



Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Laboratório Investigação Médica - LIM 56

Victor Angelo Folgosi

Desenvolvimento de peptídeos sintéticos para o diagnóstico sorológico da infecção ocasionada pelos vírus linfotrópicos de células T humanas tipo 1 e 2 (HTLV-1 e 2)

São Paulo

2022

Victor Angelo Folgosi

Desenvolvimento de peptídeos sintéticos para o diagnóstico sorológico da infecção ocasionada pelos vírus linfotrópicos de células T humanas tipo 1 e 2 (HTLV-1 e 2)

Versão original

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

Programa de Dermatologia

Orientador: Prof. Dr. Jorge Simão do Rosário Casseb

São Paulo

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Folgosi, Victor Angelo

Desenvolvimento de peptídeos sintéticos para o diagnóstico sorológico da infecção ocasionada pelos vírus linfotrópicos de células T humanas tipo 1 e 2 (HTLV-1 e 2) / Victor Angelo Folgosi. -- São Paulo, 2022.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Dermatologia.

Orientador: Jorge Simão do Rosário Casseb.

Descritores: 1.Diagnóstico 2.Testes imediatos
3.Peptídeos 4.Ensaio de imunoabsorção enzimática
5.Western Blotting

USP/FM/DBD-514/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: FOLGOSI, Victor Ângelo

Título: Desenvolvimento de peptídeos sintéticos para o diagnóstico sorológico da infecção ocasionada pelos vírus linfotrópicos de células T humanas tipo 1 e 2 (HTLV-1 e 2)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação de Dermatologia, área de Investigação em Dermatologia e Imunodeficiências da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof.(a) Dr.(a)

Instituição (Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar os meus passos, guiar meus caminhos e a quem sempre esquecermos de agradecer;

A minha querida mãe, que não pôde acompanhar a finalização deste estudo, mas que sempre me deu apoio, mesmo que em tempos de dificuldade;

A minha noiva Bianca, com quem sempre pude contar e compartilhar tudo;

Aos meus irmãos Jean e Guilherme, que sempre confiaram e apostaram em minha capacidade, mesmo quando eu não confiava;

Ao meu amigo e orientador Prof.Dr. Jorge Casseb, pela valiosa orientação e incentivo. Dentre todos os que colaboraram com esta pesquisa, tive a sorte de ter o mais companheiro como orientador;

A Prof.^a Dra. Maria Carmen Arroyo Sanchez do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia da Universidade de São Paulo, pela doação das amostras controle. E a Prof.^a titular e livre docente Maria Aparecida Juliano da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), pela síntese inicial de todos os peptídeos utilizados neste estudo. Sem a colaboração de vocês, a realização deste trabalho não seria possível;

A Tatiane, Gabriela, Wilson e Pedro, pela companhia e ajuda em meus experimentos, mesmo à noite ou em finais de semana;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para realização desse projeto;

A Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial ao Departamento de Dermatologia, pela ajuda e amizade de professores e funcionários;

Aos Drs. Augusto e Michel, pelas valiosas sugestões e colaboração durante toda análise e seleção dos voluntários;

Ao instituto de Infectologia Emílio Ribas e a toda coorte de voluntários que aceitaram participar deste estudo, torcendo pelo seu sucesso;

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Martin Luther King

RESUMO

Folgosi VA. Desenvolvimento de peptídeos sintéticos para o diagnóstico sorológico da infecção ocasionada pelos vírus linfotrópicos de células T humanas tipo 1 e 2 (HTLV-1 e 2) [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Introdução: As proteínas codificadas pelos genes *gag* (p24 e p19) e *env* (gp21 e gp46) do HTLV, apresentam um papel fundamental durante a resposta imune celular primária dos indivíduos infectados. Neste contexto é essencial o desenvolvimento de painéis de peptídeos sintéticos a partir de regiões específicas destas proteínas, levando a elaboração de tecnologias diagnósticas descentralizadas e de baixo custo “*Point of Care*”. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi identificar peptídeos sintéticos para serem utilizados no diagnóstico do HTLV. **Métodos:** Para diferenciação de reatividade e seleção das proteínas virais que serviram como base para o desenho dos peptídeos, realizamos uma análise de reatividade média dentre as proteínas utilizadas no Western Blot (HTLV Blot 2.4®, MP Biomedicals). Em seguida, foram localizadas regiões de alta similaridade destas proteínas utilizando o BLASTp e o software MEGA-X, incluindo sequências de diferentes grupos étnicos e geográficos. A partir destas regiões, a predição dos epítomos foi elaborada por meio de ferramentas de bioinformática (*in silico*), com posterior avaliação de reatividade por ELISA indireto (*in vitro*). **Resultados:** Foram desenhados nove peptídeos para HTLV-1, três para HTLV-2 e dois para HTLV-1/2. Contudo, apenas dois peptídeos obtiveram valores consideráveis de sensibilidade e especificidade, e apenas para o HTLV-1. O peptídeo 1 apresentou 43,62% de sensibilidade e 100% de especificidade, enquanto o peptídeo 2 apresentou 36% de sensibilidade e 100% de especificidade. **Conclusão:** Embora os peptídeos não tenham apresentado parâmetros elevados de sensibilidade, os valores de corte podem ser aumentados para melhorar sua eficácia. Além disso, estes peptídeos apresentaram valores de alta especificidade, o que em suma, permite sua utilização no formato de pool ou até mesmo como uma proteína recombinante. Outros experimentos usando esses peptídeos somados a outros desenvolvidos e difundidos na literatura, podem ser realizados para o desenvolvimento de testes altamente sensíveis e específicos, de baixo custo e que possam ser utilizados de forma “*Point of Care*”.

Palavras-chave: Diagnóstico. Testes imediatos. Peptídeos. Ensaio de imunoadsorção enzimática. Western Blotting.

ABSTRACT

Folgosi VA. Development of synthetic peptides for the serological diagnosis of infection caused by human T-cell lymphotropic viruses type 1 and 2 (HTLV-1 and 2) [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

Introduction: The proteins encoded by the HTLV gag (p24 and p19) and env (gp21 and gp46) genes play a key role during the primary cellular immune response of infected individuals. In this context, it is essential to develop panels of synthetic peptides from specific protein regions, leading to the development of decentralized and low-cost “Point of Care” diagnostic technologies. **Objective:** The aim of this study was to identify synthetic peptides to be used in the diagnosis of HTLV. **Methods:** In order to differentiate the reactivity and select the viral proteins that served as the basis for the design of the peptides, we performed an average reactivity analysis among the proteins used in the Western Blot (HTLV Blot 2.4®, MP Biomedicals). Then, regions of high similarity of these proteins were located using BLASTp and the MEGA-X software, including sequences from different ethnic and geographic groups. From these regions, the prediction of epitopes was elaborated using bioinformatics tools (in silico), with subsequent evaluation of reactivity by indirect ELISA (in vitro). **Results:** Nine peptides were designed for HTLV-1, three for HTLV-2 and two for HTLV-1/2. However, only two peptides achieved considerable values of sensitivity and specificity, and only for HTLV-1. Peptide 1 showed 43.62% sensitivity and 100% specificity, while peptide 2 showed 36% sensitivity and 100% specificity. **Conclusion:** Although the peptides did not show high sensitivity parameters, the cutoff values can be increased to improve their effectiveness. In addition, these peptides showed high specificity values, which in short, allows their use in pool format or even as a recombinant protein. Other experiments using these peptides, added to others developed and disseminated in the literature, can be carried out for the development of highly sensitive and specific, low-cost tests that can be used in a “Point of Care” way.

Keywords: Diagnosis. Point of care. Peptides. Enzyme-linked immunosorbent assay. Western Blotting.

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS

Figura 1 -	Cronologia do HTLV e HIV	1
Figura 2	Estrutura morfológica do HTLV	2
Figura 3 -	Estrutura genômica do HTLV-1 e HTLV-2	3
Figura 4 -	Processo de anexação e fusão da membrana viral	6
Figura 5 -	ELISA indireto para HTLV	7
Figura 6 -	Algoritmo para o diagnóstico laboratorial de infecção pelo HTLV	9
Figura 7 -	Fluxo de delineamento do estudo	14
Figura 8 -	<i>Intensity finder</i> descrito segundo protocolo da <i>MP Diagnostics</i>	15
Figura 9 -	Fluxograma de caracterização dos peptídeos sintéticos	16
Figura 10 -	Distribuição das amostras utilizadas na pesquisa	19
Figura 11 -	Intensidade de reação das amostras soropositivas para HTLV-1	21
Figura 12 -	Intensidade de reação das amostras soropositivas para HTLV-2	22
Figura 13 -	Intensidade de reação das amostras soropositivas para HTLV-1 e 2	23
Figura 14 -	Intensidade de reação das amostras soropositivas para HTLV	23
Figura 15 -	Sequências utilizadas para alinhamento da <i>env-1 e -2</i>	24
Figura 16 -	Regiões conservadas do gene <i>env</i> no HTLV-1 e HTLV-2	25
Figura 17 -	Regiões conservadas entre a <i>env-1 e -2</i>	26
Figura 18 -	Sequências utilizadas para alinhamento do <i>gag-1</i>	27
Figura 19 -	Regiões conservadas do gene <i>gag</i> do HTLV-1	28
Figura 20 -	Estrutura secundária dos peptídeos da gp21 do HTLV-1	30
Figura 21 -	Estrutura secundária dos peptídeos da p24 do HTLV-1	31
Figura 22 -	Estrutura secundária dos peptídeos da p19 do HTLV-1	32
Figura 23 -	Análise gráfica de absorbância durante a etapa de adequação	33
Figura 24 -	Comparativo entre o protocolo com e sem albumina bovina	34
Figura 25 -	Análise de reatividade dos peptídeos de HTLV-1	35
Figura 26 -	Análise de reatividade dos peptídeos de HTLV-2	36
Figura 27 -	Curva-ROC realizada com diferentes pontos de corte	37
Figura 28 -	Análise de reatividade do peptídeo P1-HTLV-1/2	38
Figura 29	Análise de reatividade do peptídeo P3-HTLV-1	39
Figura 30	Avaliação de absorbância das amostras durante a etapa de validação	40
Figura 31	Representação das cadeias de hidrogênio do peptídeo P1-HTLV-1/2.	44

LISTA DE TABELAS E QUADROS

QUADROS

Quadro 1 - Critérios de interpretação e diagnóstico da <i>MP Diagnostics</i>	8
---	---

TABELAS

Tabela 1 - Caracterização de sequências peptídicas de HTLV-1 e/ou 2	29
Tabela 2 - Tabela resumo apresentando os valores da Figura 24	36
Tabela 3 - Tabela resumo apresentando os valores da Figura 25	37
Tabela 4 - Resumo dos valores da curva ROC da Figura 26	38

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCPred	Servidor de predição de epítipo de célula B baseado em rede neural artificial
APH-2	Proteína Antisense do HTLV-2
ATF	Fator de Transcrição Ativador
ATLL	Leucemia/Linfoma de Células T Adultas
β	Beta
BcePred	Servidor de predição de epítomos lineares de células B
BLAST	Ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamento Local
bZIP	Fator de Zíper de Leucina Básico do HTLV-1
CD4	Cluster de Diferenciação 4
CD8	Cluster de Diferenciação 8
CD14	Cluster de Diferenciação 14
CD16	Cluster de Diferenciação 16
CD19	Cluster de Diferenciação 19
CRE	Elementos de Resposta cAMP
CONITEC	Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
GD21	Proteína Recombinante 21
GLUT1	Transportador de Glicose
gp21	Glicoproteína 21
gp46	Glicoproteína 46
gp62	Glicoproteína 62
HAM/TSP	Mielopatia Associada ao HTLV-1/ Paraparesia Espástica Tropical
HBZ	Fator de Zíper de Leucina Básico do HTLV-1
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSPG	Proteoglicano de Sulfato de Heparina
HTLV-1	Vírus Linfotrópico de Células T tipo 1
HTLV-2	Vírus Linfotrópico de Células T tipo 2
HTLV-3	Vírus Linfotrópico de Células T Humanas do tipo 3
HTLV-4	Vírus Linfotrópico de Células T Humanas do tipo 4

IF	Imunofluorescência
IIER	Instituto de Infectologia Emílio Ribas
INNO-LIA	Imunoensaio em Linha
IR	Índice de Reatividade
kD	kiloDalton
LFA	Teste de Fluxo Lateral
LTR	Repetições Longas Terminais
MEGA-X	Análise de Genética Evolutiva Molecular em Plataformas de Computação
MHC-1	Complexo Principal de Histocompatibilidade
mRNA	RNA mensageiro
NCBI	Centro Nacional de Informações de Biotecnologia
NFKB	Ligação de fator Nuclear Kappa
NFKB	Receptor Neuropilina-1
<i>ORF</i>	Quadros de Leitura Aberta
Pb	Pares de bases
PBMC	Células Mononucleares de Sangue Periférico
PBS	Salina Tamponada com Fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pr 53	Proteína precursora 53
PVL	Carga Proviral
pX	Proteína X
p8	Proteína 8
p10	Proteína 10
p11	Proteína 11
p12	Proteína 12
p13	Proteína 13
p14	Proteína 14
p15	Proteína 15
p19	Proteína 19
p24	Proteína 24
p28	Proteína 28
p30	Proteína 30

p32	Proteína 32
p53	Proteína 53
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real Qualitativa
Rex	Proteína Rex
RFLP	Polimorfismo de Comprimento de Fragmento para Restrição
rgp46-I	Proteína recombinante 46-I
rgp46-II	Proteína recombinante 46-II
RIPA	Ensaio de Radioimunoprecipitação
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAase H	Ribonuclease H
RPM	Rotação por minuto
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa
STLV	Vírus Linfotrópico de Células T de Símios
<i>SRF</i>	Fator de Resposta ao Soro
Tax	Proteína Tax
T CD4 +	Células T que expressam CD4
T CD8 +	Células T que expressam CD8
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
TMB	Tetrametilbenzidina
TRE	Elementos Responsivos a Tax
tRNA	Ácido Ribonucleico Transportador
WB	Western-Blot

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
μl	Microlitros
ml	Mililitros
$^{\circ}\text{C}$	Graus celsius
n $^{\circ}$	Número
nM	Nanomolar
$\mu\text{g/ml}$	Micrograma por mililitros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANA (HTLV)	1
1.2 DIAGNÓSTICO	7
1.3 JUSTIFICATIVA	12
2. OBJETIVO GERAL	13
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3. MÉTODOS	14
3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO	14
3.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	14
3.3 DIFERENCIAÇÃO E SELEÇÃO DAS PROTEÍNAS VIRAIS DO HTLV-1 E/OU -2	15
3.4 FORMAÇÃO DO <i>DATABASE</i> E ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA	16
3.5 ENSAIOS IMUNOLÓGICOS DE ELISA	17
3.6 ANÁLISE DE DADOS E ESTATÍSTICA	20
4. RESULTADOS	21
4.1 DIFERENCIAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE DIAGNÓSTICO PARA HTLV-1/2.	21
4.2 ALINHAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS LINEARES.	24
4.3 PADRONIZAÇÃO ELISA.	33
4.4 TESTAGEM POR ELISA DOS PEPTÍDEOS DE HTLV-1 E 2	35
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
ANEXOS	57

1. INTRODUÇÃO

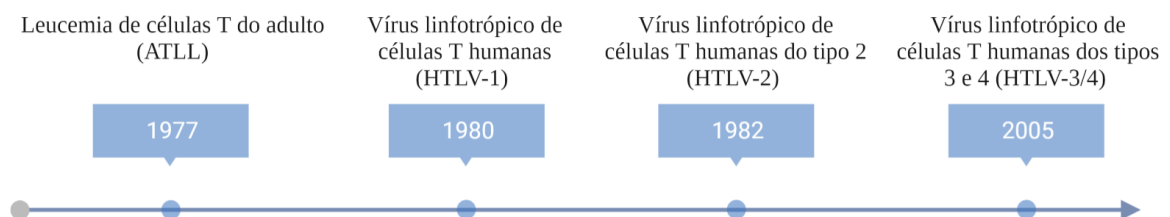
1.1 VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANA (HTLV)

No ano de 1977, pesquisadores japoneses identificaram um novo tipo de leucemia de células T do adulto (*Adult T-cell leukemia/lymphoma*) (ATLL), supostamente relacionando sua causa a um possível agente infeccioso ainda desconhecido (1). Anos mais tarde, Bernard J. Poiesz e colaboradores, conseguiram identificar a presença de partículas virais com morfologia do tipo C em duas linhagens de células linfoblastóides de células T (HUT 102 e CTCL-3) e em linfócitos do sangue periférico, obtidos a partir de um paciente com linfoma cutâneo de células T, denominando este agente de vírus linfotrópico de células T humanas (Human T-cell lymphotropic virus) (HTLV) (2).

Posteriormente, o mesmo grupo descreveu um novo subtipo do vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV-2), desta vez isolado de um paciente com leucemia em linhagens de células T pilosas (3). Notou-se que o HTLV-2 possuía considerável semelhança entre a estrutura genômica e os padrões de replicação do HTLV-1, bem como as propriedades e funções de suas proteínas estruturais, regulatórias e acessórias (3–6). Entretanto, estes vírus se diferenciam na distribuição geográfica e patogenicidade (4,5,7)

As possíveis variações do HTLV voltaram a ser discutidas de forma mais vigorosa em 2005, quando houve ao Sul de Camarões no continente africano, a descoberta de dois novos tipos de HTLV: HTLV-3 (8) e HTLV-4 (9). Aparentemente, estes vírus foram provenientes de uma infecção zoonótica de primatas locais, devido à sua alta identidade com o vírus linfotrópico de células T de símios (STLV) (10). Embora estes tenham sido casos isolados, em apenas 4 indivíduos até o momento, o ocorrido gerou novas dúvidas sobre sua epidemiologia e forma de transmissão a humanos (Figura 1) (8–11).

Figura 1 – Cronologia do HTLV.

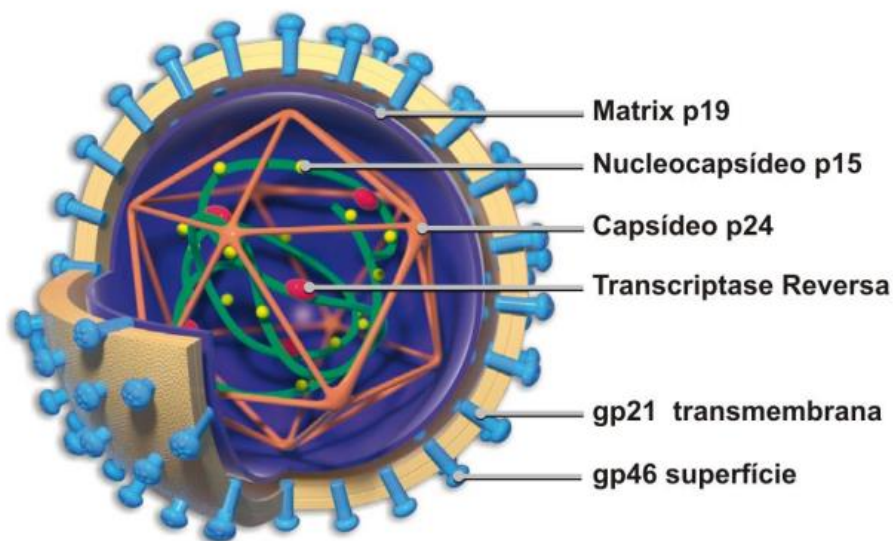


Fonte: Imagem produzida a partir da plataforma *Biorender* (app.biorender.com).

1.1.1 Classificação e Características Morfológicas

O HTLV, pertence à família *Retroviridae*, à subfamília *Orthoretrovirinae* e ao gênero *Deltaretrovirus* (12). Morfologicamente este vírus é constituído por uma estrutura esférica de aproximadamente 100 a 120 nm de diâmetro, semelhante aos demais retrovírus já descritos (4,13). Externamente possui um envelope viral composto pela matriz lipídica adquirida através da membrana plasmática da célula hospedeira, somada a duas glicoproteínas virais: glicoproteína de superfície (gp46) e glicoproteína do envelope (gp21). Além disso, possui um capsídeo icosaédrico composto pelas proteínas estruturais: do nucleocapsídeo (p15), capsídeo (p24) e matriz (p19), onde se encontram preservadas duas cadeias simples de RNA idênticas que codificam proteínas estruturais e não estruturais, tais como: transcriptase reversa (p55) e integrase (p32) (4,14,15) (Figura 2).

Figura 2 - Estrutura morfológica do HTLV.



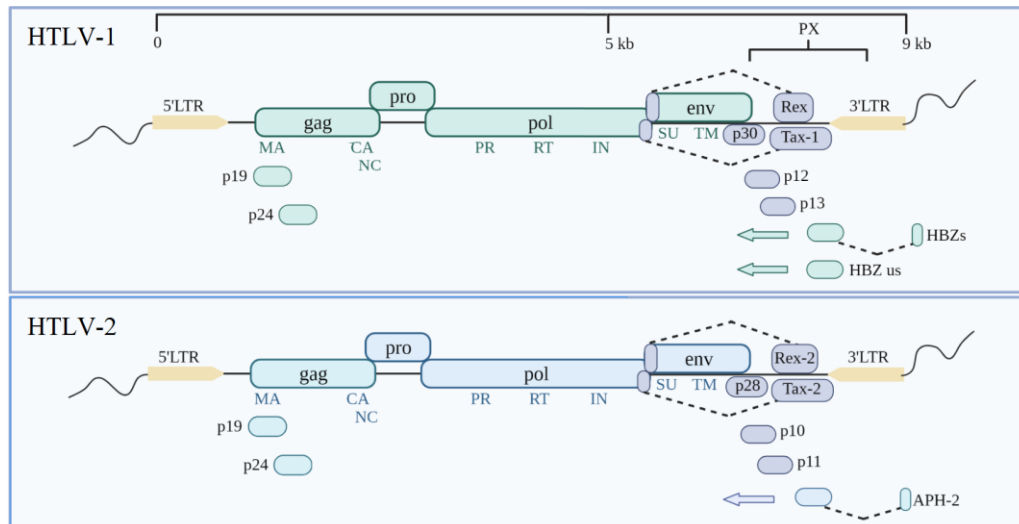
Fonte: Adaptado de Lairmore et al., 2012.

1.1.2 Organização Genômica

O HTLV-1 e HTLV-2 apresentam estrutura genômica similar e parte da sequência nucleotídica com 70% de homologia (4). Possuem genomas compostos por duas fitas de RNA dimérico simples de sentido positivo, contendo aproximadamente 9.000 pares de bases (pb) (16), responsáveis pela expressão de diferentes tipos de RNAm e proteínas a partir de diferentes estratégias, tais como: tradução policistrônica, *frame shifting*, *splicing* e a clivagem mediada por protease de poliproteínas específicas (4,17–19).

Além de possuírem os genes estruturais *gag*, *pol* e *env* (característicos dos retrovírus), uma região denominada de *pro* sobreposta aos genes *gag* e *pol* (que codifica as proteínas não estruturais) e duas repetições longas terminais (*Long Terminal Repeats* – *LTR*) 5' e 3' (20,21), o HTLV-1 e HTLV-2, também possuem uma sequência entre a *env* e a LTR 3', denominada de região *pX*, responsável por codificar genes regulatórios e acessórios (5,22,23) (Figura 3).

Figura 3 - Estrutura genômica do HTLV-1 e HTLV-2.



Legenda: Adaptado de Zhang *et al.*, 2017.

A região terminal 5', produz uma fita mRNA genômica (RNA mensageiro) que codifica a proteína precursora *gag-pol-pro*, além de servir como genoma viral (5). Enquanto que a região terminal 3', contém elementos essenciais e necessários para transcrição viral, a terminação da poliadenilação do mRNA e elementos responsivos, que estão envolvidos na transcrição da proteína *Tax* (23).

O gene *gag* é responsável pela codificação de uma poliproteína central, que inicialmente é sintetizada com peso molecular de aproximadamente 53 KDa (pr53) (23). Durante a maturação viral, este precursor é clivado formando as proteínas: matrix (p19), capsídeo (p24) e nucleocapsídeo (p15), que após rearranjo formam os componentes principais da estrutura viral madura (14,23,24).

O gene *pol* é responsável pela codificação de diversas enzimas, tais como: transcriptase reversa (p55), essencial para síntese do DNA viral; a integrase (p32), necessária para a integração do DNA viral à célula hospedeira e a RNAase H responsável pela degradação do molde de RNA e do primer tRNA (14,23,25).

A região *pro* sobreposta aos genes *gag* e *pol*, é responsável pela codificação da protease viral (p14), proteína importante para replicação viral, que processa as poliproteínas *gag* e *gag/pol* (durante a maturação viral) em componentes funcionais (4,23).

O gene *env* codifica uma poliproteína precursora denominada de gp62, que possui um peso molecular de aproximadamente 62 KDa(23). Em seguida, esta poliproteína é clivada no Complexo de Golgi da célula alvo, em duas subunidades: a glicoproteína de superfície (gp46) e a glicoproteína transmembrana (gp21) (14,26). A gp46 é responsável por realizar o reconhecimento e ligação ao receptor da célula alvo, enquanto que a gp21, ancorada ao envelope viral, é responsável pela fusão viral com a célula hospedeira (4,26,27).

1.1.2.1 Região *pX* e Seus Produtos.

A região “*pX*” do HTLV-1 e HTLV-2, possui cinco principais quadros de leitura aberta (*ORF – Open Reading Frames*), denominadas de X-I a X-V, que são responsáveis pela codificação das principais proteínas regulatórias: Tax, Rex, HBZ/APH e proteínas acessórias: p12 (p8), p13, e p30 para o HTLV-1; p10, p11 e p28 para o HTLV-2 (5,28).

A ORF X-IV é responsável pela codificação das proteínas Tax-1 e Tax-2 (do HTLV-1 e HTLV-2, respectivamente). Estas fosfoproteínas nucleares transativadoras com peso molecular aproximado de 40 kD (23,28), compartilham entre si 85% de similaridade na sequência de aminoácidos (29) e são capazes de realizar a mediação da transcrição do genoma proviral através da interação entre diferentes proteínas regulatórias celulares e os TRE (*Tax-responsive elements*) localizados na região terminal 3’(23,30). Dentre os principais fatores de ativação, podemos citar: a proteína de ligação ao elemento responsivo e via de ativação do fator de transcrição (CRE - *c-AMP Responsive Element* / ATF - *Activating Transcription Factor*); via de ligação do fator nuclear kappa (*Nuclear Factor Kappa Binding - NFKB/Rel*) e fator de resposta do soro (*Serum Response Fator - SRF*) (23,31).

A ORF X-III é responsável pela codificação das proteínas Rex-1 e Rex-2 (do HTLV-1 e HTLV-2, respectivamente). Estas fosfoproteínas nucleares transativadoras de aproximadamente 27 kD, compartilham entre si 60% similaridade da sequência de aminoácidos (5,23) e são responsáveis pela estabilização e exportação de mRNAs virais sem ligação (*unspliced*), que irão compor o genoma viral de futuros vírions (32).

Por fim, através das ORFs X-I e X-II, o HTLV-1 codifica as proteínas acessórias p12(p8), p13 e p30. Enquanto que, para o HTLV-2, esta região codifica as proteínas acessórias p10, p11 e p28 (um equivalente funcional da p30 do HTLV-1) (31,32).

As proteínas p30, p13 e p28 estão diretamente relacionadas à evasão imunológica, persistência viral e a manutenção de elevada carga proviral *in vivo* (33–36). Enquanto que, as proteínas p12 e p10 possuem sequência e funções semelhantes e apesar de aparentemente desempenharem um papel fundamental na infecção de células dendríticas, a deleção da p12 do provírus não parece alterar a imortalização de células mononucleares *in vitro* e/ou a persistência viral *in vivo* (32). Por outro lado, a proteína p11 (expressa a partir do mesmo transcrito de mRNA que a proteína p10), se liga ao MHC-1, modulando potencialmente a resposta imune (37).

O HTLV-1 também é responsável pela codificação do gene HBZ (*fator HTLV-1 basic leucine zipper* (bZIP)), formado a partir de um transcrito antisense, que inicia-se na região terminal 3' e se sobrepõe as ORFs de p12, p13 e p30 (33). Esse gene, apesar de se apresentar fracamente imunogênico e regular de forma negativa à expressão gênica viral mediada por Tax-1 (31,32,38), possui um papel fundamental durante proliferação celular (33), escape imunológico (39) e regulação da integridade genômica (40). Já o HTLV-2, expressa a codificação do gene *antisense protein of HTLV-2* (APH-2) (32), um equivalente funcional do HBZ, que por sua vez é capaz de inibir a transativação mediada por Tax-2 (31). No entanto, ao contrário do HBZ, notou-se que a perda de APH-2 *in vivo* resulta em um aumento significativo da replicação viral (38).

1.1.3 Proteínas Anexas e Fusão Viral

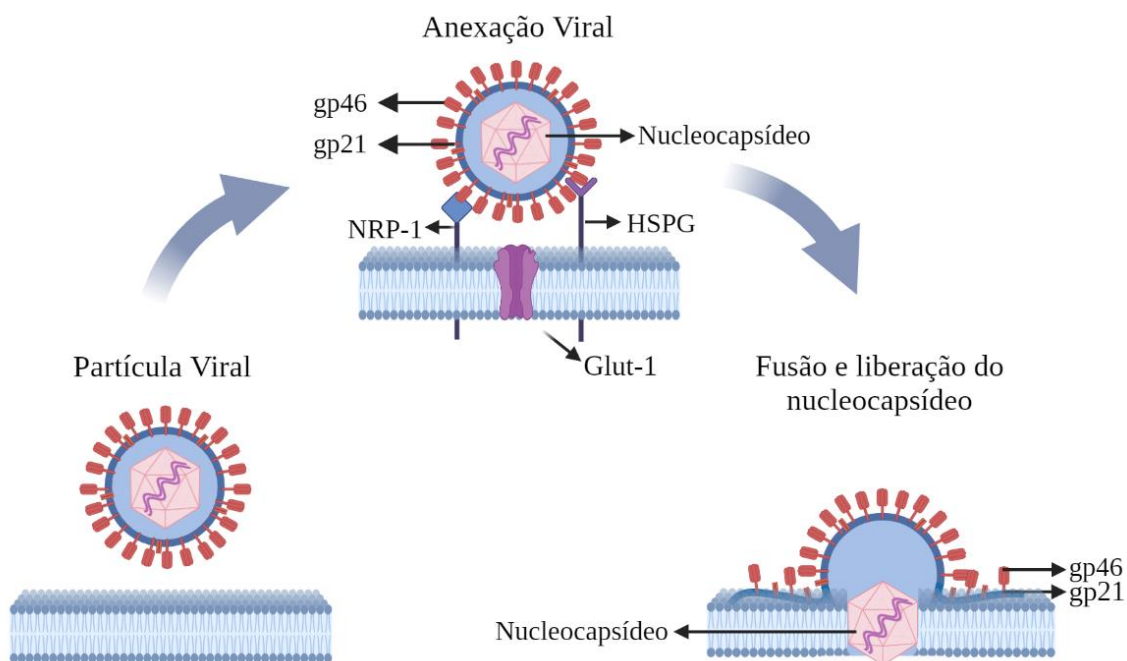
O HTLV-1 possui tropismo por linfócitos T CD4+, além de possuir potencial de infectividade para diferentes tipos celulares, tais como: linfócitos T CD8+, linfócitos B, células endoteliais, células mieloides e fibroblastos (41–44). Estudos demonstraram que de forma diferente do HTLV-1, o tropismo do HTLV-2 direciona-se para os linfócitos T CD8+, dispondo também da capacidade de fusão com outros tipos celulares, tais como: linfócitos T CD4+, CD45RO+, CD45RO- e células B (45).

A grande variedade de células-alvo, se deve em parte, à capacidade de interação entre a gp46 e os receptores de superfície celular amplamente distribuídos: *GLUT1* (*Glucose Transporter*) (5,46); *HSPG* (*Heparin Sulfate Proteoglycan*) (47) e *NRP-1* (*VEGF-165*

Receptor Neuropilin-1) (48). Segundo um estudo realizado pelo National Cancer Institute em Frederick, Maryland, o HTLV-1 apresentou um aumento significativo na expressão dos receptores de HSPG em células T CD8+. Diferentemente do HTLV-2, que demonstrou uma alta expressão dos receptores GLUT-1 em células T CD4+, evidenciando a distinção entre os requisitos de entrada na célula e interações proteicas entre ambos subtipos (49).

Resumidamente, durante o processo de infecção o HTLV utiliza a gp46 para interação com o *HSPG* e *NRP-1* (50), criando um complexo de ligação inicial, que permitirá a associação posterior da GLUT-1 e maior estabilidade para as demais ligações no estágio de pós-fixação (51,52). Durante o estágio de pós-fixação, a gp21 é utilizada de maneira semelhante a uma “âncora” que se fixa e penetra na membrana da célula alvo, originando uma fusão entre o envelope viral e a membrana celular (41,49). Por fim, ocorre a liberação do nucleocapsídeo para o citoplasma da célula hospedeira, possuindo duas cópias de RNA genômico viral e as enzimas: transcriptase reversa, integrase e protease (41) (Figura 4).

Figura 4 - Processo de anexação e fusão viral da membrana viral.



Fonte: Imagem produzida a partir da plataforma *Biorender* (app.biorender.com).

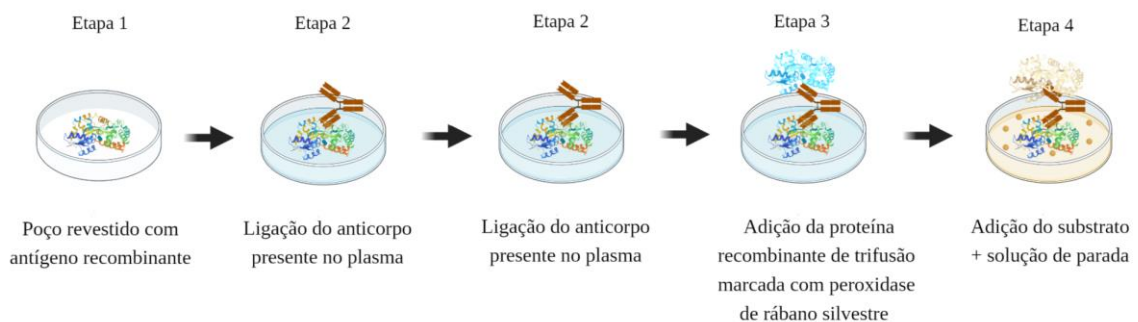
1.2 DIAGNÓSTICO

No Brasil, a realização da testagem sanguínea para a infecção ocasionada pelo HTLV, tornou-se uma política de saúde pública obrigatória em bancos de sangue desde 1993 (portaria nº 1.376). No entanto, os testes confirmatórios foram recomendados pelo SUS (Sistema Único de Saúde), apenas em 04 de fevereiro de 2016 (portaria nº 158) e somente para casos de ATLL (53).

Inicialmente para realização do diagnóstico, métodos mais simples com valores de sensibilidade (próximo de 100%) e especificidade variando de 92,0% a 99,5% são usados para triagem, como o imunoenensaio enzimático (EIA ou ELISA) ou imunoenensaio de quimioluminescência (CLIA) (54,55). Posteriormente, são utilizados os exames complementares (confirmatórios), que possuem maior especificidade (variando entre 98 a 100%) e que também identificam anticorpos produzidos contra proteínas exclusivas do HTLV-1 ou -2, como o Western Blot (WB), radioimunoprecipitação (RIPA), e mais recentemente imunoenensaio em linha (INNO-LIA) (55,56).

O ensaio imunoenzimático de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), teste comumente utilizado para triagem do HTLV, é um teste de fácil execução e aplicação em larga escala. Através de sua fase sólida consegue detectar a presença de anticorpos no soro, produzidos contra as proteínas relacionadas ao reconhecimento celular e replicação viral (gp21 e gp46) (57,58). Atualmente, estes protocolos no formato indireto, utilizam uma combinação de proteínas recombinantes e uma proteína recombinante de trifusão, marcadas com peroxidase de rábano silvestre. Assegurando a detecção de diversos anticorpos específicos (IgA, IgG e IgM) contra o HTLV-1 e -2 (59) (Figura 5).

Figura 5 – ELISA indireto para HTLV.



Fonte: Imagem produzida a partir da plataforma *Biorender* (app.biorender.com).

Entretanto, apesar da alta sensibilidade apresentada por este teste, devido a sua baixa especificidade, são exigidas repetições de amostras inicialmente reativas e confirmação das amostras com reatividade repetida através de análises adicionais, como por exemplo, a utilização do Western Blot (WB) (HTLV BLOT 2.4) (60,61).

O WB é um ensaio complementar que apresenta um aprimoramento da especificidade. Isto se deve principalmente, pela adição da proteína GD21 (uma proteína recombinante de epítipo de envelope, que embora comum ao HTLV-1 e HTLV-2, se demonstra extremamente específica). Além disso, este teste conta com a adição das proteínas rgp46-I (proteína recombinante exclusiva do envelope do HTLV-I) (MTA-1) e rgp46-II (proteína recombinante exclusiva do envelope de HTLV-II) (K55) (62,63) (Quadro 1).

Quadro 1 – Critérios de interpretação e diagnóstico da *MP Diagnostics*.

HTLV-I Seropositive	GD21 Recombinant <i>env</i> Protein	p19 Major <i>gag</i> Matrix	p24 Major <i>gag</i> Capsid	rgp46-II Recombinant <i>env</i> Protein	rgp46-I Recombinant <i>env</i> Protein
	X	X		X**	X
	X	X			X
	X	X	X		X
	X	X*	X		
*reactivity to p19 ≥ p24 ** low level reactivity					
HTLV-2 Seropositive	X		X	X	
	X		X	X	X**
	X	X	X	X	
	X	X	X*		
*reactivity to p24 > p19 ** low level reactivity					
HTLV-I/II Seropositive	X	X	X	X	X

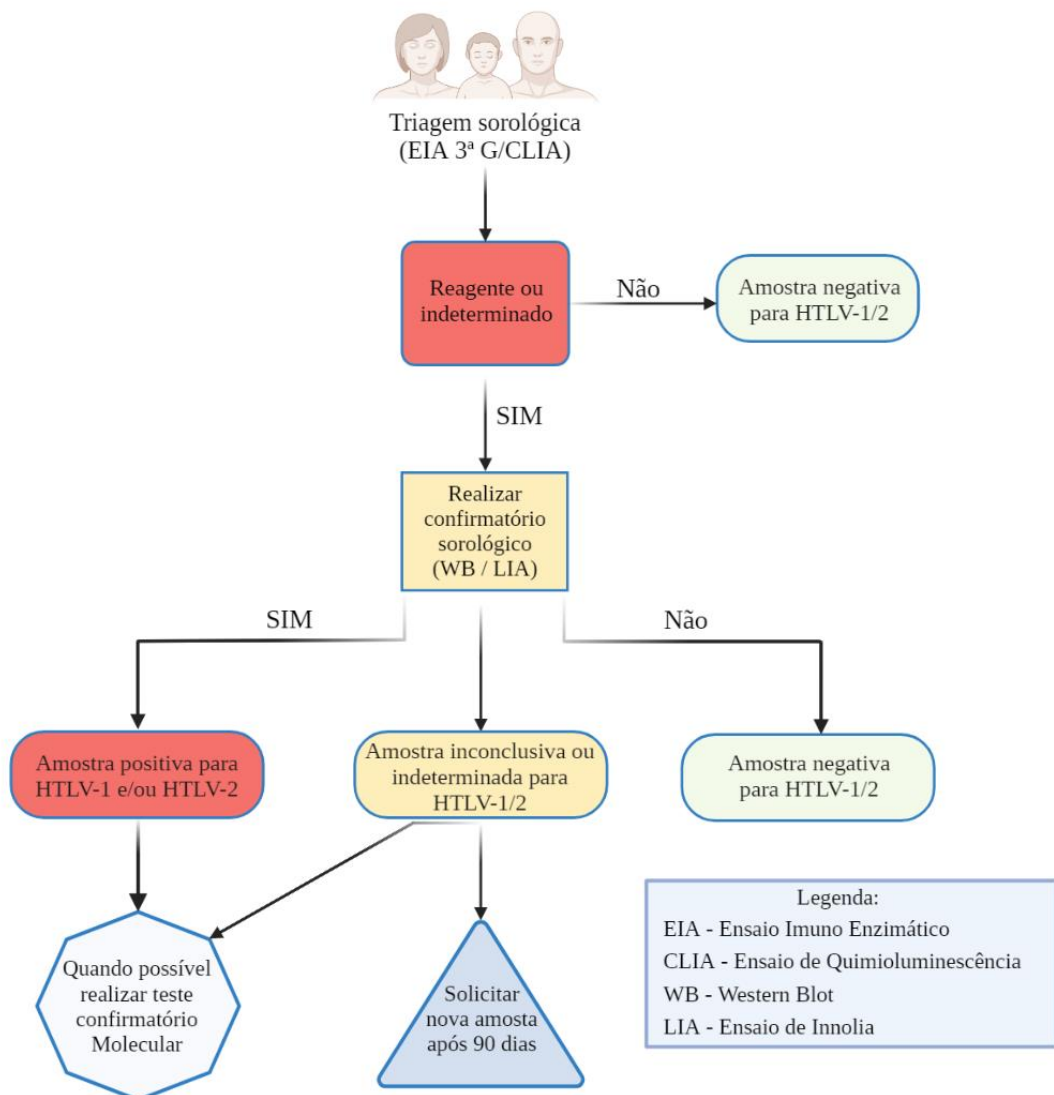
Fonte: Adaptado de *MP Diagnostics (HTLV Blot 2.4®)*.

Neste ensaio também é possível verificar a identificação de anticorpos específicos produzidos contra as proteínas relacionadas ao reconhecimento celular e replicação viral do HTLV (gp21 e gp46), bem como os produzidos contra as proteínas estruturais (p19 e p24) e não estruturais ou acessórias (p26, p28, p32, p36 e p53) (62).

1.1.5 Diagnóstico Molecular

Embora os testes complementares desempenhem um papel fundamental na tipagem viral do HTLV e na diminuição dos resultados falso-negativos apresentados pelos testes de triagem, são relatados inúmeros casos com resultados não tipados ou indeterminados (64–67). Para estes casos, é recomendado pelo Ministério de Saúde do Brasil, a utilização de técnicas moleculares baseadas na reação em cadeia de polimerase (PCR), mais sensíveis e específicas, como por exemplo: Nested PCR (n-PCR), PCR em tempo real (qPCR) e PCR seguido de análise de polimorfismo de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) (Figura 6) (68).

Figura 6 – Algoritmo para o diagnóstico laboratorial de infecção pelo HTLV.



Fonte: Adaptado de Brasil, 2020.

A utilização da metodologia molecular foi inicialmente direcionada para estudos de investigação clínica, contudo devido à redução de custos de seus reagentes e a introdução de novos protocolos, tornaram-se cada vez mais aplicáveis aos serviços de rotina (69). A RT-PCR pode ser citada como exemplo desta expansão, este método bastante difundido além de fornecer resultados precisos, sejam eles qualitativos e/ou quantitativos, também pode ser utilizada para a quantificação da carga proviral do HTLV-1 (69–72), considerada em diversos estudos como um marcador de risco para o desenvolvimento de doenças associadas a este vírus (73–75).

No entanto, atualmente não são disponibilizados protocolos ou ensaios moleculares comerciais no Brasil, bem como nenhum destes foi validado pela agência reguladora do Ministério da Saúde (ANVISA). Além disso, a maioria dos testes moleculares utilizados no Brasil foram desenvolvidos internamente, o que dificulta sua implementação no algoritmo de diagnóstico ou até mesmo a comparação de seus resultados em diferentes grupos de estudo (68).

1.1.6 Problemática do Diagnóstico

Embora os testes diagnósticos tenham evoluído muito nos últimos anos, ainda relata-se com frequência problemas tanto no sorodiagnóstico, quanto no diagnóstico molecular do HTLV-1/2, tais como: padrões indeterminados ou não reativos de WB (76–80) amostras repetidamente negativas e/ou indeterminadas em imunoenaios enzimáticos comerciais (77,79,81), alta reatividade cruzada em testes sorológicos (78,82) ou até mesmo a falha na amplificação de DNA proviral em ensaios de PCR (77,79).

Foi descrito que a falta de eficácia caracterizada pelo WB ou pelos imunoenaios enzimáticos, podem estar diretamente ligados a três fatores principais: proteínas recombinantes do diagnóstico (que não se identificam com as cepas virais circulantes de determinadas regiões); baixo número de cópias virais (resultando em baixa estimulação de anticorpos) e a longa persistência do vírus em latência (diminuindo gradualmente a concentração de anticorpos específicos) (77,80). Contudo, estudos demonstraram que apesar desta falta de eficácia afetar diretamente o diagnóstico e distinção do HTLV-1/2, quando realizadas as contraprovas moleculares em imunoenaios de densidade óptica próximas ao valor de corte ou resultados indeterminados de WB, indivíduos soropositivos para HTLV-2, HIV/AIDS ou ambos, demonstram maior representatividade (64–67).

No Brasil, outro obstáculo que afeta diretamente o diagnóstico e a tipagem dos testes sorológicos, está relacionado à distribuição heterogênea que o HTLV-1 e HTLV-2 podem

apresentar, dependendo da localização geográfica e origem étnica dos indivíduos (83,84). Estes compartilham entre si, 85% de similaridade em sua constituição aminoacídica, proporcionando alta reatividade cruzada nestes testes (78). Outro agente infeccioso que confere reação cruzada aos anticorpos contra o HTLV-1 é o *Plasmodium falciparum*, que possui determinantes antigênicos similares aos dos genes *env* e *gag*, recorrentemente utilizados para diagnóstico (82).

Por fim, em relação às dificuldades no diagnóstico confirmatório molecular, pode-se destacar as infecções com baixa quantidade de carga proviral ou presença de partículas virais defectivas, gerando resultados negativos devido a falha de amplificação dos produtos (79).

1.1.6 Testes *Point of Care*

Devido à complexidade na obtenção de um diagnóstico de alta especificidade e/ou sensibilidade para as infecções ocasionadas pelo HTLV-1 e HTLV-2, os métodos atualmente disponíveis se tornaram complexos e seu desenvolvimento contínuo exige cada vez mais recursos, como uma infra estrutura e abordagem centralizada (56,69,85). Além disso, são ineficazes quando comparados a outras tecnologias não convencionais, utilizadas em exames descentralizados (point-of-care), que necessitam de uma infraestrutura mínima para sua realização (86–88).

Dentre estas tecnologias descentralizadas, podemos citar os diferentes formatos de testes rápidos, tais como os testes de aglutinação em partículas de látex, imunoconcentração e imunocromatografia. Atualmente, estes testes são utilizados de forma recorrente para o diagnóstico de diversas infecções, como : HIV, sífilis e as hepatites B e C (86–88). Entre seus inúmeros benefícios, podemos mencionar os baixos custos de desenvolvimento e reprodução, bem como a facilidade de execução e leitura, fatores que impulsionam sua expansão diagnóstica em diversos setores (88,89).

Os ensaios de fluxo lateral (LFA) originados a partir dos imunoensaios utilizados desde 1960, podem ser citados como uma das causas principais pela expansão destas tecnologias não convencionais, por serem baseados no método imunocromatográfico possuem um excelente desempenho na detecção e/ou quantificação de analitos em misturas complexas, permitindo a testagem de praticamente qualquer tipo de amostra biológica em até 30 minutos (89–91). Atualmente os LFA são amplamente utilizados na triagem rápida de diversos agentes infecciosos em hospitais, consultórios médicos e laboratórios clínicos. Esses testes possuem um grande mercado para comercialização, sendo um dos segmentos laboratoriais que apresentam

o maior desempenho financeiro no mundo, devido à grande demanda por disponibilidade diagnóstica descentralizada (88). Apenas no ano de 2010, o LFA baseado em diagnósticos clínicos, gerou uma receita de U\$2.990 milhões e representou 89% do mercado mundial de testes rápidos. Obtendo um crescimento de mais de 1.500% nos últimos 12 anos (89).

1.3 JUSTIFICATIVA

A grande demanda por diagnóstico descentralizado, tem evidenciado cada vez mais a necessidade do desenvolvimento de testes de fácil execução, baixo custo de desenvolvimento e reprodução. Contudo, a escassez de trabalhos relacionados ao desenvolvimento de peptídeos sintéticos ou proteínas recombinantes para infecção ocasionada pelo HTLV-1 e HTLV-2, tem impedido este processo. Logo, objetivo deste estudo foi identificar e desenvolver um painel de peptídeos sintéticos que possibilitem o desenvolvimento de métodos diagnósticos não invasivos e descentralizados “Point of Care”, que além de permitirem o auto-diagnóstico, torne possível a identificação precoce da doença, uma melhor assistência pelos setores de saúde e subsequentemente melhor qualidade de vida dos indivíduos infectados.

2. OBJETIVO GERAL

Identificar peptídeos sintéticos para serem utilizados no diagnóstico do HTLV.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

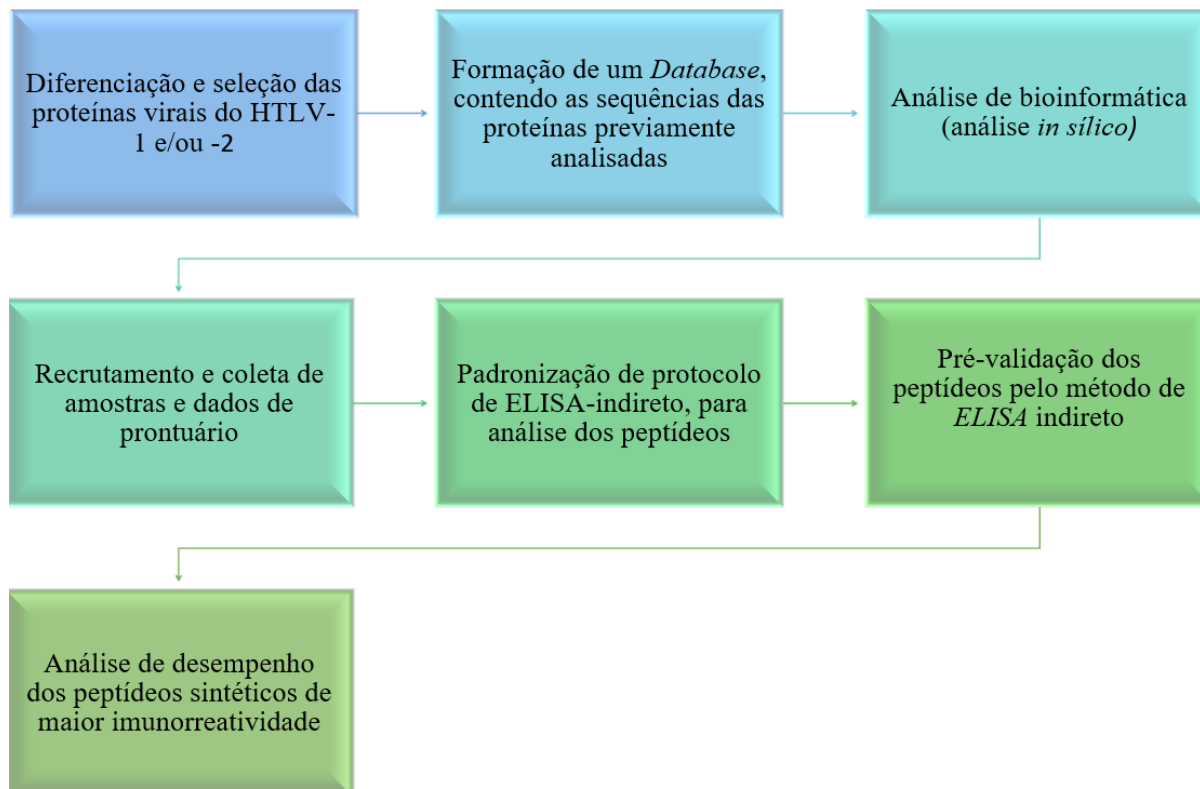
1. Diferenciar a resposta imune às proteínas virais entre os indivíduos soropositivos para HTLV-1 e/ou -2, definindo quais proteínas possuem melhor desempenho;
2. Identificar peptídeos sintéticos preservados nos tipos 1 e/ou 2, por meio da bioinformática;
3. Validar os peptídeos sintéticos utilizando a técnica de ELISA, com a utilização de soros positivos e negativos para HTLV.

3. MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Este é um estudo experimental, desenvolvido no Laboratório de Investigação em Dermatologia e Imunodeficiências (LIM/56) no período de 2020 a 2022. (Figura 7).

Figura 7 – Delineamento do estudo.



Fonte: Elaborada pelo autor.

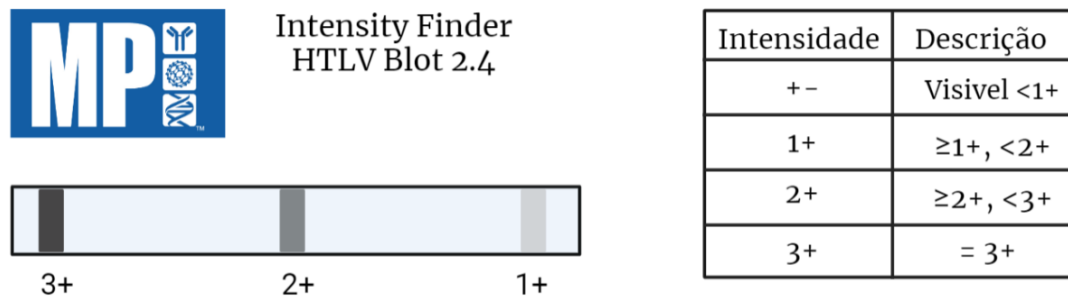
3.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este trabalho foi aprovado nos Comitês de Ética do Instituto de Infectologia “Emílio Ribas” e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com o CAAE sob número 29073020.3.0000.0061. Todas as amostras ou dados de prontuário dos indivíduos positivos utilizados para esta pesquisa, foram coletados durante o acompanhamento ambulatorial, após a assinatura do TCLE e identificadas de forma a garantir sua anonimidade. As amostras utilizadas como controle negativos, foram gentilmente cedidas pela Dra. Maria Carmen Arroyo Sanchez do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia

3.3 DIFERENCIAÇÃO E SELEÇÃO DAS PROTEÍNAS VIRAIS DO HTLV-1 E/OU -2

Para diferenciação de reatividade e seleção das proteínas virais que serviram como base para o desenvolvimento dos peptídeos, realizamos uma análise de reatividade dentre as proteínas utilizadas no Western Blot. Os valores semi quantitativos de reatividade descritos pelo *intensity finder* (protocolo da MP Diagnostics), foram utilizados para criação de um *scatter dot plot*, através do software GraphPad Prism v.8. Os dados apresentados por meio da média aritmética destes valores semi quantitativos, forneceram a média de imunorreatividade das proteínas de acordo com cada tipo viral proposto anteriormente. Entretanto, para facilitar a parametrização e evitar erros visuais durante a leitura destes resultados, foram utilizados apenas duas determinantes: 3+ (para reagente) e 1+ (reagente fraco) (Figura 8). O valor 0 foi atribuído para as bandas sem reatividade. Logo, a reatividade média ideal das bandas apresentou valor próximo ou igual a três, enquanto que, a banda com menor reatividade apresentou valor mais próximo a zero.

Figura 8 - *Intensity finder* descrito segundo protocolo da *MP Diagnostics*.



Fonte: Adaptado de *MP Diagnostics (HTLV Blot 2.4®)*.

3.3.1 Obtenção dos Resultados de Western Blot

Todos os ensaios para esta análise foram realizados pelo IIER de 2018 a 2021, precedendo o início do acompanhamento ambulatorial de cada voluntário. Ao fim da seleção, foram recrutados 211 indivíduos que realizaram o WB pertencente aos lotes: AK 005, 7008, 7010, 8006, 8011 ou 9013, do HTLV Blot 2.4® da MP Diagnostics. Todos os dados de prontuários selecionados para esta análise foram recrutados de forma aleatória e anônima.

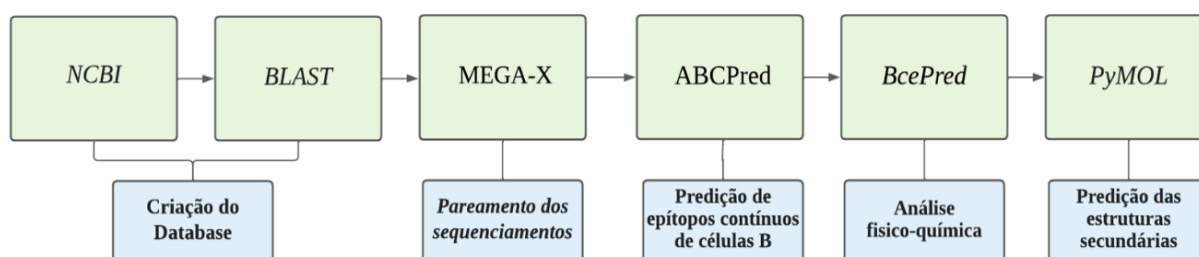
3.4 FORMAÇÃO DO *DATABASE* E ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

Os peptídeos possuem um papel fundamental na elaboração de qualquer imunoensaio. Portanto é imprescindível que para seu desenvolvimento, sejam levados em consideração diversos fatores, tais como a alta miscigenação brasileira (população ao qual o teste será empregado) e a capacidade mutagênica do HTLV (26,93).

Em vista destes possíveis interferentes, foram selecionadas sequências de referência das proteínas previamente analisadas e de melhor desempenho. Estas sequências retiradas do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (16), foram utilizadas para localização de similares, através da ferramenta de alinhamento local básico *BLAST* (Basic Local Alignment Search Tool) (94) e em seguida, pareadas para localização de regiões de identidade com a utilização do software *MEGA-X* (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms*). Esta análise forneceu a variabilidade genética e cronológica necessária, para exclusão de possíveis regiões gênicas responsáveis pela produção de proteínas ou peptídeos variantes.

Para melhor caracterização dos peptídeos lineares/contínuos, as regiões de identidade encontradas após alinhamento (com parâmetro de 80%) foram submetidas ao primeiro método de predição de epítomos contínuos de células B, baseado em rede neural recorrente (*ABCPred*) (95). Posteriormente a estrutura físico-química destas regiões, foram analisadas com a utilização do *BcePred Prediction Server* (96). Por fim, a plataforma *PyMOL* foi utilizada para descrever a estrutura secundária dos peptídeos preditos, com base em modelos estruturais de proteínas correspondentes, depositadas no banco de dados *RCSB PDB*. Para as cadeias peptídicas que não continham modelos depositados neste banco de dados, a plataforma Unipro UGENE foi utilizada para sua predição (<https://www.rcsb.org/>) (Figura 9).

Figura 9 – Fluxograma de caracterização dos peptídeos sintéticos.



Fonte: Elaborada pelo autor.

3.5 ENSAIOS IMUNOLÓGICOS DE ELISA

3.5.1 Padronização Do Método De ELISA Indireto

Devido à alta quantidade de plasma necessária durante as etapas de padronização, a padronização deste protocolo foi limitada apenas para o peptídeo que apresentou score de predição mais elevado, segundo a plataforma ABCPRED. Estes ensaios imunoenzimáticos indiretos no formato de ELISA foram padronizados de forma a definir quais as concentrações ideais de anticorpo secundário, bem como a melhor titulação das amostras plasmáticas.

Inicialmente o peptídeo foi suspenso em DMSO (c.:1 mg/ml) e em seguida diluído em solução carbonato/bicarbonato (50mM e pH 9,6) na concentração de 1 µg/ml. Posteriormente, 50 µl desta solução foi distribuído uniformemente em cada poço (*Well*), de placas de alta sensibilidade (High Binding, da Greiner Bio-One), de meia área e 96 poços (sob temperatura de 4°C por 16 horas). Após período de sensibilização os poços foram lavados com PBS-T (fosfato de sódio 10 mM de Na₃PO₄, cloreto de sódio 150 mM de NaCl e Tween-20 0,05%, pH 7,2) 5 vezes, e bloqueados por 1 hora com 50 µl/poço de PBS-T suplementado com 5% de albumina bovina, sob a temperatura de 37°C.

Para a composição das amostras sorológicas desta etapa, foram utilizadas 5 (cinco) amostras de plasma de voluntários HTLV negativos, 4 (quatro) amostras de voluntários soropositivos para HTLV-1, e 2 (duas) amostras de voluntários soropositivos para HTLV-2. Todas as amostras utilizadas foram testadas em duplicata nas diluições de 1:50, 1:100, 1:150 e 1:200, utilizando o tampão PBS-T, suplementado com 5% de albumina bovina, durante 1 hora a 37°C. Nesta etapa, também foram adicionados poços sem adição de antígeno (branco). Ao final deste período, as placas foram lavadas novamente PBS-T e em seguida, foram adicionados 50µl do anticorpo secundário diluído em PBS-T. O anti-IgG humano, conjugado com peroxidase (Sigma/Aldrich), obtido na solução estoque 1:1, foi distribuído e incubado nas diluições de 1:5.000, 1:10.000, 1:15.000 e 1:20.000, por 1 hora a 37°C. Seguinte ao período de incubação, as placas foram lavadas e a ligação antígeno/anticorpo foi detectada pela adição de 50 µl do substrato tetrametilbenzidina (TMB -Life Technologies), após 15 minutos e sob o abrigo da luz.

A reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico a 4 N e sua reatividade foi medida pelos valores de absorbância, obtidos em leitor de placas ELx800 Universal Microplate

Reader (Bio-Tek Instruments, Inc), com leitura no comprimento de onda de 450 nm. Para a interpretação dos dados, os valores de densidade óptica (DO), referente aos poços determinados de brancos, foram subtraídos das amostras. Posteriormente foi realizado o cálculo da média aritmética referente às duplicatas das amostras negativas e positivas, bem como o ponto de corte (Cut-off), que foi definido pela curva-ROC (receiver operator characteristic). Assim, os ensaios sorológicos realizados para cada um dos peptídeos foram realizados utilizando as amostras sorológicas diluídas na concentração de 1:150, e o anticorpo secundário (anti-IgG humano) na proporção de 1:10.000, conforme estabelecido durante a padronização.

3.5.2 Pré-Validação Dos Peptídeos Pelo Método De ELISA Indireto e síntese

Devido a quantidade de regiões preditas e seu alto custo para síntese, estas foram inicialmente sintetizadas *in house*, em colaboração com a Prof.^a titular e livre docente Maria Aparecida Juliano da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Após síntese as regiões peptídicas foram submetidas a uma triagem inicial, onde foi avaliado o índice de reatividade (IR) de 4 amostras plasmáticas negativas para HTLV, diante a 18 amostras positivas para HTLV-1 (utilizadas para os peptídeos de HTLV-1) e 18 amostras positivas para HTLV-2 (para os peptídeos de HTLV-2).

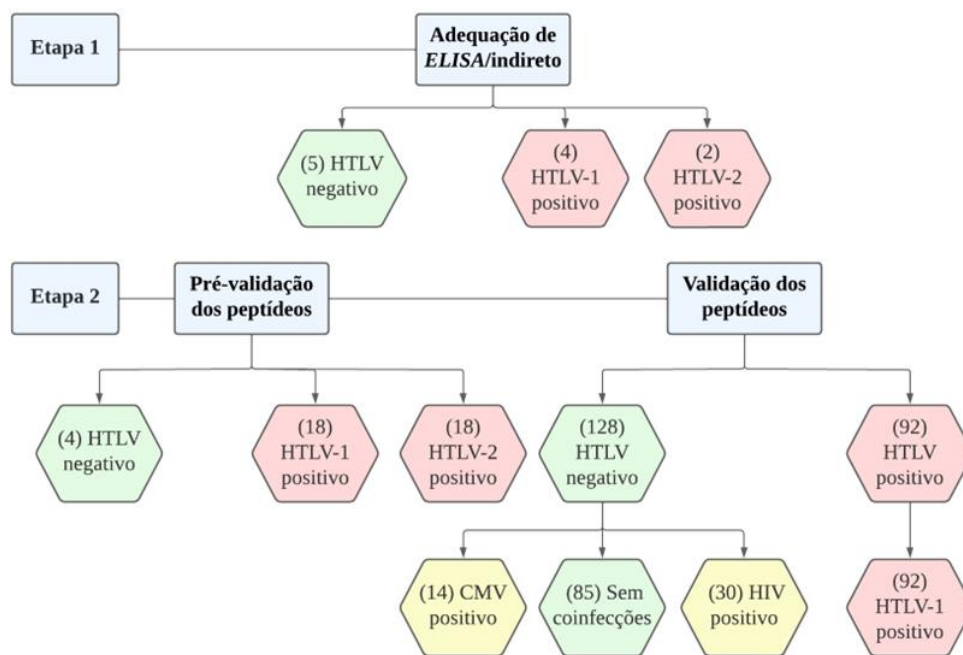
Devido ao baixo número de amostras durante a etapa de pré-validação, a curva-ROC, não apresentou valor estatístico relevante ($p < 0,05$) para todos os peptídeos. Portanto, para esta etapa o índice de reatividade foi calculado com base na média das amostras negativas + 3 desvios padrões. Posteriormente os dados foram apresentados através de gráficos de dispersão, utilizando os valores de IR (razão entre a absorbância da amostra e linha de corte), com resultados $\geq 1,00$ considerados positivos.

Após definição dos melhores determinantes antigênicos para HTLV, estes foram sintetizados com 99% de pureza pela *Genscript Biotech (Piscataway, Nova Jersey, EUA)*, em forma de peptídeos lineares e seguiram para etapa de validação.

3.5.3 Amostras Sorológicas

Para a formação do grupo controle utilizado durante a etapa de validação dos peptídeos, foram utilizadas 85 amostras soronegativas para HTLV (sem comorbidades), gentilmente cedidas pela Dra. Maria Carmen Arroyo Sanchez do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia; 30 com soropositividade para HIV e 14 amostras, com soropositividade para CMV, cedidas pelo banco de amostras do instituto de infectologia Emílio Ribas. Por fim, para a formação do grupo experimental, foram utilizadas 94 amostras soropositivas apenas para HTLV-1, visto que os peptídeos não demonstraram eficácia considerável em indivíduos positivos para HTLV-2, durante ensaios anteriores (Figura 10). Todas as amostras utilizadas durante os ensaios foram utilizadas em duplicatas.

Figura 10 - Distribuição das amostras utilizadas na pesquisa.



Legenda: A cor vermelha representa a distribuição das amostras positivas para HTLV (grupo experimental); a cor verde representa a distribuição das amostras controle (negativas para HTLV) e a cor amarela representa as amostras negativas para HTLV, no entanto positivas para coinfeções relacionadas.

Todas as amostras positivas utilizadas nesta pesquisa, foram triadas segundo os parâmetros do ministério da saúde. O teste sorológico de triagem para HTLV, foi realizado no laboratório clínico do IIER, no setor de imunologia, utilizando o teste Gold ELISA HTLV-1/2® (Teste imunoenzimático, REM). Em seguida, como teste confirmatório, foi utilizado Western Blot (WB, MP Diagnostics, HTLV Blot 2.4®), conforme as instruções dos respectivos fabricantes. Por fim, a reação da cadeia de polimerase qualitativa (Nested PCR) foi realizada e seu produto amplificado, utilizado para o estudo do polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (Restriction Fragment Length Polymorphism) (RFLP), caracterizando sua tipagem viral (HTLV-1 ou HTLV-2) (97).

3.6 ANÁLISE DE DADOS E ESTATÍSTICA

Durante a validação dos peptídeos, os dados convertidos foram analisados usando o software GraphPad Prism v.8 (San Diego, CA, EUA). O valor de *cut-off* calculado por meio da curva-ROC, foi utilizado para definir a absorbância máxima que uma amostra soronegativa pode apresentar, antes de ser considerada como positiva. Posteriormente os dados foram apresentados através de gráficos de dispersão, utilizando os valores de IR (razão entre a absorbância da amostra e linha de corte), com resultados $\geq 1,00$ considerados positivos. Intervalos de confiança (IC) foram calculados para avaliar a precisão desses parâmetros, com intervalo de confiança de 95%.

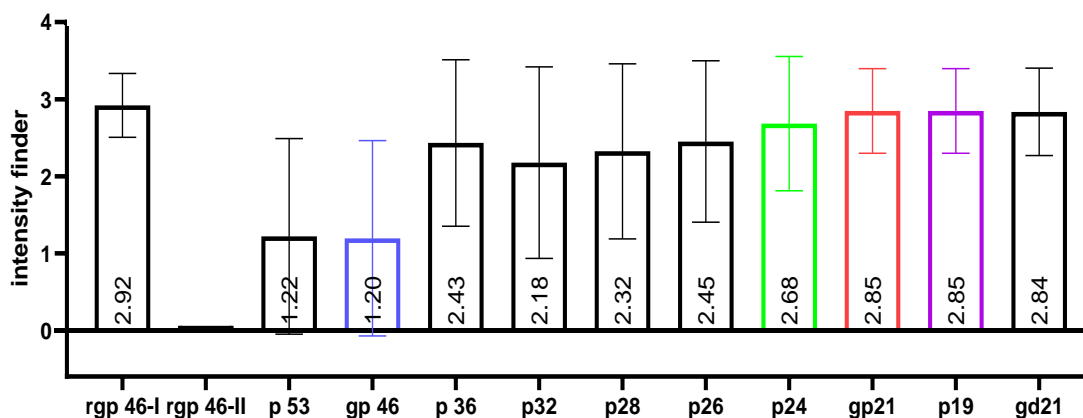
4. RESULTADOS

4.1 DIFERENCIAÇÃO DAS PROTEÍNAS DE DIAGNÓSTICO PARA HTLV-1/2.

A análise de reatividade média das proteínas fundamentais pela resposta imune celular primária, *gag* (p24 e p19) e *env* (gp21 e gp46) do HTLV-1/2, estabeleceram as proteínas de melhor desempenho para formação dos peptídeos, de acordo com seu tipo viral. Nesta análise, a reatividade média ideal das bandas apresentou valor próximo ou igual a três, enquanto que, a banda com menor reatividade apresentou valor mais próximo a zero.

Para formulação da análise de reatividade média destas proteínas, perante a indivíduos soro portadores de HTLV-1 (Figura 11), foram selecionados 164 testes que apresentaram imunorreatividade para as proteínas discriminatórias do HTLV-1 (reatividade para: p19, GD21 e rgp46-I; ou reatividade para p19, p24 e GD21 (com reatividade para p19 maior ou igual a p24)). Neste grupo, foi observado alta expressão média de reatividade para as proteínas: p19 (proteína matrix), p24 (proteína do nucleocapsídeo) e gp21 (glicoproteína de transmembrana), de aproximadamente 2,85 (dos ensaios testados, 92% apresentaram reatividade a este conjunto de proteínas). Entretanto, a gp46 (glicoproteína de superfície), apresentou valor médio de intensidade de 1.20, menor quando comparado a intensidade média da proteína p28 (proteína relacionada ao escape viral do HTLV-2).

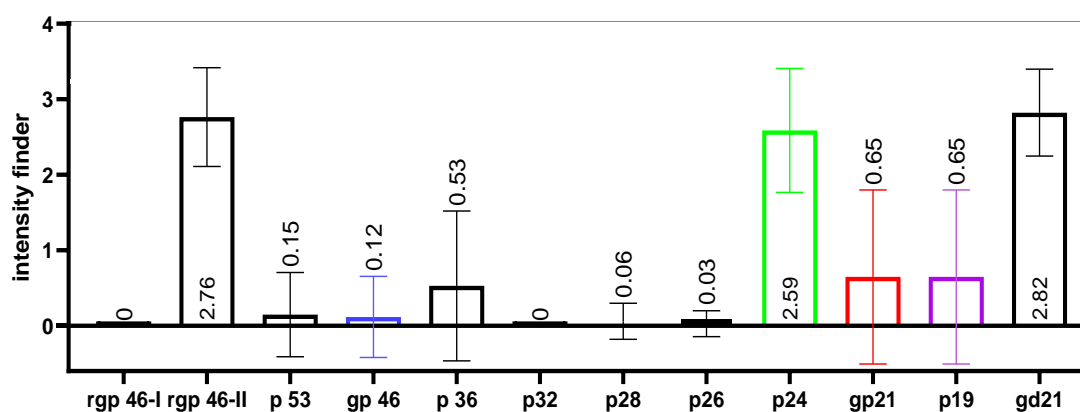
Figura 11 – Intensidade de reação das amostras soropositivas para HTLV-1.



Legenda: As cores: azul, verde, vermelha e roxa, compreendem as proteínas fundamentais utilizadas nos testes sorológicos para diagnóstico da infecção por HTLV; a cor preta, representa as demais proteínas utilizadas para diagnóstico durante o ensaio de WB.

Posteriormente para a análise de reatividade média destas proteínas, perante indivíduos soro portadores de HTLV-2 (Figura 12), foram utilizados 34 ensaios de WB, que apresentaram imunorreatividade para as proteínas discriminatórias do HTLV-2 (reatividade para: p24, GD21 e rgp46-II ou reatividade para p19, p24 e GD21 (com reatividade para p24 maior que p19)). Este grupo, demonstrou considerável queda de reatividade para as proteínas: p19, gp21 e gp46, apresentando respectivamente: 0.64, 0.64 e 0.11 de média. Enquanto que a proteína p24, apresentou melhor desempenho, mantendo seu índice médio próximo, quando comparado ao de indivíduos soro portadores de HTLV-1, de aproximadamente 2.59.

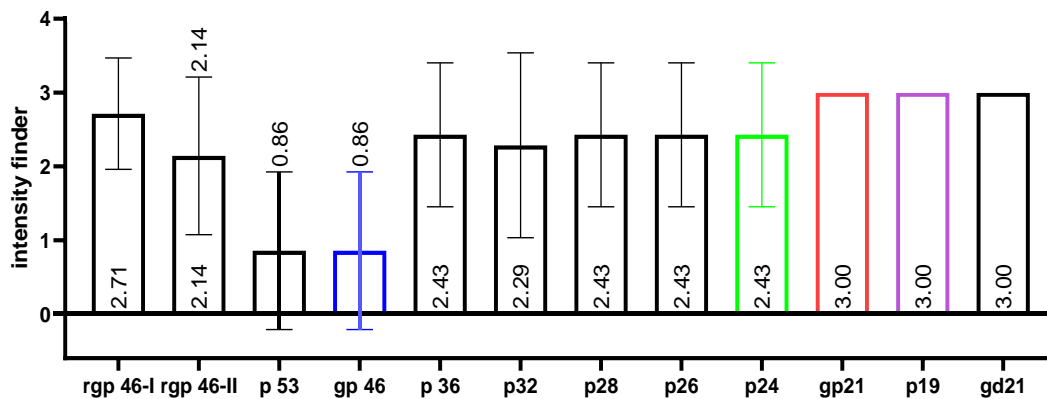
Figura 12 - Intensidade de reação das amostras soropositivas para HTLV-2.



Legenda: As cores: azul, verde, vermelha e roxa, compreendem as proteínas fundamentais utilizadas nos testes sorológicos para diagnóstico da infecção por HTLV; a cor preta, representa as demais proteínas utilizadas para diagnóstico durante o ensaio de WB.

Durante a análise destes dados, também foram identificados sete indivíduos apresentaram reatividade para as proteínas discriminatórias do HTLV-1 e -2 (reatividade para: Gd21, p19, p24, rgp46-II e rgp46-I) (Figura 13). Estes indivíduos demonstram grande semelhança nos índices médios de reatividade, quando comparados aos indivíduos soro portadores de HTLV-1. As proteínas p19 e gp21, apresentaram valores médios de 3.0, apresentando-se como altamente reagentes (3+), em todos os testes. Contudo, as proteínas p24 e gp46, desta vez apresentaram menor avidéz, com intensidade média de 2.43 e 0.86.

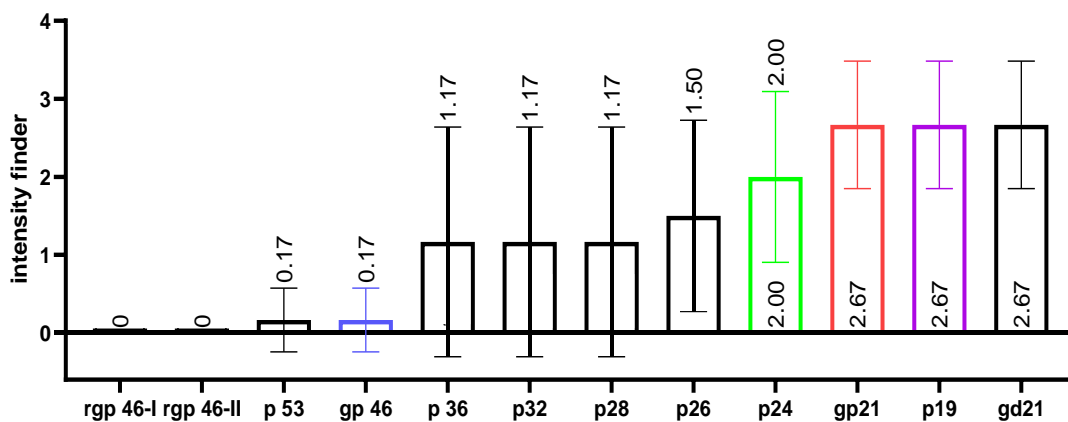
Figura 13 - Intensidade de reação das amostras soropositivas para HTLV-1 e 2.



Legenda: as cores: azul, verde, vermelha e roxa, compreendem as proteínas fundamentais utilizadas nos testes sorológicos para diagnóstico da infecção por HTLV; a cor preta, representa as demais proteínas utilizadas para diagnóstico durante o ensaio de WB.

Com o objetivo de elaborar de peptídeos que possam ser utilizados em um teste, que não possua discriminação do tipo viral, também foram levados em consideração, 6 ensaios positivos para HTLV, que segundo os critérios de interpretação e diagnóstico conforme descritos no protocolo da *MP Diagnostics* (HTLV Blot 2.4®), não apresentaram tipagem viral (Figura 14). Este grupo apresentou intensidade média mais relevante para as proteínas: p19, gp21, de aproximadamente 2.67. A p24, demonstrou média de 2.00, e a gp46 seguiu com valor mais baixo dentre as proteínas fundamentais, média de 0.17.

Figura 14 - Intensidade de reação das amostras soropositivas para HTLV.



Legenda: As cores: azul, verde, vermelha e roxa, compreendem as proteínas fundamentais utilizadas nos testes sorológicos para diagnóstico da infecção por HTLV; a cor preta, representa as demais proteínas utilizadas para diagnóstico durante o ensaio de WB.

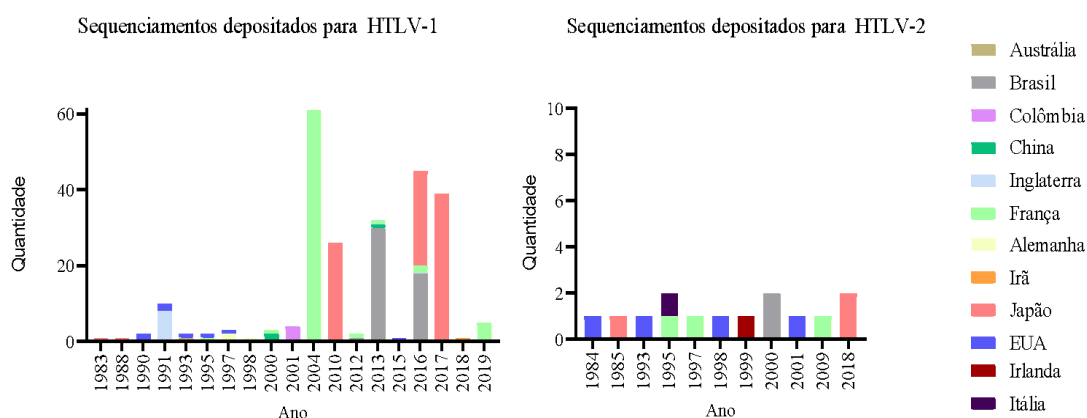
4.2 ALINHAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS PEPTÍDEOS LINEARES.

Devido a presença de inúmeros resultados inconclusivos ou falso positivos ocasionados pela falta de sensibilidade e especificidade das proteínas utilizadas para o diagnóstico do HTLV-2 (53), os peptídeos deste estudo foram caracterizados com base nas proteínas de maior imunorreatividade para o HTLV-1. Além disso, mesmo que a p24 tenha demonstrado um papel fundamental no diagnóstico em indivíduos positivos para HTLV-2, estudos apontam que quando utilizada de forma isolada, se torna um potencial indicador de falsa positividade (98). Portanto, para a formação de peptídeos com base nesta proteína, foram utilizadas apenas regiões específicas encontradas no tipo viral do HTLV-1.

4.2.1 Sequências peptídicas preservadas no gene *env* do HTLV-1/2

Inicialmente para a caracterização dos peptídeos, foram localizadas as regiões de identidade pertencentes às subunidades protéicas da *env* (gp21 e gp46). Embora a gp46 não tenha demonstrado alta afinidade para os anticorpos de soro portadores para HTLV-1 e -2, esta também foi definida, por ser complementar a gp21 e devido a sua recorrente utilização nos testes diagnósticos de triagem. Para esta análise, inicialmente foram selecionadas duas sequências de referências para o gene *env*, NP_057865.1 e NP_041006.1 (HTLV-1 e HTLV-2, respectivamente), previamente publicados e submetidos ao NCBI. Posteriormente, através da plataforma *BLAST* foram localizadas 254 sequências (240 referentes ao HTLV-1, e 14 referentes ao HTLV-2) (figura 15).

Figura 15 – Sequências utilizadas para alinhamento da *env-1* e *-2*.



Legenda: A imagem demonstra variabilidade genética encontrada nas sequências de *env-1* e *env-2* do HTLV, depositados pelo NCBI, além de representarem também, a sua variabilidade cronológica. Os parâmetros utilizados para obtenção deste resultado pelo *BLAST*, foram: Taxonomia: 11908 e 11909 (respectivamente HTLV-1 e -2); alvo máximo: 5000; identidade: de 100% a 69.64%; cobertura de consulta: de 100% a 11%; extensão: 488aa e exclusão de sequenciamentos com GAPS.

Após seleção dos sequenciamentos e pareamento dos genes referentes ao HTLV-1 e HTLV-2, utilizando a ferramenta *ClustalW* dentro do software MEGA-X. As proteínas codificadas a partir do gene *env* (gp21 e gp46), apresentaram alta conservação entre as cadeias de aminoácidos de suas sequências, demonstrando apenas seis mutações em aminoácidos isolados, tanto no HTLV-1, quanto no HTLV-2. O que demonstra identidade de aproximadamente 98%, entre as sequências definidas para cada tipo viral. (Figura 16).

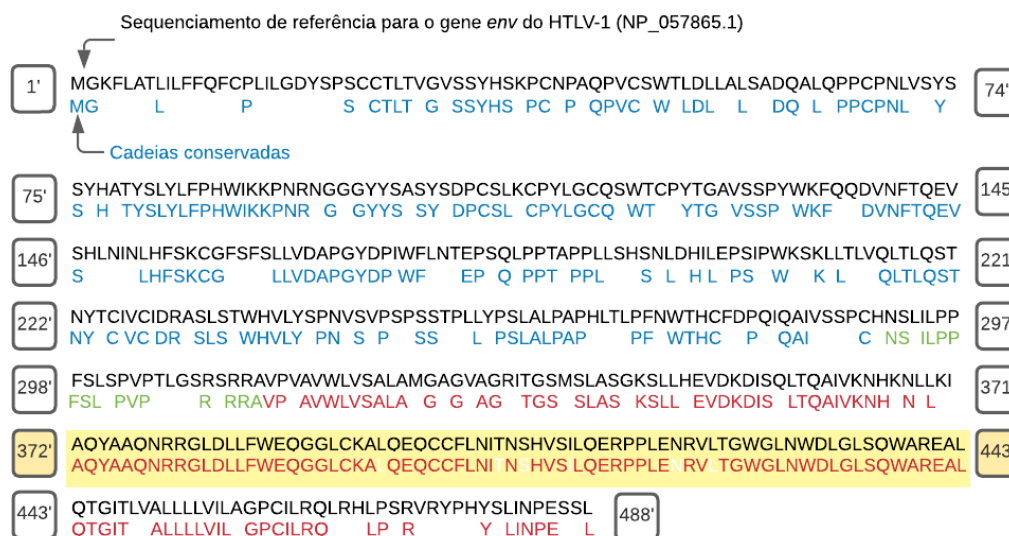
Figura 16 – Regiões conservadas do gene *env* no HTLV-1 e HTLV-2.



Legenda: A cor preta, representa as sequências de referência NP_057865.1 e NP_041006.1 (HTLV-1 e HTLV-2, respectivamente); a cor azul, representa as regiões da gp46, com 80% de similaridade entre suas respectivas sequências; a cor verde, representa a região de transição; por fim, a cor vermelha, representa as regiões da gp21, com 80% de similaridade entre os seus respectivos sequenciamentos.

Por fim, após as análises intragrupos, os resultados foram pareados com modelo de referência utilizado para o HTLV-1 (Figura 17). As sequências referentes ao gene *env* do HTLV-1 e HTLV-2, quando alinhados apresentaram aproximadamente 70% de identidade. Entretanto, pode ser observado um maior nível de identidade na região entre os dois tipos virais, situada entre os aminoácidos 372 e 443'.

Figura 17 – Regiões conservadas entre a *env*-1 e -2.



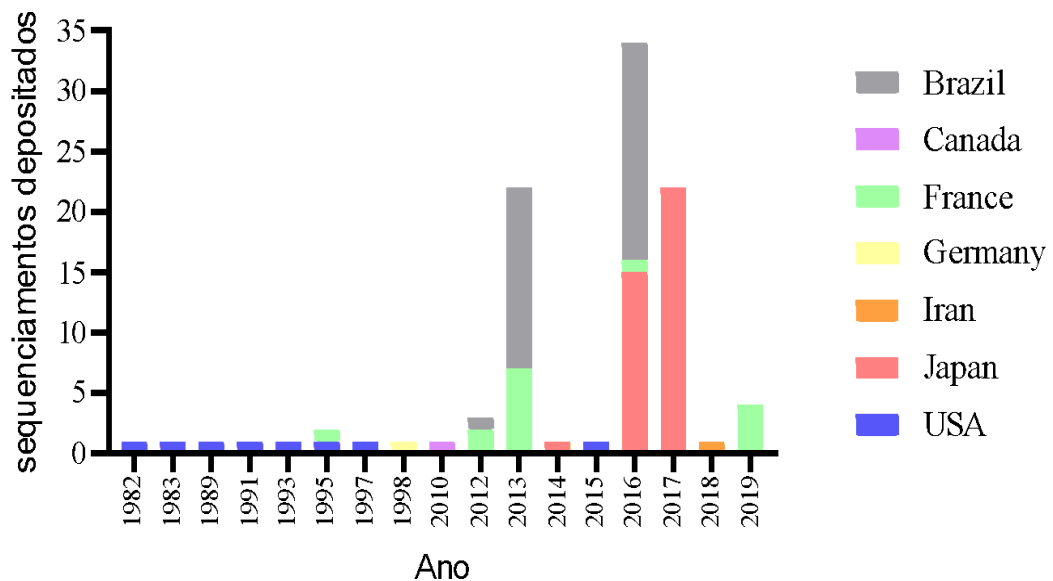
Legenda: A cor preta, representa a sequência de referência NP_057865.1 (do HTLV-1); a cor azul, representa as regiões da gp46, com 80% de similaridade entre suas respectivas sequências; a cor verde, representa a região de transição; a cor vermelha, representa as regiões da gp21, com 80% de similaridade entre os seus respectivos sequenciamentos; por fim, a cor amarela representa a região de maior identidade entre a gp21 do HTLV-1 e gp21 do HTLV-2.

4.2.2 Sequências peptídicas preservadas no gene *gag*

Após o alinhamento das regiões referentes ao *env*, utilizadas para localização de regiões de identidade. O gene *gag*, responsável pela codificação das proteínas estruturais (p19 e p24), também foi utilizado para elaboração de peptídeos que aumentem a sensibilidade do teste para o HTLV-1. Para esta análise, apenas uma sequência de referência foi selecionada, *NP_057862.1* (HTLV-1), previamente publicada e submetida ao *NCBI*.

Posteriormente foram localizados 98 sequências, traduzidos do gene *gag* do HTLV-1, sendo composto pela variabilidade genética encontrada nos países: Brasil, Canadá, França, Alemanha, Irã, Japão e USA. Além de representar todos os sequenciamentos completos da proteína *gag* do HTLV-1, depositados no NCBI entre o período de 1982 a 2019 (Figura 18).

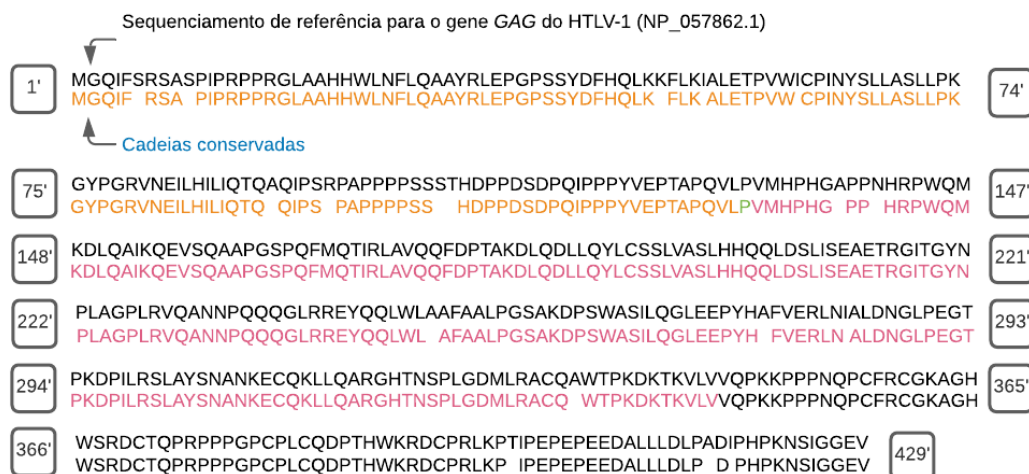
Figura 18 – Sequências utilizadas para alinhamento do *gag-1*.



Legenda: A imagem demonstra variabilidade genética encontrada nas sequências de *gag-1* do HTLV, depositados pelo NCBI, além de representar também, sua variabilidade cronológica. Os parâmetros utilizados para obtenção deste resultado pelo *BLAST*, foram: Taxonomia: 11908 (HTLV-1); alvo máximo: 5000; identidade: de 100% a 91.53%; cobertura de consulta: de 100% a 3%; extensão: 429aa e exclusão de sequenciamentos com GAPS.

Após seleção dos sequenciamentos e alinhamento dos genes referentes ao HTLV-1. As proteínas codificadas pelo gene *gag* (p19 e p24), apresentaram índice de conservação similar quando comparadas ao gene *env*, apresentando aproximadamente 97% de igualdade nas cadeias de aminoácidos, entre todas as sequências utilizadas para esta análise (Figura 19).

Figura 19 – Regiões conservadas do gene *gag* do HTLV-1.



Legenda: A cor preta, representa a sequência de referência NP_057862.1 (HTLV-1); a cor amarela, representa as regiões da p19, com 80% de similaridade entre suas respectivas sequências; a cor verde, representa a região de transição; por fim, a cor rosa, representa as regiões da p24 com 80% de similaridade entre os seus respectivos sequenciamentos.

4.2.3 Caracterização dos peptídeos lineares/contínuos

Após a etapa de alinhamento, as regiões de identidade encontradas nos genes *env-1*, *env-2* e *gag-1* do HTVL, foram caracterizadas segundo escore da ferramenta de predição de epítomos para células B (*ABCPRED*), com base em padrões de comprimento fixo. Posteriormente, as regiões que apresentaram o score de 0.94 à 0.82, foram submetidas à análise físico-química de epítomos contínuos de células B (do inglês *continuous B-cell epitopes*) através da plataforma *BcePred Prediction Server*, para melhor compreensão de sua estrutura físico-química. As sequências peptídicas que apresentaram melhor estrutura físico-química e maiores níveis de predição, se encontram na Tabela 1.

Tabela 1 – Caracterização de sequências peptídicas de HTLV-1 e/ou 2.

Peptídeos	Sequência	Gene	Proteína	Sítio inicial	
Sequências comuns para HTLV-1 e 2				HTLV-1	HTLV-2
P1-HTLV-1/2	RRGLDLLFWEQGGL	<i>env</i>	gp21	379	375
P2-HTLV-1/2	YAAQNRRLDGLLFW	<i>env</i>	gp21	374	370
Sequências comuns para HTLV-1				HTLV-1	HTLV-2
P3-HTLV-1	HSNLDHILEPSIPW	<i>env</i>	gp46	193	-
P4-HTLV-1	EPSIPWKSLLTLV	<i>env</i>	gp46	201	-
P5-HTLV-1	LPPTAPPLLSHNSL	<i>env</i>	gp46	183	-
P6-HTLV-1	IFRSASPIRPPR	<i>gag</i>	p19	4	-
P7-HTLV-1	AAyrLEPGSSYDF	<i>gag</i>	p19	30	-
P8-HTLV-1	RGHTNSPLGDMLRA	<i>gag</i>	p24	318	-
P9-HTLV-1	GTPKDPIRLSLAYS	<i>gag</i>	p24	292	-
P10-HTLV-1	DKTKVLVVQPKKP	<i>gag</i>	p24	339	-
P11-HTLV-1	HPHGAPPNHRPWQM	<i>gag</i>	p24	134	-
Sequências comuns para HTLV-2				HTLV-1	HTLV-2
P12-HTLV-2	LTQAIVKNHQNILR	<i>env</i>	gp21	-	353
P13-HTLV-2	AAGTGIAGGVTGSL	<i>env</i>	gp21	-	321

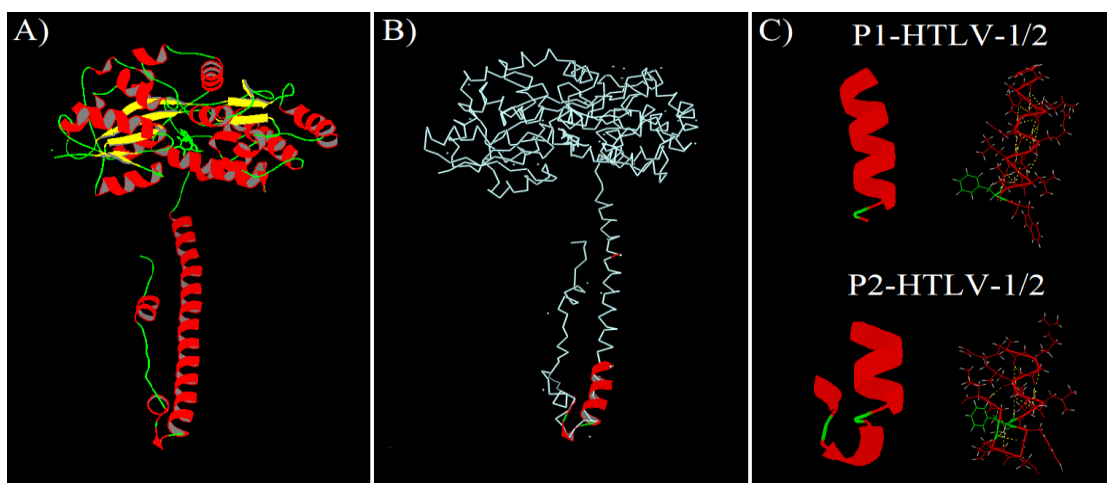
Legenda: A tabela organizada em ordem crescente de predição caracterizada (*ABCPRED*), indica os possíveis peptídeos e seus respectivos sítios iniciais.

4.2.4 Predição das estruturas secundárias

Há alguns estudos que tentam relacionar a conformação secundária das proteínas do HTLV, a seu reconhecimento imunológico e expressão fisiopatológica (99,100). Além disso, a estrutura secundária possui um papel fundamental durante a validação de peptídeos sintéticos ou recombinantes, pois caracterizam alguns aspectos que podem influir negativamente ou positivamente sobre sua imunorreatividade. Logo, para a caracterização dos peptídeos aqui propostos, utilizamos o modelo descrito por Pauling e Corey em 1951, que definiu corretamente as estruturas secundárias em 3 (três) padrões geométricos regulares e repetitivos: hélice α , folha β e regiões de alça ou voltas.

Para a definição das estruturas secundárias dos peptídeos desenvolvidos com base nos polímeros da gp21 do HTLV-1, utilizamos o modelo de proteína quimérica descrito por *Kobe et al.*, 2018, através do mapa de densidade eletrônica (100). A gp21 discutida por este estudo, consiste em uma região de *coiled coil* (hélice α) trimérica N-terminal adjacente (comum a outros retrovírus), uma alça curta ligada por dissulfeto, responsável por estabilizar a reversão de cadeia e uma sequência C-terminal empacotada contra a hélice de forma antiparalela estendida, contendo elementos α -helicoidais (Figura 20A). Os peptídeos preditos a partir desta região (P1/2-HTLV-1), apresentaram formação de polímeros estabilizados por pontes de hidrogênio, resultando em padrões cilíndricos e rígidos, responsáveis por manter suas regiões hidrofóbicas protegidas em sua parte interna (Figura 20 B/C).

Figura 20 - Estrutura secundária dos peptídeos da gp21 do HTLV-1.

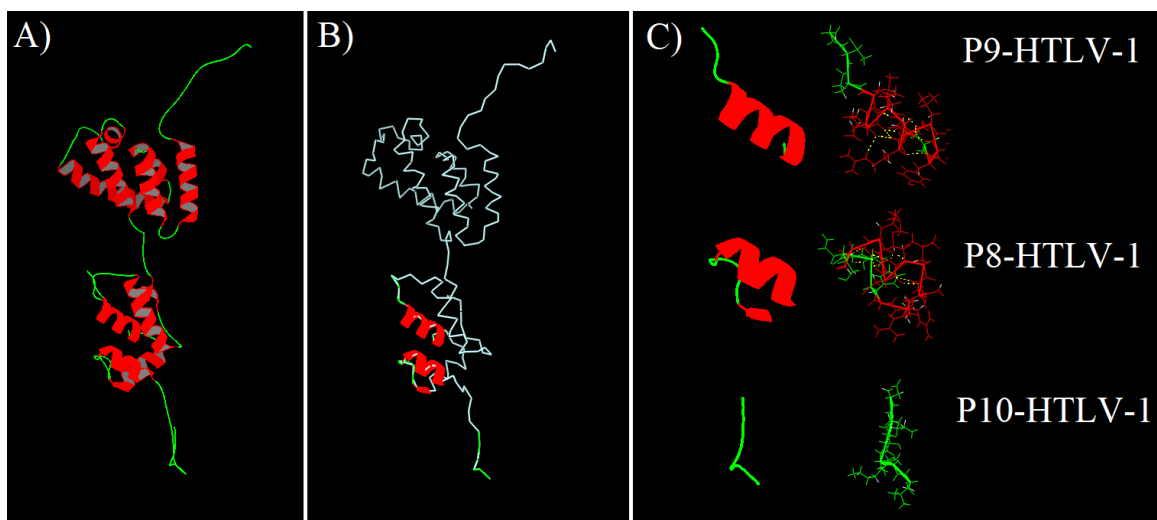


Legenda: Figura 20A: Representa o modelo proposto por *Kobe et al.*, 2018, sem modificações. Figura 20B: Representa a localização das regiões peptídicas pré-estabelecidas para gp21. Figura 20C: Representa os padrões geométricos regulares destas regiões. A cor: Vermelha indica as regiões de hélice α ; verde, regiões de alça/volta; amarela, folhas β /lâminas beta pregueadas.

Para a gp21 do HTLV-2, nenhum modelo estrutural pré-estabelecido foi localizado. Para definir a estrutura secundária desta proteína utilizamos o software Unipro UGENE, onde a região P12-HTLV-1 foi predita com padrões geométricos regulares de hélice α , semelhante às regiões da gp21 do HTLV-1. Contudo a região, P13-HTLV-2 apresentou formação polimérica normalmente não hidrofóbica, achatada e rígida, denominada de Folha β ou Lâmina beta pregueadas.

Para definir a estrutura secundária dos peptídeos preditos a partir das regiões da p24, utilizamos o modelo proposto por *Khorasanizadeh et al.*, 1999 (101). Este modelo, fundamentado nos métodos de índices de deslocamento químico apresentados por *Wishart e Sykes.*, 1994 (102), demonstrou que cerca de 61% da estrutura é constituída por regiões de hélice α interpoladas por regiões de alça ou voltas (Figura 21A). Os peptídeos (P8 e P9-HTLV-1) desenvolvidos com base nesta região, também apresentaram formação não hidrofóbica (hélice α). Entretanto, o peptídeo P10-HTLV-1, além das ligações de hidrogênio, apresentou a presença do carbono α , resultando em uma estrutura mais instável e desordenada, no formato de alça ou voltas (Figura 21 B/C). A região referente ao peptídeo P11-HTLV-1 não foi localizada neste modelo, contudo com a utilização da plataforma Unipro UGENE, esta foi predita e representada por uma conformação de Folhas β .

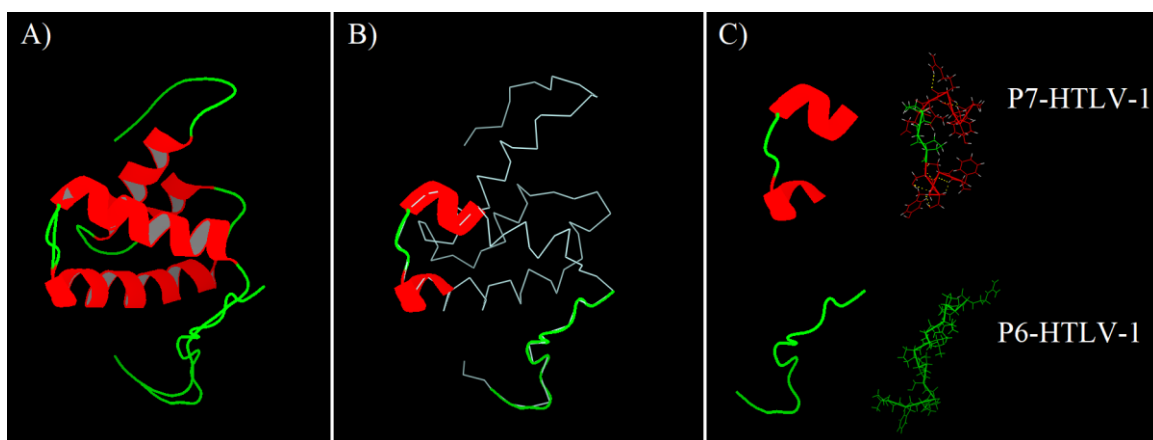
Figura 21- Estrutura secundária dos peptídeos p24 do HTLV-1.



Legenda: Figura 21A: Representa o modelo proposto por *Khorasanizadeh et al.*, 1999, sem modificações. Figura 21B: Representa a localização das regiões peptídicas pré-estabelecidas para p24. Figura 21C: Representa os padrões geométricos regulares destas regiões. A cor: Vermelha indica as regiões de hélice α ; verde, regiões de alça/volta; amarela, folhas β /lâminas beta pregueadas.

Por fim, para verificar a estrutura secundária dos peptídeos preditos a partir das regiões da p19, utilizamos o modelo proposto por *Herrmann, D. et al.*, em 2021 (103). Este modelo, realizado por análise manual de espectros, caracterizou a presença de quatro hélices α , dentre os resíduos 21 a 93, alternados por regiões de alça (Figura 22A). O peptídeo P7-HTLV-1, apresentou padrões geométricos regulares e repetitivos de hélices α em seus terminais, ligados por uma região de alça. Enquanto o peptídeo P6-HTLV-1, apresentou constituição de alça (Figura 22 B/C).

Figura 22- Estrutura secundária dos peptídeos da p19 do HTLV-1.



Legenda: Figura 22A: Representa o modelo proposto por *Herrmann, D. et al.*, 2021 sem modificações. Figura 22B: Representa a localização das regiões peptídicas pré-estabelecidas para p19. Figura 22C: Representa os padrões geométricos regulares destas regiões. A cor: Vermelha indica as regiões de hélice α ; verde, regiões de alça/volta; amarela, folhas β /lâminas beta pregueadas.

Devido à falta de um modelo desenvolvido para a elucidação dos mecanismos presentes na proteína gp46, para a análise das estruturas secundárias desta proteína, utilizamos o software Unipro UGENE. Segundo a plataforma, as regiões referentes aos peptídeos P3/5-HTLV-1, apresentaram uma conformação achatada e rígida de Folhas β ou Lâminas beta pregueadas. Enquanto o peptídeo P4-HTLV-1, apresentou uma conformação de Hélice α .

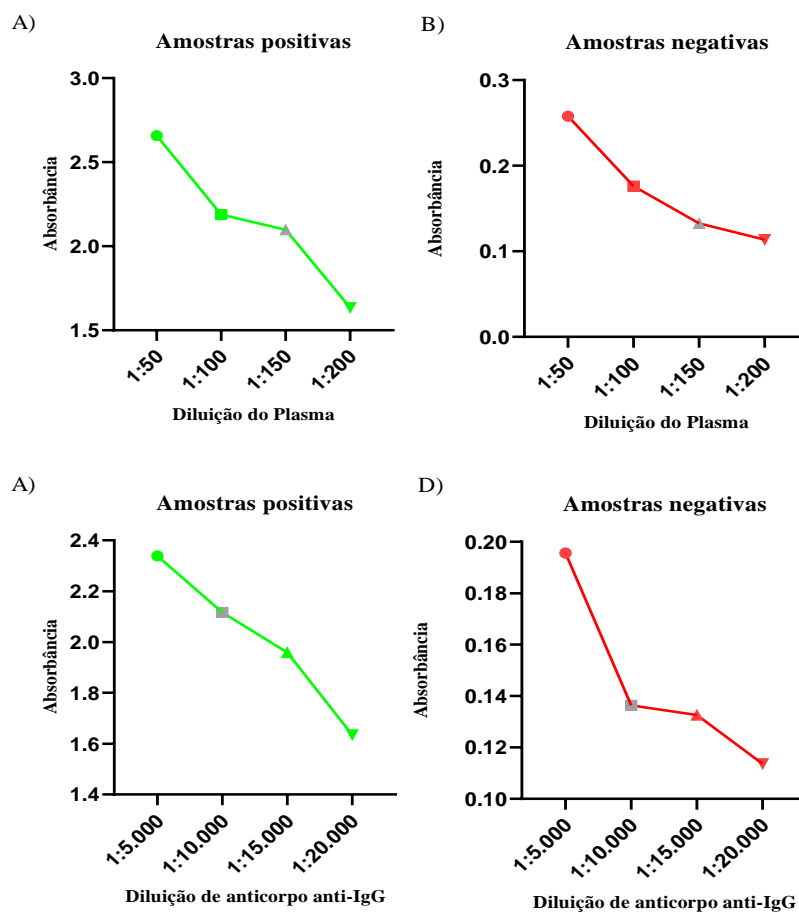
4.3 PADRONIZAÇÃO ELISA.

4.3.1 Adequação do protocolo para os peptídeos

Para a etapa de adequação dos ensaios imunológicos de ELISA, inicialmente foram testados parâmetros, como: temperatura e tempo de incubação, quantidade de antígeno e condições de lavagem (dados não mostrados). Posteriormente foram testados: diluições de plasma, de anticorpos secundários e a necessidade de albumina para estas diluições.

Através da análise de absorbância obtidas nos ensaios sorológicos (figura 19), foi possível estabelecer a diluição dos plasmas e anticorpo secundário (anti-IgG humano). A melhor condição estabelecida foi na proporção de 1:150 para o plasma, e 1:10.000 para o anticorpo conjugado (Figura 23).

Figura 23 – Análise gráfica de absorbância durante a etapa de adequação.



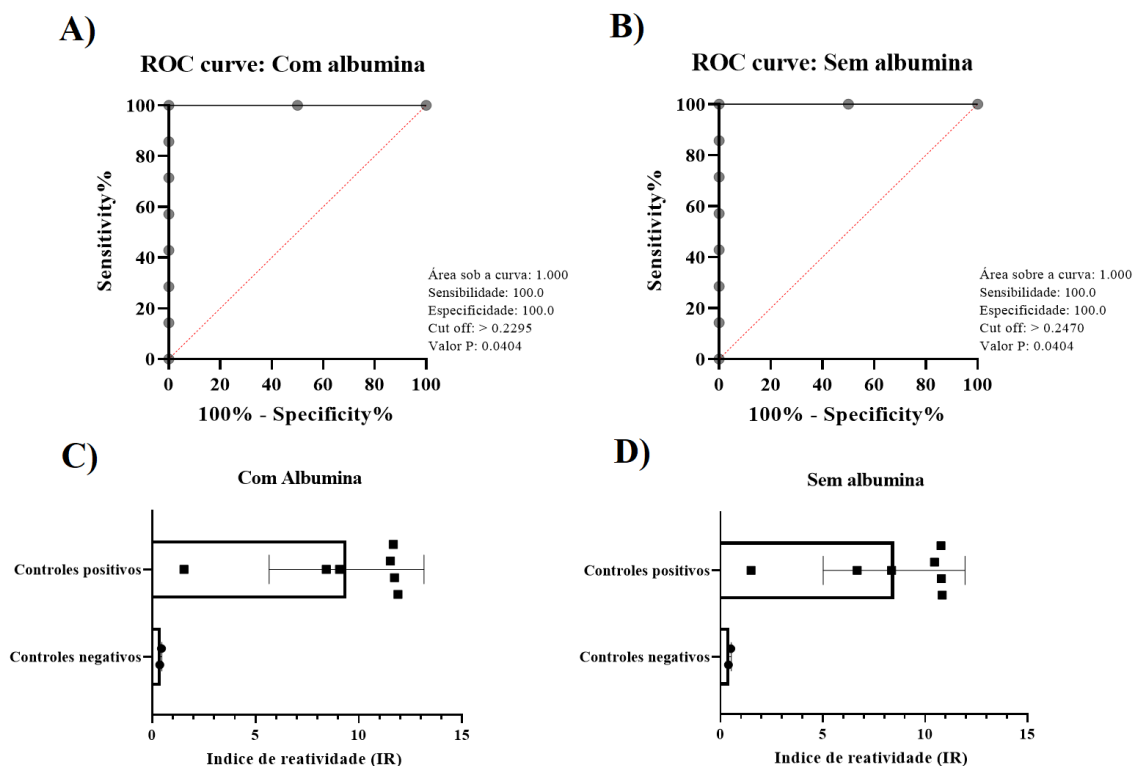
Legenda: Figura 23A: Amostras de plasma positivas para HTLV diluídas de 1:50 à 1:200. Figura 23B: Amostras de plasma negativas para HTLV diluídas de 1:50 à 1:200. Figura 23C: Anticorpo anti-IgG humano diluído em 1:5.000 à 1:20.000, em amostras positivas para HTLV. Figura 23D: Anticorpo anti-IgG humano diluído em 1:5.000 à 1:20.000, em amostras negativas para HTLV. A Cor Cinza representa a diluição definida.

4.3.2 Relevância da Albumina Bovina

Para verificar a relevância da albumina bovina nas diluições de plasma e conjugado, uma análise comparativa foi realizada, entre o IR da reação seguindo o protocolo (com albumina) e outro, com uma variação no protocolo (sem albumina). Para isso, foram selecionadas sete amostras, do grupo I e duas do grupo IV, que não possuíam coinfeção com outros agentes virais (HIV, HBV e HCV). As reações foram realizadas no mesmo período de tempo, sobre as mesmas circunstâncias, e pelo mesmo operador.

As reações com albumina bovina, embora que, de forma sutil, apresentaram uma ligação levemente mais específica abaixando o índice do Cut-off, quando comparadas as reações sem albumina bovina. Sugerindo, que a utilização deste componente, pode interferir positivamente, ainda que em menor escala, sobre a acurácia final do teste (Figura 24).

Figura 24 – Comparativo entre o protocolo de ELISA/indireto, com e sem albumina bovina.



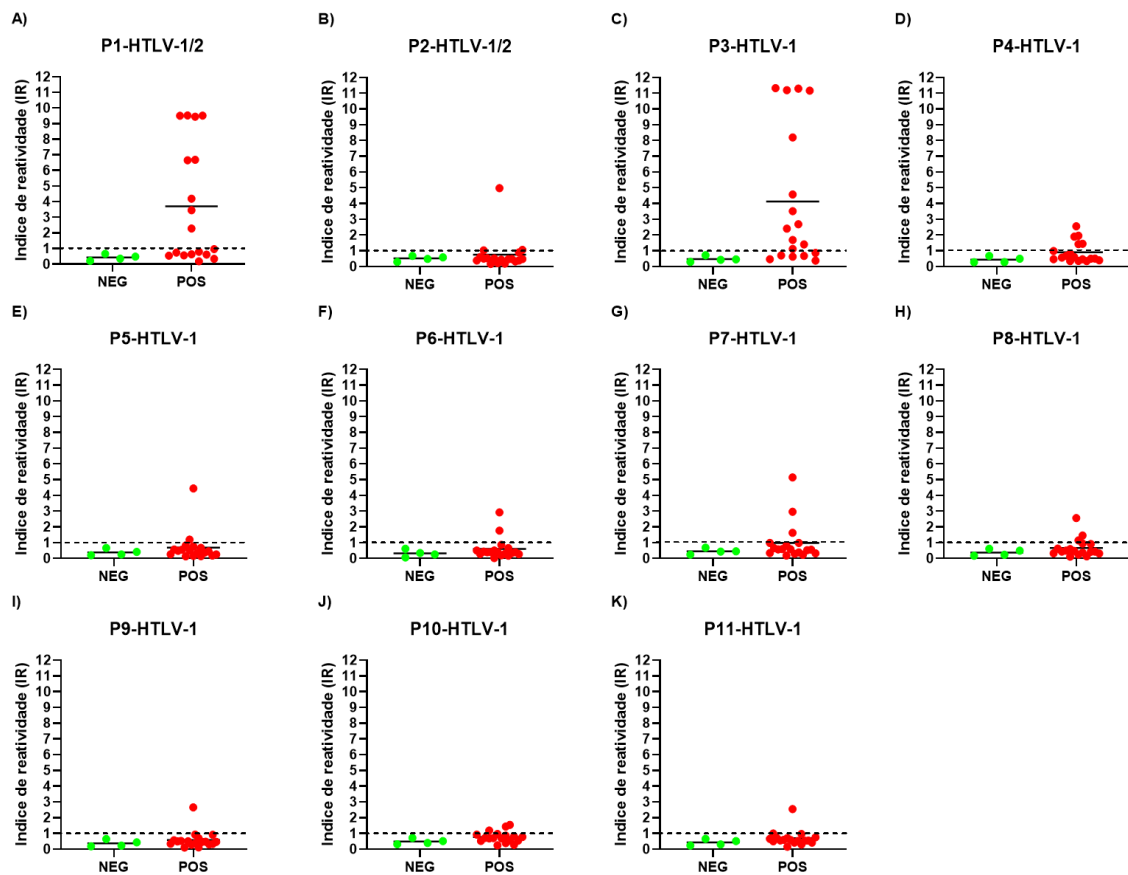
Legenda: A figura 24A e C, representam a Curva-Roc e o gráfico de dispersão para o protocolo com albumina em suas diluições de plasma e anticorpo. A figura 24B e D, representam o protocolo sem a adição de albumina em suas diluições.

4.4 TESTAGEM POR ELISA DOS PEPTÍDEOS DE HTLV-1 E 2

4.4.1 Triagem dos peptídeos de HTLV-1 e 2

Devido à quantidade de regiões preditas e seu alto custo para síntese, inicialmente os peptídeos preditos foram sintetizados com a colaboração com a Prof.^a Dra. Maria Aparecida Juliano do Laboratório Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e submetidos a uma triagem inicial, realizada com o objetivo de identificar os peptídeos de maior reatividade (Figura 25/Tabela 2). Nesta etapa, a análise de reatividade dos peptídeos foi realizada com quatro amostras de indivíduos controle, frente a 18 amostras de indivíduos soro portadores de HTLV-1.

Figura 25 - Análise de reatividade dos peptídeos de HTLV-1.



Legenda: Figura 25A: Gráfico de dispersão do peptídeo P1-HTLV-1/2 (gp21). Figura 25B: Gráfico de dispersão do peptídeo P2-HTLV-1/2 (gp21). Figura 25C: Gráfico de dispersão do peptídeo P3-HTLV-1 (Gp46). Figura 25D: Gráfico de dispersão do peptídeo P4-HTLV-1 (gp46). Figura 25E: Gráfico de dispersão do peptídeo P5-HTLV-1 (gp46). Figura 25F: Gráfico de dispersão do peptídeo P6-HTLV-1 (p19). Figura 25G: Gráfico de dispersão do peptídeo P7-HTLV-1 (p19). Figura 25H: Gráfico de dispersão do peptídeo P8-HTLV-1 (p24). Figura 25I: Gráfico de dispersão do peptídeo P9-HTLV-1 (p24). Figura 25J: Gráfico de dispersão do peptídeo P10-HTLV-1 (p24). Figura 25K: Gráfico de dispersão do peptídeo P11-HTLV-1 (p24). As amostras do grupo controle estão indicadas pela cor verde (NEG), enquanto que as amostras do grupo experimental estão indicadas pela cor vermelha (POS).

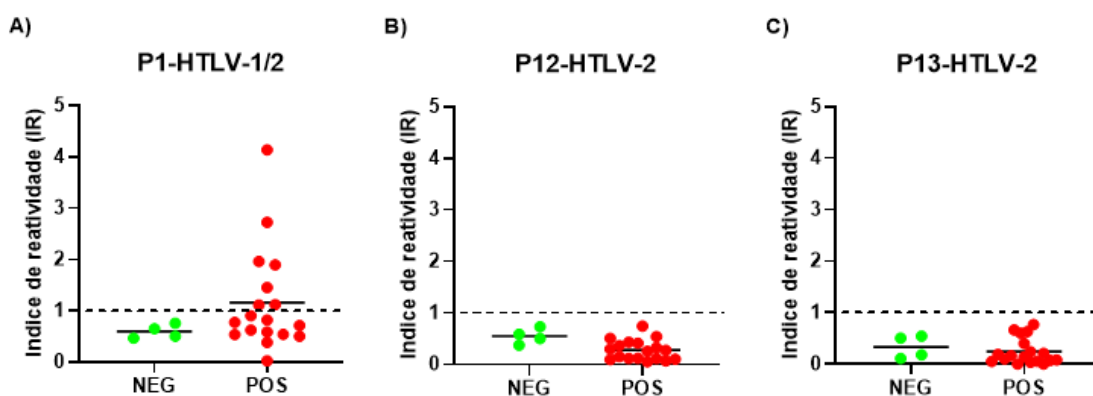
Durante esta triagem, apenas os peptídeos P1-HTLV-1/2 e P3-HTLV-1, apresentaram índices significativos de eficácia, respectivamente 50 e 66% de sensibilidade e 100% de especificidade. Os demais peptídeos não apresentaram valores consideráveis, portanto não seguiram para a etapa de validação (Tabela 2).

Tabela 2 – Tabela resumo apresentando os valores da Figura 25.

Peptídeos	Proteína	Região (HTLV-1)	Sensibilidade e	Especificidade	Média de IR das amostras	
					Positivas	Negativas
P1-HTLV-1/2	gp21-1	379'-392'	50,0%	100%	3,703	0,430
P2-HTLV-1/2	gp21-1	374'-387'	16,6%	100%	0,756	0,511
P3-HTLV-1	gp46-1	193'-206'	66,6%	100%	4,126	0,470
P4-HTLV-1	gp46-1	201'-214'	27,7%	100%	0,904	0,432
P5-HTLV-1	gp46-1	183'-196'	11,1%	100%	0,686	0,383
P6-HTLV-1	p19-1	4'-17'	11,1%	100%	0,602	0,321
P7-HTLV-1	p19-1	30'-43'	16,6%	100%	0,987	0,456
P8-HTLV-1	p24-1	318'-331'	16,6%	100%	0,667	0,378
P9-HTLV-1	p24-1	292'-305'	5,5%	100%	0,585	0,371
P10-HTLV-1	p24-1	339'-351'	16,6%	100%	0,768	0,485
P11-HTLV-1	p24-1	134'-117'	5,5%	100%	0,692	0,427

Em seguida, realizamos a triagem para os peptídeos constituídos a partir das regiões do HTLV-2, sob as mesmas condições e parâmetros. Contudo, esta análise foi realizada entre as amostras controle e amostras de indivíduos soropositivos de HTLV-2. Nenhum destes peptídeos pré-validados apresentaram valores consideráveis de eficácia, portanto não seguiram para etapa de validação (Figura 26/ Tabela 3).

Figura 26 - Análise de reatividade dos peptídeos de HTLV-2.



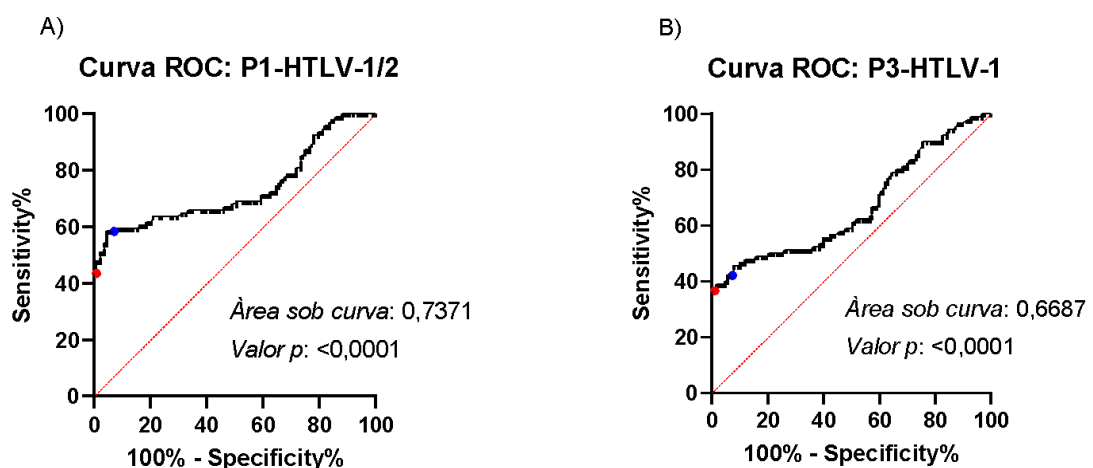
Legenda: Figura 26A: Gráfico de dispersão do peptídeo P1-HTLV-1/2 (gp21). Figura 26B: Gráfico de dispersão do peptídeo P12-HTLV-2 (gp21). Figura 26C: Gráfico de dispersão do peptídeo P13-HTLV-2 (gp21). As amostras do grupo controle estão indicadas pela cor verde (NEG), enquanto que as amostras do grupo experimental estão indicadas pela cor vermelha (POS).

Tabela 3 – Tabela resumo apresentando os valores da Figura 26.

Peptídeos	Proteína	Região	Sensibilidade	Especificidade	Média de IR das amostras	
					Positivas	Negativas
P1-HTLV-1/2	gp21	375'-388'	38,8%.	100%	1.158	0,430
P12-HTLV-2	gp21	353'-366'	0%	100%	0.275	0.547
P13-HTLV-2	gp21	321'-334'	0%	100%	0.335	0.245

4.4.2 Validação dos peptídeos por ELISA indireto.

Após triagem inicial, um novo Cut-off foi calculado para os peptídeos de maior imunorreatividade, constituídos a partir de regiões localizadas na gp21 e gp46. Este novo Cut-off foi calculado com base em dois possíveis pontos: o primeiro visando a utilização dos peptídeos em conjunto, cuja a especificidade foi de 100% (ponto A) e outro onde avaliamos sua utilização com um decréscimo da especificidade (que alcançou aproximadamente 93%), para verificar o aumento de sua sensibilidade (ponto B). Para realização desta etapa foram utilizadas 94 amostras positivas para HTLV-1 e 128 amostras controle, distribuídas em: 85 amostras testadas negativas para HTLV, 30 amostras negativas para HTLV, no entanto com resultados positivos para HIV e 14 também negativas para HTLV, com resultados positivos para CMV (Figura 27/ Tabela 4).

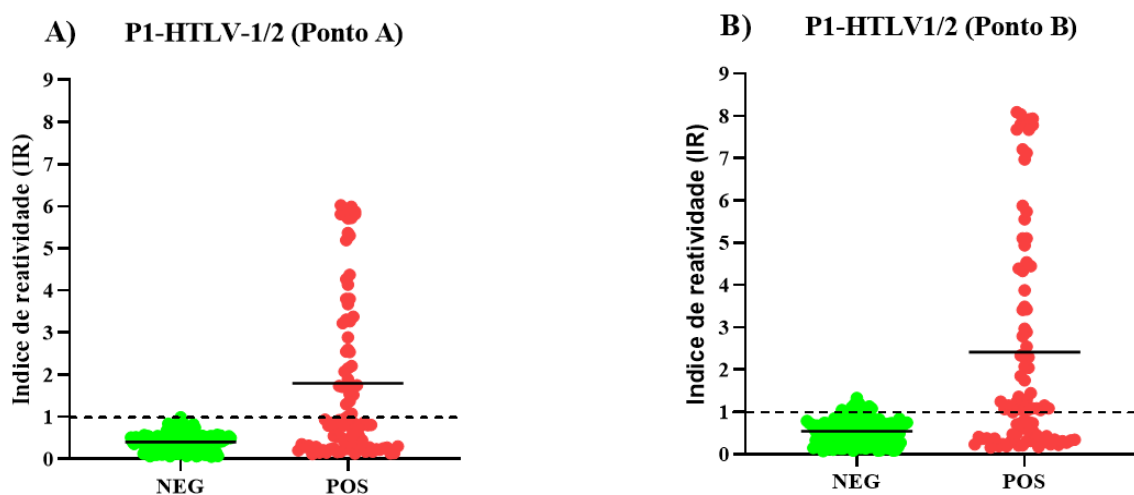
Figura 27 – Curva-ROC realizada com diferentes pontos de corte.

Legenda; Figura 27A: Representa os pontos de corte para o peptídeo P1-HTLV-1/2. Figura 27B: Representa os pontos de corte para o peptídeo P3-HTLV-1. Ponto A, cuja especificidade foi de 100%, está representado pela cor vermelha e ponto B, cuja especificidade foi de aproximadamente 93%, indicado pela cor azul.

Tabela 4 –Resumo dos valores da curva ROC da Figura 27.

Peptídeos	Cut-off	Valor	Sensibilidade (IC 95%)	Especificidade (IC 95%)	Valor de p
P1-HTLV-1/2	ponto A	> 0.4895	43,62% (34,04% to 53,70%)	100,0% (97,09% to 100,0%)	<0,0001
	ponto B	> 0.3645	58,51% (48,41% to 67,94%)	93,75% (88,15% to 96,80%)	<0,0001
P3-HTLV-1	ponto A	> 0.4835	36,67% (27,45% to 46,98%)	100,0% (97,06% to 100,0%)	<0,0001
	ponto B	> 0.3645	42,22% (32,54% to 52,54%)	93,75% (88,15% to 96,80%)	<0,0001

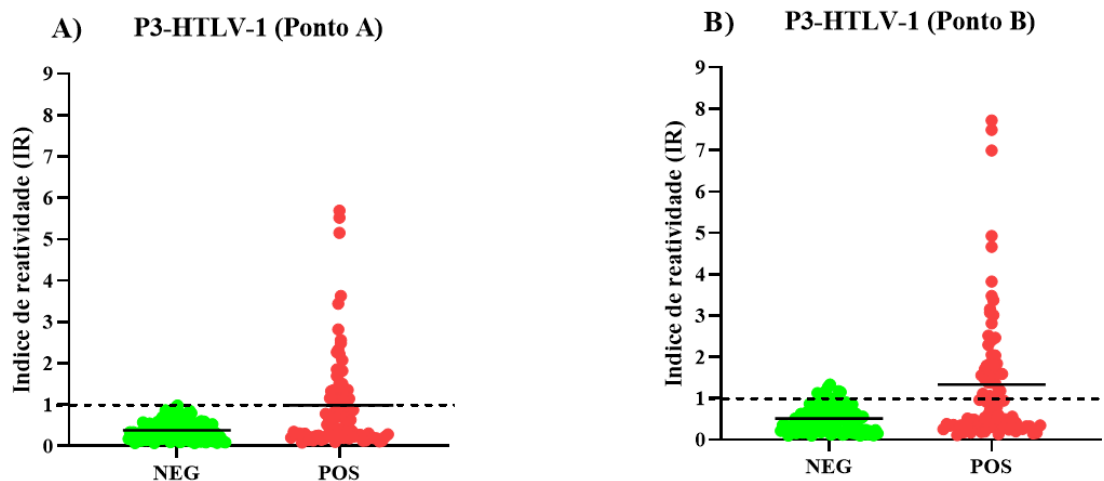
No ponto A, o peptídeo P1-HTLV-1/2, identificou corretamente 41 amostras positivas (índice de reatividade ≥ 1) alcançando a sensibilidade de 43,62%. Dentre os soros negativos, nenhum foi identificado como falso-positivo, obtendo a especificidade de 100%. Contudo, abaixando um pouco a especificidade para cerca de 94%, este peptídeo identificou 55 amostras positivas, aumentando sua sensibilidade para 58,51%. O gráfico de índice de reatividade da Figura 28 – A/B demonstra que a média de reatividade no ponto A para amostras positivas foi de 1,894 enquanto a média dos plasmas negativos foi de 0,441 e para o ponto B foi de respectivamente, 2,543 e 0,642.

Figura 28 - Análise de reatividade do peptídeo P1-HTLV-1/2.

Legenda; Figura 28A: Representa o gráfico de dispersão para o peptídeo P1-HTLV-1/2, com cálculo de IR a partir do ponto de corte A (100% de especificidade). Figura 28B: Representa o gráfico de dispersão para o peptídeo P1-HTLV-1/2, com cálculo de IR a partir do ponto de corte B (94% de especificidade). As amostras do grupo controle estão indicadas pela cor verde (NEG), enquanto que as amostras do grupo experimental estão indicadas pela cor vermelha (POS).

Já o peptídeo P3-HTLV-1, foi testado em 90 amostras positivas e 127 amostras controle: constituído por 84 amostras negativas para HTLV-1 e /ou 2, 30 com reatividade negativa para HTLV, no entanto positivas para HIV e 14 positivas para CMV. Este peptídeo no ponto A, identificou 33 amostras positivas, obtendo 36,67% de sensibilidade. Neste ponto de corte nenhuma amostra negativa obteve resultado falso-positivo, demonstrando 100% de especificidade. Contudo, de maneira similar ao peptídeo P1-HTLV-1/2, mas com menor eficácia, quando sua especificidade foi diminuída para cerca de 94%, este peptídeo identificou corretamente 38 amostras positivas, adquirindo a sensibilidade de 42,22%. O gráfico de índice de reatividade da Figura 29 - A/B demonstra que a média de reatividade no ponto A para amostras positivas foi de 1,018 enquanto a média dos plasmas negativos foi de 0,319 e para o ponto B foi de respectivamente, 1,380 e 0,387.

Figura 29 - Análise de reatividade dos peptídeos P3-HTLV-1.

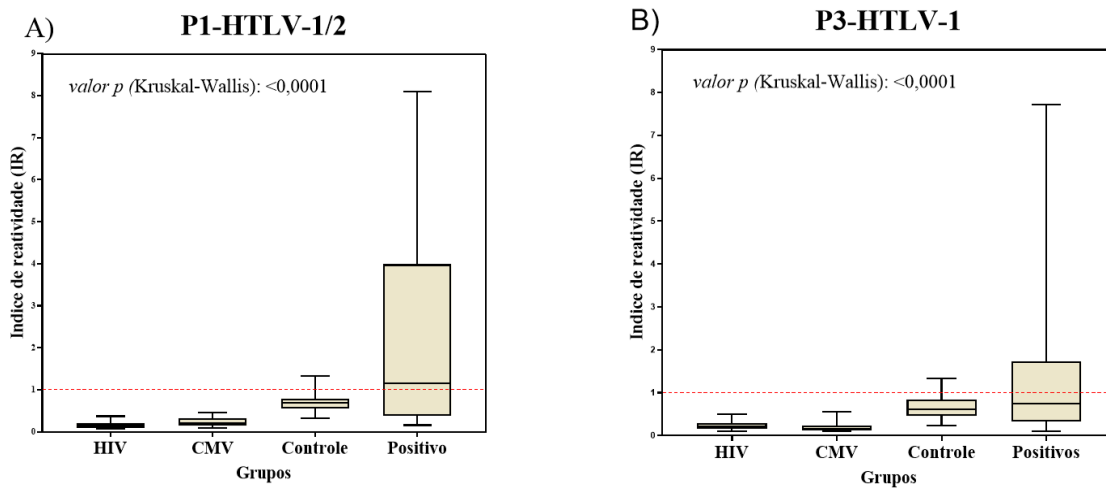


Legenda: Figura 29A: Representa o gráfico de dispersão para o peptídeo P3-HTLV-1, com cálculo de IR a partir do ponto de corte A (100% de especificidade). Figura 29B: Representa o gráfico de dispersão para o peptídeo P3-HTLV-1, com cálculo de IR a partir do ponto de corte B (94% de especificidade). As amostras do grupo controle estão indicadas pela cor verde (NEG), enquanto que as amostras do grupo experimental estão indicadas pela cor vermelha (POS).

4.4.4 Avaliação de reatividade cruzada com soros de HIV

A fim de avaliar a taxa de reatividade cruzada com os plasmas positivos para HIV e CMV, os grupos foram separados e a média de índice de reatividade para cada grupo proposto, comparando com as amostras positivas para HTLV-1. Nenhum dos peptídeos demonstrou qualquer reação cruzada para os grupos HIV e CMV. Entretanto foi notado um aumento na imunorreatividade média para as amostras controle. Para verificar melhor o índice de reatividade cruzada, as médias foram calculadas com valor de IR referente ao ponto B, utilizando o método estatístico de *Kruskal-Wallis* (Figura 30).

Figura 30 - Avaliação de absorvância das amostras durante a etapa de validação



Legenda: Figura 30A: Representa a reatividade média das amostras para o P1-HTLV-1/2, a partir do ponto B. Figura 30B: Representa a reatividade média das amostras para o P3-HTLV-1, a partir do ponto B.

5. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de testes para diagnóstico, que levam a uma identificação precoce de uma doença em pacientes ou doadores de sangue, desempenha um papel fundamental na saúde pública, ajudando a criar estratégias para combater doenças infecciosas (104). No entanto, nos 30 anos desde o desenvolvimento do imunoenensaio enzimático em linha (INNO-LIA) para a infecção ocasionada pelo HTLV, nenhum progresso significativo foi realizado para a validação de testes de fácil execução, baixo custo de desenvolvimento e reprodução (104,105). Além disso, a não disponibilidade de testes “Point of Care”, que possibilitem o auto-diagnóstico ou a triagem em larga escala, tornou-se o principal obstáculo para a identificação precoce da doença, uma melhor assistência pelos setores de saúde e subsequentemente melhor qualidade de vida dos indivíduos infectados e residentes em locais de difícil acesso.

Nesta pesquisa, procuramos identificar peptídeos que possam ser utilizados para o desenvolvimento de novas metodologias descentralizadas, fáceis de desenvolvimento ou reprodução e de baixo custo. Para isso, avaliamos a eficácia de peptídeos lineares sintéticos, que foram desenvolvidos a partir regiões de identidade das estruturas virais, com base em suas respectivas interações sobre a resposta imune celular primária dos indivíduos infectados HTLV-1 e HTLV-2. A região central e C-Terminal da *env* (gp46), apresenta domínios funcionais que estão diretamente associados à inibição da formação do sincício, transmissão célula-célula e à produção de anticorpos. Além disso, por ser uma proteína exposta na superfície das partículas virais e células infecciosas é facilmente acessível ao sistema imunológico (99). Proteínas recombinantes desenvolvidas a partir desta região, se demonstram efetivas na indução da resposta imune, conseguindo alcançar valores de 98 à 100% de sensibilidade e especificidade em indivíduos HTLV-1 (106). Contudo, durante a análise média de reatividade realizada em nosso estudo, esta proteína quando utilizada de forma isolada no Western Blot, apresentou baixa imunorreatividade (em menos de 40%) neste grupo de indivíduos. Índice menor quando comparado com imunorreatividade apresentada para a proteína p28, relacionada ao escape viral e específica para o HTLV-2 (107).

Nossos achados em um número significativo de amostras, demonstraram também que o peptídeo sintético P3-HTLV-1, desenvolvido com base nesta região, obteve padrões similares de sensibilidade (cerca de 36%), alcançando 100% de especificidade. Além disso, quando aumentamos seu valor de corte (Cut-off), sua sensibilidade atinge cerca de 42% e sua especificidade decai para 94%. Apesar da baixa sensibilidade apresentada por este peptídeo,

devido à sua alta especificidade, sua utilização em formato de pool com outros peptídeos, pode influir positivamente na eficácia dos métodos de diagnóstico, da mesma maneira que ocorre na utilização de proteínas recombinantes desenvolvidas a partir desta região.

Em contra partida, a gp21 quando utilizada no Western Blot, apresentou reatividade em 92% dos indivíduos testados. Entretanto, proteínas recombinantes desta região, quando utilizadas em testes confirmatórios como o Western Blot, estão relacionadas a resultados falso-positivos e indeterminados (108–110). Em nosso estudo, o peptídeo sintético desenvolvido com base nesta região, apresentou uma sensibilidade mais baixa quando comparado a esta proteína recombinante (cerca de 44%). Por outro lado, não apresentou nenhuma reatividade cruzada, obtendo 100% de especificidade. Em adição, pensando em testes de triagem mais sensíveis e diminuindo sua especificidade para 94%, a sensibilidade deste peptídeo apresentou valor próximo a 60%.

A análise *in silico* é uma metodologia bem aceita e utilizada atualmente para o desenvolvimento de peptídeos e proteínas recombinantes. Os epítomos de células T e B da proteína *Emy162* do *Echinococcus multilocularis*, por exemplo, foram preditos utilizando as plataformas *ABCpred* e *BCpred* (111). Contudo, a avaliação de um peptídeo ou proteína recombinante, também deve ser realizada por meio da determinação de parâmetros de desempenho frente a uma quantidade amostral significativa. A quantidade de amostras utilizadas para a validação de um ensaio, bem como os custos para adequar novas soluções de lavagem e de diluição, por muitas vezes representa um desafio e/ou um demérito dos insumos durante a fase inicial de uma pesquisa, levando a poucos estudos com esta finalidade (4). Apesar disso, buscamos comparar o desempenho atingido pelos peptídeos desenvolvidos neste trabalho aos poucos publicados, com objetivo de verificar se nossos antígenos possuem desempenho semelhante a outros desenvolvidos.

Siravenha L.Q et al., 2018, em estudo identificaram 4 (quatro) peptídeos miméticos a partir da região gp46 do HTLV-1, através da metodologia de *PHAGE-ELISA*. Contudo, os peptídeos formados a partir desta região apresentaram índices baixos de eficácia, variando de 68% a 72% de sensibilidade e especificidade (4). Apesar destes peptídeos apresentarem índices de sensibilidade ligeiramente mais altos, em comparação aos encontrados nesta pesquisa. Durante nossa padronização, visamos valores mais altos de especificidade. Possibilitando assim, a utilização destes peptídeos no formato de *pool*, o que em suma aumenta consideravelmente, o índice de sensibilidade. Além disso, quando antígenos com baixa

especificidade são utilizados em testes de triagem em larga escala, geram excessivos resultados indeterminados ou falso-negativos, inviabilizando sua utilização.

Em um outro estudo, *Marin M.H et al., 2007*, conseguiram identificar dois peptídeos, de aproximadamente 40 aminoácidos da região da gp21, que apresentaram 92-62% de sensibilidade e 100% de especificidade (112). Ainda que estes peptídeos tenham apresentado uma sensibilidade consideravelmente superior aos identificados por nosso estudo. As regiões encontradas por *Marin M.H et al., 2007*, possuem cerca de três vezes o seu tamanho de extensão, levando a um custo de síntese consideravelmente maior. Apesar disso, o estudo de *Marin M.H et al., 2007*, apresenta novas dúvidas e é válido considerar que outras análises possam ser realizadas a fim de verificar um possível aumento na extensão destas regiões, levando a uma melhoria em sua eficácia.

É válido mencionar, que apesar da alta sensibilidade e especificidade apresentada pelas proteínas recombinantes ou peptídeos sintéticos presentes em ensaios comerciais, estes testes apresentam diferentes índices de sensibilidade e especificidade, podendo gerar resultados discordantes, inconclusivos, falso-positivos ou até mesmo falso-negativos. Estes resultados discrepantes estão relacionados principalmente, a testes aplicados em indivíduos com HTLV-2 e/ou infectados pelo HIV, HCV e HBV (64–67). Além disso, estudos apontam que parte destes resultados, ocorrem devido a uma reatividade cruzada entre proteínas do HIV-1 e HTLV (113,114). Esta reatividade cruzada, afeta cerca de 3 a 54% de amostras HIV-1 e está ligada a cadeias de aminoácidos específicas de algumas proteínas, mais especificamente a região 100'-130' da p19, 376'-381' e 381'-400' da gp21 do HTLV-1 (82). Os peptídeos apresentados por este trabalho, não obtiveram reatividade cruzada, mesmo o peptídeo formado a partir da região 379-393 da gp21. Apesar disso, foi notado que média de reatividade apresentada por indivíduos do grupo controle, foi maior quando comparada a dos indivíduos soro portadores de HIV e CMV (negativos para HTLV). Acreditamos que este aumento de reatividade esteja relacionado a diferença de manuseio, armazenamento e/ou data da coleta, realizada pelo laboratório da Dra. Maria Carmen Arroyo Sanchez, o que possivelmente pode caracterizar também, uma leve degradação das demais amostras utilizadas nesta pesquisa.

De fato, os peptídeos identificados neste trabalho, não demonstraram sensibilidade para detecção anticorpos anti-HTLV-2. O que em parte, se deve ao fato de que a proteína de maior imunorreatividade para este grupo, está relacionada a casos indeterminados e falso-positivos, o que inviabiliza sua utilização em testes de triagem ou até mesmo confirmatórios que não sejam

multiparamétricos. Além disso, foi descrito que a falta de eficácia caracterizada pelo WB ou pelos imunoenaios enzimáticos para este grupo de indivíduos, pode estar diretamente ligados a três fatores principais: proteínas recombinantes do diagnóstico (que não se identificam com as cepas virais circulantes de determinadas regiões); baixo número de cópias virais, que resultando em baixa estimulação para a produção de anticorpos anti-HTLV-2 e a longa persistência do vírus em latência, que diminui gradualmente a concentração de anticorpos específicos (77,80).

Por fim, outra dificuldade encontrada por este trabalho, está relacionada à semelhança entre os padrões geométricos regulares e repetitivos destas proteínas. Em grande parte, os peptídeos aqui definidos e que apresentaram alta imunorreatividade, apresentaram formação de polímeros estabilizados por pontes de hidrogênio em seus radicais hidrofílicos, resultando em padrões cilíndricos e rígidos que possuem regiões hidrofóbicas preservadas e não acessíveis ao meio externo (Figura 31). Contudo, quando sintetizados no formato de peptídeos lineares modificando sua estrutura secundária e subsequente a sua interação com a cadeias laterais, podem sofrer degradação devido a adição dos diferentes tampões surfactantes presentes em protocolos sorológicos, levando a um considerável decréscimo de reatividade.

Figura 31 - Representação das cadeias de hidrogênio do peptídeo P1-HTLV-1/2

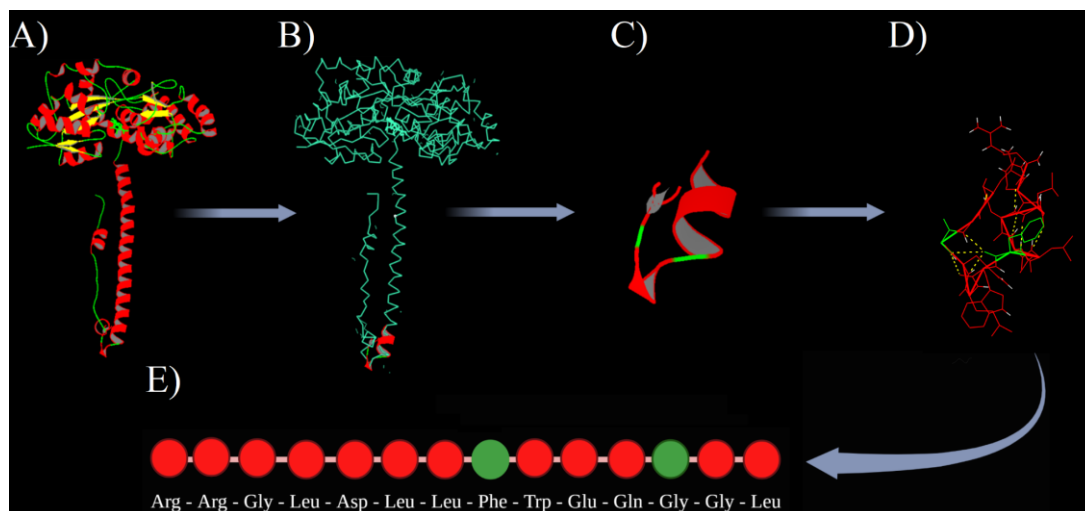


Figura 31: Representa a estrutura peptídica do P1-HTLV-1/2; Figura B: Representa a região peptídica pré-estabelecida; Figura C: Representa a estrutura secundária da região peptídica; Figura D: Representa a distribuição das pontes de hidrogênio, pela cor amarela. Figura E: Representa a estrutura do peptídeo sintético. A cor: Vermelha indica a região de hélice α ; verde, regiões de alça/volta; amarela, folhas β /lâminas beta pregueadas.

6. CONCLUSÕES

Os peptídeos identificados por este estudo, apresentaram alta especificidade e podem ser utilizados no formato de pool, para alcançar índices mais altos de sensibilidade. Além disso, esta metodologia pode ser empregada para o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas de fácil acesso, baixo custo e que possam ser implementadas de forma “Point of Care”, possibilitando o auto-teste. A descentralização do diagnóstico de HTLV, é de urgência internacional e desempenha um papel fundamental para tratamento precoce, melhor atendimento pelos serviços de saúde e melhor qualidade de vida aos infectados, principalmente daqueles que residem em locais periféricos ou de difícil acessibilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, Takatsuki K, Uchino H. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood*. 1977;50(3):481-492. *Blood*. 15 de dezembro de 2016;128(24):2745–2745.
2. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. dezembro de 1980;77(12):7415–9.
3. Kalyanaraman V, Sarngadharan M, Robert-Guroff M, Miyoshi I, Golde D, Gallo R. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science*. 5 de novembro de 1982;218(4572):571.
4. Siravenha LQ. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA DE AGENTES INFECCIOSOS E PARASITÁRIOS. [Belém-Pará]: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará; 2018.
5. Ciminale V, Rende F, Bertazzoni U, Romanelli MG. HTLV-1 and HTLV-2: highly similar viruses with distinct oncogenic properties. *Frontiers in Microbiology*. 2014;5:398.
6. Okajima RMO. Avaliação da correlação da carga proviral do HTLV-1 e da quantificação das células CD4+ e CD8+ entre pacientes soropositivos assintomáticos, pacientes soropositivos com dermatoses e pacientes com HAM/TSP [Internet] [text]. Universidade de São Paulo; 2013 [citado 15 de setembro de 2020]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5133/tde-12032013-165707/>
7. Gessain A, Gessain A, Cassar O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Frontiers in Microbiology*. 2012;3:388.
8. Calattini S, Chevalier SA, Duprez R, Bassot S, Froment A, Mahieux R, et al. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. *Retrovirology*. 9 de maio de 2005;2(1):30.
9. Wolfe ND, Heneine W, Carr JK, Garcia AD, Shanmugam V, Tamoufe U, et al. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 31 de maio de 2005;102(22):7994–9.
10. Gessain A, Rua R, Betsem E, Turpin J, Mahieux R. HTLV-3/4 and simian foamy retroviruses in humans: Discovery, epidemiology, cross-species transmission and molecular virology. *Virology*. 2013;435(1):187–99.
11. Mahieux R, Gessain A. HTLV-3/STLV-3 and HTLV-4 viruses: discovery, epidemiology, serology and molecular aspects. *Viruses*. 2011/07/08 ed julho de 2011;3(7):1074–90.
12. Lefkowitz EJ, Dempsey DM, Hendrickson RC, Orton RJ, Siddell SG, Smith DB. Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Research*. 4 de janeiro de 2018;46(D1):D708–17.

13. Verdonck K, González E, Van Dooren S, Vandamme AM, Vanham G, Gotuzzo E. Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. *The Lancet Infectious Diseases*. 1º de abril de 2007;7(4):266–81.
14. Lairmore MD, Haines R, Anupam R. Mechanisms of human T-lymphotropic virus type 1 transmission and disease. *Current Opinion in Virology*. 2012;2(4):474–81.
15. Brites C, Grassi MF, Quaresma JAS, Ishak R, Vallinoto ACR. Pathogenesis of HTLV-1 infection and progression biomarkers: An overview. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2021;25.
16. NCBI Resource Coordinators. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res*. 4 de janeiro de 2018;46(D1):D8–13.
17. Romanelli M, Diani E, Bergamo E, Casoli C, Ciminale V, Bex F, et al. Highlights on distinctive structural and functional properties of HTLV Tax proteins. *Frontiers in Microbiology*. 2013;4:271.
18. Zhang LL, Wei JY, Wang L, Huang S le, Chen JL. Human T-cell lymphotropic virus type 1 and its oncogenesis. *Acta Pharmacol Sin*. 2017/04/10 ed agosto de 2017;38(8):1093–103.
19. A.R. Rosenberg, L. Delamarre, C. Pique, M.-C. Dokh elar. Les glycoprot eines d’enveloppe du r trovirus HTLV-I. *Virologie*. 13 de dezembro de 1997;1(6):463–9.
20. Nakano K, Watanabe T. HTLV-1 Rex: the courier of viral messages making use of the host vehicle. *Front Microbiol*. 6 de setembro de 2012;3:330–330.
21. Manns A, Hisada M, Grenade LL. Human T-lymphotropic virus type I infection. *The Lancet*. 5 de junho de 1999;353(9168):1951–8.
22. Seiki M, Hattori S, Hirayama Y, Yoshida M. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. junho de 1983;80(12):3618–22.
23. Rafatpanah H, Farid R, Golanbar G, Azad F. HTLV-I Infection: Virus structure, Immune Response to the Virus and Genetic Association Studies in HTLV-I-Infected Individuals. *Iranian journal of allergy, asthma, and immunology*. 1º de janeiro de 2007;5:153–66.
24. Le Blanc I, Grange MP, Delamarre L, Rosenberg AR, Blot V, Pique C, et al. HTLV-1 structural proteins. *Virus Research*. 1º de novembro de 2001;78(1):5–16.
25. Trentin B, Rebeyrotte N, Mamoun RZ. Human T-cell leukemia virus type 1 reverse transcriptase (RT) originates from the pro and pol open reading frames and requires the presence of RT-RNase H (RH) and RT-RH-integrase proteins for its activity. *J Virol*. agosto de 1998;72(8):6504–10.
26. Tsukahara T, Wielgosz MM, Ratner L. Characterization of Envelope Glycoprotein Mutants for Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Infectivity and Immortalization. *J Virol*. 1º de outubro de 2001;75(19):9553.

27. Karpas A. Human retroviruses in leukaemia and AIDS: reflections on their discovery, biology and epidemiology. *Biological Reviews*. 1º de novembro de 2004;79(4):911–33.
28. Cavallari I, Rende F, Bender C, Romanelli M, D'Agostino D, Ciminale V. Fine tuning of the temporal expression of HTLV-1 and HTLV-2. *Frontiers in Microbiology*. 2013;4:235.
29. Shirinian M, Kfoury Y, Dassouki Z, El-Hajj H, Bazarbachi A. Tax-1 and Tax-2 similarities and differences: focus on post-translational modifications and NF- κ B activation. *Front Microbiol*. 15 de agosto de 2013;4:231–231.
30. Santos FLN, Lima FW de M. Epidemiologia, fisiopatogenia e diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV-I. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2005;41:105–16.
31. Harrod R. Silencers of HTLV-1 and HTLV-2: the pX-encoded latency-maintenance factors. *Retrovirology*. 6 de setembro de 2019;16(1):25–25.
32. Martinez MP, Al-Saleem J, Green PL. Comparative virology of HTLV-1 and HTLV-2. *Retrovirology*. 7 de agosto de 2019;16(1):21.
33. Valeri VW, Hryniewicz A, Andresen V, Jones K, Fenizia C, Bialuk I, et al. Requirement of the human T-cell leukemia virus p12 and p30 products for infectivity of human dendritic cells and macaques but not rabbits. *Blood*. 2010/07/20 ed 11 de novembro de 2010;116(19):3809–17.
34. Bartoe JT, Albrecht B, Collins ND, Robek MD, Ratner L, Green PL, et al. Functional role of pX open reading frame II of human T-lymphotropic virus type 1 in maintenance of viral loads in vivo. *J Virol*. fevereiro de 2000;74(3):1094–100.
35. Hiraragi H, Kim SJ, Phipps AJ, Silic-Benussi M, Ciminale V, Ratner L, et al. Human T-lymphotropic virus type 1 mitochondrion-localizing protein p13(II) is required for viral infectivity in vivo. *J Virol*. abril de 2006;80(7):3469–76.
36. Yamamoto B, Li M, Kesic M, Younis I, Lairmore MD, Green PL. Human T-cell leukemia virus type 2 post-transcriptional control protein p28 is required for viral infectivity and persistence in vivo. *Retrovirology*. 12 de maio de 2008;5:38–38.
37. Johnson JM, Mulloy JC, Ciminale V, Fullen J, Nicot C, Franchini G. The MHC Class I Heavy Chain Is a Common Target of the Small Proteins Encoded by the 3' End of HTLV Type 1 and HTLV Type 2. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 1º de novembro de 2000;16(16):1777–81.
38. Panfil AR, Dissinger NJ, Howard CM, Murphy BM, Landes K, Fernandez SA, et al. Functional Comparison of HBZ and the Related APH-2 Protein Provides Insight into Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Pathogenesis. *J Virol*. 27 de janeiro de 2016;90(7):3760–72.
39. Sugata K, Satou Y, Yasunaga J, Ichirou, Hara H, Ohshima K, Utsunomiya A, et al. HTLV-1 bZIP factor impairs cell-mediated immunity by suppressing production of Th1 cytokines. *Blood*. 2011/11/28 ed 12 de janeiro de 2012;119(2):434–44.

40. Dissinger N, Shkriabai N, Hess S, Al-Saleem J, Kvaratskhelia M, Green PL. Identification and characterization of HTLV-1 HBZ post-translational modifications. *PLoS One*. 12 de novembro de 2014;9(11):e112762–e112762.
41. Martin JL, Maldonado JO, Mueller JD, Zhang W, Mansky LM. Molecular Studies of HTLV-1 Replication: An Update. *Viruses*. 27 de janeiro de 2016;8(2):31.
42. Yamamoto N, Matsumoto T, Koyanagi Y, Tanaka Y, Hinuma Y. Unique cell lines harbouring both Epstein–Barr virus and adult T-cell leukaemia virus, established from leukaemia patients. *Nature*. 1º de setembro de 1982;299(5881):367–9.
43. Ho DD, Rota TR, Hirsch MS. Infection of human endothelial cells by human T-lymphotropic virus type I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. dezembro de 1984;81(23):7588–90.
44. Koyanagi Y, Itoyama Y, Nakamura N, Takamatsu K, Kira JI, Iwamasa T, et al. In Vivo Infection of Human T-Cell Leukemia Virus Type I in Non-T Cells. *Virology*. 1º de setembro de 1993;196(1):25–33.
45. Lal RB, Owen SM, Rudolph DL, Dawson C, Prince H. In Vivo Cellular Tropism of Human T-Lymphotropic Virus Type II Is Not Restricted to CD8+ Cells. *Virology*. 10 de julho de 1995;210(2):441–7.
46. Manel N, Kim FJ, Kinet S, Taylor N, Sitbon M, Battini JL. The Ubiquitous Glucose Transporter GLUT-1 Is a Receptor for HTLV. *Cell*. 14 de novembro de 2003;115(4):449–59.
47. Jones KS, Petrow-Sadowski C, Bertolette DC, Huang Y, Ruscetti FW. Heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of human T-cell leukemia virus type 1 virions into CD4+ T cells. *J Virol*. outubro de 2005;79(20):12692–702.
48. Ghez D, Lepelletier Y, Lambert S, Fourneau JM, Blot V, Janvier S, et al. Neuropilin-1 is involved in human T-cell lymphotropic virus type 1 entry. *J Virol*. julho de 2006;80(14):6844–54.
49. Jones KS, Fugo K, Petrow-Sadowski C, Huang Y, Bertolette DC, Lisinski I, et al. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 use different receptor complexes to enter T cells. *J Virol*. setembro de 2006;80(17):8291–302.
50. Lambert S, Bouttier M, Vassy R, Seigneuret M, Petrow-Sadowski C, Janvier S, et al. HTLV-1 uses HSPG and neuropilin-1 for entry by molecular mimicry of VEGF165. *Blood*. 2009/03/06 ed 21 de maio de 2009;113(21):5176–85.
51. Takenouchi N, Jones KS, Lisinski I, Fugo K, Yao K, Cushman SW, et al. GLUT1 is not the primary binding receptor but is associated with cell-to-cell transmission of human T-cell leukemia virus type 1. *J Virol*. 2006/11/15 ed fevereiro de 2007;81(3):1506–10.
52. Jones KS, Huang YK, Chevalier SA, Afonso PV, Petrow-Sadowski C, Bertolette DC, et al. The receptor complex associated with human T-cell lymphotropic virus type 3 (HTLV-3) Env-mediated binding and entry is distinct from, but overlaps with, the receptor complexes of HTLV-1 and HTLV-2. *J Virol*. 2009/03/11 ed maio de 2009;83(10):5244–55.
53. Caterino-de-Araujo A, Barbosa-Stancioli EF, Alonso Neto JB, Aragón MG, Galvão-Castro B, Ishak R, et al. Laboratory diagnosis of human T-lymphotropic virus in Brazil: assays,

flowcharts, challenges, and perspectives. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2021;54.

54. Caterino-de-Araujo A, Gonçalves MG. Diagnóstico molecular de vírus T-linfotrópico humano (HTLV): histórico e estado da arte. *BEPA Boletim Epidemiológico Paulista*. 2021;18(212):14–62.

55. da Silva Brito V, Santos FLN, Gonçalves NLS, Araujo THA, Nascimento DSV, Pereira FM, et al. Performance of commercially available serological screening tests for human T-cell lymphotropic virus infection in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*. 2018;56(12):e00961-18.

56. Sabino EC, Zrein M, Taborda CP, Otani MM, Ribeiro-Dos-Santos G, Sáez-Alquézar A. Evaluation of the INNO-LIA HTLV I/II assay for confirmation of human T-cell leukemia virus-reactive sera in blood bank donations. *J Clin Microbiol*. maio de 1999;37(5):1324–8.

57. Rosadas C, Menezes MLB, Galvão-Castro B, Assone T, Miranda AE, Aragón MG, et al. Blocking HTLV-1/2 silent transmission in Brazil: Current public health policies and proposal for additional strategies. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2021;15(9):e0009717.

58. Vrieling H, Reesink HW, Habibuw MR, Schuller M, van der Meer CBM, Lelie PN. Comparison of Four HTLV-I and HTLV-I + II ELISAs. *Vox Sanguinis*. 1999;76(3):187–91.

59. Matsson Y. Utvärdering av HTLV-I/II ELISA 4.0 (MP Diagnostics). 2014.

60. Romanelli LCF, Caramelli P, Proietti AB de FC. O vírus linfotrópico de células T humanos tipo 1 (HTLV-1): Quando suspeitar da infecção? *Revista da Associação Médica Brasileira*. 2010;56:340–7.

61. Carneiro-Proietti ABF, Sabino EC, Leão S, Salles NA, Loureiro P, Sarr M, et al. Human T-lymphotropic virus type 1 and type 2 seroprevalence, incidence, and residual transfusion risk among blood donors in Brazil during 2007-2009. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012/05/03 ed outubro de 2012;28(10):1265–72.

62. MP DIAGNOSTICS HTLV BLOT 2.4 WESTERN BLOT ASSAY [Internet]. [citado 2 de novembro de 2020]. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/90226/download>

63. Miller L. Profile of the MP Diagnostics HTLV Blot 2.4 test: a supplemental assay for the confirmation and differentiation of antibodies to HTLV-1 and HTLV-2. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2016;16(2):135–45.

64. Campos KR, Gonçalves MG, Costa NA, Caterino-de-Araujo A. Comparative performances of serologic and molecular assays for detecting human T lymphotropic virus type 1 and type 2 (HTLV-1 and HTLV-2) in patients infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2017;21:297–305.

65. Campos KR, Gonçalves MG, Fukasawa LO, Costa NA, Barreto-Damião CH, Magri MC, et al. Comparação de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por vírus linfotrópicos de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) e tipo 2 (HTLV-2) em pacientes infectados por HIV-1. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 5 de outubro de 2015;74(1):57–65.

66. Campos KR, de Araujo AC. Desafios no diagnóstico da infecção pelos Vírus Linfotrópicos de Células T Humanas do tipo 1 e tipo 2 (HTLV-1 e HTLV-2) em pacientes infectados com o HIV-1. *BEPA Boletim Epidemiológico Paulista*. 2018;15(173).
67. Caterino-de-Araujo A, Magri MC, Sato NS, Morimoto HK, Brigido LFM, Morimoto AA. Inability to detect HTLV-2-specific antibodies in a patient coinfecting with HIV-1, HTLV-1, HTLV-2, and hepatitis C virus. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2014;30(1):97–101.
68. Gonçalves MG, Fukasawa LO, Campos KR, Higa FT, Caterino-de-Araujo A. Development and Validation of Multiplex Quantitative Real-Time PCR Assays for Simultaneous Detection and Differentiation of HTLV-1 and HTLV-2, Using Different PCR Platforms and Reagent Brands. *Front Microbiol*. 2022;13:831594.
69. Andrade RG, Ribeiro MA, Namen-Lopes MSS, Silva SMN, Basques FV, Ribas JG, et al. Evaluation of the use of real-time PCR for human T cell lymphotropic virus 1 and 2 as a confirmatory test in screening for blood donors. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2010;43:111–5.
70. Lee TH, Chafets DM, Busch MP, Murphy EL. Quantitation of HTLV-I and II proviral load using real-time quantitative PCR with SYBR Green chemistry. *Journal of Clinical Virology*. 1º de dezembro de 2004;31(4):275–82.
71. Kamihira S, Dateki N, Sugahara K, Hayashi T, Harasawa H, Minami S, et al. Significance of HTLV1 proviral load quantification by real-time PCR as a surrogate marker for HTLV1-infected cell count. *Clinical and Laboratory Haematology - CLIN LAB HAEMATOL*. 1º de abril de 2003;25:111–7.
72. Usui T, Yanagihara K, Tsukasaki K, Murata K, Hasegawa H, Yamada Y, et al. Characteristic expression of HTLV-1 basic zipper factor (HBZ) transcripts in HTLV-1 provirus-positive cells. *Retrovirology*. 22 de abril de 2008;5:34–34.
73. Olindo S, Lézin A, Cabre P, Merle H, Saint-Vil M, Edimonana Kaptue M, et al. HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells quantified in 100 HAM/TSP patients: A marker of disease progression. *Journal of the Neurological Sciences*. 15 de outubro de 2005;237(1):53–9.
74. Bassi SS, Coutinho R Jr, Olavarria VN, Martin F, Galvão-Castro B, Grassi MFR. HTLV-1 proviral load as an indicative marker of HAM/TSP: a systematic review of studies of patients with HAM/TSP. *Retrovirology*. 7 de janeiro de 2014;11(Suppl 1):P36–P36.
75. Iwanaga M, Watanabe T, Utsunomiya A, Okayama A, Uchimar K, Koh KR, et al. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) proviral load and disease progression in asymptomatic HTLV-1 carriers: a nationwide prospective study in Japan. *Blood*. 26 de agosto de 2010;116(8):1211–9.
76. Rouet F, Meertens L, Courouble G, Herrmann-Storck C, Pabingui R, Chancerel B, et al. Serological, epidemiological, and molecular differences between human T-cell lymphotropic virus Type 1 (HTLV-1)-seropositive healthy carriers and persons with HTLV-I Gag indeterminate Western blot patterns from the Caribbean. *J Clin Microbiol*. abril de 2001;39(4):1247–53.

77. Ishak R, Vallinoto ACR, Azevedo VN, Vicente ACP, Hall WW, Ishak MOG. Molecular evidence for infection by HTLV-2 among individuals with negative serological screening tests for HTLV antibodies. *Epidemiol Infect.* 2006/09/07 ed maio de 2007;135(4):604–9.
78. Novoa P, Oliveira A, Posada Vergara M, Duarte A. Molecular characterization of human T-cell lymphotropic virus type 2 (HTLV-II) from people living in urban areas of Sao Paulo City: Evidence of multiple subtypes circulation. *Journal of medical virology.* 1º de fevereiro de 2007;79:182–7.
79. Costa J, Segurado A. Molecular evidence of human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2 (HTLV-1 and HTLV-2) infections in HTLV seroindeterminate individuals from Sao Paulo, Brazil. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology.* 1º de fevereiro de 2009;44:185–9.
80. Olah I, Fukumori LMI, Smid J, de Oliveira ACP, Duarte AJS, Casseb J. 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. *Journal of Medical Virology.* 1º de maio de 2010;82(5):837–42.
81. Busch M, Laycock M, Kleinman S, Wages JJ, Calabro M, Kaplan J, et al. Accuracy of supplementary serologic testing for human T-lymphotropic virus types I and II in US blood donors. *Retrovirus Epidemiology Donor Study. Blood.* 15 de fevereiro de 1994;83(4):1143–8.
82. Lal RB, Rudolph D, Alpers MP, Sulzer AJ, Shi YP, Lal AA. Immunologic cross-reactivity between structural proteins of human T-cell lymphotropic virus type I and the blood stage of *Plasmodium falciparum*. *Clin Diagn Lab Immunol.* janeiro de 1994;1(1):5–10.
83. Catalan-Soares B, Carneiro-Proietti AB de F, Proietti FA. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública.* 2005;21:926–31.
84. Carneiro-Proietti ABF, Ribas JGR, Catalan-Soares BC, Martins ML, Brito-Melo GEA, Martins-Filho OA, et al. Infecção e doença pelos vírus linfotrópicos humanos de células T (HTLV-I/II) no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop.* outubro de 2002;35:499–508.
85. Castro GM, Balangero MC, Maturano E, Mangeaud A, Gallego SV. Development and validation of a real-time PCR assay for a novel HTLV-1 tax sequence detection and proviral load quantitation. *Journal of Virological Methods.* 1º de maio de 2013;189(2):383–7.
86. Costa EAS, Jacob F, Feliciano R dos S, Santos-Fortuna E de los, caterino-de-Araujo A. Falha na implantação de um novo algoritmo de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 em população de risco. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso).* 2009;68:314–7.
87. Lopes ACMU, Araújo MAL de, Vasconcelo LDPG, Uchoa FSV, Rocha HP, Santos JR dos. Implantação dos testes rápidos para sífilis e HIV na rotina do pré-natal em Fortaleza - Ceará. *Revista Brasileira de Enfermagem.* 2016;69:62–6.

88. Pereira LB. Validação de kit imunocromatográfico rápido para detecção da doença de Chagas [Internet] [text]. Universidade de São Paulo; 2018 [citado 8 de novembro de 2020]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/17/17156/tde-13092018-152402/>
89. Rosen S. Market Trends in Lateral Flow Immunoassays. Em: Wong R, Tse H, organizadores. Lateral Flow Immunoassay [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2009. p. 1–15. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-59745-240-3_2
90. O’Farrell B. Lateral Flow Immunoassay Systems: Evolution from the Current State of the Art to the Next Generation of Highly Sensitive, Quantitative Rapid Assays. The Immunoassay Handbook. 31 de dezembro de 2013;89–107.
91. Koczula KM, Gallotta A. Lateral flow assays. Estrela P, organizador. Essays in Biochemistry. 30 de junho de 2016;60(1):111–20.
92. Davi EV. Clonagem de fragmentos dos genes gag e env do HIV-1 e HTLV-1, expressão em *Escherichia coli* das proteínas gp21, p24 e gp46 do HTLV-1 e imunodeteção [Internet] [Mestrado em Biociências Aplicadas à Farmácia]. [Ribeirão Preto]: Universidade de São Paulo; 2015 [citado 28 de setembro de 2021]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60135/tde-01072015-103417/>
93. Rego FF de A. Mutações na região LTR do HTLV e sua implicação na presença do vírus na saliva e origem na Bahia. 2010 [citado 10 de novembro de 2020]; Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/4205>
94. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 5 de outubro de 1990;215(3):403–10.
95. Saha S, Raghava GPS. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 1º de outubro de 2006;65(1):40–8.
96. Saha S, Raghava GPS. BcePred: Prediction of Continuous B-Cell Epitopes in Antigenic Sequences Using Physico-chemical Properties. Em: Nicosia G, Cutello V, Bentley PJ, Timmis J, organizadores. Artificial Immune Systems. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2004. p. 197–204.
97. [guia_de_manejo_clinico_do_paciente_com_HTLV.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_de_manejo_clinico_do_paciente_com_HTLV.pdf) [Internet]. [citado 2 de novembro de 2020]. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_de_manejo_clinico_do_paciente_com_HTLV.pdf
98. Martins ML, Santos AC da S, Namen-Lopes MS, Barbosa-Stancioli EF, Utsch DG, Carneiro-Proietti AB de F. Long-term serological follow-up of blood donors with an HTLV-Indeterminate Western Blot: Antibody Profile of Seroconverters and Individuals With False Reactions. *Journal of medical virology*. 2010;82(10):1746–53.
99. Miranda ACAM. Estudo molecular de proteínas estruturais (gp21 e gp46) e regulatórias (HBZ) do HTLV-1 em indivíduos com diferentes perfis clínicos [Internet] [Thesis]. 2012 [citado 19 de abril de 2022]. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/4109>

100. Kobe B, Center RJ, Kemp BE, Pountourios P. Crystal structure of human T cell leukemia virus type 1 gp21 ectodomain crystallized as a maltose-binding protein chimera reveals structural evolution of retroviral transmembrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(8):4319–24.
101. Khorasanizadeh S, Campos-Olivas R, Clark CA, Summers MF. Letter to the Editor: Sequence-specific ¹H, ¹³C and ¹⁵N chemical shift assignment and secondary structure of the HTLV-I capsid protein. *Journal of Biomolecular NMR*. 1º de junho de 1999;14(2):199–200.
102. Wishart DS, Sykes BD. The ¹³C Chemical-Shift Index: A simple method for the identification of protein secondary structure using ¹³C chemical-shift data. *Journal of Biomolecular NMR*. 1º de março de 1994;4(2):171–80.
103. Herrmann D, Zhou LW, Hanson HM, Willkomm NA, Mansky LM, Saad JS. Structural Insights into the Mechanism of Human T-cell Leukemia Virus Type 1 Gag Targeting to the Plasma Membrane for Assembly. *Journal of Molecular Biology*. 17 de setembro de 2021;433(19):167161.
104. Human T-lymphotropic virus type 1: technical report [Internet]. [citado 30 de outubro de 2022]. Disponível em: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240020221>
105. Okuma K, Kuramitsu M, Niwa T, Taniguchi T, Masaki Y, Ueda G, et al. Establishment of a novel diagnostic test algorithm for human T-cell leukemia virus type 1 infection with line immunoassay replacement of western blotting: a collaborative study for performance evaluation of diagnostic assays in Japan. *Retrovirology*. 24 de agosto de 2020;17(1):26.
106. Marqué L, Liehl P, De Boer J, Pottel H, Murphy EL, Bruhn R, et al. A novel high performing multiplex immunoassay Multi-HTLV for serological confirmation and typing of HTLV infections. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 1º de novembro de 2021;15(11):e0009925.
107. Anupam R, Doueiri R, Green P. The need to accessorize: molecular roles of HTLV-1 p30 and HTLV-2 p28 accessory proteins in the viral life cycle. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2013;4. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2013.00275>
108. Marin MH, Pentón PC, Bocalandro YM, Pena LP, Navarro JD, López LJG. Chimeric synthetic peptides from the envelope (gp46) and the transmembrane (gp21) glycoproteins for the detection of antibodies to human T-cell leukemia virus type II. *Biochemical and biophysical research communications*. 2001;289(1):7–12.
109. Lal RB, Brodine S, Kazura J, Mbidde-Katonga E, Yanagihara R, Roberts C. Sensitivity and specificity of a recombinant transmembrane glycoprotein (rgp21)-spiked western immunoblot for serological confirmation of human T-cell lymphotropic virus type I and type II infections. *Journal of clinical microbiology*. 1992;30(2):296–9.
110. Lal RB, Rudolph DL, Kaplan JE, Hjelle B, Levine PH, Coligan JE, et al. Identification of immunodominant epitopes in envelope glycoprotein of human T lymphotropic virus type II. *Virology*. 1992;186(1):274–9.
111. Potocnakova L, Bhide M, Pulzova LB. An Introduction to B-Cell Epitope Mapping and In Silico Epitope Prediction. *J Immunol Res*. 2016/12/29 ed 2016;2016:6760830–6760830.

112. Marín MH, Rodríguez-Tanty C, Higginson-Clarke D, Bocalandro M, Navarro JD. Síntesis química en fase sólida de dos péptidos de la glicoproteína de la transmembrana (gp21) del HTLV-I. 38(2):7.
113. Gastaldello R, Gallego S, Isa MB, Maturano E, Sileoni S, Nates S, et al. Immunofluorescence assay reactivity patterns of serum samples presenting indeterminate Western blot results for antibodies to HIV-1 and HTLV-I/II in Cordoba, Argentina. Rev Inst Med trop S Paulo. outubro de 2001;43(5):277–82.
114. Elm J, Desowitz R, Diwan A. Serological cross-reactivities between the retroviruses HIV and HTLV-1 and the malaria parasite Plasmodium falciparum. P N G Med J. março de 1998;41(1):15–22.

ANEXO A - TCL

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Instituto de Infectologia Emílio Ribas

Resolução nº 196/96 – Conselho Nacional de Saúde
Protocolo nº

Título do estudo: Padronização de um teste sorológico de triagem, baseado na identificação de anticorpos anti-HTLV.

Investigador Responsável e Principal: Dr. Augusto C. P. de Oliveira
Pesquisador Assistente: Jorge Casseb
Pesquisador Assistente: Victor Angelo Folgosi

Nome da instituição: Instituto De Infectologia Emílio Ribas, com colaboração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM/56).

Prezado(a) senhor(a):

O (a) Sr(a) foi selecionado(a) e está sendo CONVIDADO(A) para participar da pesquisa intitulada: Padronização de um teste sorológico de triagem, baseado na identificação de anticorpos anti-HTLV, no ambulatório do “Instituto de Infectologia Emílio Ribas”. Durante sua participação neste estudo, gostaríamos de coletar algumas amostras de sangue, bem como dados do seu prontuário. Seu nome e dados que possam lhe identificar não serão divulgados, mantendo-se o sigilo em todas as fases do estudo.

Antes de concordar em participar deste estudo é muito importante que você compreenda as informações e instruções contidas neste documento. O(s) autor(es) deverá(ão) responder todas as suas dúvidas antes que você decida participar. Você tem o direito de desistir de participar do estudo a qualquer momento, sem nenhuma penalidade ou prejuízo em seu tratamento nesta instituição. Este termo também explicará como suas informações serão usadas e quem terá acesso a elas. Se você concordar em participar deste estudo, pediremos que você assine este termo de consentimento. Uma via deste consentimento informado será arquivada com o(a) pesquisador(a) principal e outra via será fornecida a você.

Objetivo do estudo:

Esta pesquisa tem como objetivo a padronização de um teste sorológico de triagem, baseado na identificação de anticorpos anti-HTLV-1, HTLV-2, HTLV-3 e HTLV-4, com isso será desenvolvida uma nova técnica de diagnóstico baseada nos testes de fluxo lateral (do inglês Lateral flow assays) (LFA), semelhante aos testes rápidos utilizados hoje para o diagnóstico de outras infecções, tais como: HIV, sífilis e as hepatites B e C. Os resultados deste estudo irão favorecer o desenvolvimento de um teste rápido, com acurácia de resultados satisfatórios e dentro das expectativas de um teste de triagem, possibilitando a realização de levantamentos epidemiológicos, campanhas de intervenção, monitoramento e diagnóstico dos novos tipos emergentes (HTLV-3 e HTLV-4), que atualmente, não possuem método de diagnóstico padronizado.

Descrição dos procedimentos que serão realizados:

Realizaremos uma coleta de sangue de duas formas: Na primeira, coletaremos dez (10) mL de seu sangue (equivalente a 2 colheres de chá) para a realização de testes sorológicos e imunológicos. A segunda só será realizada caso tenha alguma dificuldade em encontrar sua veia, faremos um pequeno furo no seu dedo com a ajuda de uma agulha e coletaremos gotas que sairão deste furo. Caso seja preciso, você será chamado para nova coleta de sangue, igual à primeira, para que refaçamos os testes.

Descrição dos desconfortos e riscos esperados nos procedimentos:

Você poderá sentir algum desconforto na hora da coleta do sangue, no local onde a agulha será colocada o Sr.(a) pode sentir dor, que logo desaparecerá; poderá surgir neste local uma área vermelha ou até mesmo roxa, que também desaparecerá depois de algum tempo, desmaio, ou em casos extremos pode ocorrer uma infecção na sua veia, que será tratada. Este sangue será coletado por uma equipe especializada que trabalha no Laboratório do “Instituto de Infectologia Emilio Ribas”, e utilizaremos todas as técnicas para evitar os desconfortos mencionados acima.

Riscos e Benefícios:

- **Riscos:** A quebra da confidencialidade desses dados é possível. Os pesquisadores tomarão todas as medidas necessárias para manter a privacidade das informações sobre a sua saúde e prevenir o mau uso dessas informações. Os participantes do estudo não serão identificados em nenhum momento, mesmo quando os resultados deste estudo forem divulgados em qualquer forma.

O(s) pesquisador(es) irá(ão) tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. O seu nome ou o material que identifique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. A amostra de sangue obtida, será estocada em freezer -20C (se necessário -80C), no laboratório LIM/56, até a realização dos exames, e será descartada após o término da pesquisa. Caso o paciente recuse/desista de participar do estudo, as amostras serão descartadas.

O(A) senhor(a) não receberá nenhum benefício direto ao participar deste projeto de Pesquisa, mas esta pesquisa pode ajudar no diagnóstico de futuros pacientes portadores de HTLV-1, HTLV-2, HTLV-3 e HTLV-4.

Quais são os custos para você?

Sua participação é **voluntária**, isto é, a qualquer momento você pode recusar-se a responder qualquer pergunta ou desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa ou desistência não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição que forneceu os seus dados, como também na que trabalha.

Sr(a) não terá nenhum custo ou quaisquer compensações financeiras. **Não haverá nenhum benefício à sua participação**, a não ser de aumentar o conhecimento científico para compreender melhores formas de diagnóstico da infecção causada pelo vírus (HTLV).

E se algum dano for causado a você?

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 e gratuita custeada pelos participantes do estudo e pelo projeto de pesquisa. Assim,

se você sofrer qualquer dano durante a sua participação no estudo, você receberá assistência integral e imediata oferecida pela equipe do estudo pelo tempo que for necessário, sem nenhum custo para você. Caso você seja mulher e engravidar durante o estudo, assistência integral e gratuita será fornecida a você e ao seu bebê pelo tempo que for preciso. Você não estará renunciando ou abrindo mão de qualquer direito legal de obter indenização por danos eventuais ao assinar este termo de consentimento.

O que fazer caso tenha perguntas ou problemas?

Se você tiver alguma pergunta sobre este estudo ou em caso de danos relacionados com a pesquisa, você deverá entrar em contato com o (a) Investigador (a) Principal: Victor Angelo Folgosi ou com o Prof.Assoc. Dr. Jorge Casseb, pelo telefone (11) 3066-7194 e/ou pelo e-mail (jcasseb10@gmail.com).

Caso tenha alguma dúvida ou questão sobre seus direitos como participante deste estudo, você poderá procurar o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Infectologia Emílio Ribas no número (11) 3896-1406, ou através do seguinte endereço: Av. Dr. Arnaldo, 165, São Paulo - SP. Horário de Atendimento: de segunda a sexta-feira de 08-13hs (e-mail: comitedeetica@emilioribas.sp.gov.br). Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é um grupo de membros independentes do patrocinador/centro de pesquisa responsável por revisar os estudos de pesquisa com o objetivo de proteger os direitos e o bem-estar dos participantes.

A sua participação é voluntária:

Você pode retirar o seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na instituição.

Direito de sigilo das informações:

Os dados coletados do seu prontuário terão sigilo garantido pelos autores responsáveis. Os participantes do estudo não serão identificados em nenhum momento, mesmo quando os resultados deste estudo forem divulgados em qualquer meio de comunicação científica. As amostras coletadas para o Projeto de Pesquisa também serão tratadas com o mesmo nível de confidencialidade.

Aspectos Financeiros:

Sua participação na pesquisa é voluntária e não envolverá qualquer custo adicional para você. Também não receberá nenhum pagamento por participar desta pesquisa. Por outro lado, esta pesquisa é uma iniciativa independente e nenhum pesquisador receberá compensação financeira por participar dela.

O estudo foi explicado com palavras que eu consegui entender, discutir, fazer perguntas e estou satisfeito com as respostas. Ao assinar este TCLE em duas vias, ficando com uma delas, demonstro que aceitei o convite para participar do estudo: Padronização de um teste sorológico de triagem, baseado na identificação de anticorpos anti-HTLV-1, HTLV-2, HTLV-3 e HTLV-4.

_____ Data __/__/__

Nome legível do participante da pesquisa ou responsável legal pelo participante da pesquisa

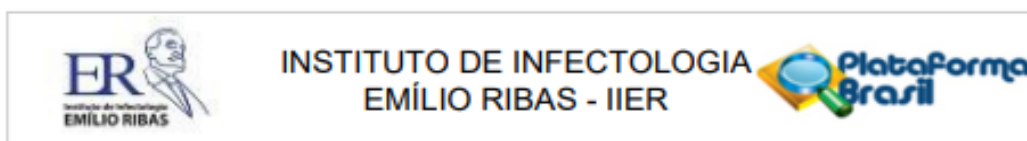
Assinatura do participante da pesquisa ou responsável legal pelo participante da pesquisa

_____ Data __/__/__

Nome legível do Pesquisador que obteve o consentimento

Assinatura do Pesquisador que obteve o consentimento

ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética


PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Padronização de um teste sorológico de triagem, baseado na identificação de anticorpos anti-HTLV.

Pesquisador: Augusto César Penalva de Oliveira

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 29073020.3.0000.0061

Instituição Proponente: Instituto de Infectologia Emílio Ribas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.092.667

Apresentação do Projeto:

Introdução: Atualmente estima-se que cerca de 10 a 20 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HTLV no mundo, variando de 1 a 10% na população geral das áreas endêmicas. Devido a inexistência de diagnóstico nos tipos emergentes (HTLV-3 e HTLV-4) e a complexidade na obtenção de um diagnóstico de alta especificidade e/ou sensibilidade para HTLV-1 e HTLV-2, os métodos atualmente utilizados se tornaram prolixos, e seu desenvolvimento contínuo exige cada vez mais recursos, como uma infraestrutura e abordagem centralizada. Por outro lado, o desenvolvimento de algumas tecnologias de menor precisão, utilizadas para triagem ou diagnóstico, podem ser empregadas de forma descentralizada (point-of-care), necessitando de infraestrutura mínima para sua execução. Um exemplo desta última tecnologia mencionada, seriam os testes rápidos (testes não convencionais, baseados na identificação de anticorpos ou antígenos). **Objetivo:** Padronização de um teste sorológico de triagem, baseado na identificação de anticorpos anti HTLV-1, HTLV-2, HTLV-3 e HTLV-4. **Material e Métodos:** Para este projeto, serão utilizadas cerca de 550 amostras de voluntários sabidamente positivos para infecção causada pelo HTLV-1 e HTLV-2, disponibilizados pelo instituto de infectologia "Emílio Ribas" (IIER). Também serão recrutados, ao menos 250 voluntários sabidamente negativos para infecção causada pelo HTLV, destes voluntários, 50 deverão estar divididos entre indivíduos politransfundidos, portadores de doenças parasitárias ou

Endereço: Avenida Dr. Arnaldo 165
Bairro: Cerqueira César **CEP:** 01.246-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3896-1406 **Fax:** (11)3896-1406 **E-mail:** comiteetica@emilioribas.sp.gov.br

ANEXO C – Participações em Programas de Incentivo

Este estudo participou da primeira edição do programa de Inovação Tecnológica do HCFMUSP (In.cube), sendo selecionado em 9º Lugar. Ao fim do programa, também fomos prestigiados com um prêmio de destaque.



ANEXO D – Participações em Congressos

Participações realizadas

1. Folgosi VA, Leite Junior PD, Prates GS, Komninakis SV, Penalva A, Assone T, Casseb J. USE OF WESTERN BLOT (WB) TO DETECT HTLV-1 AND/OR 2 INFECTIONS. In: Webinar HTLV World Day: International health policy forum for the elimination of HTLV/PAHO, 2021.
(Congresso/Poster).

Link do Resumo: paho.org/sites/default/files/2022-cde-webinar-htlv-web-annexs_0.pdf

2. Folgosi VA, Juliano MA, Assone T, Leite Junior PD, Casseb J. IMMUNOGENIC SYNTHETIC PEPTIDES: CANDIDATES FOR HTLV TEST OF POINT OF CARE DEVELOPMENT. In: 20th International Conference on Human Retrovirology; 2022; Melbourne, Australia.
(Congresso/Poster)

Link do Resumo: <https://az659834.vo.msecnd.net/eventsairaeuprod/production-ashm-public/53bf1f89abda4bc0921d2a099149c2f8>

3. Prates G, Folgosi VA, Oliveira L, Andrade MM, Leuzzi Y, Pereira NZ, Marcusso R, Assone T, Penalva A, Casseb J. (2021). POTENCIAIS FATORES DE RISCO E PROTEÇÃO DA TRANSMISSÃO VERTICAL DO HTLV-1. In: 12º Congresso Paulista de Infectologia; 2021; São Paulo, Brazil.
(Congresso/Poster)

Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.101471>

Participações Futuras

1. Folgosi VA, Leite Junior PD, Silva FD, Penalva A, Zrein M, Salvador F, Casseb J. EVALUATION OF A NOVEL MULTIPLEX IMMUNOASSAY: IMPROVEMENT FOR HTLV-2 DETECTION. In: Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI); 2023; Seattle, USA.
(Congresso/Poster)

ANEXO E – Submissões em Periódicos

Publicados

1. Assone T, Menezes SM, de Toledo Gonçalves F, Folgosi VA, da Silva Prates G, Dierckx T, ... & Van Weyenbergh J. (2022). SYSTEMIC CYTOKINES AND GLYCA DISCRIMINATE DISEASE STATUS AND PREDICT CORTICOSTEROID RESPONSE IN HTLV-1-ASSOCIATED NEUROINFLAMMATION. JOURNAL OF NEUROINFLAMMATION, 19(1), 1-15.

Sob Revisão

1. Folgosi VA, Konminakis SV, Silva FD, Leite Junior PD, Haziot MEJ, Penalva A, Smid J, Zrein M, Salvador F, Casseb J. Title: EVALUATION OF THE NEW MULTI-HTLV SEROLOGICAL ASSAY: IMPROVEMENT FOR HTLV-2 DETECTION.

Revista: AIDS Research and Human Retroviruses (Em revisão);
Tipo: Full Manuscript.

2. Folgosi VA, Konminakis SV, Juliano MA, Leite Junior PD, Haziot MEJ, Penalva A, Smid J, Casseb J. Title: IMMUNOGENIC SYNTHETIC PEPTIDES: CANDIDATES FOR HTLV TEST OF POINT OF CARE DEVELOPMENT

Revista: AIDS Research and Human Retroviruses (Em revisão);
Tipo: Short Communication.

3. Konminakis SV, Domingues W, Sanabani S, Folgosi VA, Barbosa I, Casseb J. Title: APPLICATION OF CLUSTERED REGULARLY INTERSPACED SHORT PALINDROMIC REPEATS ASSOCIATED PROTEIN 9 (CRISPR/CAS9) IN HIV-1-ASSOCIATED NEUROCOGNITIVE DISORDERS: A REVIEW

Revista: AIDS Research and Human Retroviruses (Em revisão);
Tipo: Review Article.