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

CÁSSIA CRISTINA ALVES GONÇALVES

AVALIAÇÃO E ADAPTAÇÃO DO TESTE WESTERN BLOT PARA ANÁLISE DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO NA MIELOPATIA ASSOCIADA AO HTLV-I / PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL

RIO DE JANEIRO
2007

CÁSSIA CRISTINA ALVES GONÇALVES

AVALIAÇÃO E ADAPTAÇÃO DO TESTE WESTERN BLOT PARA ANÁLISE DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO NA MIELOPATIA ASSOCIADA AO HTLV-I / PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL

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

Orientadora: Profª. Drª. Marzia Pucioni Sohler
Co-orientadora: Drª. Sílvia Maia Farias de Carvalho

RIO DE JANEIRO
2007

616.83 Gonçalves, Cássia Cristina Alves,
G635a Avaliação e adaptação do teste Western Blot para análise do líquido cefalorraquiano na mielopatia associada ao HTLV-I / Paraparesia espástica tropical. / Cássia Cristina Alves Gonçalves - Rio de Janeiro, 2007.

91 f.

Orientadora: Profª. Drª. Marzia Puccioni Sohler.
Co-orientadora: Drª. Sílvia Maia Farias de Carvalho.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Mestrado em Neurologia, 2007.

1. Liquido Cefalorraquidiano. 2. HAM/TSP. 3. HTLV-1. 4. Síntese intratecal. 5 *Western blot*. I. Puccioni-Sohler, Marzia. II. Carvalho, Sílvia Maia Farias de. III. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. IV. Título.

CÁSSIA CRISTINA ALVES GONÇALVES

AVALIAÇÃO E ADAPTAÇÃO DO TESTE WESTERN BLOT PARA ANÁLISE DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO NA MIELOPATIA ASSOCIADA AO HTLV-I / PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL

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

Aprovado em: ___/___/___.

BANCA EXAMINADORA

_____

Profª. Drª. Marzia Puccioni Sohler
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

_____

Prof. Dr. Carlos Alberto Morais de Sá
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO

_____

Prof. Dr. José Pascoal Simonetti
Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais, pelo esforço ao longo desses anos para minha formação profissional e pessoal.

AGRADECIMENTOS

Registro aqui meus agradecimentos a todos os colegas que incentivaram e colaboraram para a realização desta dissertação e especialmente a:

- À Profª. Drª. Marzia Puccioni Sohler, pela orientação, conhecimento, confiança, seriedade, sensibilidade e estímulo ininterrupto para a conclusão deste estudo.

- A Profª. Drª. Silvia Maia Farias de Carvalho, pelo apoio ao desenvolvimento da pesquisa e orientação acadêmica.

- Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Morais de Sá pela acolhida no serviço de Imunologia, atenção e confiança.

- A Profª. Drª. Regina Maria Papais Alvarenga, Coordenadora da Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Neurologia, meus agradecimentos pela oportunidade, atenção, objetividade e competência na transmissão de conhecimentos.

- Ao Prof. Fernando Samuel Sion pelo carinho, apoio e incentivo ao desenvolvimento desta pesquisa.

- Ao Corpo Docente do Curso de Mestrado em Neurologia da UNIRIO, por todos os ensinamentos transmitidos;

- Aos colegas do Curso de Mestrado em Neurologia da UNIRIO, pelo companheirismo;

- Ao farmacêutico Luiz Cláudio Pereira Ribeiro, pela ajuda na conferência das diluições realizadas durante o estudo, incentivo e amizade;

- A biomédica Maria de Fátima Nahal Sanches de Carvalho, pela orientação profissional, incentivo, amizade e carinho;

- Ao Prof. Adilson José de Almeida, pela orientação acadêmica, incentivo e amizade;

- A minha amiga Rosangela de Souza Kalil, pela orientação profissional, incentivo, amizade e carinho;

- A todos os colegas de trabalho do Laboratório de pesquisa em Imunologia e Aids pelo carinho, incentivo e amizade;

- A todos os funcionários do Laboratório de LCR do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho pela colaboração na separação e armazenamento das amostras, incentivo e amizade;

- Aos médicos e funcionários do ambulatório de Neuroinfecção pelo atendimento dos pacientes e coleta do LCR.

- Ao secretário do Curso de Mestrado em Neurologia, Luiz Eduardo da Cruz Veiga pela eficiência, atenção e colaboração durante o período de estudo;

- Aos pacientes pela participação;

- A minha família, pela compreensão nos momentos em que estive ausente nestes dois anos.

- Ao Jonatan Pereira Valente, meu namorado, pelo apoio, incentivo, carinho, compreensão e paciência.

- A DEUS meu criador, minha luz e meu caminho.

"Tenha sempre bons pensamentos,
porque os seus pensamentos se
transformam em suas palavras.

Tenha boas palavras,
porque as suas palavras se
transformam em suas ações.

Tenha boas ações
porque as suas ações se
transformam em seus hábitos.

Tenha bons hábitos
porque os seus hábitos se
transformam em seus valores.

Tenha bons valores
porque os seus valores se
transformam no seu
próprio destino".

Ghandi

RESUMO

Introdução: O vírus linfotrópico de células T humanas do tipo I (HTLV-I) foi o primeiro retrovírus a ser isolado em seres humanos. O vírus tem sido associado a um tipo de doença linfoproliferativa humana denominada leucemia/linfoma de células T do adulto e a um tipo de mielopatia crônica progressiva, a mielopatia associada ao HTLV-I ou paraparesia espástica tropical (HAM/TSP). A HAM/TSP é mielopatia de progressão lenta. Durante a evolução da doença ocorre em geral um período de estabilidade com duração de vários anos. Sintomas freqüentes consistem em: fraqueza assimétrica de membros inferiores, lombalgia, incontinência urinária e impotência. O diagnóstico laboratorial da HAM/TSP baseia-se na demonstração da presença de anticorpos anti-HTLV-I no soro e líquido cefalorraquiano (LCR). O método de Western blot (WB) identifica anticorpos contra proteínas virais específicas e vem sendo utilizado como teste confirmatório da infecção primariamente no compartimento periférico (soro ou plasma). No LCR é importante a identificação da origem dos anticorpos, se provenientes do soro ou de síntese intratecal (produzidos no sistema nervoso central), e contra qual proteína do vírus estão sendo produzidos. Apresentamos uma avaliação do método de WB no LCR como ferramenta auxiliar para o estudo da síntese intratecal de anticorpos anti-HTLV-I. **Objetivo:** O presente estudo consiste em adaptar o teste de WB para análise de síntese intratecal de anticorpos para HTLV-I na HAM/TSP e demonstrar quais as proteínas estudadas no teste WB que provocam resposta imunológica no sistema nervoso central (SNC). **Materiais e Métodos:** Amostras de LCR e soro de uma paciente com o diagnóstico de HAM/TSP atendida no HUGG/UNIRIO foram repetidamente analisadas. O exame de rotina do LCR incluiu citologia, bioquímica, barreira hemato-LCR, índice de IgG e teste de ELISA para HTLV-I/II. As amostras de soro foram previamente diluídas conforme concentração de IgG total do LCR. Com base nestes dados realizou-se analise pareada de LCR e soro utilizando o teste WB para HTLV-I (HTLV-BLOT 2.4 - Genelabs Diagnostics). Presença de bandas mais intensas no LCR do que soro ou visualizadas unicamente no LCR foram consideradas indicativas de síntese local de anticorpo específico. **Resultados:** Ensaios do teste de WB foram realizados na busca de uma diluição ideal que pudesse verificar a presença de bandas no LCR como prova da síntese intratecal de anticorpo específico. A diluição ideal encontrada foi demonstrada no ensaio que incluí as seguintes razões: 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16. O teste de WB realizado mostrou impregnação mais intensa na tira de nitrocelulose de anticorpos contra proteínas: rgp46-I, p24, gp21 e GD21 em amostras de LCR do que nas do soro, em idênticas diluições. O teste foi repetido em alíquotas diferentes da mesma paciente quatro vezes em dias alternados e o mesmo resultado foi obtido. **Conclusão:** O teste de WB é instrumento preciso que pode seu utilizado para avaliação da síntese intratecal de anticorpos específicos para HTLV-I. No SNC, ocorre resposta imunológica específica no SNC às proteínas de envelope do vírus HTLV-I (rgp46-I, GD21, gp21) e do core (p24).

Palavras-chave: Liquido cefalorraquidiano, HAM/TSP, síntese intratecal, HTLV-1, w*estern blot*.

ABSTRACT

Introdution: Human lymphotropic virus type I (HTLV-I) was the first retrovírus it be isolated. This virus is associated with adult T-cell leukemia and a chronic progressive neurologic disease known as HTLV-I- associated myelopathy-tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). HAM/TSP is a neurologic syndrome characterized by slowly progressive spastic paraparesis associated with mild sensory abnormalities and disturbances of bladder function. Symptoms frequent consist of: asymmetrical weakness of lower members, backache, urinary incontinence and impotence. The laboratory diagnosis is based on the presence of antibodies to HTLV-I in both serum and cerebrospinal fluid (CSF). Western blot (WB) assays identifies antibodies against specific viral proteins and is used, primarily in the periphral compartment (serum or plasma) as a confirmatory test of HTLV-I infection. In the LCR is important the identification of the origin of the antibodies, if originating from the serum or of intrathecal synthesis (produced in the central nervous system), and against which protein of the virus are being produced. It has been shown that WB assays may identify specific viral proteins and can be used as an indication of productive central nervous system (CNS) infection. We present an analysis of WB assays as an auxiliary tool for the study of intrathecal synthesis of anti-HTLV-I antibodies. **Objective**: The present study aims to adapt the WB test for analysis of intrathecal synthesis of HTLV-I antibodies in HAM/TSP and to demonstrate which specific proteins are synthesized in the central nervous system. **Methods** CSF and serum samples of a patient with the diagnosis of HAM/TSP attended in the HUGG/UNIRIO were analyzed. The CSF exam included cytology, biochemical, intra-blood-CSF barrier and IgG index and ELISA test for HTLV-I. The serum samples were previously diluted at the same concentration of total IgG in the CSF. We then performed paired CSF and serum Western blot assays for HTLV-I antibodies (HTLV-BLOT 2.4 – Genelabs Diagnostics). Presence of more intense bands in the CSF, when compared to serum, or bands visualized only in the CSF was considered indicative of local synthesis. **Results:** Attempt of the WB test were carried out in the search of an ideal dilution that could verify the presence of bands in the LCR, test of the synthesis intratecal of specific antibody. The ideal dilution found was shown in the assay that included the following reasons: 1:2, 1:4, 1:8 and 1:16. The test of WB carried out, showed more intense impregnation in the strip of nitrocelulose of antibodies against proteins: rgp46-I, p24, gp21 and GD21 in sample of CSF than in the serum, in identical dilutions. Different rate the same patient had been repeated four times in alternate days and same result was obtained. **Conclusion:** The test of WB showed to be an instrument of evaluation for intrathecal synthesis of specific antibodies to HTLV-I. Its use provided the identification of the immunological answer to the proteins of the HTLV-I virus envelope (rgp46-I, GD21, gp21) and core (p24) in the SNC.

Keywords: Cerebrospinal Fluid, HAM/TSP, intrathecal synthesis, HTLV-1, western blot.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Organização Genética do Vírus HTLV-I 19
Figura 2 Distribuição das Proteínas no Vírus HTLV-I 19
Figura 3 Invasão do Vírus na Célula 21
Figura 4 Ciclo de Replicação Viral 21
Figura 5 Representação Esquemática do ELISA positivo 28
Figura 6 Reação de Aglutinação 29
Figura 7 Seqüência esquemática da Reação do WB 31
Figura 8 Exemplo de Resultado de WB 32
Figura 9 Seqüência esquemática de Imunofluorescência Indireta 34
Figura 10 Gráfico Reiber e Felgenhauer, 1987; Reiber e Lange, 1991 43

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1 Testes laboratoriais utilizados para o diagnóstico da infecção pelo HTLV-1..... 27

Tabela 2 Diagnóstico de HAM/TSP segundo recomendações da OMS, 1989 38

Quadro 1 Resumo dos protocolos do teste *western blot* 54

Quadro 2 Diluição do soro para atingir a mesma concentração de IgG do LCR 56

Quadro 3 Diluições das amostras para desenvolvimento do ensaio 57

Quadro 4 Protocolo de pesquisa de anti-HTLV-1 *western blot* 57

Quadro 5 Diluições das amostras para desenvolvimento do ensaio final 58

Quadro 6 Protocolo final de pesquisa de anti-HTLV-1 *western blot* 59

Quadro 7 Relação das proteínas virais do HTLV-1 e presença da resposta imunológica nas diluições realizadas nas amostras 60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP	Aglutinação de partículas
ATL	*Adult t-cell leukemia/lymphoma* ou Leucemia/linfoma de Células T do Adulto
ATLV	*Adult t-cell leukemia/lymphoma Virus* ou Vírus da Leucemia/linfoma de Células T do Adulto
CDC	*Center for Disease Control and Prevention* ou Centro para prevenção e controle de doenças
DNA	*Desoxiribonucleic acid* ou ácido desoxirribonucleico
ELISA	*Enzyme-linked immunosorbent assay* ou ensaio imunoenzimático
EIA	Ensaio imunoenzimático
EM	Esclerose múltipla
Env	envelope
EUA	Estados Unidos da América
FIE	Focalização isoelétrica
Gag	Grupo antigênico
HAM	*HTLV-1 - associated myelopathy* ou mielopatia associada ao HTLV-1
HAM/TSP	*HTLV-1 - associated myelopathy/ Tropical spastic paraparesis* ou Mielopatia associada ao HTLV-I/ Paraparesia espástica tropical
HIV	*Human immunodeficiency vírus* ou vírus da imunodeficiência
HLA	*Leucocyte antigen* ou Antígeno leucocitário humano
HTLV-I	*Human T-lymphotropic retrovírus type* I ou retrovírus linfotrópico de células T humanas
HUGG	Hospital Universitário Gaffrée e Guinle
IFI	Imunofluorescência Indireta
IgG	Imunoglobulina do tipo G
IgM	Imunoglobulina do tipo M
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LTRs	*Long terminal* repeats ou seqüência longa repetida
MS	Mato Grosso
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	*Polymerase chain* reaction ou Reação em cadeia de polimerase
Pol	polimerase
Rex	*Regulator of expression* ou gene regulador de expressão

RNA	*Ribonucleic* acid ou ácido ribonucléico
RIPA	Radioimunoprecipitação
SNC	Sistema nervoso central
Tax	*Transactivator* ou gene de transativação
TSP	*Tropical spastic paraparesis* ou paraparesia espástica tropical
UNIRIO	Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
WB	*Western blot*

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO** 15
2 **REVISÃO DA LITERATURA** 17
2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS 17
2.2 CLASSIFICAÇÃO E ESTRUTURA DO HTLV-I 18
2.3 EPIDEMIOLOGIA E PREVALÊNCIA DO VÍRUS HTLV-I 22
2.4 VIAS DE TRANSMISSÃO 25
2.5 MÉTODOS DE INVESTIGAÇÃO LABORATORIAL 26
2.5.1 **Testes imunológicos** 27
2.5.2 **Biologia molecular** 35
2.6 DOENÇAS ASSOCIADAS AO HTLV-I 36
2.7 MIELOPATIA ASSOCIADA AO HTLV-I/ PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL (HAM/TSP) 37
2.7.1 **Patogênese** 38
2.7.2 **Critério Diagnóstico** 39
2.7.3 **Exame de rotina do líquido cefalorraquidiano (LCR)** 41
2.7.4 **Pesquisa de Anticorpos do HTLV-I no LCR** 44
3 **JUSTIFICATIVA DO ESTUDO** 47
4 **OBJETIVOS** 48
4.1 OBJETIVO GERAL 48
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 48
5 **METODOLOGIA** 49
5.1 DESENHO DO ESTUDO 49
5.2 AMOSTRAS 49
5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO 50
5.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO 50
5.5 EXAME DO LCR 51
5.6 ADAPTAÇÃO DO TESTE WESTERN BLOT PARA DEMONSTRAÇÃO DE BANDAS ESPECÍFICAS DO HTLV-I DE SÍNTESE INTRATECAL 51
5.6.1 **Preparação dos reagentes do teste de WB** 51
5.6.2 **Procedimento do teste de WB** 52
5.6.3 **Resumo** 54
5.7 ASPECTOS ÉTICOS 54

6 **RESULTADOS** 55
6.1 EXAME DE ROTINA DO LCR 55
6.2 TESTE WB COMO INSTRUMENTO DE AVALIAÇÃO DE SÍNTESE INTRATECAL DE ANTICORPO PARA HTLV-I 55
6.3 IDENTIFICAÇÃO DAS BANDAS ESPECÍFICAS DO HTLV-I DE SÍNTESE INTRATECAL 60
6.4 PRECISÃO DO TESTE 60
7 **DISCUSSÃO** 62
8 **CONCLUSÕES** 73
REFERÊNCIAS 74
ANEXO A - Carta de aprovação do Comitê de Ética 83
ANEXO B - Carta de consentimento informado ao paciente 84
APÊNDICE A - Resultado do procedimento do teste de WB nº 01 87
APÊNDICE B - Resultado do procedimento do teste de WB nº 02 88
APÊNDICE C - Resultado do procedimento do teste de WB nº 03 89
APÊNDICE D - Resultado do procedimento do teste de WB nº 04 90
APÊNDICE E - Resultado do procedimento do teste de WB nº 05 91

1 **INTRODUÇÃO**

O vírus linfotrópico de células T humanas do tipo I (HTLV-I) pertence à família *Retroviridae* (POIESZ et al., 1980). É um vírus envelopado, possui genoma com duas fitas simples de RNA disposta na seqüência gag, pol, env, *X.* A seqüência *X* origina três proteínas: tax, rex e p21 (FRANCHINI, 1995). Após penetração na célula, libera RNA viral, que é transcrito em DNA de fita dupla pela enzima transcriptase reversa; penetra no núcleo onde se integra ao DNA celular, formando o DNA proviral (SEIKI et al., 1983).

O vírus HTLV-I está associado a um tipo de manifestação neurológica: a mielopatia associada ao HTLV-I / paraparesia espástica tropical (HAM/TSP). Esta enfermidade caracteriza-se pelo acometimento da medula espinhal de predomínio torácico, paraparesia espástica lentamente progressiva, associada à alteração sensitiva do tipo dormência nos membros inferiores, dor lombar e distúrbio de função da bexiga (retenção ou incontinência urinária). O diagnóstico laboratorial está baseado na demonstração da presença de anticorpos anti-HTLV-I no soro e líquido cefalorraquidiano (LCR) (OSAME, 1990).

O exame do LCR na HAM/TSP apresenta reação inflamatória caracterizada por leve pleocitose, síntese intratecal de IgG total e presença de anticorpos para HTLV-I. A determinação de níveis de imunoglobulinas do LCR pode representar passagem de imunoglobulinas do sangue através da barreira hemato-LCR ou síntese intratecal no SNC. A demonstração de síntese intratecal de IgG representa o parâmetro mais sensível da reação inflamatória local que ocorre no LCR da HAM/TSP (presente em 95% dos pacientes) (PUCCIONI-SOHLER et al., 2001). A

demonstração da síntese intratecal de anticorpos anti-HTLV-I reflete a reação imune dirigida contra organismo especifico (PUCCIONI- SOHLER et al., 1999). Síntese intratecal de anticorpo anti-HTLV-I foi evidenciada em 85% dos pacientes com HAM/TSP, com base na análise do índice de anticorpo especifico. Este método quantitativo correlaciona a concentração de anticorpos específicos no LCR e soro, utilizando um teste ELISA contendo antígenos provenientes de um lisado viral do HTLV-I (PUCCIONI-SOHLER et al., 1995a, 2001; KITZE et al., 1995).

2 **REVISÃO DE LITERATURA**

2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS

Em meados da década de 70, no Japão, Takatsuki et al. (1977) descreveram uma doença linfoproliferativa altamente agressiva e prevalente, como leucemia /linfoma de células T do adulto (ATL). Por possuir distribuição geográfica restrita a certas regiões do sul do Japão, propuseram que o agente causal da enfermidade poderia ser um vírus (TAKATSUKI et al.,1977; UCHIYAMA et al., 1977).

No final dos anos 70, nos Estados Unidos, o primeiro retrovírus patogênico humano foi descoberto por Poiesz, e então, denominado vírus linfotrópico de células T humano do tipo I (HTLV-I), originalmente isolado de uma paciente com forma cutânea de linfoma de células T, de evolução agressiva e semelhante ao já descrito por Takatsuki et al. (1977). No Japão, em 1982 verificou-se a existência de um retrovírus, que foi chamado vírus da leucemia de células T do adulto (ATLV) a partir de células de pacientes com ATL (YOSHIDA et al., 1982). Após análise de sequenciamento genético das proteínas virais dos dois retrovírus denominaram-no de HTLV-I, pois ficou estabelecido que ambos fossem idênticos (SEIKI et al., 1983).

A origem do vírus linfotrópico de células T humanas do tipo I (HTLV-I) não está bem definida, com isso, tem sido sugerido que a infecção em humanos se originou na África e foi levada para as ilhas do Caribe pelo tráfico de escravos, para o Japão pela tripulação africana dos navios portugueses - e também tráfico de escravos – nos séculos XVI e XVII (CATALAN-SOARES et al., 2001).

Em 1985, Gessain et al. observaram em indivíduos da Martinica anticorpos para HTLV-I pesquisados no soro de 17 pacientes, todos apresentavam uma síndrome denominada paraparesia espástica tropical (TSP). Estudos em Kagoshima, uma das áreas endêmicas do HTLV-I no Japão, analisaram anticorpos anti HTLV-I em amostras de soro e LCR de seis pacientes. Todos apresentavam paraparesia espástica progressiva e altos títulos de anticorpos anti HTLV-I no soro e LCR (OSAME et al., 1986). Desta maneira, foi então evidenciado o caráter neurotrópico do HTLV-I (SANTOS et al., 2005). A TSP e a HAM apresentavam as mesmas características clínicas e patológicas, e desde 1988, recomendou-se que a mielopatia associada ao HTLV-I fosse identificada como HAM/TSP (WHO, 1989).

2.2 CLASSIFICAÇÃO E ESTRUTURA DO HTLV-I

O HTLV-I é um retrovirus que pertence à família *Retroviridae*, subfamília O*ncovirinae* e apresenta morfologia de partícula tipo C e tem diâmetro de aproximadamente 100nm. É um vírus que apresenta genoma com duas fitas simples de RNA dentro de nucleocapsídio icosaédrico envolto por uma membrana lipoprotéica (CANN et al., 1996). O genoma possui 9.032 pares de bases. Sua estrutura genética similar à dos demais retrovírus, possui os genes do grupo antigênico (gag), polimerase (pol) e de envelope (env), e genes dos flancos das terminações longas repetidas (LTRs). A região gag é inicialmente traduzida em uma proteína precursora (p53) que sofre clivagem e origina as proteínas que correspondem a matriz (p19), ao capsídeo (p24) e ao nuclecapsídeo (p15); a região pol contém os sinais para a produção da transcriptase reversa, RNAseH e integrase; a região env tem como produto de tradução uma proteína glicosilada de 61 a 69 kDa que é clivada em duas proteínas, a gp46 de superfície e gp21 transmembrana. As

LTRs consistem nas regiões U3, R e U5. A região U3 contém essencialmente elementos da transcrição viral. A região R contém a maioria dos elementos responsáveis pela Rex, a qual está superposta na parte 3' da região U3. Somados, temos o gene pX contendo os genes reguladores tax e rex, localizado na região 3' do gene *env*. A região pX contém 4 aberturas de leituras da estrutura e código das 3 maiores proteínas reguladoras, p40 tax, p27 rex e p21 rex (FRANCHINI, 1995; KUBOTA et al., 2000). (Figuras 1 e 2).

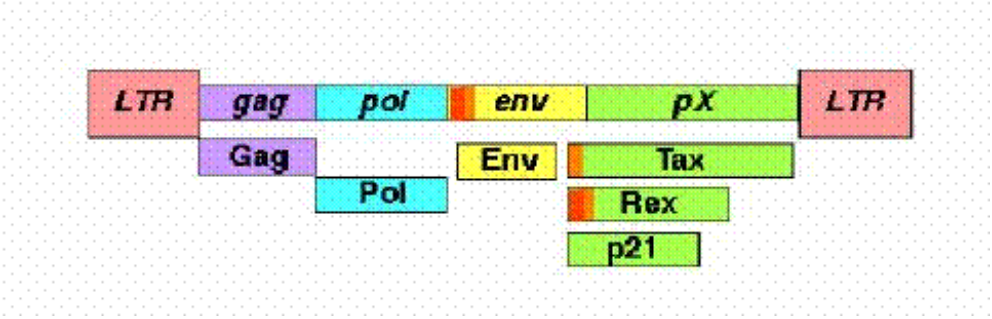


Figura 1: Organização genética do virus HTLV-I
Fonte: www.ims.u-tokyo.ac.jp
Acesso em: 03 mar. 2007 , 15:00h

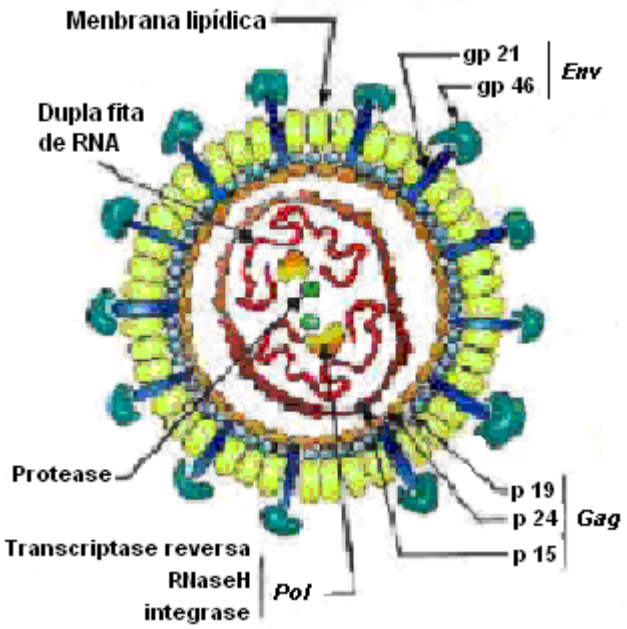


Figura 2: Distribuição das proteínas no vírus
Fonte: aupec.univalle.edu.com
Acesso em: 03 mar. 2007, 15:05h

A $p40^{Tax}$ é uma fosfoproteína nuclear que age na transativação gênica e tem um efeito positivo sobre a replicação viral. A $p27^{Rex}$ é uma proteína nucleolar que participa na regulação de expressão viral ao nível pós-transcripcional. O papel da proteína $p21^{Rex}$ permanece desconhecido (KORALNIK e GESSAIN, 1994).

O HTLV-I tem como alvos principais da infecção vários tipos de células T, particularmente os linfócitos T $CD4^{+}$ (VERONESI, 1997). Seu ciclo replicativo é comum a todos os retrovírus e ocorre em duas fases. A primeira fase é iniciada pela ligação das glicoproteínas do envelope viral à superfície da célula hospedeira. O envoltório do vírus funde-se com a membrana plasmática celular liberando o nucleocapsídeo no citoplasma da célula.O RNA genômico do vírus é transcrito em DNA de fita dupla pela transcriptase reversa e então a integrase viral catalisa a integração do DNA viral no genoma da célula hospedeira, na forma de provírus. Estas etapas são executadas pelas proteínas contidas no virion infectante. A segunda fase consiste na síntese e processamento do genoma (mRNAs) e das proteínas virais, utilizando componentes moleculares da célula hospedeira e em algumas ocasiões utilizam produtos específicos dos genes virais. A montagem do vírus precede com englobamento do genoma pelas proteínas codificadas pelos genes gag e gag-pol, processamento dos produtos, associação do nucleocapsídeo com a membrana da célula e liberação de nova partícula viral por brotamento (VARMUS e SWANSTROM, 1982) (Figura 3 e 4). Esta estratégia parece ser fundamental para manter a habilidade dos retrovírus em induzir infecção e doenças latentes crônicas durante toda a vida (VERONESI, 1997).

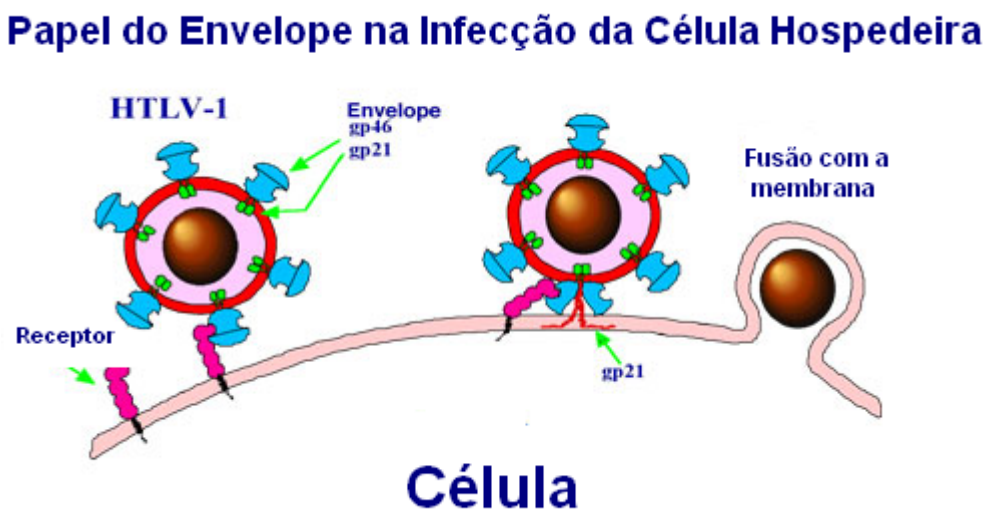


Figura 3: Esquema da invasão do vírus na célula
Fonte: www.dundee.ac.uk/biomedres/images/brighty2.jpg
Acesso em: 03 mar. 2007 , 15:10h

O vírus passa a fazer parte da célula infectada pelo hospedeiro.

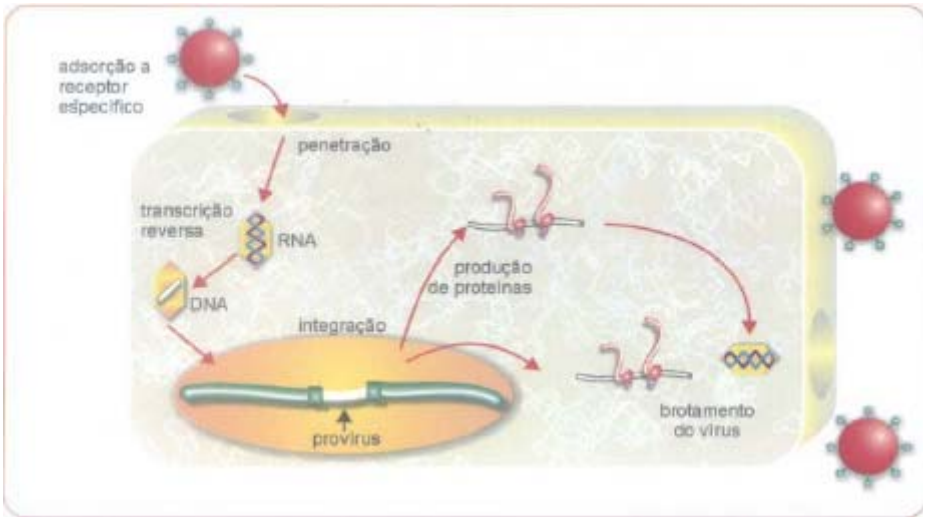


Figura 4: Esquema do ciclo de replicação viral
Fonte:http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cd08_08.pdf
Acesso em: 05 set. 2007 , 21:05h

2.3 EPIDEMIOLOGIA E PREVALÊNCIA DO VÍRUS HTLV-I

São diversas as áreas endêmicas no mundo para infecção pelo HTLV-I. No Japão, foram testados soros de adultos originários de 15 regiões diferentes para um grande estudo soroepidemiológico para detectar anticorpos anti HTLV-I, sendo observada alta prevalência em sete regiões: Wakayama (13%), na ilha de Honshu; Fukuoka (17%), Nagasaki (37%) e Kagoshima (24%) na ilha de Kyushu; Uwajima (6%) na ilha de Shikoku e na ilha de Okinawa (10%) (KAJIYAMA et al., 1986).

O HTLV-I também é endêmico no Caribe, África, Melanésia, América Central e do Sul, incluindo Panamá, Colômbia, Venezuela e Brasil (BANGHAM et al., 2000; IJICHI e OSAME, 1995). No Caribe a soroprevalência de 5 a 8% tem sido encontrada na população da Jamaica, Trinidad-Tobago, Barbados e Haiti. Estudo realizado em 13.260 jamaicanos oriundos de diversas partes da ilha mostrou que o HTLV-I naquela região está intensamente ligado a idade e ao sexo. A soroprevalência nos homens variou de 1,7% (10 a 19 anos) a 9,1% (>70 anos) e nas mulheres de 1,9% (10 a 19 anos) a 17,4% (>70 anos) (BLATTNER et al., 1990; MURPHY et al., 1991).

No Panamá, trabalho realizado em 745 indivíduos residentes na cidade do Panamá e Colón, mostraram que 5% das pessoas possuíam anticorpos para HTLV-I (REEVES et al., 1988). Na Colômbia, entre 670 indivíduos estudados em populações residentes na região da costa sul do Pacífico, a soroprevalência para HTLV-I variou de 0,9 a 4,3% dependendo do grupo populacional e variando também com a idade e sexo. Pessoas com idade acima de 40 anos apresentaram maior soroprevalência

(6,2%) que os indivíduos mais jovens (1%) e nas mulheres a soropositividade (3,3%) foi maior que nos homens (1%) (MALONEY et al., 1989).

Esporadicamente alguns casos foram relatados em áreas não endêmicas como Estados Unidos (EUA) e Europa, especialmente em imigrantes de áreas endêmicas do HTLV-I e usuários de drogas endovenosas. No Hawaii, pacientes com HAM/TSP são identificados entre os imigrantes japoneses (IJICHI e OSAME, 1995).

No Brasil, o HTLV-I foi inicialmente descrito em 1986, por Kitagawa et al., na comunidade japonesa residente em Campo Grande (MS), com soroprevalência de 13%, sendo a maioria dos indivíduos oriundos de Okinawa, uma região endêmica para HTLV-I no Japão. Também foram estudados 51 imigrantes japoneses em São Paulo, não provenientes de Okinawa, sendo todos negativos (KITAGAWA et al., 1986). Estudos realizados em populações de risco demonstraram a taxa de positividade em prostitutas da zona rural de 1% e em hemofílicos de 13% nos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo (CORTES et al.,1989). O HTLV-I está presente em todas as regiões brasileiras, com prevalências variadas de um estado para outro, sendo Bahia, Pernambuco e Pará os mais elevados (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002). Estudos sobre a prevalência do vírus em doadores de sangue das diferentes regiões geográficas brasileiras demonstraram que a prevalência da infecção varia nessas regiões, sendo 0,08% no norte e no sul do país (Manaus e Florianópolis); 0,33% no nordeste e no sudeste (Recife e Rio de Janeiro) e 1,35% em Salvador (SANTOS et al., 2005).

Em 1989 foi publicado o primeiro artigo no Brasil sobre HAM/TSP por Castro-Costa et al.; questionando a possível origem viral. Realizado no Ceará com 10 pacientes com faixa etária de 21 a 59 anos, todos de raça negra, discreto predomínio de mulheres, com clínica compatível com os critérios descritos por Roman et al.(1985) para estabelecer o diagnóstico de TSP. Entretanto, estes pacientes não tiveram testes para HTLV-I realizados naquele período.

Em outro estudo também em 1989 Castro et al., publicaram um trabalho, onde 16 pacientes foram estudados com mielopatia crônica de causa indeterminada e 13 doentes com esclerose múltipla. Pesquisa de anticorpos anti-HTLV-I foi realizado no soro pelo teste de WB onde seis pacientes (37,5%) foram positivos para HTLV-I no primeiro grupo e um (7,6%) no segundo. Esta foi a primeira evidência nacional da associação da infecção por HTLV-I com neuropatias de caráter paraparético.

Em São Paulo, um estudo pesquisou a presença de anticorpos contra HTLV-I no soro e LCR de 150 pacientes com afecções do sistema nervoso, particularmente mielopatias. Os pacientes foram considerados em três grupos de acordo com a possível relação entre a doença e presença de anticorpos do HTLV-I: sem risco de relação(grupo controle); grupo de risco opcasional; grupo de risco possível com 56 pacientes com paraparesia ou paraplegia de etiologia não esclarecida (PE). A técnica de aglutinação de partículas foi a utilizada onde o terceiro grupo apresentou positividade de 55,4% (SPINA-FRANÇA et al., 1990).

.

Um estudo realizado na Bahia com 367 indivíduos avaliou a soroprevalência de HTLV-I em TSP. Encontraram 16 casos positivos entre 28 pacientes com TSP. O soro de três cônjuges de pacientes com TSP estudados foi positivo. Entre os 36 casos de outras neuropatias com envolvimento de pernas, um foi positivo. Entre os 26 pacientes que sofriam de dores de cabeça e os 96 indivíduos saudáveis nenhum foi positivo. Os demais casos foram: 5 positivos entre 64 prisioneiros, um positivo entre as 99 mulheres grávidas e dois casos positivos entre os doadores de sangue HIV positivos. A soroprevalência total no grupo estudado foi de 7,65% sendo a prevalência de infecção por HTLV-I maior em mulheres que em homens com TSP e entre os indivíduos de grupos de risco para HIV (MORENO-CARVALHO et al., 1992).

No Rio de Janeiro estudo realizado a partir de um caso de TSP, quatro gerações de uma família brasileira de descendência africana, quanto à infecção por HTLV-I e sua associação com manifestações neurológicas e os possíveis meios de transmissão viral. Trinta e dois indivíduos foram testados e a infecção foi detectada em oito (25%). Dos infectados, 3 apresentavam TSP e quatro, distúrbios neurológicos sub-clínicos (CAVALCANTI et al., 1993).

2.4 VIAS DE TRANSMISSÃO

O HTLV-1 é transmitido via vertical (da mãe para o filho), via parenteral (transfusão sanguínea), via horizontal (relações sexuais) e uso de drogas endovenosas (WHO, 1989; MANNS et al., 1999). Estas formas de transmissão são semelhantes às do HIV, contudo a transmissão do HTLV-I é menos eficiente que a do HIV, em virtude de estar estritamente ligada à célula (KAMIHIRA, 1987).

A transmissão de mãe para o filho ocorre possivelmente de três maneiras: infecção via transplacentaria, contaminação via canal da parturiente, durante o parto e pela amamentação (SUGIYAMA, 1986).

A transmissão via perenteral ocorre através da transfusão de sangue contaminado e seus produtos. No Japão estudos mostraram que sangue total, concentrado de hemácias e plaquetas é responsável por uma taxa de infecção de 64% (OKOCHI et al., 1984). Dos componentes celulares o que apresenta maior risco de transmissão é a plaqueta, possivelmente porque ela é mais facilmente contaminada com linfócitos (DONEGAN et al., 1989).

A transmissão via horizontal acontece entre parceiros sexuais infectados e parece ser mais eficiente do homem para a mulher do que o inverso. Entende-se que a infecção adquirida através da atividade sexual seja resultado dos linfócitos infectados presentes no sêmen. Este tipo de contaminação ocorre principalmente na atividade sexual repetida entre homem e mulher (KAJIYAMA et al., 1986). Fatores de risco para transmissão sexual homem-mulher do HTLV-I e II foram avaliados em doadores de sangue soropositivos e suas parceiras de longa duração. A elevada carga viral, elevados títulos de anticorpos e duração do relacionamento, foram os principais fatores reunidos (KAPLAN et al., 1996).

2.5 MÉTODOS DE INVESTIGAÇÃO LABORATORIAL

A infecção por HTLV-I/II induz no hospedeiro a uma resposta imune, com a produção de anticorpos dirigidos para uma variedade de proteínas virais específicas.

O diagnóstico sorológico da infecção baseia-se na detecção destes anticorpos contra proteínas virais. Segundo os critérios da OMS são realizados testes de triagem (ELISA ou EIA e aglutinação de partículas de látex) e confirmatórios (Western blot, radioimunopreciptação e Imunofluorescência indireta) (OSAME, 1990).

Tabela 1: Testes laboratoriais utilizados para o diagnóstico da infecção pelo HTLV I/II

Teste	***Categoria***
ELISA (teste imunoenzimático)	triagem
Aglutinação de partículas (látex ou gelatina)	triagem
IFP (imunofluorescência indireta)	confirmatório
WB (Western blot)	Confirmatório
RIPA	Confirmatório
PCR	confirmatório

2.5.1 **Testes imunológicos**

A) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA é o teste de escolha para triagem da maioria dos marcadores de doenças infecciosas, pois é de fácil uso, reprodutível, sensível, tem potencial de automação e custo mais acessível.

É um ensaio que utiliza o vírus obtido de cultura de células infectadas pelo HTLV-I para sensibilizar a fase sólida. As amostras e os controles são incubados

com o antígeno e os eventuais anticorpos presentes nas amostras se ligarão especificamente, formando o complexo imune ligado a fase sólida. A seguir é colocada uma anti-globulina humana conjugada a uma enzima que se ligará especificamente ao complexo antígeno-anticorpo da fase sólida, caso este esteja presente. A reação é revelada pela adição do substrato, com desenvolvimento de cor nas reações positivas, proporcional à quantidade de anticorpos para HTLV presentes nas amostras (TAGUSHI et al, 1983) (Figura 5). O teste apresenta sensibilidade de 99,7% e especificidade maior que 99% para o diagnóstico de infecção no soro pelo HTLV-I, conforme bula do kit (ELISA HTLV I/II 3.0).

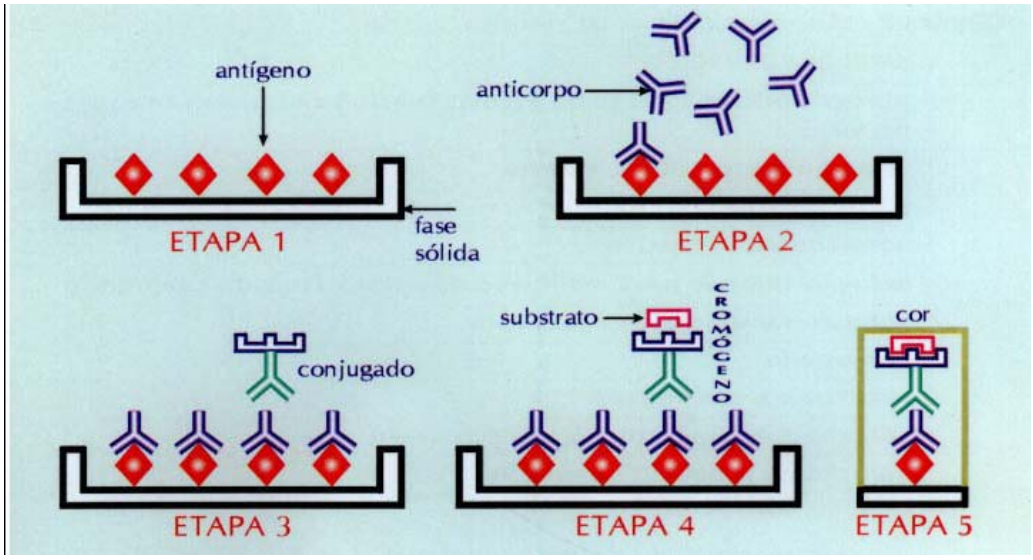


Figura 5: Representação esquemática do ELISA positivo
Fonte: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cd08_08.pdf
Acesso em: 05set. 2007, 21:10h.

O método de ELISA é usado para pesquisa de anticorpos de HTLV-I no LCR de pacientes com HAM/TSP (LESSA et al., 1993). Em estudo com 81 pacientes paraparesia espástica e infecção pelo HTLV-I, a triagem do LCR foi realizada com o teste de ELISA. A presença de anticorpos foi encontrada em 80 dos 81 pacientes. Neste estudo, o teste de ELISA para o LCR teve uma sensibilidade de 99% e

especificidade de 41% para o diagnóstico da HAM/TSP (PUCCIONI-SOHLER et al., 2001).

B) Aglutinação de Partículas de Gelatina (AP)

Este método não requer equipamento especial, consiste de uma reação simples, de um só passo, cuja leitura pode ser feita visualmente. É um teste rápido, de fácil execução e apresenta boa reprodutibilidade e alta sensibilidade.

O teste de AP baseia-se no princípio da aglutinação indireta. Os antígenos virais obtidos a partir de cultura de células, são absorvidos à partículas de gelatina e os anticorpos anti-HTLV contidos na amostra, reagem com estes antígenos, provocando a aglutinação das partículas (Figura 6). A reação é realizada em placas de micro-titulação, utilizando-se como controle partículas não sensibilizadas. Com o uso de partículas de gelatina como portadoras de antígenos virais purificados como agentes sensibilizantes podem ser eliminadas as reações não específicas, que ocasionalmente ocorrem em algumas amostras. Estas amostras são absorvidas com partículas não sensibilizadas e o teste é então repetido (IKEDA et al, 1984).

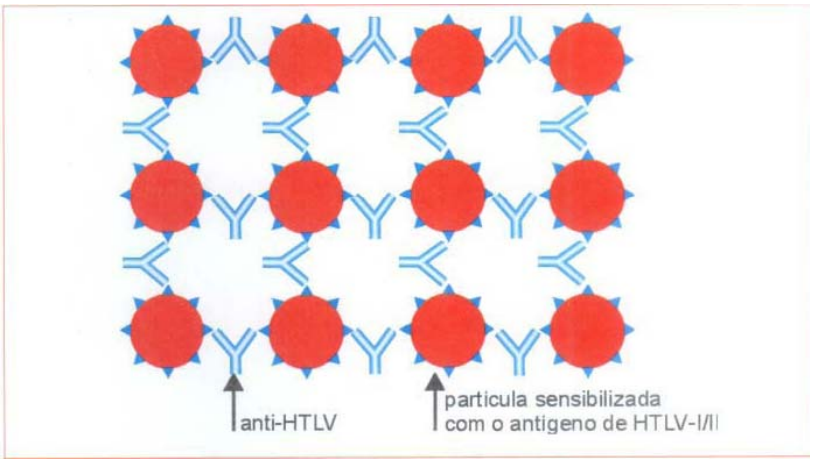


Figura 6: Esquema da reação de aglutinação
Fonte: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cd08_08.pdf
Acesso em: 05set. 2007, 21:15h.

O método de AP é usado como teste de triagem. Seu resultado não é específico, determina a titulação de anticorpos contra o HTLV-I (OSAME et al, 1986). Em 1996, estudo utilizou o exame de AP como escolha para identificação da presença de anticorpos contra HTLV-I nas amostras de soro e LCR em um grupo de 39 pacientes com HAM/TSP (KITZE et al.,1996).

C) Teste de Western Blot (WB)

O teste WB emprega proteínas provenientes de proteínas virais do HTLV-I derivadas de partículas virais rompidas nativas e inativadas e proteínas obtidas por engenharia genética. É utilizado como teste confirmatório em amostras positivas após a triagem sorológica. Pode ser usado para determinar se os anticorpos presentes são específicos e para quais produtos dos genes virais. Apresenta sensibilidade de > 99,9% e especificidade de 92,5% no soro.

O princípio do teste para HTLV-I/II consiste no fato de que os polipeptídios virais nativos do HTLV-I são fracionados de acordo com o peso molecular por eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio. Os polipeptídeos do HTLV-I separados são então transferidos eletroforéticamente do gel para uma membrana de nitrocelulose. A membrana contendo as proteínas do vírus é lavada, bloqueada e cortada em tiras (TOWBIN, 1979).

Na prática diagnóstica, o teste inicia-se com a incubação dos soros sobre as fitas, sendo a reação antígeno-anticorpo revelada pela adição de uma anti-globulina humana conjugada a uma enzima e do respectivo substrato (figura 7).

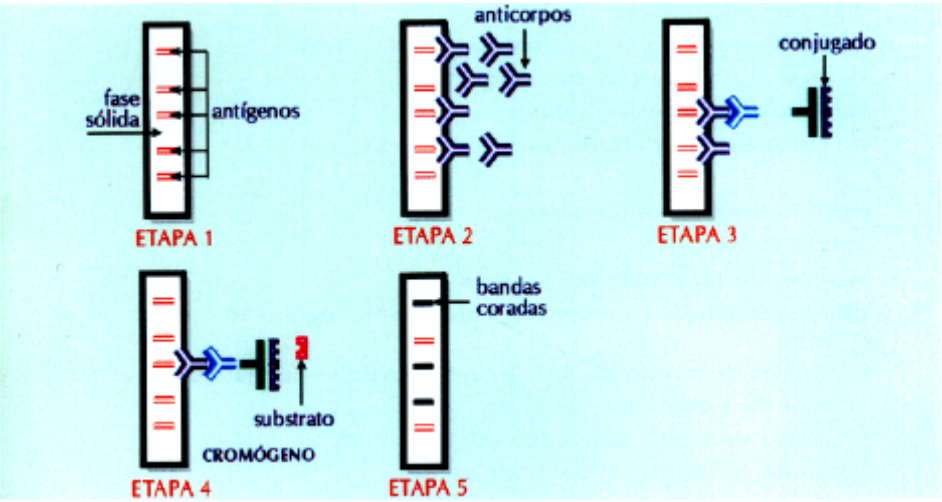
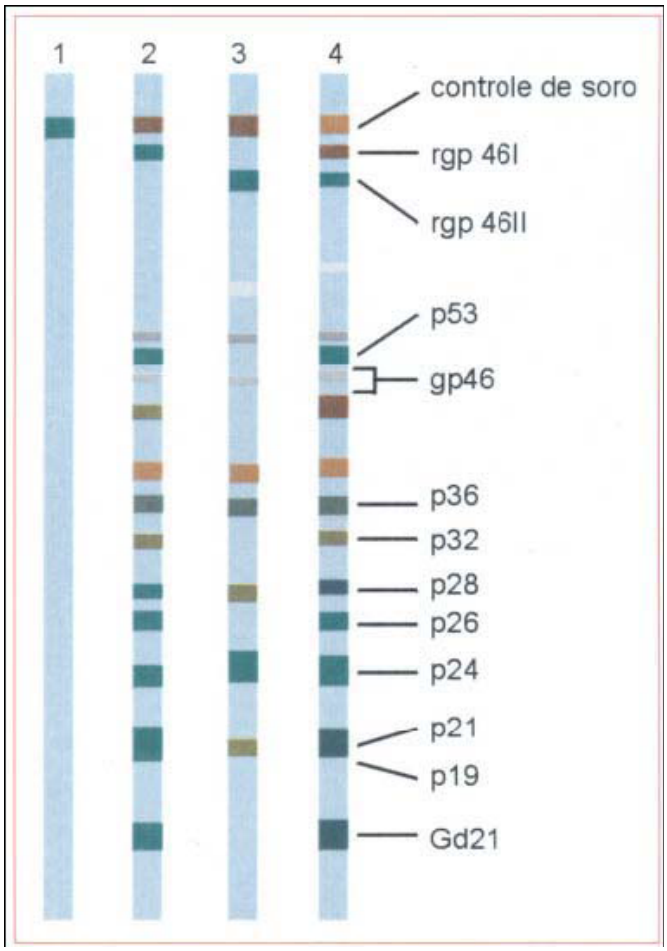


Figura 7: Seqüência esquemática da reação do Western blot.
Fonte: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cd08_08.pdf
Acesso em: 05set. 2007, 21:20h.

A interpretação do WB é feita pela análise da ausência ou presença de anticorpos contra proteínas virais, revelados no teste como bandas, comparando a intensidade das mesmas com a do controle positivo. São adotados os seguintes critérios: a) negativo: ausência de bandas; b) positivo: presença de pelo menos uma proteína do envelope mais a proteína p24 do core; c) indeterminado: presença de bandas, mas que não se enquadram no critério de positividade (GUIDELINES, 1993).

Veja, na figura 8, um exemplo de resultados do WB para HTLV-I/II.



Observe:
* na tira 1, controle negativo;
* na tira 2, o controle positivo para HTLV-I;
* na tira 3, o controle positivo para HTLV-Il;
* na tira 4, infecção pelo HTLV-I/II.

Figura 8: Exemplo de resultados de WB.
Fonte: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cd08_08.pdf
Acesso em: 05set. 2007, 21:25h.

A avaliação por blot é realizada como teste confirmatório das metodologias de triagem (ELISA e AP). O teste de WB é aplicado nas amostras de LCR e soro para confirmar a presença de anticorpos. Em estudo realizado com seis pacientes HAM/TSP, todos apresentaram bandas características no LCR, como p24 e p32 que foram mais notadas em comparação com a p28 e p22 as quais não foram observadas em nenhuma amostra. O autor não relata nenhuma diluição aplicada nas amostras de LCR e soro. (OSAME et al., 1986).

D) Radioimunoprecipitação (RIPA)

É uma técnica na qual células infectadas com o HTLV-I em sua fase *log* de crescimento são expostas a isótopos radioativos (^{35}S-Met), de modo a se obter um lisado celular solúvel que contém proteínas virais radiomarcadas. Os lisados celulares são colocados frente ao soro a ser testado pré-adsorvido a pérolas de Sepharose revestidas de proteínas A. Os imunoprecipitados formados são eluídos e as proteínas virais são separadas por SDS-PAGE e a revelação da reação é feita por autorradiografia (HARTLEY,1990; DEFER, 1995).

É utilizado como teste confirmatório no soro, e apresenta alta sensibilidade para detectar anticorpos direcionados contra as glicoproteínas do envelope, gp46 e gp61. Entretanto a confirmação pelo RIPA é inviável em áreas onde o HTLV-I é endêmico, por causa da sua complexidade e alto custo.

Estudo em 1995 investigou a significância dos anticorpos específicos no LCR utilizando o RIPA como uma das metodologias. A sensibilidade do teste foi primeiro testada com diluições seriadas de controle de soro positivo, mostrando que proteínas da região env e gag poderiam ser precipitadas e claramente visualizadas nas diluições de soro de 1:3000. Isto proporcionou o uso do RIPA para detecção de IgG no LCR. Em todas as amostras de LCR e de soro de pacientes HAM/TSP testados, ambos anticorpos IgG contra proteínas gag (p24) e env (gp68) poderia ser detectado pelo RIPA (KITZE et al., 1995).

E) Reação de Imunofluorescência Indireta (RIF)

Um dos primeiros ensaios desenvolvidos para pesquisa de anti-HTLV-I foi a imunofluorescência indireta. Foi desenvolvido por Hinuma (1981) e tem sido usado para estudos de soroprevalência, principalmente no Japão, em conjunto com a aglutinação de partículas.

Na técnica de RIF para detecção de anticorpos anti-HTLV, células de linhagem MT-1 ou MT-2 infectadas com HTLV-I, ou MOT com HTLV-II, isto é, expressando antígenos virais e células não infectadas são fixadas em lâminas que são incubadas com o soro a ser testado. Se a amostra em questão contiver anticorpos anti-HTLV, estes irão se ligar aos antígenos virais presentes nas células infectadas. A reação é revelada pela adição de uma antiglobulina humana conjugada ao isotiocianato de fluoresceína e evidenciada com o auxílio de um microscópio de fluorescência (Figura 9). Uma reação positiva caracteriza-se pela visualização de fluorescência nas células infectadas. A observação de fluorescência em células não infectadas é indicativo de inespecificidade, em decorrência da presença de anticorpos contra estruturas celulares em algumas amostras (MERINO, 1992).

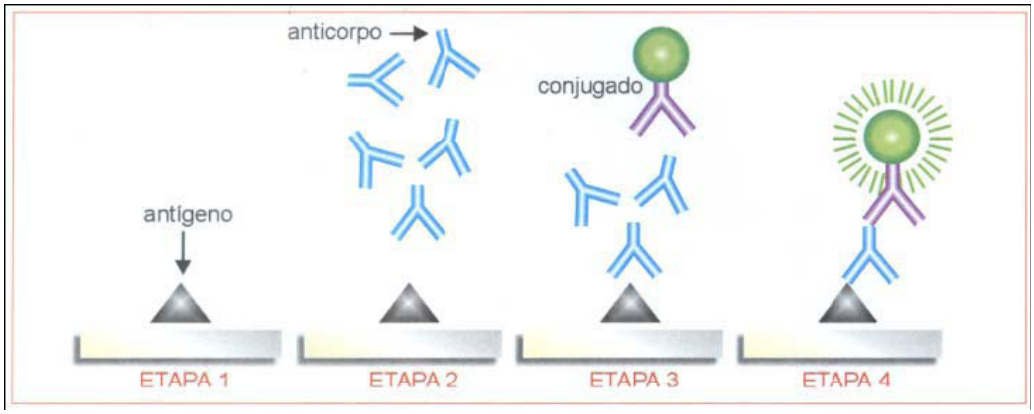


Figura 9: Esquema da **s**eqüência da imunofluorescência indireta.
Fonte: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cd08_08.pdf
Acesso em: 05set. 2007, 21:30h.

Conclusão

Em um trabalho realizado para comparar sensibilidade e especificidade de quatro testes empregados para detecção de anticorpos anti-HTLV-I: imunofluorescência, radioimunoensaio competitivo, aglutinação de partículas de gelatina e ELISA, o teste de AP teve a maior sensibilidade (100%), porém foi o teste menos específico (96,3%) (WHITE, 1988).

2.5.2 **Biologia molecular**

Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

A técnica da reação em cadeia de polimerase foi desenvolvida em 1986 (SAIKI, 1988) onde o princípio da reação em cadeia de polimerase baseia-se no mecanismo natural de duplicação do material genético, que ocorre sempre que uma célula se divide para duas novas. Ela é fundamentada na síntese enzimática de uma seqüência específica de DNA, usando dois iniciadores ou “primers” complementares à fita de DNA molde em regiões que flanqueiam o segmento a ser amplificado. Neste processo, o DNA é desnaturado a uma temperatura de 94-96ºC o que promove a separação da fita dupla em duas fitas simples e complementares de DNA. Esta fase é chamada de “desnaturação”. Os iniciadores hibridizam, a uma temperatura de 37-65ºC, em seus complementares na fita de DNA molde desnaturada fazendo o anelamento e uma DNA polimerase é capaz de reconhecer esta fita dupla e deslizar fazendo uma duplicação da fita molde ocorrendo a extensão. Estas três etapas formam um ciclo e a repetição deste ciclo resulta em um acúmulo exponencial de fragmentos específicos, que tem a porção 5’ dos iniciadores como término. O acúmulo do material amplificado é exponencial, pois o produto sintetizado em um

ciclo servirá como molde no ciclo subseqüente, o que duplica a quantidade de DNA a cada ciclo. A síntese exponencial de DNA é determinada pela fórmula: $(2^n-2n)x$, onde n é o número de ciclos, 2n é o produto primário e secundário com comprimento indeterminado, e x é igual ao número de cópias originais de DNA molde.

Amostras de sangue periférico e LCR foram analisados por PCR de DNA 39 casos de soropositivos para HTLV-I classificados em tres grupos: grupo 1 com 17 pacientes HTLV-I positivos com HAM/TSP. Grupo 2 com 11 pacientes assintomáticos, portadores do vírus HTLV-I sem HAM/TSP e 7 pacientes portadores de outras doenças neurológicas. Grupo 3 com 4 pacientes soropositivos para HTLV-I com Esclerose Multípla (EM). A alta carga viral no LCR e PBMC diferenciam HAM/TSP de outros grupos. A carga viral no LCR ou PBMC ou ambos foram alta entre os pacientes HAM/TSP (grupo 1) do que no grupo 2 ($p< 0.005$). dois pacientes no grupo 3 tinham carga viral do HTLV-I comparado com as do grupo 2. E os outros dois pacientes tinham carga viral comparável com as do grupo 1 (PUCCIONI-SOHLER et al., 2007).

2.6. DOENÇAS ASSOCIADAS AO HTLV-I

Dentre as doenças etiologicamente relacionadas à infecção por HTLV-I, destacam-se a leucemia-linfoma de células T do adulto (ATL) e a paraparesia espástica tropical /mielopatia associada ao HTLV-I (HAM/TSP) (GESSAIN et al, 1985).

Outras síndromes clínicas têm sido também descritas como manifestações da infecção por HTLV-I, dentre as quais podem-se citar: uveíte (MOCHIZUKI et al., 1996), polimiosite (MORGAN et al., 1989), artropatias e síndrome de Sjögren (NISHIOKA, 1996), a dermatite infecciosa associada ao HTLV-I e outras dermatoses (LA GRENADE, 1996), além de manifestações resultantes de coinfecções com outros agentes infecciosos.

ATL e/ou HAM/TSP desenvolvem-se em uma pequena proporção de pessoas infectadas. Cerca de 98% dos portadores, permanecem assintomáticos (OKOCHI et al., 1984). Estudos têm mostrado que grande percentual da população japonesa é portadora do vírus, porém, o risco estimado para desenvolver ATL nestes portadores é de 2 a 4%, enquanto o risco para desenvolvimento de mielopatias é 0,25% durante toda a vida (KAPLAN et al., 1990).

2.7 MIELOPATIA ASSOCIADA AO HTLV-I/ PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL (HAM/TSP)

A HAM/TSP é mielopatia de progressão lenta, caracterizada por fraqueza crônica progressiva e permanente dos membros inferiores, hiperreflexia, distúrbios sensoriais, incontinência urinária e impotência sexual (GESSAIN et al., 1988). Pode manifestar-se entre 20 e 70 anos de idade (MCFARLIN e BLATTNER, 1990). Excepcionalmente é observada em crianças (WHO, 1989). Além disso, é mais freqüentemente encontrada em mulheres do que em homens, na razão de 2,5 a 3:1. O grau de espasticidade é o principal fator limitante da marcha (NAKAGAWA et al., 1995). Há restrições da deambulação comunitária e o paciente pode necessitar de auxilio progressivo, como cajados, bengalas e andadores, para realizá-la. A cadeira

de rodas representa o estágio final da evolução (CARTIER et al., 1997). O exame neurológico revela paraparesia espástica associada a sinais piramidais como hiperreflexia, sinal de Babinski, clono e sinal de Hoffman (OSAME et al., 1994).

As alterações sensitivas nem sempre acompanham o quadro motor, embora o relato de disestesias e parestesias ao longo dos membros inferiores e predominantemente distais é freqüente. A dor na região dorso-lombar constitui também sintoma comum, correlacionada, muitas vezes, aos dermátomos acometidos ou manifestando-se com raquialgia ou dor segmentar. São descritas lesões do cerebelo e do segundo neurônio motor. Existem relatos de neurite óptica ou surdez. Metade dos pacientes poderá limitar-se a cadeira de rodas em torno de 10 anos (CARTIER et al., 1997).

2.7.1 **Patogênese**

A neuropatologia da HAM/TSP foi extensivamente investigada e fornece evidência que os mecanismos imune-mediados podem ter um papel no curso da doença. É importante que a clínica, os dados neurorradiológicos e os achados neuropatológicos sejam correlacionados nestes pacientes. Descrições patológicas anteriores de material de autopsia de pacientes com HAM/TSP indicam que a doença afeta a medula espinhal, predominantemente no nível torácico (LEVIN et al., 1997; WU et al., 1993). Pode ter uma perda de mielina e axônios na coluna lateral. Estas lesões são associadas com infiltração de linfócitos perivascular e no parênquima com a presença de macrófagos, proliferação de astrócitos e gliose (WU et al., 1993).

No início da doença, os linfócitos são abundantes, com números iguais de células T CD4+ e CD8+. Os linfócitos B e os macrófagos atuam na área do parênquima. No curso da doença, há poucas células inflamatórias, e estas são quase exclusivamente células TCD8+ (LEVIN et al., 1997). Estudos demonstraram que linfócitos T citotóxicos $CD8^+$ circulantes, reagem contra proteínas do HTLV-I de modo restrito por antígenos MHC classe I (HLA-A2) em pacientes com mielopatias associadas ao HTLV-I, mas não reagem com as mesmas proteínas em portadores sadios ou pacientes com ATL. Entretanto, no líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com HAM, uma alta proporção de células T são $CD8^+$ e citotóxicas para células infectadas com HTLV-I (JACOBSON et al., 1992).

2.7.2 **Critérios diagnósticos**

O diagnóstico dos pacientes com HAM/TSP baseia-se nos critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde, 1989, segundo estudos de Osame (tabela 2).

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

Principais manifestações neurológicas

- Paraparesia espástica crônica, a qual progride lentamente, algumas vezes permanece estável após progressão inicial.
- Fraqueza de membros inferiores, de predomínio proximal.
- Distúrbio da bexiga é geralmente um aspecto inicial, enquanto a constipação ocorre mais tardiamente; impotência ou diminuição da libido é comum.

- Sintomas sensitivos como sensação de formigamento, queimação etc. são mais proeminentes do que os sinais físicos objetivos.
- Dor lombar com irradiação para as pernas é comum.
- Sensação de vibração é freqüentemente prejudicada, enquanto a propriocepção está menos freqüentemente afetada.
- Hiperreflexia de membros inferiores com clono e sinal de Babinski.
- Reflexo mandibular exaltado em alguns pacientes.

Achados neurológicos menos freqüentes

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

Outras manifestações neurológicas, as quais podem estar associadas com HAM/TSP.

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

Diagnóstico laboratorial

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

2.7.3 **Exame de rotina do líquido cefalorraquidiano (LCR) na HAM/TSP**

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

A análise das amostras de LCR inclui contagem de células, dosagem de glicose, de proteínas, albumina e imunoglobulinas IgG, os quais são determinados em correspondência com amostras do soro (REIBER e FELGENHAUER, 1987).

Pode ocorrer leve pleocitose (> 4 células/mm^3) e cerca de 1% dos linfócitos no LCR apresenta um aspecto atípico semelhante ao encontrado na leucemia de células T do adulto denominado de “flowers cells” (OSAME et al., 1990). A concentração de glicose pode ser normal (2/3 glicemia) ou ocasionalmente, diminuída. A concentração de proteínas totais pode ser moderadamente elevada

(>40mg/dl). A gamaglobulina pode ser discreta a moderadamente aumentada (>14%) (SPINA-FRANÇA et al, 1990).

a. Avaliação Imunológica

Barreira Hemato-LCR e Síntese Intratecal de Imunoglobulinas

Uma parte importante da análise do LCR é o estudo do perfil imunológico, que inclui pesquisa da barreira hemato-LCR, de imunoliberação intratecal de imunoglobulinas totais e específicas e pesquisa de antígenos específicos (REIBER e FELGENHAUER, 1987).

A concentração de albumina e imunoglobulina G (IgG) no LCR e soro é determinado pelo método de nefelometria. O estudo da integridade da barreira hemato-LCR é realizado pelo cálculo da concentração de albumina do LCR/ soro (REIBER e FELGENHAUER, 1987). A determinação de IgG esta indicada para a avaliação de síntese intratecal, especialmente para diagnóstico de processo inflamatório do SNC. Para análise da síntese intratecal de IgG é usado o índice de IgG calculado por (IgG do LCR/soro): (albumina do LCR/ soro) (LINK et al., 1989; PUCCIONI-SOHLER et al., 1999). Outro tipo de avaliação de síntese intratecal de imunoglobulinas é feito através do diagrama de Reiber e Felgenhauer (1987) onde a linha limite corresponde a 0 mg/L de síntese local de anticorpo. O quociente de IgG à direita desta linha indica transferência passiva do sangue para o LCR e à esquerda demonstra síntese intratecal de anticorpos. A linha pontilha da mostra o percentual de imunoglobulina total encontrada no LCR (Figura 10). Este valor pode ser

calculado através de uma fórmula matemática (REIBER e FELGENHAUER, 1987; REIBER e LANGE, 1991; REIBER, 1994a; REIBER, 1995).

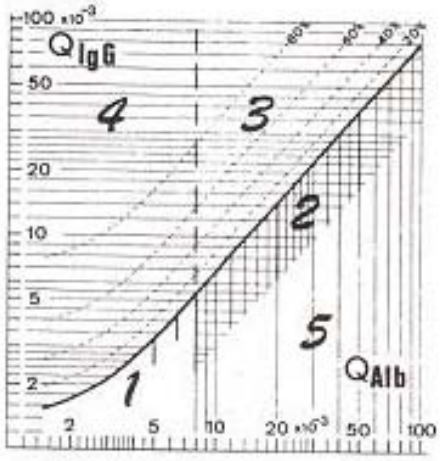


Figura 10: Gráfico Reiber e Felgenhauer (1987); Reiber e Lange (1991)

Gessain et al. em 1988 também fez uso da dosagem de albumina e imunoglobulina IgG em um grupo de 19 pacientes com mielopatia de etiologia desconhecida, para realizar seus estudos de integridade de barreira e índice de IgG, obtendo um resultado elevado em 14 (74%) dos 19 pacientes.

Pesquisa de Banda IgG Oligoclonal

Pesquisa de bandas IgG oligoclonais, correlacionando as bandas do LCR às do soro, também representa um método de análise da síntese intratecal de IgG total, porém é qualitativo e mais sensível do que os métodos quantitativos. As bandas podem ser determinadas pela focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida ou com imunofixação (LINK et al., 1989; MCLEAN et al., 1989). Cerca de 95% dos pacientes com HAM/TSP apresentam bandas IgG oligoclonais restritas ao LCR (PUCCIONI-SOHLER et al., 1995).

Diagnóstico Diferencial de HAM/TSP e Esclerose Múltipla

A avaliação de rotina do LCR permite diferenciar a mielopatia associada ao HTLV-I de outras condições do sistema nervoso. Nos casos de HAM/TSP não ocorre resposta imune poliespecífica no SNC para sarampo, rubéola e vírus varicela zoster, denominada reação bystander, como ocorre em pacientes com esclerose múltipla (EM), na ausência dos respectivos vírus. Na HAM/TSP, a resposta imune no SNC é monoespecifica contra o vírus HTLV-I (PUCCIONI-SOHLER et al., 1998).

2.7.4 **Pesquisas de Anticorpo para HTLV-I no LCR**

Reatividade no LCR

A pesquisa de anticorpos contra o HTLV-I no LCR pode ser realizada através dos métodos de ELISA e aglutinação de partículas de látex, que servem como indicadores da presença de anticorpos, mas estes não permitem demonstrar se estes anticorpos são produzidos no SNC ou provém do sangue pela passagem da barreira hemato-LCR (MCLEAN et al., 1989; PUCCIONI-SOHLER et al., 1995; KITZE et al., 1996). E através do RIPA, focalização isoelétrica e AI, que podem ser usados para identificar produção local de IgG total e específica (GESSAIN et al., 1988; KITZE et al., 1995; PUCCIONI-SOHLER et al., 2001).

Síntese Intratecal do IgG para HTLV-I

A produção intratecal de anticorpos específicos pode ser avaliada por método quantitativo (índice de anticorpo especifico (AI)) e qualitativos (focalização isoelétrica, radioimunoprecipitação) (LINK et al., 1989; KITZE et al., 1996; PUCCIONI-SOHLER et al., 2001). Esta análise é uma prova do reconhecimento imune do vírus no SNC, um parâmetro sensível de inflamação no SNC, e indica a fração do anticorpo especifico sintetizado no LCR (PUCCIONI-SOHLER, 1998).

Método de Análise Quantitativo

A quantificação da IgG vírus especifica no LCR é realizada através do calculo do índice da anticorpo especifico (AI) correlacionando as concentrações de anticorpos específicos e totais no LCR e soro e a função da barreira hemato-LCR, de acordo com Reiber e Lange (1991). O AI maior do que 1,5, sugere síntese intratecal de anticorpos específicos (|REIBER et al, 1987) . Com base no teste de AI para HTLV-I (ELISA in house), síntese intratecal de anticorpos para HTLV-I ocorre em 85% dos pacientes com HAM/TSP (PUCCIONI-SOHLER et al., 1995). Puccioni-Sohler et al. (2001), calcularam o AI para HTLV-I, adaptando um teste de ELISA comercial e obtiveram a mesma freqüência de 85% em outra população de pacientes com HAM/TSP.

Método de Análise Qualitativo

O método de focalização isoelétrica verifica a existência de banda IgG oligoclonal no LCR e no soro. A presença de banda oligoclonal específica somente

no LCR ou a presença de mais bandas no LCR do que no soro são consideradas indicações de síntese intratecal de IgG total ou específica (SINDIC et al., 2001). Por este método, já foi demonstrada a síntese intratecal de imunoglobulinas dirigidas para a proteína p24 do HTLV-I na HAM/TSP. Segundo Grimaldi et al.(1988), esta pode ser o maior alvo antigênico da resposta imune no LCR da HAM. Anticorpos para as proteínas do gag e do env do HTLV-I são encontradas no soro e LCR de indivíduos com HAM/TSP e em menor freqüência, nos infectados.

Um estudo realizado em 1988 teve como objetivo mostrar síntese intratecal de anticorpos contra o HTLV-I usando métodos confirmatórios qualitativos como WB e RIPA. Para o WB foi usado kit Dupont WB. O soro foi diluído de 1:200 e o LCR de 1:20. O WB no soro mostrou as proteínas P19, P24, P26, P28, P32, P36 E Pr 53; no LCR a principal proteína foi a p24 e com menor freqüência p19, p32, p36 e Pr53. No RIPA foi usado células HUT-102 infectadas com HTLV-I. As bandas visíveis quando o LCR foi testado pelo RIPA foram contra proteínas do envelope gp45 e gp61, mais também foram reativos para p19 e p24 confirmando as bandas encontradas no WB (GESSAIN et al., 1988).

3 **JUSTIFICATIVA DO ESTUDO**

O teste de WB é um teste imunoenzimático qualitativo para detecção *in vitro* de anticorpos para HTLV-I e HTLV-II no soro ou plasma humanos. Seu resultado no soro ou plasma é específico por apresentar anticorpos contra as proteínas do HTLV-I/II mostrando a qual proteína específica o organismo produziu resposta imune.

O presente estudo usa o método de WB para avaliação de síntese intratecal de anticorpo específico contra o HTLV-I, pois ele identifica as diferentes proteínas virais, sendo necessária adaptação da metodologia para aplicação no LCR, onde as imunoglobulinas do LCR podem representar passagem de imunoglobulinas do sangue através da barreira hemato-LCR ou síntese intratecal no SNC.

4 **OBJETIVOS**

4.1 OBJETIVO GERAL

Adaptar o teste Western Blot para análise no LCR de síntese intratecal de anticorpos contra HTLV-I na HAM / TSP.

4.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Definir a diluição ideal para amostras de LCR e soro conforme princípios de testes qualitativos para avaliação de síntese intratecal.
- Avaliar precisão do teste de *Western blot* para avaliação de síntese intratecal de anticorpo para HTLV-I.
- Demonstrar os anticorpos contra as proteínas do vírus sintetizadas no SNC através do uso do método de *Western blot*.

5 **METODOLOGIA**

5.1 DESENHO DO ESTUDO

Trata-se de estudo retrospectivo, descritivo com delineamento transversal.

5.2 AMOSTRAS

Foram analisadas amostras de LCR e de soro de uma paciente, selecionada aleatoriamente, com o diagnóstico de HAM/TSP, atendida no ambulatório de Neuroinfecção do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (HUGG) e que realizou exame do LCR como rotina para investigação diagnóstica. Tratava-se de uma paciente do sexo feminino, 55 anos, viúva, natural de Ubá (MG), sendo diagnosticada como HAM/TSP em 2005. As sobras da rotina das amostras de LCR e soro (volume de 3 mL) foram armazenadas no freezer -20ºC no laboratório de LCR do HUCFF/ UFRJ cerca de 2 horas após a coleta em 10 de agosto de 2005. Essas sobras sofreram um descongelamento, foram homogeneizadas e novamente aliquotadas em microtubos com volumes de 300 µL para evitar o processo de descongelamento todas as vezes que precisássemos utilizá-las, e conseqüentemente com possível perda da qualidade da amostra, sendo então novamente congeladas.

Para o início da preparação do teste, realizamos a retirada das amostras de soro e LCR do freezer – 20ºC pelo menos 30 minutos antes, para que as mesmas ficassem a temperatura ambiente.

5.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Paciente atendido no ambulatório de neuroinfecção do HUGG;
- Preenchimento do critério de HAM/TSP (Osame, 1990);
- Ter assinado termo de consentimento informado;
- Cadastro de dados clínicos e laboratoriais no protocolo de pesquisa “online”, vinculado ao ambulatório;
- Realizado exame completo de LCR no laboratório de LCR do HUCFF com presença de anticorpos anti-HTLV-I no soro e LCR;
- Volume mínimo de 1ml estocado de LCR e soro em freezer -20ºC. Máximo de um ano de estocagem.

5.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Sífilis;
- Diminuição sérica da vitamina B12;
- Infecção pelo HIV – I;
- Ausência de lesão compressiva da medula espinhal.
- Infecção do SNC por germes comuns (BK ou fungo)
- Doença autoimune
- Distúrbio da função tiroideana
- Esclerose múltipla

5.5 EXAME DA AMOSTRA LCR

A amostra de LCR selecionada foi analisada quanto à celularidade global na câmara de Fuchs-Rosenthal e específica através da sedimentação na câmara de Suta, proteínas totais e glicose pela espectroscopia, microbiologia (exame direto e cultura para germes comuns, BK e fungos), barreira hemato-LCR pelo quociente de albumina, síntese intratecal de IgG total pelo índice de IgG (dosagem de IgG e albumina pela nefelometria) e pela pesquisa de banda IgG oligoclonal (focalização isoelétrica) e determinação da presença de anticorpos para HIV, para HTLV-I, *Cytomegalovirus*, herpes s*implex virus* e *Toxoplasma gondii* utilizando o teste de ELISA e para síflis pelo VDRL.

5.6 ADAPTAÇÃO DO TESTE WESTERN BLOT PARA DEMONSTRAÇÃO DE BANDAS ESPECÍFICAS DO HTLV-I DE SÍNTESE INTRATECAL

O teste de WB usado é Genelabs Diagnostics Pte Ltd. 85, Science Park Drive, # 04-01, Singapore Science Park, Singapore. 118259 – Singapore e apresenta para o soro uma sensibilidade maior que 98% e especificidade de 97% conforme ficha técnica do kit.

5.6.1 **Preparação dos reagentes do teste de WB**

a. Solução de Tampão de Lavagem Diluída:

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

Para corrida foram diluídos 12 ml de solução tampão de lavagem para 228 ml de água.

b. Solução Tampão para Blotting:

- Reconstituição do frasco de tampão estoque liofilizado com 100 ml de água de qualidade reagente que se mantém estável durante 6 semanas se conservada entre 2ºC e 8ºC.

Após a reconstituição foi adicionado 1 g de pó para blotting (leite desnatado) a cada 20 ml de solução tampão estoque reconstituída, totalizando 80 ml para corrida e 4g de pó para blotting.

c. Solução de Conjugado de Trabalho:

- Diluição do conjugado a 1:1000 em solução tampão para blotting, ou seja, 35 µl de conjugado para 35 ml de tampão.

d. Solução de Substrato:

- Pronta pra uso.

5.6.2 **Procedimento do teste de WB**

Procedimento:

1. Usando a pinça, retiramos cuidadosamente o número necessário de FITAS do tubo e colocamos em cada poço com a face numerada voltada para cima. Incluímos fitas para controle reativo forte, reativo fraco e não-reativo.

2. Adicionamos 2 ml de solução tampão de lavagem diluída a cada poço.

3. Incubamos as fitas durante pelo menos 5 minutos à temperatura ambiente (25 +/- 3ºC) sobre uma plataforma oscilante (velocidade de 10 a 14 oscilações por minuto). Removemos a solução-tampão por aspiração.

4. Adicionamos 2 ml de SOLUÇÃO solução- tampão para blotting a cada poço.

5. Adicionamos 20µl de cada amostra do paciente e de controle nos poços apropriados.

6. Cobrimos a bandeja com tampa fornecida e incubamos durante 1 hora à temperatura ambiente (25 +/- 3ºC) na plataforma oscilante.

7. Retiramos cuidadosamente a tampa, evitando salpicos ou misturar as amostras. Inclinamos a bandeja para aspirar a mistura dos poços. Trocamos as ponteiras de aspiração entre as aplicações das amostras para evitar contaminação cruzada.

8. Lavamos cada fita com 2 ml de solução-tampão de lavagem diluída deixando-as imersas durante 5 minutos sobre a plataforma oscilante entre cada lavagem.

9. Adicionamos 2 ml de solução de conjugado de trabalho a cada poço.

10. Cobrimos a bandeja e incubamos durante 1 hora à temperatura ambiente (25+/- 3ºC) na plataforma oscilante.

11. Aspiramos o conjugado dos poços. Lavamos como na etapa 8.

12. Adicionamos 2 ml de solução de substrato a cada poço.

13. Cobrimos a bandeja e incuba-la durante 15 minutos na plataforma oscilante.

14. Aspiramos o substrato e enxaguamos as fitas pelo menos três vezes com água de qualidade reagente para interromper a reação.

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

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

5.6.3 **Resumo**

Reagentes	**Qtde**	**Duração**
Fita de nitrocelulose	1	---
Solução-tampão de lavagem	2 ml	5 min
Solução-tampão para blotting	2 ml	---
Amostra	20 µl	60 min
Solução-tampão de lavagem	3 x 2 ml	3 x 5 min
Conjugado	2 ml	60 min
Solução-tampão de lavagem	3 x 2 ml	3 x 5 min
Substrato (pronto para uso)	2 ml	15 min
Água destilada	3 x 2 ml	---

Quadro 01: Resumo dos Protocolos do Teste

5.7 ASPECTOS ÉTICOS

O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do HUGG, em sua reunião de 06 de abril de 2006 segundo a Resolução 196/96 (Anexo A). Para a avaliação retrospectiva, as amostras foram provenientes de uma paciente atendida no Serviço de Neurologia do HUGG/UNI-RIO com assinatura do termo CONSENTIMENTO INFORMADO (Anexo B). O Serviço de Neurologia possui um ambulatório de Neuroinfecção especializado no atendimento das doenças neurológicas relacionadas a enfermidades infecciosas.

6 **RESULTADOS**

6.1 EXAME DE ROTINA DA AMOSTRA DE LCR UTILIZADA

O LCR estava límpido e incolor. A citologia (0-4) apresentou 7 leucócitos e 3 hemácias. A citologia diferencial (predominantemente linfócitos e células mononucleares) foi 100% de linfócitos. A dosagem de proteínas totais (até 40 mg/dl) estava normal com dosagem de 27 mg/d, assim como a glicose (45-80 mg/dl) 58 mg/dL. O índice de IgG (0.07) foi de 0.58; o quociente de albumina de 8.81 x 10^{-3} e a pesquisa de banda oligloconal foi negativa.

6.2 TESTE WB COMO INSTRUMENTO DE AVALIAÇÃO DE SÍNTESE INTRATECAL DE ANTICORPO PARA HTLV-I

- **Determinação da concentração de IgG total sérica para a Análise.**

É importante identificar a concentração de IgG total sérica para aplicação no teste de WB para que possamos analisar amostras idênticas e conseqüentemente avaliar a origem das imunoglobulinas, pois em indivíduos normais, a concentração de IgG do soro é até 500 vezes maior do que a do LCR.

Utilizamos a amostra de LCR e soro da paciente, cujo resultado da dosagem de IgG foi o seguinte:

IgG soro: 973,8 mg/dl IgG LCR: 6,1 mg/dl

Dividimos o resultado de IgG do soro sobre o LCR para achar o fator dilucional do IgG do soro para obter a mesma concentração do IgG do LCR, cujo

resultado foi de +/- 160x. Na preparação da diluição da amostra usamos 5 µl do soro e 795 µl de diluente. A amostra foi homogeneizada antes da sua utilização e o diluente usado foi o do kit de WB (solução tampão para blotting). O quadro abaixo mostra o procedimento aplicado.

Solução (Sç)	**Amostra**	**Diluente**	**Fotor dilucional**
Sç diluída	5 µl soro	795 µl	1:160

Quadro 02: Diluição do soro para atingir a mesma concentração de IgG do LCR

- **Escolha inicial da diluição do LCR e soro.**

Com base em estudos anteriores não publicados realizado pelas orientadoras (Marzia Puccioni Sohler e Silvia Maia de Farias Carvalho), começamos com a escolha da seguinte diluição: 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 e 1:640. Chamamos de solução A (SçA) a primeira diluição realizada com as amostras de LCR “in natura” e soro diluído para mesma concentração de IgG do LCR, sendo uma 10 µl de amostra e 90 µl de diluente cuja razão foi de 1:10. Solução B (Sç B) 10 µl da Sç A mais 90 µl de diluente (1:20). Solução C (Sç C) 10 µl da Sç B mais 90 µl de diluente (1:40). Solução D (Sç D) 10 µl da Sç C mais 90 µl de diluente (1:80). Solução E (Sç E) 10 µl da Sç D mais 90 µl de diluente (1:160). Solução F (Sç F) 10 µl da Sç E mais 90 µl de diluente (1:320). Solução G (Sç G) 10 µl da Sç F mais 90 µl de diluente (1:640) (quadro 03).

Solução (Sç)	Amostra	Diluente	Fotor dilucional
Sç A	10 µl	90 µl	1:10
Sç B	10 µl Sc A	90 µl	1:20
Sç C	10 µl Sc B	90 µl	1:40
Sç D	10 µl Sc C	90 µl	1:80
Sç E	10 µl Sc D	90 µl	1:160
Sç F	10 µl Sc E	90 µl	1:320
Sç G	10 µl Sc F	90 µl	1:640

Quadro 03: Diluições das amostras para desenvolvimento do ensaio.

Após a preparação das diluições foi montado o protocolo do ensaio. Como mostra o quadro 04.

Número da tira	*Tipo de amostra*	*Diluição*
01	CN	----
02	CP I	----
03	CP II	----
04	B	----
05	SORO	1:10
06	LCR	1:10
07	SORO	1:20
08	LCR	1:20
09	SORO	1:40
10	LCR	1:40
11	SORO	1:80
12	LCR	1:80
13	SORO	1:160
14	LCR	1:160
15	SORO	1:320
16	LCR	1:320
17	SORO	1:640
18	LCR	1:640

Quadro 04: Protocolo de pesquisa de Anti-HTLV-I - Western Blot

Realizamos um ensaio na busca de uma diluição que pudesse verificar a presença de bandas no LCR, prova da síntese intratecal de anticorpo específico. As diluições inicialmente escolhidas foram 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640 e foram aplicadas nas amostras de LCR e soro diluído (1:160) para mesma concentração de IgG do LCR, pareados. Encontramos impregnação na diluição de 1:10 no LCR e soro. No soro as bandas encontradas representam antígeno p24, p21 e rgp 46-I. No LCR as bandas encontradas foram p24 e rgp 46-I, as demais diluições não apresentaram nenhuma impregnação no soro ou no LCR (Apêndice A).

- **Diluição ideal do LCR e soro**

Solução A (SçA) foi a primeira diluição realizada com as amostras de LCR “in natura” e soro diluído para mesma concentração de IgG do LCR, sendo uma 50 µl de amostra e 50 µl de diluente cuja razão foi de 1:2. Solução B (Sç B) 50 µl da Sç A mais 50 µl de diluente (1:4). Solução C (Sç C) 50 µl da Sç B mais 50 µl de diluente (1:8). Solução D (Sç D) 50 µl da Sç C mais 50 µl de diluente (1:16). (quadro 05).

Solução (Sç)	**Amostras**	**Diluente**	**Fator dilucional**
Sç A	50 µl	50 µl	1: 2
Sç B	50 µl Sc A	50 µl	1: 4
Sç C	50 µl Sc B	50 µl	1: 8
Sç D	50 µl Sc C	50 µl	1: 16

Quadro 05: Diluições das amostras para desenvolvimento do ensaio final

Após a preparação das diluições foi montado o protocolo do ensaio. Como mostra o quadro 06.

Número da tira	*Tipo de amostra*	*Diluição*
01	CP I	----
02	CP II	----
03	CN	----
04	SORO IN NATURA	----
05	LCR IN NATURA	----
06	SORO DILUIDO 1:160	1: 2
07	LCR	1: 2
08	SORO DILUIDO 1:160	1: 4
09	LCR	1: 4
10	SORO DILUIDO 1:160	1: 8
11	LCR	1: 8
12	SORO DILUIDO 1:160	1: 16
13	LCR	1: 16

Quadro 06: Protocolo de pesquisa final de Anti-HTLV-I - Western Blot

Refizemos o ensaio diminuindo as razões da diluição, sendo utilizadas diluições na razão de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 aplicadas no LCR e soro pré-diluído, realizando assim o segundo ensaio. Obtivemos impregnações mais intensas na revelação das bandas. Na razão de 1:2 e 1:4, encontramos impregnação mais intensa das bandas, p24, p21, rgp46-I e GD21 no LCR do que no soro diluído. Nas demais diluições (1:8 e 1:16) somente havia impregnação da p24 mais intensa no LCR do que no soro diluído, e as demais bandas desapareceram do soro e do LCR (Apêndice B).

6.3 IDENTIFICAÇÃO DAS BANDAS ESPECÍFICAS DO HTLV-I DE SÍNTESE INTRATECAL

A resposta imune encontrada nos ensaios de WB foi dirigida às proteínas de envelope do vírus HTLV-I (rgp46-I, GD21, gp21) e do core (p24). A presença de bandas mais intensas ou somente no LCR demonstrou produção local contra estas proteínas do vírus HTLV-I no SNC.

Segue abaixo resumo com relação das proteínas virais do HTLV-I e resposta imunológica no LCR e soro diluído para mesma concentração de IgG de acordo com as diluições realizadas no desenvolvimento do estudo.

Diluição	**rgp46I**		**rgp46II**		**p53**		**gp46**		**p36**		**p32**		**p28**		**p26**		**p24**		**gp21**		**p19**		**GD21**	
	L	**S**	**L**	**S**	**L**	**S**	**L**	**S**	**L**	**S**	**L**	**S**	**L**	**S**	**L**	**S**	**L**	**S**	**L**	**S**	**L**	**S**	**L**	**S**
1:2	X	x	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	X	x	X	x	_	_	X	x
1:4	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	X	x	_	_	_	_	x	_
1:8	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	x	_	_	_	_	_	_	_
1:16	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	_	x	_	_	_	_	_	_	_

L – LCR; **S** – soro diluído para mesma concentração de IgG do LCR; **X** - presença mais intensa da banda; **x** – presença de banda.

Quadro 07: Relação das proteínas virais do HTLV-I e presença da resposta imunológica nas diluições realizadas nas amostras

6.4 PRECISÃO DO TESTE

Após encontrarmos resposta satisfatória na aplicação desta metodologia no WB com estas diluições repetimos o ensaio (terceiro ensaio) da mesma forma como

havia sido executado e encontramos o mesmo resultado, na razão de 1:2 e 1:4 impregnação mais intensa das bandas, p24, p21, rgp46-I e GD21 no LCR do que no soro diluído e nas demais diluições (1:8 e 1:16) somente impregnação da p24 mais intensa no LCR do que no soro diluído, e as demais bandas desapareceram do soro e do LCR, sugerindo precisão da metodologia desenvolvida (Apêndice C).

Realizamos mais dois ensaios (quarto e quinto ensaios) da mesma forma que fizemos o terceiro e obtivemos o mesmo resultado. Este processo preenche parcialmente o protocolo de validação de uma metodologia (Apêndice D e E).

7 **DISCUSSÃO**

Em pacientes com HAM/TSP estudos no LCR mostraram alterações similares (banda oligoclonal, síntese de IgG) a outras doenças inflamatórias crônicas no SNC, como EM (OSAME et al., 1987; GESSIAN et al., 1988; LINK et al., 1989). Em relação à HAM/TSP, não existe, um consenso sobre o método de avaliação de anticorpos anti-HTLV-I no LCR (SUEHARA et al., 1992; NAKAMURA et al., 1991). É importante estabelecer a origem da imunoglobulina, ou seja, se ela atravessou a barreira hemato-LCR, ou se foi produzida dentro do SNC, pois esta representa um marcador de inflamação. Empregando este princípio da análise do LCR para pesquisa de anticorpo específico, métodos como focalização isoelétrica, immunoblotting, ELISA e RIPA são usados para demonstrar síntese intratecal de anticorpos contra o vírus HTLV-I, de acordo com os princípios fisiológicos do LCR (GRIMALDI et al., 1988; GESSAIN et al., 1988; LINK et al., 1989; MCLEAN et al., 1989). Alguns destes testes podem também demonstrar a síntese intratecal de anticorpos contra proteínas especificas do vírus, tais como contra proteína p24 da região gag do HTLV-I (GRIMALDI et al., 1988, GESSAIN et al., 1988, KITZE et al., 1995). Seguindo estas considerações, nosso estudo utilizou o teste de WB para demonstrar produção de anticorpo específico no LCR e discriminar anticorpos anti-HTLV-I do gag, do env ou do núcleo.

Estudo realizado em 1986 por Osame et al., analisou presença de anticorpos no LCR e soro de seis pacientes com HAM/TSP. O teste de AP foi aplicado primeiro para dosar títulos de anticorpos contra o HTLV-I. O parâmetro de positividade usado foi igual ou maior do que 16 vezes. Não é citada a aplicação de diluição nas

amostras e todas foram positivas sendo o menor valor 64 vezes e o maior 512 vezes. Essas amostras positivas foram aplicadas no teste de ELISA, onde para o soro a absorbância considerada positiva foi > 0.06 e no LCR >0.04. Todas foram positivas variando de 0,0460 a 0,388. Não mencionam nenhum tipo de diluição aplicado às amostras nesta etapa. O WB usando células MT2 foi aplicado nas amostras, de LCR e soro, positivas pelos métodos AP e ELISA. A análise do WB confirmou a presença dos anticorpos para HTLV-I em soro e LCR. Todos os pacientes mostraram bandas características no LCR, como, p24 e p32 notadas quando comparadas com p28 e p22 que não foram visualizadas. As bandas padrões no soro dos pacientes com HAM/TSP não foram tão características como as do LCR. E como conclusão eles associam o HTLV-I com a mielopatia por razões como: presença de altos títulos de anticorpos no soro e LCR e confirmados pelo WB; os padrões de IgG no LCR no teste de WB foram característicos nos seis pacientes com HAM/TSP. Os autores não revelam o padrão avaliado de positividade aplicado para os métodos de AP e ELISA, se com base na bula do teste ou outro estudo. Ainda apresentam um resultado de ELISA positivo de uma das amostras de LCR próximo do valor de “cut off” usado. Neste caso não deveria ser considerado e a testagem deveria ser repetida. E relatam características padrões de IgG do LCR em relação ao soro sem tratamento das amostras. O nosso estudo não usou o método de WB para identificar imunoglobulinas contra proteínas do HTLV-I e sim para avaliar a sua produção local das mesmas.

A presença de bandas IgG oligoclonais específicas para o HTLV-I no LCR de cinco pacientes HAM/TSP foram demonstradas por Grimaldi et al. (1988), usando o método de focalização isoelétrica (FIE) seguida de coloração de prata. Imunofixação

em gel (seguido FIE) com anti IgG humana foi usado para caracterizar o tipo de imunoglobulina da banda. A p24 do HTLV-I foi a proteína escolhida para impregnação por eletroforese no papel de nitrocelulose, por ser, segundo os autores, a maior proteína alvo da resposta imune na HAM/TSP. Amostras de LCR de cinco pacientes com HAM/TSP tinham banda oligoclonal demonstrada pelo FIE. Presença de bandas no LCR, com ausência nas amostras de soro indicaram que elas foram produzidas dentro do SNC. As bandas no LCR na FIE foram únicas para cada paciente. Todos os LCR dos pacientes HAM/TSP tinham fácil visualização da p24 na FIE com coloração de prata, não encontradas no soro de pacientes com HAM, indicando resposta específica no SNC para síntese intratecal de anticorpo p24 anti-HTLV-I nos pacientes estudados. O trabalho não faz menção a diluição do soro e LCR caracterizando uso de amostras com diferentes concentrações de IgG, e assim não podendo afirmar que as bandas encontradas no LCR eram produzidas no SNC. Dosamos a imuniglobulina G do soro e LCR, por serem fluidos de concentrações diferentes, e assim com o resultado conseguimos torná-los fluidos idênticos. Com isto fizemos aplicações destes em paralelo encontrando impregnação mais intensa da banda no LCR do que no soro, sugerindo síntese intratecal contra as proteínas do gag e env do HTLV-I.

Investigação realizada por Gessain et al. (1988), no soro e LCR de 19 pacientes com HAM/TSP síntese intratecal de anticorpos contra HTLV-I. Os anticorpos foram detectados pelo método de ELISA e confirmados pelo WB e eventualmente pelo RIPA. No ELISA para determinar os títulos de anticorpos foi usada diluição serial em duplicata, no soro variou de 1:100 a 1:8000 e no LCR de 1:2 a 1:320. As amostras foram positivas. Para confirmação com WB, o soro foi

diluído 1:200 e o LCR 1:20. Os anticorpos contra os antígenos do HTLV-I incluíram as proteínas gag p19 e p24 e seu precursor, Pr53, assim como p26, p28, p32 e p36. O WB foi usado para todas as amostras de ELISA positivas. O RIPA foi aplicado em algumas amostras de acordo com o método de Lee et al. (1984). Pelo WB, todos os soros foram reativos para p19, p24, p26, p28, p32, p36 e Pr53. No LCR a reatividade contra o HTLV-I foi principalmente direcionada para proteína p24, mas também em menor proporção para p19, p32, p36 e Pr53. Em todos os casos se uma banda foi presente no LCR também estava presente no soro correspondente. Quatro pacientes que tiveram baixos títulos de anticorpos pelo ELISA no LCR, no WB claramente exibiram as bandas correspondentes às proteínas p19 e p24; estas bandas foram visíveis quando o LCR foi testado pelo RIPA aparecendo as proteínas gp45 e gp61. A reatividade no RIPA foi direcionado para p19 e p24, entretanto, a reatividade maior foi direcionada para as glicoproteínas gp45 e gp61 em seis soros positivos e fraca em correspondência no LCR. Ambos, soro e LCR de todos os pacientes com HAM/TSP exibiram anticorpos contra proteínas da região gag e env em padrão diferente do observado no soro de pacientes com ATL. Não observaram nenhuma diferença entre os padrões do WB e o RIPA no soro e LCR de nenhum dos pacientes com HAM/TSP. A evidência de síntese de IgG total (avaliada por dois indicadores: índice de IgG, descrito por Delpech e Lichtblau (1972), e pela média de síntese de IgG através da barreira hemato-encefálica, de acordo com a fórmula de Tourtelote et al. (1985) em 14 (74%) dos 19 pacientes com HAM/TSP e a presença de banda IgG oligoclonal detectado pela eletroforese em gel de agarose no LCR de 13 (92,85%) destes 14 pacientes demonstra elevada reação inflamatória no LCR dos pacientes com HAM/TSP. Embora o estudo tenha avaliado síntese de IgG por outros instrumentos, não foi explicado a diluição aplicada no WB na razão de 1:100 no LCR

o que pode explicar presença de banda mais intensa no soro do que no LCR neste estudo, pois não foi realizado dosagem de IgG total no LCR e soro para saber a diferença exata da concentração da imunoglobulina. Então as bandas encontradas não caracterizavam síntese intratecal de anticorpo específico. Em nosso estudo podemos sugerir que a presença de bandas do envelope do vírus HTLV-I (rgp46-I, GD21, gp21) e do core (p24) mais intensas no LCR do que no soro são produção local de anticorpo específico.

Estudos realizados por Ceroni et al. (1988), demonstraram banda oligoclonal de IgG contra o HTLV-I no soro e LCR de pacientes com HAM/TSP. 17 amostras de soro e LCR foram testadas pelo ELISA para presença de anticorpos do HTLV-I e confirmados pelo Western imunoblot. A detecção de bandas IgG específicas contra o HTLV-I foi feito de acordo com o método de Dörries e Ter Meulen (1984). Onze pares de soro e LCR foram pesquisados para banda IgG oligoclonal total. Nove dos 11 (81%) mostraram banda oligoclonal total, com uma ou mais bandas detectadas exclusivamente no LCR quando soro e LCR do mesmo paciente corriam em paralelo no mesmo gel. Algumas bandas foram comuns para o soro e LCR. Três pares de soro e LCR foram estudados para banda IgG oligoclonal específica do HTLV-I. Todos mostraram bandas no soro e LCR. Em cada par de amostras, os padrões das bandas IgG foram diferentes no soro e LCR, demonstrando síntese intratecal de anticorpos IgG direcionados para o HTLV-I. Duas amostras de LCR de um mesmo paciente, obtida em um intervalo de seis meses foram corridas em paralelo, e mostraram o mesmo padrão de banda oligoclonal específica. Os dados indicaram síntese intratecal de IgG como outras investigações já haviam revelado, porém os

autores utilizaram as amostras “in natura” colocando em dúvida o resultado mostrado, já que estas apresentam concentrações de IgG diferentes.

Estudo realizado com soro e LCR de 22 pacientes HAM/TSP, investigou bandas de anticorpos IgG anti-HTLV-I (LINK et al.,1989). Os anticorpos foram detectados pelo ELISA e confirmados pela IFI e WB. Diluições seriais em duplicata nas amostras de soro e LCR foram usadas para determinar títulos de anticorpos. Entre os pacientes com HAM/TSP o limite dos títulos variou de 1/1,280 a 1/10,240 no soro e 1/20 a 1/320 no LCR. Para o ensaio da IFI o soro foi diluído 1/50 e o LCR 1/10. Para confirmação pelo WB o soro foi diluído 1/200 e o LCR 1/20. O “kit” de WB usado detecta proteínas p19, p24 e seu precursor Pr53 e a glicoproteína gp46. A FIE foi usada para demonstrar anticorpos IgG anti-HTLV-I. Foi encontrado IgG anti-HTLV-I no LCR e soro pela transferência de proteínas virais na membrana de nitrocelulose. Vinte um pacientes (95%) tinham banda IgG oligoclonal total. Observando a presença no LCR comparado com o soro, os padrões observados poderiam ser divididos em três grupos. Bandas oligoclonais exclusivas no LCR foram achadas em três pacientes (14%) refletindo síntese de IgG no local. Em 11 pacientes (50%), banda IgG oligoclonal foi demonstrada no LCR, uma ou mais bandas, embora nunca todas, também foram encontradas em correspondência no soro. Um terceiro tipo de padrão na forma de duas ou mais bandas IgG oligoclonal ocorreram no LCR e soro em paralelo, tendo similar migração e propriedades de coloração encontrados em sete pacientes (32%). Dezenove dos 22 pacientes (86%) tinham bandas de anticorpo IgG oligoclonal anti-HTLV-I. Dependendo da presença de banda no LCR comparado com o soro, os padrões observados poderiam ser divididos em três categorias, como foi feita para banda oligoclonal total. Bandas oligoclonais

exclusivas no LCR foram achadas em cinco pacientes (23%). Nove pacientes (41%) tinham bandas de anticorpos no LCR, uma ou mais bandas, embora nunca todas, também foram encontradas em correspondência no soro. Nos cinco pacientes (23%) restantes tinham bandas de anticorpos IgG anti-HTLV-I no LCR e correspondência no soro tendo similar migração e propriedades de coloração para cada par de amostra. As diluições aplicadas no referido estudo não foram esclarecidas quanto à aplicação da variação da diluição. No estudo atual fizemos aplicação das diluições com base na diferença de concentração de IgG do LCR e soro.

Pares de LCR e soro de sete pacientes foram estudados por McLean et al. (1989). FIE para IgG total foi executado em paralelo com antígeno blotting nos pares de LCR e soro usando o método descrito por Moyle et al. (1984). Todos os pacientes foram positivos para IgG oligoclonal total no LCR; dois tinham bandas emparelhadas no soro. Nenhum dos soros testados tinham IgG ou IgM específicos. Oito LCR de cinco pacientes tinham IgG oligoclonal HTLV-I específico no imunoblotting antigênico. O número de bandas variou de poucas até mais de 30 e algumas bandas correspondentes na eletroforese de IgG total. A maioria das bandas não eram evidentes no padrão IgG total. Três LCR de dois pacientes mostraram bandas IgM contra HTLV-I. O número de bandas foi pouco, porém a coloração foi intensa. Pacientes positivos para IgM específica não tinham resposta IgG oligoclonal específico para HTLV-I. Todos os pacientes com HAM/TSP tiveram síntese local de IgG oligoclonal no LCR com alguns soros apresentando bandas. Os autores não relatam à aplicação de diluição nas amostras para realização dos testes. Por ser a concentração de IgG do soro até 500 vezes maior do que no LCR não fica claro que a produção de síntese local de imunoglobulina aconteça sem tratamento das

amostras de soro e LCR. De acordo com nosso estudo para demonstração da produção de síntese local de imunoglobulina foi necessário tratamento das amostras de soro e LCR, transformando a concentração de IgG do soro na mesma concentração de IgG do LCR.

Amostras de LCR e soro de três pacientes HAM/TSP foram analisadas por McKendall et al. (1991) pela metodologia do “imunoblot”. As amostras foram consideradas positivas para anticorpos contra HTLV-I quando detectado p24 e gp46 e/ou gp61/68. A reatividade do soro para todos os pacientes foi confirmada pelo “imunoblot”. Soro e LCR foram reativos para todas as maiores proteínas e glicoproteínas do HTLV-I incluindo p19, p24, p53, gp46 e gp68. Quando soro e LCR de dois pacientes foram processados em igual concentração de IgG (6 mg/ml), encontraram maior intensidade da p24 no LCR do que no soro, indicando mais anticorpo contra p24 no LCR do que no soro. Embora os autores não relatem como foi feita a diluição, mostraram o resultado encontrado. Este vem de encontro aos resultados apontados em nosso estudo.

Análises de amostras de LCR e plasma de 20 pacientes com HAM/TSP provenientes do Brasil (18) e Irã (2) foram desenvolvidas por Puccioni-Sohler et al. (1995). Ensaio imunoenzimático (EIA) foi usado para triagem dos anticorpos HTLV-I nas amostras de soro. O RIPA foi realizado para confirmar o resultado de todas as amostras. A preciptação das proteínas do core e do envelope para as amostras de soro diluído foi considerado positivo. A análise do LCR foi feita em todos os pacientes. A focalização isoelétrica com coloração de prata foi realizado para detectar banda IgG oligoclonal. A presença de banda restrita no LCR ou com duas

ou mais bandas no LCR, não encontrada no soro, foi considerado produção de síntese intratecal de IgG. Síntese intratecal de anticorpo IgG do HTLV-I foi avaliada quantitativamente pelo método de AI através do método de ELISA. Valores maiores do que 1.5 foram estabelecidos como positivo. Observou-se no grupo de pacientes com HAM/TSP: reação inflamatória no SNC em todos os casos; 95% (19/20) mostravam bandas oligoclonais refletindo síntese intratecal de IgG no SNC; 85% (7/20) apresentavam síntese local de anticorpos para HTLV-I; 35% tinham síntese mensurável de imunoglobulinas no SNC. Foi encontrada evidencia de mielopatia inflamatória crônica em todos os pacientes testados. Presença de banda oligoclonal foi o parâmetro mais sensível para detectar resposta imune humoral dentro do SNC (refletindo produção intratecal de IgG). Em outro estudo Kitze et al. (1995), também demonstraram síntese intratecal de anticorpos específicos se utilizando de métodos qualitatitavo (RIPA) e quantitativo (AI). A sensibilidade do teste foi primeiro testada com diluições seriadas de controle de soro positivo, mostrando que proteínas da região env e gag poderiam ser precipitadas e claramente visualizadas nas diluições de soro de 1:3000. Isto proporcionou o uso do RIPA para detecção de IgG no LCR. A análise do RIPA em diluições de iguais quantidades de IgG de LCR e soro, mostraram que bandas típicas de proteína do envelope (gp 68) e do gag (p24) do HTLV-I foram mais evidentes em várias precipitações do LCR em comparação com o soro, promovendo evidência de síntese intratecal de anticorpos específicos. A síntese intratecal de anticorpo direcionado contra proteínas do env e gag do HTLV-I mantém a concepção que células infectadas com vírus estão presentes no SNC em alguns estágios da HAM/TSP e que induzem a resposta imune local antiviral. Os dados apresentados nesses estudos indicam a importância da análise do LCR para

o diagnóstico de HAM/TSP, pois foi observada reação inflamatória no LCR. Esses resultados corroboram com os objetivos e resultados do nosso estudo.

Estudo utilizando o método AI, aplicado para estimar frações de síntese de anticorpo especifico no SNC, como única metodologia, demonstrou sensibilidade de 83% e especificidade de 89% para o diagnóstico da HAM/TSP. Em pacientes com sintomas clínicos de HAM/TSP, o valor preditivo positivo de AI foi de 95% e o preditivo negativo foi de 65%, enquanto que o valor preditivo positivo da análise do valor absoluto de anticorpos anti-HTLV-I no LCR, pelo método de ELISA foi 75% e o preditivo negativo de 95% (PUCCIONI-SOHLER et al., 2001). Este estudo demonstra a importância de avaliar sensibilidade e especificidade das técnicas empregadas no LCR. Nossos estudos preliminares não permitiram avaliar sensibilidade e especificidade da técnica de WB por necessidade de ampliação da amostra em período mais prolongado.

No presente estudo, demonstramos síntese intratecal de anticorpo específico contra proteínas anti-gag e env do HTLV-I usando o método qualitativo de WB. Na análise do WB usando quantidade de concentração de IgG iguais no LCR e soro as diluições realizadas de 1:2 e 1:4 mostraram que bandas de proteínas do gag (p24) e do env (gp21, rgp46-I e GD21) tiveram impregnação mais intensa no LCR do que no soro sugerindo síntese intratecal de anticorpo específico, assim como outros autores já haviam demonstrado.

O WB quando comparado com outras metodologias existentes é prático por ser um “kit” comercial, pronto para o uso, desenvolvido em um intervalo de quatro

horas. Enquanto o RIPA coloca em risco o técnico a radioatividade e requer sala específica para eliminar o risco de vazamento radioativo. E o teste AI embora use um teste comercial de ELISA, é muito trabalhoso e necessita de cálculos para o resultado. O método de focalização isoelétrica para verificação de anticorpo para HTLV-I foi aplicado somente para pesquisa “in house” em alguns centros e em pequeno número de amostras e demanda muito tempo.

8 **CONCLUSÕES**

O teste de WB é um instrumento eficaz de avaliação para síntese intratecal de anticorpos específicos para HTLV-I no LCR.

A adaptação do teste de WB propicia a identificação da resposta imunológica intratecal às proteínas de envelope e do core do vírus HTLV-I no SNC.

O *Western blot* é método reprodutível para avaliação do LCR.

O resultado encontrado no LCR está em concordância com o padrão de positividade adotado para o teste de *Western blot.*

REFERÊNCIAS

Bangham CRM. HTLV-I infections. J Clin Pathol 53: 581-586, 2000.

Blattner WA, Saxinger C, Riedel D. A study of HTLV-I and its associated risk factors in Trinidad e Tobago. J. AIDS 3: 1102-1108, 1990.

Cann AJ, Chen ISY. Human T-cell leukemia vírus types I and II. In Fields BN, Knipe DM, Howley PM. Fields Virology. Third Ed. Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia 1849-1880, 1996.

Carneiro-Proietii ABF, Ribas JGR, Catalan-Soares BC, Martins ML et al. Infecção e doença pelos vírus linfotrópicos humanos de células T (HTLV-I/II) no Brasil. Ver. Soc. Brás. de Méd Trop. 35(5): 499-508, 2002.

Cartier LM, Cea JG, Vergara C, Araya F, et al. Clinical and neuropathological study of six patients with sastic paraparesis associated with HTLV-I : an axomyelinic degeneration of the central nervous system. J of Neuropath. And Experim. Neurol. 56:403-413, 1997.

Castro LHM, Chaves, Claudia J, Callegaro D, Nóbrega JPS, Scaff M. HTLV-I associated myelopathy in Brazil. Arq. Neuro-Psiquiat. (São Paulo) 47(4): 501-502, 1989.

Castro-Costa CM, Salgueiro MR, Carton H, Vale OC, Arruda AM. Tropical spastic paraparesis in Northeastern Brazil. Arq Neuro-Psiquiat. 47(2):134-138, 1989.

Catalan-Soares BC, Proietti FA, Carneiro-Proietti ABF. Os vírus linfotrópicos de células T humanos (HTLV) na última década (1990-2000) aspectos epidemiológicos. Ver. Brás. Epidemiol. 4 (2), 2001.

Cavalcanti M, Ferreira Jr. O, Puccioni M, Novis S, Schechter M. HTLV-I-associated neurologic manifestation in four generations of a Brazilian family. J. of. Acquir. Immune Defic. Syndr. 6: 213-217, 1993.

Ceroni M, Piccardo P, Rodgers-Johnson P, Mora C, et al. Intrathecal synthesis of IgG antibodies to HTLV-I supports an etiological role for HTLV-I in tropical spastic paraparesis. Ann Neurol. 23(suppl):S188-S191, 1988.

Cortes E, Detels R, Aboulafia D, Li XL, Moudgil T, Alan M, Bonecker C, Gonzaga A, Oyafuso L, Tondo M, Boite C, Hamerschlak N, Capitani C, Slamon DJ, Ho DD. HIV-1, HIV-2 and HTLV-I in high-risk groups in Brazil. N. Engl. J. Med. 320: 953-8, 1989.

Defer C, Coste J, Descamps F, Voisin S, et al. Contribution of polymerase chain reaction and radioimmunoprecipitation assay in the confirmation of human T-lymphotropic virus infection in French blood donors. Transfusion. 35:596-600, 1995.

Donegan E. Transfusion safety study (TSS) group. Comparison of HTLVI/II with HIV-1 transmission by component type and shelf storage before administration. Transfusion. 29: S130, 1989.

Franchini G. Molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I infection. Blood 86(10): 3619-3639, 1995.

Gessain A, Barin E, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A. Antibodies to human T-lymphotropic virus type I in patients with tropical spastic paraparesis. Lancet. 2:407-410, 1985.

Gessain A, Caudie C, Gout O, Vernant JC, *et al*. Intrathecal synthesis of antibodies to human T lymphotropic virus type I and the presence of IgG oligoclonal bands in the cerebrospinal fluid of patients with endemic tropical spastic paraparesis. The Journal of Infectious Diseases 157 (6):1226-1234, 1988.

Grimaldi LM, Roos RP, Devare SG, Casey JM, *et al*. HTLV-I-associated myelopathy: oligoclonal immunoglobulin bands contain anti-HTLV-I p 24 antibody. Ann Neurol. 24(6):727-31, 1988.

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

Hartley TM, Khabbaz RF, Cannon RO, Kapplan JE, Lairmore MD. Characterization of antibody reativity to human T-cell lymphotropic virus types I and II using immunoblot and radioimmunoprecipitation assays. J Clin Microbiol. 28:646-50, 1990.

Hinuma Y, Nagata K, Hanaoka M. Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. USA. Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 6476-80, 1981.

Ijichi S, Osame M. Human T lymphotropic virus type I (HTLV-I)- associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis (HAM/TSP): recent perspectives. Internal Medicine. 34 (8):713-721, 1995.

Ikeda M Fijino R, Matsui T. A new agglutination test for serum antibodies to adult T-cell leukemia vírus. Gann. 75:845-848, 1984.

Jacobson S., McFarlin DE, Robinson S. HTLV-I specific cytotoxic T lymphocytes in the cerebrospinal fluid of pacients with HTLV-I-associated neurological disease. Ann. Neurol. 32: 651-657, 1992.

Jeffery KJM, Bangham CRM. Recent advances in the laboratory diagnosis of central nervous system infections. Curr Opin Dis. 9:132-137, 1996.

Kajiyama W, Kashiwagi S, Nomura H, Ikematsu H, Hayashi J, Ikematsu W. Soroepidemiologic study of antibody to adult T-cell leukemia virus in Okinawa, Japan. Am. J. Epidemiol. 123: 41-47, 1986.

Kamihira S, Nakasima S, Oyakawa Y. Transmission of human T-cell lymphotropic vírus type I by blood transfusion before and after mass screening of será from seropositive donors. Vox Sang. 52:43-44, 1987.

Kaplan JE, Khabbaz RF, Murphy EL, Hermansen S. e*t al*. Retrovirus epidemiology donor study group. Male-to-female transmission of human T-cell lymphotropic virus types I and II: association with viral load. J. of Acquir. Immune Def. Syndr. 12:193-201, 1996.

Kaplan JE, Osame M, Kubota H. The risk of development of HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. J. Acq. Immune. Defic. Syndr. 3:1096-1101, 1990.

Kitagawa T, Fujishita M, Taguchi H, Miyoshi I, Tadokoro H. Antibodies to HTLV-I in Japanese imigrantes in Brazil. JAMA 256(17): 2342, 1986.

Kitze B, Puccioni-Sohler M, Schaffner J, Rieckmann P, *et al*. Specificity of intrathecal IgG synthesis for HTLV-I core and envelope proteins in HAM/TSP. Acta Neuro Scand. 92:213-217, 1995.

Kitze B, Usuku K, Izumo S, Nakamura M, *et al.* Diversity of intrathecal antibody synthesis against HTLV-I and its relation to HTLV-I associated myelopathy. Neurol. 243:33-400, 1996.

Koralnik IJ, Gessain A. Vírus HTLV-I: structure et fonctin des protéins de la gegion pX. Medicine/sciences 3(10):296-305, 1994.

Kubota R, Osame M, Jacobso S. Effects of Microbes on the Immune System. In Retrovirus: Humam T-cell Lymphotropic Virus Type I-associated Diseases and Immune Dysfunction. Lippincott Williams & Wilkins; 2000. p. 349-371.

La Grenade L. HTLV-I-associated infective dermatitis: past, present, and future. J of Acquir Immune Def Syndr. 13(suppl 1): S46-S49, 1996.

Lee TH, Coligan JE, Homma T, Mclane MF, et al. Human T-cell leukemia virus-associated membrane antigens : identity of the major antigens recognized after virus infection. Proc. Natl Acad Sci USA. 81:3856-60, 1984.

Lessa I, Moraes D, Moura L, Melo A. HTLV-1 and myelopathy in salvador (northeastern razil). Arq. Neuropsiquiatr. 51(4): 447-451, 1993.

Levin MC, Jacobson S. HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP): A chronic progressive neurologic disease associated with immunologically mediated demage to the central nervous system. J Neurovirology.126, 1997.

Link H, Cruz M, Gessain A, Gout O, *et al.* Chronic progressive myelopathy associated with HTLV-I: oligoclonal IgG and anti-HTLV-I IgG antibodies in cerebrospinal fluid and serum. Neurol. 1566-1571,1989.

Maloney EM, Ramirez H, Levin A, Blattner WA. A survey of human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) in south-western Colombia. Int. J. Cancer. 44 : 419-423, 1989.

Manns A., Hisada M., La Grenade L. Human T-lymphotropic virus type infection. Lancet. 353:1951-58, 1999.

McFarlin DE, Blattner WA. Non-Aids retroviral infections in humans. Annu Rev Med. 42:97-105, 1991.

McLean BN, Rudge P, Thompson EJ. Viral specific IgG and IgM antibodies in the CSF of pacients with tropical spastic paraparesis. Neurol. 2: 236-351, 1989.

Merino NV. Diagnóstico serológico Del HTLV-I. In Zaninovic V, Galindo J, Blank A. Enfermedades asociadas com el vírus HTLV-I. 1ª ed. XYZ impressores, Cali, Colômbia 14-15, 1992.

Mochizuki M, Ono A, Ikeda E, Hikita N, et al. HTLV-I uveitis. J of Acquir Immune Def Syndr. 13(suppl 1):S50-S56, 1996.

Moreno-Carvalho OA, Santos JI, Credico G, Galvão CB. Evidence of preferential female prevalence of HTLV-I associated tropical spastic paraparesis in Bahia-Brazil. Arq. Neuro-Psiquiat. 50(2):183-188, 1992.

Morgan OS, Rodgers-Johnson P, Mora C, Char G. HTLV-I and polymyositis in Jamaica. Lancet. 1184-1187, 1989.

Moyle S, Keir G, Thompson EJ. Viral imunoblotting: a sensitive method for detecting viral-specific oligoclonal bands in unconcentrated cerebrospinal fluid. Biosci Rep. 4:505-510, 1984.

Murphy EL, Figueroa JP, Gibbs WN, Holding-Cobham M, Cranston B, Malley K, Bodner AJ, Alexander SS, Blattner WA. Human T-Lymphotropic virus type I (HTLV-I) soroprevalence in Jamaica. Am. J. Epidemiol. 133:1114-24, 1991.

Nakagawa M, Izumo S, Ijichi S, Kubota J, Arimura K, Kawabata M, Osame M. HTLV-I associated myelopathy: analysis of 213 patients based on clinical features and laboratory findings. J neurovirology. 1(1):50-61, 1995.

Nakamura M, Kuroki M, Kira J. et al. Elevated antibodies to synthetic peptides of HTLV-I envelope transmembrane glycoproteins in patients with HAM/TSP. J Neuroimmunol. 35:167-177, 1991.

Okochi K, Sato H, Hinuma Y. A retrospective study on transmission of adult T-cell leukemia vírus by blood transfusion: seroconversion in recipients. Vox Sang. 46: 245-253, 1984.

Osame M, Janssen R, Kubota H, Nishitani H, et al. Nationwide survey of HTLV-I associated myelopathy in Japan: association with blood transfusion. Ann Neurol. 28:50-56, 1990.

Osame M, Matsumoto M, Usuku K, Izumo S, et al. Chronic progressive myelopathy associated with elevated antibodies to human T-limphotropic vírus type I and adult T-cell leukemialike cells. Ann neurol. 21:117-122, 1987.

Osame M, Nakagawa M, Umehara F, Ijichi S, et al. Recent studies on the epidemiology, clinical features and pathogenic mechanisms of HTLV-I associated myelopathy (HAM/TSP) and other diseases associated to HTLV. J of Neurovirol. 3 (supl 1):S50-S51, 1994.

Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, et al. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. Lancet. 1:1031-1032, 1986.

Osame M. Review of WHO Kagoshima meeting and diagnostic guidelines for HAM/TSP. In: Blattner WA, ed. Human Retrovirology: HTLV. New York: Raven Press 191-197, 1990.

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. 77(12):7415-7419, 1980.

Puccioni-Sohler M, Kitze B, Felgenhauer K. HTLV-I associated myelopathy in patients from Brazil and Iran: neurological manifestations and cerebrospinal fluid findings. Arq Neuropsiquiatr. 53(2):213-217, 1995a.

Puccioni-Sohler M, Rios M, Bianco C, Zhu SW, Oliveira C, Novis S, Pombo-de-Oliveira MS. An inverse correlation of HTLV-I viral load in CSF and intrathecal synthesis of HTLV-I antibodies in TSP/HAM. Neurology. 53(6):1335-1339, 1999.

Puccioni-Sohler M, Rios M, Carvalho S et al. Diagnosis of HAM/TSP based on CSF proviral HTLV-I DNA and HTLV-I antibody index. Neurology. 57:725-727, 2001.

Puccioni-Sohler M, Yamano Y, Rios M, Carvalho SMF, et al. Differentiation of HAM/TSP from patients with multiple sclerosis infected with HTLV-I. Neurology. 68:206-213, 2007.

Puccioni-Sohler M. HTLV-I: Quadro clínico e laboratorial. Em: Clínica Neurológica. Ed. Lemos; 1998. p.149-154.

Reeves WC, Saxinger C, Brenes MM, Quiroz E, et al. Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) seroepidemiology and risk factors in metropolitan Panamá. Am J Epidemiol. 127: 532-9, 1988.

Reiber H, Felgenhauer K. Protein transfer at the blood cerebrospinal fluid barrier na the quantification of the humoral immune response within the central nervous system. Clin Chem Acta. 163:319-328, 1987.

Reiber H, Lange P. Quantification of virus-specific antibodies in cerebrospinal fluid and serum: sensitive and specific detection of antibody synthesis in brain. Clin Chem. 37(7):1153-1160, 1991.

Reiber H. External quality assessment in clinical neurochemistry: survey of analysis for cerebrospinal fluid (CSF) proteins based on CSF/serum quotients. Clin Chem. 41:256-263, 1995.

Reiber H. Flow rate of cerebrospinal fluid (CSF) – a concept common to normal blood-CSF barrier function and to dysfunction in neurological disease. J Neurol Sci. 122:189-203, 1994a.

Roman GC, Roman LN, Spencer OS, Schoenberg BS. Tropical spastic paraparesis: a neuroepidemiological study in Colombia. Ann Neurol. 17:361-365, 1985.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. 239:487-491, 1988.

Santos FLN, Lima FWM. Epidemiologia, fisiopatogenia e diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV-I. J Brás Patol Méd Lab. 41(2):105-116, 2005.

Seike M, Hattori S, Hirayama Y, Yoshida M. Human adult T-cell leukemia virus: Complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 80:3618-3622, 1983.

Sindic CJM, Antwerpen MPV, Goffette S. The intratecal humoral immune response: laboratory analysis and clinical relevante. Clin. Chem. Lab. Med. 39(4): 333-340, 2001.

Spina-França A, Livramento JÁ, Machado LR, Gomes HR, et al. HTLV-I antibodies in serum and cerebrospinal fluid in tropical spastic paraparesis in Brazil. Arq Neuro-psiquiat 48(4): 441-447, 1990.

Suehara M, Izumo S Kumamoto I, Osame M. Significance of anti-HTLV-I antibody in cerebrospinal fluid in diagnosis of HTLV-I associated myelopathy (HAM). Rinsho Byori. 40:311-316, 1992.

Sugiyama H, Doi H, Yamagushi K, Tsuji Y, et al. Significance of postnatal mother-to-child transmission of human T-lymphotropic virus type-I on the development of adult T-cell leukemia/lymphoma. J Med Virol. 20 :253-260, 1986.

Tagushi H, Sawada T, Fujishita M. Ezyme-linked immunosorbent assay of antibodies to adult T-cell leukemia associated antigen. Gann. 74 :185-187, 1983.

Takatsuki K, Uchiyama T, Sagawa K, Yodoi J. Adult : T cell leukemia in Japan. In Seno S, Takaku F, Irino S. Eds. Topics in Hematology. Amsterdam : Excepta Medica 73-77, 1977.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electroferetic tranfer of protein from polyacrilamyde gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:4350-4354, 1979.

Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, Takatsuki K, Uchino H. Adult T-cell leukemia : clinical and hematologic features of 16 cases. Blood. 50 :481-92, 1977.

Varmus H, Swanstron R. Replication of retroviruses. In Weiss R., Teich N, Varmus H. RNA tumor viruses. Cold Spring Harbor Laboratory: 369, 1982.

Veronesi R. (1997). HTLV e Doenças associadas. In:_____.Tratado de Infectologia (pp. 400-422). São Paulo:Atheneu.
White PMB. Comparion of assays for antibody to HTLV-I. J Clin Pathol. 41:700-702, 1988.

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

Wu E, Dickson DW, Jacobson S, Raine CS. Neuroaxonal dystrophy in HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: neuropathologic and neuroimmunologic correlations. Acta Neuropathol. 86:224-235, 1993.

Yoshida M, Miyoshi I, Hinuma Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. Proc. Natl. Acad. Sci. 79:2031-2035, 1982.

Anexo A - Carta de aprovação do Comitê de Ética

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

MEMO CEP / Nº 19 / 2006

Rio de Janeiro, 06 de abril de 2006

Ilma
Profª. Marzia Puccioni Sohler
Disciplina de Neurologia

Conforme determinação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, em sua reunião de 06 de abril de 2006, o projeto **"Avaliação e adaptação do teste westem blot para análise do liquido cefalorraquidiano na mielopatia associada ao HTLV-I / paraparesiaespastica tropical (HAM / TSP)"** foi aprovado segundo a Resolução 196/96

Atenciosamente

Fernanda Medeiros
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa do HUGG

Anexo B - Carta de consentimento informado ao paciente

IDADE _____ ANOS.

RG HOSPITAL_____

RESPONSÁVEL LEGAL_____

(SE FOR O CASO)

TÍTULO DO PROJETO: "AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA DO LIQUIDO CEFALORRAQUIDIANO NA MIELOPATIA ASSOCIADA AO HTLV-I"

RESPONSÁVEIS PELO PROJETO:PROF MARZIA PUCCIONI SOHLER

DEPARTAMENTO DE MEDICINA ESPECIALIZADA

UNIVERSIDADE: UNIRIO

INSTITUIÇÃO: HOSPITAL UNIVERSITÁRIO GAFFRE GUINLE (HUGG)

NOME DO PACIENTE: _____

Eu, _____ abaixo assinado, responsável pelo meu parente próximo, _____

(nome do paciente)

Declaro ter pleno conhecimento do que se segue: (especificar cada um dos itens):

1. O exame do líquido da espinha (liquor) é importante método auxiliar no diagnóstico das doenças do sistema nervoso

2- A pesquisa a ser realizada é para estudar a reação de defesa do organismo na presença de vírus, parasitas ou germes que causam problema neurológico.

3- Sei que o liquor será colhido nas costas, através de punção lombar. A dor que acompanha a punção lombar é semelhante aquela da coleta do exame do sangue, podendo em raros casos produzir efeitos indesejáveis.

4. Após submeter-se a punção lombar deverei permanecer em **REPOUSO ABSOLUTO**, em torno de 48 horas e aumentar a ingestão de líquidos. Caso contrário, poderei sentir dor de cabeça ao levantar, podendo a dor prolongar-se por um período de 04 a 07 dias, em média, após a punção, impossibilitando a realização das minhas atividades habituais, pessoais e profissionais.

5.Por ser técnica de tipo invasivo, a coleta do liquor pode apresentar riscos inerentes ao procedimento. São descritas, raramente, intercorrências da punção, com danos neurológicos. Podem ocorrer dores de cabeça, dormência transitórias, dor no local da punção e infecção.

6.Entretanto, a incidência destas complicações é muito pequena, ocorrendo em raras ocasiões.

7. Qualquer dúvida que tiver receberei dos médicos pesquisadores, informações sobre os benefícios e riscos que podem surgir no decorrer do tratamento e também posso usar o telefone: _____.

8. Autorizo a utilização do meu soro e/ou liquor estocado no laboratório _____, bem como meus dados clínicos, laboratoriais e de imagem.

9. Em caso de necessidade de exames mais apurados a serem realizados com este soro e/ou liquor, mas com a mesma finalidade, não será necessária autorização subseqüente.

10. Poderei sair a qualquer momento da pesquisa, retirar o meu consentimento. Isto não impedirá que continue a realizar meu tratamento neste hospital.

11. Ninguém poderá saber o que contarei ao médico pesquisador, mantendo-se o caráter confidencial.

12.Durante todo o tempo da pesquisa, poderei saber o que está acontecendo.

13. A instituição será responsável por meu tratamento caso haja algum dano à minha pessoa diretamente causado pela pesquisa.

Consentimento ao Paciente

A sua participação é voluntária, isto é, a sua decisão de autorizar ou não o uso de seu soro e /ou liquor, bem como seus dados clínicos, laboratoriais e de imagem não afetará de forma alguma a sua assistência médica neste Hospital.

1. Li com atenção o texto sobre informação ao paciente;
2. Conversei com o _____(tel.: _____);
3. Tive a oportunidade de fazer perguntas e discutir a pesquisa;
4. Compreendi completamente as respostas às minhas perguntas feitas ao médico;
5. Entendi que tenho direito de não participar da pesquisa;
6. Entendi que minhas informações pessoais podem ser revistas por pessoas devidamente autorizadas para conduzir a pesquisa. Porém essas serão informações estritamente confidenciais, sendo resguardada minha identidade.

Data:__/__/__.

_____

Assinatura do ( ) paciente ou ( ) seu responsável

_____

Assinatura do médico que obteve o consentimento e inscrição

_____

Assinatura da testemunha Assinatura da testemunha

Casos especiais de consentimento:

1 – Paciente menor de 16 anos; deverá ser dado por um dos pais ou, na inexistência destes, pelo parente mais próximo ou responsável.

2 – Paciente maior de 16 e menor de 21 anos; com a assistência de um dos pais ou responsável.

3 – Paciente e/ou responsável analfabeto; o presente documento deverá ser lido em voz alta para o paciente e seu responsável na presença de duas testemunhas que firmarão também o documento.

4 - Paciente deficiente mental incapaz de manifestação de vontade: suprimento necessário da manifestação de vontade por seu representante legal.

Apêndice A - Resultado do procedimento do teste de WB nº 01

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

Kit: HTLV-I BLOT 2.4 Lote: AK5008 Validade: 01/10/2006

Operador: Cássia Data: 11/09/2006

Número da tira	Tipo de amostra	Diluição	Tiras
01	CN	———	19
02	CP-I	———	20
03	CP-II	———	21
04	Branco	———	22
05	Soro	1:10	
06	LCR	1:10	24
07	Soro	1:20	25
08	LCR	1:20	26
09	Soro	1:40	27
10	LCR	1:40	28
11	Soro	1:80	29
12	LCR	1:80	30
13	Soro	1:160	31
14	LCR	1:160	32
15	Soro	1:320	33
16	LCR	1:320	34
17	Soro	1:640	35
18	LCR	1:640	36

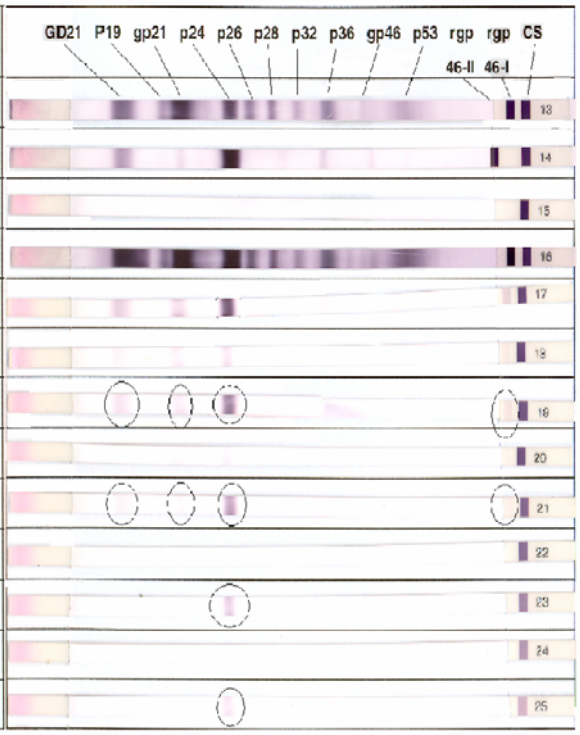
Apêndice B - Resultado do procedimento do teste de WB nº 02

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

Kit: HTLV-BLOT 2.4 Lote: AK5008 Validade: 01/10/2006

Operador: Cássia Data: 15/ 09/ 2006

Número da tira	Tipo de amostra	Diluição	bandas
01	CP I	——	GD21-p19-gp21-p24-p26-p28-p32-p36-gp46-p53-rgp46-I
02	CP II	——	GD21-gp21-p24-p36-gp46-p53-rgp46-II
03	CN	——	————————
04	SORO	IN NATURA	GD21-p19-gp21-p24-p26-p28-p32-p36-gp46-p53-rgp46-I
05	LCR	IN NATURA	GD21-p21-p24-rgp46-I
06	SORO	1:2	GD21-p21-p24-rgp46-I
07	LCR	1:2	GD21-p21-p24-rgp46-I
08	SORO	1:4	p24
09	LCR	1:4	GD21-p21-p24-rgp46-I
10	SORO	1:8	————
11	LCR	1:8	p24
12	SORO	1:16	————
13	LCR	1:16	p24



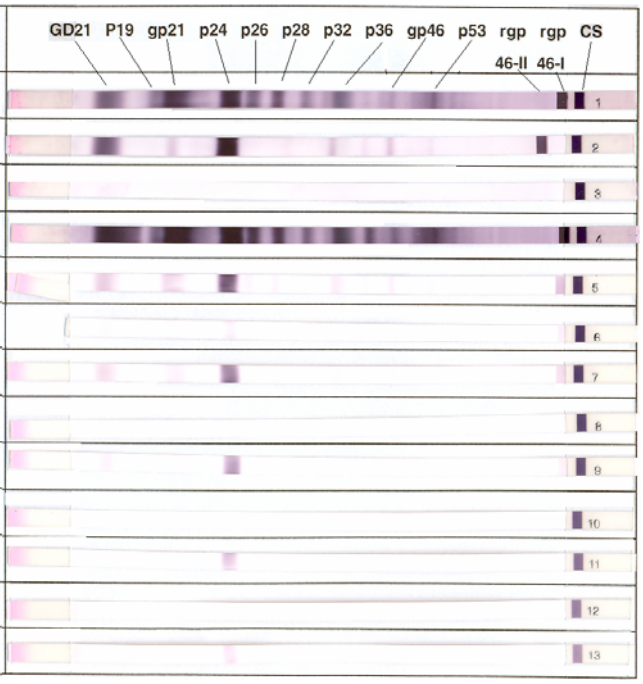
Apêndice C - Resultado do procedimento do teste de WB nº 03

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

Kit: HTLV-BLOT 2.4 Lote: AK5008 Validade: 01/10/2006

Operador: Cássia Data: 18/09/06

Número da tira	Tipo de amostra	Diluição	bandas
01	CP I	—	GD21-p19-gp21-p24-p26-p28-p32-p36-gp46-p53-rgp46-I
02	CP II	—	GD21-gp21-p24-p36-gp46-p53-rgp46-II
03	CN	—	—
04	SORO	IN NATURA	GD21-p19-gp21-p24-p26-p28-p32-p36-gp46-p53-rgp46-I
05	LCR	IN NATURA	GD21-p21-p24-rgp46-I
06	SORO	1:2	GD21-p21-p24-rgp46-I
07	LCR	1:2	GD21-p21-p24-rgp46-I
08	SORO	1:4	p24
09	LCR	1:4	GD21-p24
10	SORO	1:8	—
11	LCR	1:8	p24
12	SORO	1:16	—
13	LCR	1:16	p24



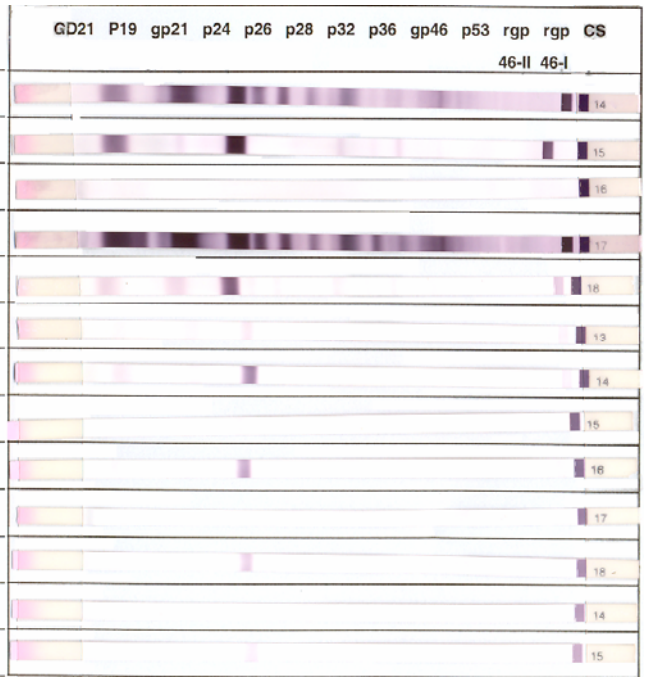
Apêndice D - Resultado do procedimento do teste de WB nº 04

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

Kit: HTLV-BLOT 2.4 Lote: AK5008 Validade: 01/10/2006

Operador: Cássia Data: 22/09/2006

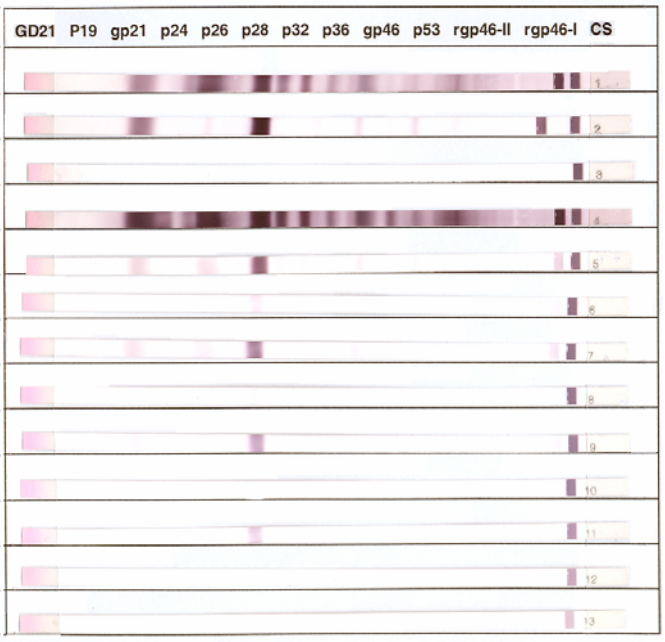
Número da tira	Tipo de amostra	Diluição	bandas
01	CP I	—	GD21-p19-gp21-p24-p26-p28-p32-p36-gp46-p53-rgp46-I
02	CP II	—	GD21-gp21-p24-p36-gp46-p53-rgp46-II
03	CN	—	—
04	SORO	IN NATURA	GD21-p19-gp21-p24-p26-p28-p32-p36-gp46-p53-rgp46-I
05	LCR	IN NATURA	GD21-p21-p24-rgp46-I
06	SORO	1:2	p24-rgp46-I
07	LCR	1:2	GD21-p24-rgp46-I
08	SORO	1:4	—
09	LCR	1:4	p24
10	SORO	1:8	—
11	LCR	1:8	p24
12	SORO	1:16	—
13	LCR	1:16	p24



Apêndice E - Resultado do procedimento do teste de WB nº 05

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

Kit: HTLV-BLOT 2.4 Lote: AK5008 Validade: 01/10/2006

Operador: Cássia Data: 25/09/2006

Número da tira	Tipo de amostra	Diluição	bandas
01	CP I	——	GD21-p19-gp21-p24-p26-p28-p32-p36-gp46-p53-rgp46-I
02	CP II	——	GD21-gp21-p24-p36-gp46-p53-rgp46-II
03	CN	——	——————
04	SORO	IN NATURA	GD21-p19-gp21-p24-p26-p28-p32-p36-gp46-p53-rgp46-I
05	LCR	IN NATURA	GD21-p21-p24-rgp46-I
06	SORO	1:2	GD21-p21-p24-rgp46-I
07	LCR	1:2	GD21-p21-p24-rgp46-I
08	SORO	1:4	p24
09	LCR	1:4	GD21-p24
10	SORO	1:8	——————
11	LCR	1:8	p24
12	SORO	1:16	——————
13	LCR	1:16	p24