We also studied if the envelope diversity was the cause of the indeterminate WB. We found one mutation, proline to serine in the envelope region in the position 184 was described among African samples [GeneBank]. However, this mutation was seen in

patients with positive and indeterminated WB profile [Lal et al. 1994]. We did not perform phylogenetic analysis of these sequences, but the reference strain used here, from Africa, may indicate that mutation is present at least 1/3 of the samples. In fact, both sequences were found in our samples, taken together these findings, we may speculate that both strains are circulating in Sao Paulo: one from Africa and another from US/Europe origin. Therefore, since both sequences are present regardless of WB profile, additional studies should be done to find why indeterminate WB occurs. Finally, we found no correlation of immune state, HTLV-2 proviral load, or *env* diversity in the K55 region and WB indeterminate results. We believe that the only WB kit available in the market is probably more accurate to detect HTLV-1 antibodies, and some improvement for HTLV-2 detection should be pursued in the next WB generation, especially among high-risk populations with a combination of molecular and serological approaches should be tested in the future.

Acknowledgements

We thank all patients who participated in this study and Dana Gallo for reading this manuscript. The financial support was provided by FAPESP 07/52298-2. J.C is senior scientist of CNPq and FFM.

References

- Bassani S, Toro C, Jimenez V, Rodes B, Soriano V. 2006. Can the level of immunosuppression in human immunodeficiency virus-infected patients affect the reliability of human T-cell lymphotropic virus type 2 serological diagnosis? Clin Vaccine Immunol 13:160-1.
- Biglione M, Gessain A, Quiruela, S et al. 1993. Endemic HTLV-II infection among Tobas and Matacos Amerindians from North Argentina. J AIDS 6:631-633.
- Black FL, Biggar RJ, Neel JV, maloney EM and Waters DJ. 1994. Endemic transmission of HTLV type II among Kaiapo Indians of Brazil. AIDS Res Human Retroviruses 10:1165-71.
- Brodine SK, Kaime EM, Roberts C, Turnicky RP, Lal RB. 1993. Simultaneous confirmation and differentiation of human T-lymphotropic virus types I and II infection by modified western blot containing recombinant envelope glycoproteins. Transfusion 33:925-9.

Cimarelli A, Duclos CA, Gessain A, Cattaneo E, Casoli C, Biglione M, Mauciere P, Bertozzoni, U. 1995. Quantification of HTLV-2 proviral copies by competitive polymerase chain reaction in peripheral blood mononuclear cells of Italian injecting drug users, Central Africans and Amerindians. *J. Acquir. Immune Defic. Syndrome* 10:198-204.

De-Araujo A, Santos-Fortuna E, Meleiro MCZ, Suleiman J, Calabró ML, Favero A, De Rossi A, Chieco-Bianchi L. 1998. Sensitivity of two enzyme-linked immunosorbent assay tests in relation to Western Blot in detecting human T-cell lymphotropic virus types I and II infection among HIV-1-infected patients from São Paulo, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 30:173-182.

Dehee A, Cesaire R, Desire N . 2002. Quantitation of HTLV-I proviral load by a TaqMan real-time PCR assay. *J Virol Methods* 102:37-51.

Duenas-Barajas E, Bernal JE, Vaught DR, Nerurkar VR, Sarmiento P, Yanagihara R and Gajdusek DC. 1993. Human retroviruses in Amerindians of Colombia: High prevalence of human T cell lymphotropic virus type II infection among the Tunebo Indians. *Am J Trop Med Hyg* 49:657-663.

Eiraku N, Novoa P, Da Costa Ferreira M, Monken C, Ishak R, Da Costa Ferreira O, Zhu SW, Lorenço R, Ishak M, Azevedo V, Guerreiro J, De Oliveira MP, Loureiro P, Hammerschlag N, Ijichi S, Hall WW. 1996. Identification and characterization of a new and distinct molecular subtype of human T-cell lymphotropic virus type 2. *J Virol* 70:1481-1492.

Ferrer JF, Del Pino N, Esteban E, Sherman MP, Dube S et al. 1993. High rate of infection with the human T-cell leukemia retrovirus type II in four Indian population of Argentina. *Virology* 197:576-584.

Fukushima Y, Lewis MJ, Monken C, Komuro K, Kusagawa S, Sato H, Takebe Y, Yamazaki S, Hien NT, Anh H, Long HT, Honda M, Hall WW. 1998. Identification and molecular characterization of human T lymphotropic virus type II infections in intravenous drug abusers in the former South Vietnam. *AIDS Res Human Retrov* 14: 537-540.

Hall WW, Ishak R, Zhu SW et al. 1996. Human T lymphotropic virus type II (HTLV-II): epidemiology, molecular properties, and clinical features of infection. *J Acquire Immune Defic Syndr Human Retrovirol* 13 (suppl 1):S204-S214.

Hall WW, Kubo T, Ijichi S, Takahashi H, Zhu SW. 1994. Human T cell leukemia/lymphoma virus, type II (HTLV-II): emergence of an important newly recognized pathogen. *Seminars in Virology* 5: 165-178.

Ishak R, Harrington Jr WJ, Azevedo VN, Eiraku, N, Ishak MO, Guerreiro JF, Santos SB, Kubo T, Monken C, Alexander S. 1995. Identification of human T cell lymphotropic virus type IIa infection in the Kayapo, an indigenous population of Brazil. *AIDS Res Human Retrov.* 11: 813-821.

Ishak R, Vallinoto AC, Azevedo VN, Vicente AC, W, Ishak MO. 2006. Molecular evidence for infection by HTLV-2 among individuals with negative serological screening tests for HTLV antibodies. *Epidemiol Infect* 7:1-6.

Gallo D, Diggs JL, Hanson CV. 1994. Evaluation of two commercial human T-cell lymphotropic virus Western Blot (Immunoblot) kits with problem specimens. *J. Clinical Microbiology* 32:2046-9.

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

Lal RB, Owen SM, Rudolph D, Levine PH. 1994. Sequence variation within the immunodominant epitope-coding region from the external glycoprotein of human T lymphotropic virus type II in isolates from Seminole Indians. *J Infect Dis.* 169:407-11.

Lewis GW, Sheremata WA, Minagar A. 2002. Epidemiologic features of HTLV-II: Serologic and molecular evidence. *Ann Epidemiol* 12: 46-66.

Mahieux R, Horal P, Mauciere P, Murphy E and Gessain A. 2000. Human T-cell Lymphotropic virus type I Gag indeterminate Western Blot patterns in Central Africa:relationship to *Plasmodium falciparum* infection. J Clin Microbiol 38:4049-4057.

Montanheiro PA, Penalva-de-Oliveira AC, Posada-Vergara MP, Milagres AC, Tauil C, Marchiori PE, Duarte AJS, Casseb J. 2005. Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) DNA proviral viral load among asymptomatic and HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) patients. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 38: 1643-7.

Montanheiro P, Olah I, Fukumori LMI, Smid J, Oliveira ACP, Kanzaki LIB, Marcondes LAF, Duarte AJS, Casseb J. 2008. Low DNA HTLV-2 proviral load among women in São Paulo City. Virus Research, 135:22-5.

Murphy EI, Lee TH, Chafets D, Nass CC, Wang B, Loughlin K, Smith D. 2004. Higher human T lymphotropic virus (HTLV) provirus load is associated with HTLV-I versus HTLV-II, with HTLV-II subtype A versus B, and with male sex and a history of blood transfusion. J Infect Dis 191:1383-5.

Novoa P, Penalva AC, Posada Vergara MP, Duarte AJ, Casseb, J. 2007. Molecular characterization of Human T-cell lymphotropic virus type 2 (HTLV-II) from people living in Urban areas of São Paulo city: evidence of multiple subtypes circulation. J Med Virol 79:182-7.

Orland JR, Engstrom J, Frider J, Sacher RA, Smith JW, Nass C, Garratty G, Newman B, Smith D, Wang B, Loughlin K, Murphy EL. 2003. Prevalence and clinical features of HTLV neurologic disease in the HTLV Outcomes Study. Neurology 61:1588-94.

Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. 1980. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proc Natl Acad Sci (USA) 77: 7415-19.

Rudolph DL, Lal RB. 1993. Discrimination of human T-lymphotropic virus type-I and type-II infections by synthetic peptides representing structural epitopes from the envelope glycoproteins. Clin Chem. 39:288-292.

Salemi M, Vandamme A-M, Desmyter J, Casoli C, Bertazzoni U. 1999. The origin and evolution of human T-cell lymphotropic virus type 2 (HTLV-2) and the relationship with its replication strategy. Gene 234:11-21.

Wattel E, Vartanain Jp, Pannetier C. 1995. Clonal expansion of HTLV-I infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. J Virol 69:2863-8.

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

Zehender G, De Maddalena C, Gianotto M, Cavalli B, Santambrogio S, Orso M, Moroni M, Galli M. 1997. High prevalence of false-negative anti-HTLV type I/II enzyme-linked immunosorbent assay results in HIV type 1-positive patients. AIDS Res Hum Retroviruses 13: 1141-1146.

Zela D, Cavicchini A, Salemi M, casoli C, Lori F, Achilli G, Cattaneo E, Landini V and Bertazoni U. 1993. Molecular characterization of two isolates of human T cell leukaemia virus type II from Italian drug abusers and comparison of genome structure with other isolates. J Gen Virol. 74: 437-444.

Table 1. Genomic sequence of primers for PCR and used for sequencing in the HTLV-2 samples.

Primers	<u>Sequences</u>
E_FR_S	GCTACAATGCCCTACTTGG
E_FR_AS	CCTATGGGAGGAATGTGAGC
E_SR_S	GTCTCCAGTCCATCCTGGAA
E_SR_AS	CAGGGGCCAAACAATATGAC
E_seq1_as	ATGGAGATGTTGGGGTGTA
E_seq1_s	TACACCCCCAACATCTCCAT
E_seq2_as	TGACTATGGCCTGGGTAAGG
E_seq2_s	CCTTACCCAGGCCATAGTCA

Table 2. Some demographic and immunological characteristics of HTLV-2-infected individuals

Variable	HTLV-2 Positive WB (n= 29)	HTLV Indeterminate WB (n=21)	Total (n=50)	P value
Gender				
Female / Men	14/15	9/12	23/27	NS
Age				
Mean, years	41	38	40	NS
T CD4⁺ cells,				
Median, cells/mm ³	443	608	476	NS
(percentil 25% - 75%)	188 - 663	227 - 941	190-899	
T CD8⁺				
Cells, median, cells/mm ³	781	746	781	NS
(percentil 25% - 75%)	551 - 1044	473 - 1288	500-1166	
HCV (n. %)	8 (28)	12 (57)	20 (40)	0.04
HIV (n. %)	18 (62)	14 (67)	32 (64)	NS
DNA proviral load HTLV-2				
n. % > 10 copies/10 ⁶ PBMC	0/13 (0)	6/17 (35)	6/30	0.02

NOTA: NS: No statistical significant; WB= Western-Blot

Table 3. Reactivity in the Western-Blot in 27 HTLV-2-infected subjects or non-typeable HTLV

ID Sample	<u>WB 2.4 Profile</u>
321/334	GD 21, GP 21, p24wk
35	GD 21, p19,p24
82/158/307/317/335	GD 21, p24
193	GD 21wk, p53wk, P28wk
361	rgp 46-lwk, p24,p19,GD21
415	rgp 46-lwk, GD 21
472	rgp46-II, GD 21
116	rgp46-II, gp21, p24
101	rgp46-II, P28, P24
346/350	rgp46-IIwk
80/95/274/285/394/539	rgp46-II, P24
81/302/265	rgp46-II, p24wk, p19
Total: 25	

Note: In two samples, no band was described. Wk: weak

Figure 1. Comparison of sequences of HTLV-2-positive samples and indeterminate by WB with K55 protein and one African HTLV-2 sequence of the envelope region (shown only 17 sequences)

				160	170	180	190	200	210
445	AMTLL	VDAPGYDPLW	FITSEPTQPP	ETPLPLVHDS	DLEHVLTPST	SWTTKILKFIQ			
82	AMTLL	VDAPGYDPLW	FITSEPTQPP	ETPLPLVHDS	DLEHVLTPST	SWTTKILKFIQ			
81	AMTLL	VDAPGYDPLW	FITSEPTQPP	ETPLPLVHDS	DLEHVLTPST	SWTTKILKFIQ			
274	AMTLL	VDAPGYDPLW	FITSEPTQPP	ETPLPLVHDS	DLEHVLTPST	SWTTKILKFIQ			
80	AMTLL	VDAPGYDPLW	FITSEPTQPP	ETPLPLVHDS	DLEHVLTPST	SWTTKILKFIQ			
302	-MTLL	VDAPGYDPLW	FITSEPTQPP	ETPLPLVHDS	DLEHVLTPST	SWTTKILKFIQ			
317	-MTLL	VDAPGYDPLW	FITSEPTQPP	ETPLPLVHDS	DLEHVLTPST	SWTTKILKFIQ			
307	-MTLL	VDAPGYDPLW	FITSEPTQPP	ETPLPLVHDS	DLEHVLTPST	SWTTKILKFIQ			
265	-MTLL	VDAPGYDPLW	FITSEPTQPP	ETPLPLVHDS	DLEHVLTPST	SWTTKILKFIQ			
285	-MTLL	VDAPGYDPLW	FITSEPTQPP	ETPLPLVHDS	DLEHVLTPST	SWTTKILKFIQ			
395	-MTLL	VDAPGYDPLW	FITSEPTQPP	ETPLPLVHDS	DLEHVLTPST	SWTTKILKFIQ			
35	AMTLL	VDAPGYDPLW	FITSEPTQPP	ETPLPLVHDS	DLEHVLTPST	SWTTKILKFIQ			
K55	HTLV-2	-----	-DAPGYDPLW	FITSEPTQPP	ETPLPLVHDS	DLEHVLTPST	SWTTK-----		
Y13051	AFRICA	-MTLL	VDAPGYDPLW	FITSEPTQPP	ETPLPLVHDS	DLEHVLTPST	SWTTKMLKFIQ		
334	----	L	VDAPGYDPLW	FITSEPTQPP	ETPLPLVHDS	DLEHVLTPST	SWT-----		
346	----	L	VDAPGYDPLW	FITSEPTQPP	ETPLPLVHDS	DLEHVLTPST	SWT-----		
352	----	L	VDAPGYDPLW	FITSEPTQPP	ETPLPLVHDS	DLEHVLTPST	SWT-----		
369	----	--	APGYDPLW	FITSEPTQPP	ETPLPLVHDS	DLEHVLTPST	SWT-----		
391	----	--L	VDAPGYDPLW	FITSEPTQPP	ETPLPLVHDS	DLEHVLTPST	SWT-----		
116	----	L	VDAPGYDPLW	FITSEPTQPP	ETPLPLVHDS	DLEHVLTPST	SWT-----		
351	----	-	-DAPGYDPLW	FITSEPTQPP	ETPLPLVHDS	DLEHVLTPST	SWTTKI----		