

KAROLINE RODRIGUES CAMPOS

**Estratégias de melhoria, expansão do diagnóstico e
monitoramento das infecções por HTLV-1 e HTLV-2
nas coinfeções por HIV, HBV e HCV**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Profa. Dra. Adele Caterino de Araujo

São Paulo

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Campos, Karoline Rodrigues

Estratégias de melhoria, expansão do diagnóstico e monitoramento das infecções por HTLV-1 e HTLV-2 nas coinfeções por HIV, HBV e HCV / Karoline Rodrigues Campos. – 2020.

Tese (Doutorado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2020.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientação: Profa. Dra. Adele Caterino de Araújo.

1. Virus linfotrópico T humano 1 e 2.
2. Hepatite B e C/complicações.
3. Coinfecção/complicações.
4. Mutação.
5. Técnicas de laboratório clínico/método.

SES/CCD/CD - 422/2020

Elaborada por Renan Matheus Predasoli CRB 8/9275

**Trabalho realizado no Centro de
Imunologia do Instituto Adolfo Lutz de
São Paulo/SP da Coordenadoria de
Controle de Doenças - Secretaria de
Estado da Saúde de São Paulo.**

Apoio Financeiro:

FAPESP # 2016/03654-0

Bolsa CAPES (Doutorado)

*“O que sabemos é uma gota, o
que ignoramos é um oceano”*

(Isaac Newton)

*Dedico este trabalho aos meus pais Francisco e Generosa e
à Profª Drª Adele Caterino de Araujo, exemplos a quem busco
me espelhar.*

Agradecimentos

A Deus por me capacitar e pôr pessoas maravilhosas no meu caminho, que me ajudaram, apoiaram e incentivaram. Sem a colaboração de cada um, não seria possível concretizar este sonho.

Aos meus pais Francisco e Generosa meus alicerces, exemplos de respeito, amor e perseverança. Sempre me incentivaram a estudar e, me deram todo o suporte para buscar e realizar meus objetivos.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Adele Caterino de Araujo, por estes dez anos de convivência, aprendizado, amizade e inspiração. Exemplo de ética e profissionalismo. Obrigada por estar ao meu lado e pegar na minha mão desde os primeiros passos desta jornada, quando iniciava na Ciência, por todo o incentivo, participação no meu amadurecimento e amor pela Pesquisa Científica. Difícil encontrar palavras para expressar toda admiração, respeito e gratidão que tenho por você.

À minha irmã Maryellen Rodrigues Campos pelo apoio, torcida e por me presentear com a Maria Eduarda Campos, minha sobrinha, fonte de ternura, risos e “abraços quentinhos”.

Ao meu namorado Renato Valentim, pelo apoio incondicional, por vibrar comigo nas pequenas e grandes vitórias e ser meu porto seguro nos momentos difíceis.

A todos os amigos e familiares que torceram por mim, seja de perto ou de longe, para que eu alcançasse mais esta vitória.

Aos membros da Banca de Exame de Qualificação, Dr^a. Tatiane Assone dos Santos, Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto e Prof. Dr. Luiz Fernando de Macedo Brígido, pelas sugestões que melhoraram este manuscrito.

Ao Instituto Adolfo Lutz, minha segunda casa durante estes dez anos, onde aprendi muito e cresci profissionalmente.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretária de Estado da Saúde de São Paulo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa concedida.

A todos os meus sinceros agradecimentos!

Campos, KR. Estratégias de melhoria, expansão do diagnóstico e monitoramento das infecções por HTLV-1 e HTLV-2 nas coinfeções por HIV, HBV e HCV

Para avaliar o impacto das coinfeções pelos vírus T-linfotrópicos humanos 1 e 2 (HTLV-1/-2) e vírus da imunodeficiência humana (HIV) nas hepatites virais B e C, e analisar estratégias para melhoria e expansão do diagnóstico das infecções por HTLV-1/2, realizou-se este estudo. O impacto nas hepatites foi analisado pelas medianas de carga viral (CV) e clareamento viral obtidos em cada grupo de indivíduos infectados pelos vírus das hepatites B (HBV, n=1.910) e C (HCV, n=1.315), separados quanto à positividade para as coinfeções. A menor CV de HBV foi detectada nos HBV/HTLV-2, independente do *status* HIV ($p<0,05$). Enquanto os coinfectados HCV/HIV, HCV/HIV/HTLV-1/-2, apresentaram as maiores CV de HCV ($p<0,05$), e a menor foi detectada nos pacientes HCV/HTLV-2. No início do estudo 61,1% dos HBV/HTLV-2 e 21,4% dos HBV/HTLV-1 tinham CV indetectável. Contrapondo as porcentagens de CV indetectável nos HCV/HTLV-1 e HCV/HTLV-2, que eram inicialmente similares e, durante o acompanhamento, ocorreu mais depuração do HCV em pacientes HCV/HTLV-2 [OR 2,65; IC 95% (1,17–5,99)]. A busca por marcadores genéticos virais que pudessem interferir nos testes diagnósticos para HTLV-1/2, avaliou 69 amostras de DNA de indivíduos de SP [HTLV-1 (n=44) e HTLV-2 (n=25)] e, encontrou os subtipos HTLV-1aA e HTLV-2c e os respectivos genótipos TaxA e TaxC entre as estirpes circulantes. Ainda, mutações pontuais (LTR), sinônimas e não sinônimas (*env* e *tax*) e deleção de segmentos genômicos de HTLV-1/-2 (provírus defectivos), foram associados com pior desempenho dos testes de triagem e confirmatórios ($p<0,05$). A capacidade do imunoensaio de linha (LIA) em solucionar resultados Western blot (WB) inconclusivos (Ind – indeterminados; e HTLV não tipados), foi confirmada em três cenários, onde se agrupou 111 amostras de acordo com a positividade ou não para HIV e HBV/HCV. Assim, o LIA resolveu: 66,1% (G1-HIV); 83,3% (G2-HBV/HCV), e 76,0% (G3-HTLV monoinfectados) dos casos, sendo que a maioria dos WB-Ind foram

confirmadas pelo LIA como HTLV-2 (G1 e G2) e como HTLV-1 ou HTLV (G3). A estratégia de *pool* com cinco soros na triagem de HTLV-1/2 usando o ensaio imunoenzimático Murex foi validada e aprovada, proporcionando 60,7% a 73,6% de economia, que variou de acordo com a prevalência de infecção HTLV-1/2 encontrada na população de estudo. Concluindo, foi confirmado o impacto negativo do HTLV-1 e HIV nas coinfeções HBV e HCV, por aumentar os níveis de CV e diminuir a depuração de HCV; enquanto a influência de HTLV-2 foi positiva na evolução das hepatites B e C, pois diminuiu CV e aumentou o clareamento viral. Identificaram-se marcadores virais que interferem nos testes sorológicos e moleculares, também, encontraram-se maneiras de melhorar e expandir o diagnóstico de HTLV-1/2, com a utilização do LIA na etapa confirmatória e o *pool* de soros na triagem, que se mostrou exequível a incorporação à menor custo para o Sistema Único de Saúde.

Palavras-chave: HTLV-1 e HTLV-2; Hepatites virais B e C; Coinfecção; Partículas provirais defectivas; Mutações; Técnicas de Laboratório Clínico.

Campos, KR. Strategies for improving, expanding the diagnosis and monitoring HTLV-1 and HTLV-2 infections in HIV, HBV and HCV coinfections

This study was conducted to assess the impact of human T- lymphotropic virus 1 and 2 (HTLV-1/-2) and human immunodeficiency virus (HIV) in viral hepatitis B and C coinfections, and to analyze strategies for improving and expanding the diagnosis of HTLV-1/2 infections. The hepatitis B and C outcomes were evaluated by HBV and HCV viral load (VL) levels and clearance in HBV (n=1,910) and HCV (n=1,315) infected individuals, grouped for HIV and/or HTLV-1/2 coinfections. The lowest HBV VL was detected in HBV/HTLV-2 coinfecting patients, regardless of their HIV status ($p<0.05$). In contrast, higher HCV VL were detected in HCV/HIV, HCV/HIV/HTLV-1/-2 coinfecting patients (all $p<0.05$), and the lowest HCV VL in HCV/HTLV-2 coinfecting patients. Curiously, 61.1% of patients with HBV/HTLV-2 had an undetectable HBV VL at the beginning of the study versus 21.4% in patients with HBV/HTLV-1. Although the percentages of undetectable HCV loads in HCV/HTLV-1 and HCV/HTLV-2 coinfecting patients were quite similar, during follow-up, more HCV clearance was detected in patients with HCV/HTLV-2 [OR 2.65; 95% IC (1.17–5.99)]. To search for genetic markers that could influence the performance of HTLV-1/2 diagnostic tests, 69 DNA samples from individuals from SP [HTLV-1 (n=44) and HTLV-2 (n=25)] were evaluated. HTLV-1aA and HTLV-2c subtypes and the TaxA and TaxC genotypes were detected circulating in such individuals, and point mutations in LTR, synonymous and nonsynonymous mutations in *env* and *tax* genes, joint to genomic segments deletion of HTLV-1/-2 (defective provirus) were detected and associated with worse performance of the screening and confirmatory tests (all $p<0.05$). The ability of the line immunoassay (LIA) to confirm HTLV-1/2 infections was assured in three scenarios, which grouped 111 Western blot (WB) inconclusive samples (Ind - indeterminate and HTLV untypeable), according to HIV- or HBV/HCV-positivity. HTLV-1/2 infections were confirmed in 66.1% (G1-HIV); 83.3% (G2-HBV/HCV), and 76.0% (G3-HTLV monoinfected) of samples; the majority of WB-Ind as being HTLV-2 positive in G1 and G2, and HTLV-1 or HTLV positive in G3. The pooling

strategy for HTLV-1/2 screening using five serum samples and the Murex immunoenzymatic assay was validated, and applied in at-risk populations, showing a reduction cost varying from 60.7% to 73.6%, depending on the HTLV-1/2 prevalence. In conclusion, the results obtained confirmed the negative impact of HTLV-1 and HIV on HBV and HCV virological outcome (increased VL levels and decreased HCV clearance), and the positive impact of HTLV-2 (lower HBV and HCV VL and increased HCV clearance). Provirus mutations that interfere with serological and molecular tests were identified. Strategies to improve and expand the diagnosis of HTLV-1/2 were achieved, as the use of LIA in confirming infections, and the pooling sera in reducing costs of the screening for the Health Unique System in Brazil.

Keywords: HTLV-1 and HTLV-2; Viral hepatitis B and C; Coinfection; Defective provirus; Mutations; Clinical Laboratory Techniques.

Lista de abreviações, siglas e símbolos

A, C, G, T	Adenina, Citosina, Guanina, Timina
aa	Aminoácido
ATLL	<i>Adult T-cell leukemia/lymphoma</i> - Leucemia linfoma de células T adultas
APH-2	<i>Antisense Protein HTLV-2</i> – Proteína anti-senso do HTLV-2
ASS	Assintomático
BA	Bahia
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> – Ferramenta de comparação de sequências
CA	Capsídeo
CLIA	<i>Chemiluminescent immunoassay</i> – Imunoensaio de quimiluminescência
CO	<i>Cutoff</i> – ponto de corte
CONITEC	Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS
CPV	Carga proviral
CRE	<i>cAMP response elements</i>
CTC	Comitê Técnico Científico
CV	Carga viral
DAAs	<i>Direct Acting Antiviral</i> – Antivirais de ação direta
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> - Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
DO/CO	Densidade óptica em relação ao <i>cutoff</i>
dqPCR	<i>Digital quantitative PCR</i> – PCR em tempo real digital
E-Box	<i>Enhancer box motif</i>
EIA	<i>Enzyme Immune Assay</i> - Ensaio imunoenzimático
ETS	<i>E-twenty-six transcription factor family motif</i>
EUA	Estados Unidos da América
env/Env	Gene (<i>env</i>) e proteína (Env) da região do envelope viral
Freq.	Mutações mais frequentes
G1, G2, G3	Grupo 1, grupo 2 e grupo 3
gag/Gag	Gene (<i>gag</i>) e proteína (Gag) da região do core viral

GLUT1	<i>Glucose transporter 1</i> - transportador de glicose-1
gp	<i>Glycoprotein</i> – glicoproteína
HAM/TSP	<i>HTLV-I-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis</i> - Mielopatia associada ao HTLV-1/Paraparesia Espástica Tropical
HBV	<i>Hepatitis B virus</i> - vírus da hepatite B
HBsAg	<i>Hepatitis B virus surface Antigen</i> – Antígeno de superfície de HBV
HBZ	<i>HTLV-1 basic zipper factor</i> – proteína anti-senso do HTLV-1
HCV	<i>Hepatitis C virus</i> - vírus da hepatite C
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> - vírus da imunodeficiência humana
HSPG	<i>Heparan sulfate proteoglycan receptor</i> – Receptor de proteoglicanos de heparam sulfato
HTLV	<i>Human T-lymphotropic virus</i> - vírus T-linfotrópico humano
HTLV-1	<i>Human T-lymphotropic virus 1</i> - vírus T-linfotrópico humano 1
HTLV-2	<i>Human T-lymphotropic virus 2</i> - vírus T-linfotrópico humano 2
HTLV-3	<i>Human T-lymphotropic virus 3</i> - vírus T-linfotrópico humano 3
HTLV-4	<i>Human T-lymphotropic virus 4</i> - vírus T-linfotrópico humano 4
IAL	Instituto Adolfo Lutz
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> , Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus
IC95%	95% de Intervalo de Confiança
ID	Identificação
IN	Integrase
INNO-LIA	<i>Line immunoassay from Innogenetics</i> - Imunoensaio de linha da marca Innogenetics
IQR	<i>Interquartil range</i> – Intervalo interquartil
IST	Infecção Sexualmente Transmissível
Kit	Conjunto de reagentes
Kb	Kilobase
kDa	Kilodaltons
LAMP	<i>Loop-mediated isothermal amplification</i> - amplificação isotérmica de ácidos nucleicos mediada por alça
LIA	<i>Line immunoassay</i> - imunoensaio de linha
5'-, 3'- LTR	<i>Long terminal repeat 5'/3'</i> - Repetições terminais longa sentido 5' e 3'

MA	Matriz
ML	<i>Maximum Likelihood</i> – Máxima verossimilhança
<i>motifs</i>	Sítios de ligação
MS	Ministério da Saúde do Brasil
N	Número
NC	Nucleocapsídeo
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NJ	<i>Neighbor joining</i>
<i>n</i>-PCR	<i>Nested-Polymerase Chain Reaction</i> – segunda etapa de reação em cadeia da polimerase utilizando iniciadores internos ao produto da primeira reação
NRP-1	<i>neuropilin-1</i> - Receptores celulares de neuropilina-1
NSIN	Mutações não sinônimas
nt	Nucleotídeos
OR	<i>Odds ratio</i> - razão de chances/possibilidades
OLIGO	Oligossintomático – apresenta sintomas não neurológicos associados à infecção por HTLV-1
p	Proteína
<i>p</i>	<i>p value</i> - probabilidade de significância estatística
PA	<i>Particle Agglutination</i> – Aglutinação em partícula
pb	Pares de bases
PCDT	Protocolo Clínico e de Diretrizes Terapêuticas
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em cadeia da polimerase
PCR-RFLP	<i>PCR - Restriction Fragments Length Polymorphism</i> - Polimorfismo do tamanho de fragmentos de restrição enzimática em produtos de PCR
PE	Pernambuco
<i>pol</i>/Pol	Gene (<i>pol</i>) e proteína (Pol) da região da polimerase viral
Poly A	domínio responsável por ativar a poliadenilação do RNAm
<i>pro</i>/PR	Gene (<i>pro</i>) e proteína (PR) da região da protease viral
<i>primer</i>	Sequência de oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR
<i>Promoter</i>	Região promotora no LTR
<i>pX</i>	Região que codifica as proteínas regulatórias virais
qPCR	<i>Real-time Polymerase Chain Reaction</i> - Reação em cadeia da polimerase em tempo real ou quantitativa

R	Segmento de repetição do LTR
rgp	<i>recombinant glycoprotein</i> – glicoproteína recombinante
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> - Ácido ribonucleico
RNA_m	RNA mensageiro
RT	<i>Reverse transcriptase</i> – Transcriptase reversa
<i>round</i>	Primeira etapa da <i>nested-PCR</i>
Sig 2c	Assinatura molecular do subtipo 2c na região LTR
SIGH	Sistema de Gestão Hospitalar
SIN	Mutações sinônimas
Sinan	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SP	São Paulo capital e região
SRE	<i>Serum Response Element</i>
SU	Superfície
SUS	Sistema Único de Saúde
T CD4⁺	Linfócitos T auxiliares
T CD8⁺	Linfócitos T citotóxicos
TARV	Terapia antirretroviral
TATA Box	Sequência de nucleotídeos na região promotora que sinaliza o local de início da replicação em eucariontes
<i>tax/Tax</i>	Gene (<i>tax</i>) e proteína (<i>Tax</i>) – envolvidas na regulação e patogênese
TM	Transmembrana
TER	<i>Tax Responsive Elements</i>
U3, U5	Segmento único 3, único 5 do LTR
UDE	Usuário/uso de drogas endovenosas
UNAIDS	<i>Joint United Nations Program on HIV/AIDS</i>
WB	<i>Western blot</i>
WB-HTLV	Amostras com resultado HTLV não tipado pelo WB
WB-Ind	Amostras com resultado indeterminado pelo WB
WHO	<i>World Health Organization</i>

Lista de Quadros e Tabelas

Quadro 1. Sequências dos <i>primers</i> utilizados nas reações em cadeia da polimerase e de sequenciamento genético de HTLV-1 e HTLV-2	42
Tabela 1. Características dos indivíduos infectados por HBV e resultados de carga viral de acordo com as coinfeções por HIV, HTLV-1 e HTLV-2	52
Tabela 2. Características dos indivíduos infectados por HCV e resultados de carga viral de acordo com as coinfeções por HIV, HTLV-1 e HTLV-2	53
Tabela 3. Fatores associados com carga viral de HBV não detectada nas amostras de infecção e coinfeção por HBV	56
Tabela 4. Fatores associados com o clareamento viral de HCV nas amostras de infecção e coinfeção por HCV	57
Quadro 2. Característica dos indivíduos coinfectados por HIV/HTLV-1/-2 de SP e monoinfectados por HTLV-1 de PE, e número de mutações encontradas em cada amostra de acordo com as regiões de LTR, <i>env</i> e <i>tax</i> sequenciados	59
Quadro 3. Substituições nucleotídicas, inserções, deleções no LTR, e mutações sinônimas e não sinônimas nos genes <i>env</i> e <i>tax</i> das sequências de HTLV-1 de SP e PE	69
Quadro 4. Substituições nucleotídicas, inserções, deleções no LTR, e mutações sinônimas e não sinônimas nos genes <i>env</i> e <i>tax</i> das sequências de HTLV-2 de SP	74
Tabela 5. Características (sexo e idade) e número de indivíduos em cada grupo, cujas amostras de soro resultaram HTLV inconclusivos no WB e estavam disponíveis para análise pelo LIA	79
Tabela 6. Perfis de WB-indeterminados detectados em amostras de soro de cada grupo de estudo; número e porcentagem das amostras de soro que confirmaram infecção por HTLV-1/2 após análise pelo LIA	81
Quadro 5. Resultados finais e perfis obtidos com ensaios sorológicos confirmatórios para a detecção de anticorpos HTLV-1/2 em 111 amostras de soro que resultaram inconclusivos no WB e foram testadas por LIA	82
Tabela 7. Medianas das mutações totais, pontuais em região promotora, sinônimas e não sinônimas encontradas de acordo com o resultado nos testes confirmatórios sorológicos e moleculares de 69 amostras de SP	93

Lista de Figuras

Figura 1. Fluxograma das amostras utilizadas no estudo	38
Figura 2. Fluxograma com as etapas e amostras utilizadas na estratégia de <i>pool</i> de soros aplicada para a triagem de infecção por HTLV-1/2	39
Figura 3. Medianas e intervalos interquartis das idades dos indivíduos com HBV de acordo com os tipos de infecções e coinfeções viras	54
Figura 4. Medianas e intervalos interquartis dos valores de carga viral dos indivíduos com HBV de acordo com os tipos de infecções e coinfeções viras	54
Figura 5. Medianas e intervalos interquartis das idades dos indivíduos com HCV de acordo com os tipos de infecções e coinfeções viras	55
Figura 6. Medianas e intervalos interquartis dos valores de carga viral dos indivíduos com HCV de acordo com os tipos de infecções e coinfeções viras	55
Figura 7. Representação dos subtipos HTLV-1a (A) e HTLV-2a (B) gerado pela ferramenta <i>Genotyping</i> (NCBI) com as sequências do estudo	58
Figura 8. Árvore filogenética <i>Maximum Likelihood</i> da região LTR de HTLV-1	66
Figura 9. Árvore filogenética <i>Maximum Likelihood</i> da região <i>tax</i> de HTLV-1	67
Figura 10. Árvore filogenética <i>Maximum Likelihood</i> da região <i>env</i> de HTLV-1	68
Figura 11. Árvore filogenética <i>Maximum Likelihood</i> da região <i>env</i> de HTLV-2	71
Figura 12. Árvore filogenética <i>Maximum Likelihood</i> da região <i>tax</i> de HTLV-2	72
Figura 13. Árvore filogenética <i>Maximum Likelihood</i> da região LTR de HTLV-2	73
Figura 14. Comparação do número de mutações de HTLV-1 e HTLV-2 totais (A) em cada gene (LTR, <i>env</i> e <i>tax</i>) e em região promotora do LTR (B)	76
Figura 15. Comparação de mutações sinônimas (A) e não sinônimas (B) nos genes <i>env</i> e <i>tax</i> de HTLV-1 e HTLV-2	77

Figura 16. Partículas provirais defectivas nas amostras de HTLV-1 (SP e PE) e de HTLV-2	78
Figura 17. Número de amostras de soro em cada grupo de estudo com resultado WB-indeterminado ou HTLV não tipado em análises anteriores que confirmaram ou excluíram infecções por HTLV pelo LIA	80
Figura 18. Acurácia da estratégia de <i>pool</i> de soros	88
Figura 19. Resultado da triagem sorológica de 69 amostras HIV/HTLV-1/2 de acordo com a detecção do provírus na qPCR e <i>n</i> PCR-RFLP, usando U-test Mann-Whitney para avaliar às associações estatísticas	90
Figura 20. Médias de DO/CO detectados na triagem de 69 amostras com a coinfeção HIV/HTLV-1/2, segundo o sequenciamento dos genes LTR, <i>env</i> e <i>tax</i> , utilizando o teste estatístico U-test Mann-Whitney	91
Figura 21. Algoritmo de testes laboratoriais para o diagnóstico das infecções por HTLV-1 e HTLV-2	94

Índice

Resumo

Abstract

1. Introdução	18
1.1. Histórico e epidemiologia	18
1.2. Estrutura do genoma, replicação e análise filogenética dos HTLV-1/2	22
1.3. Diagnóstico laboratorial das infecções por HTLV-1/2	28
2. Objetivos	33
2.1. Objetivo geral	33
2.2. Objetivos específicos	33
3. Material e Métodos	34
3.1. Material	34
3.1.1. Amostras de Hepatite B e C para avaliação de carga viral (CV) e clareamento viral	34
3.1.2. Amostras para a caracterização molecular de HTLV-1 e HTLV-2	35
3.1.3. Amostras utilizadas na comparação dos testes sorológicos confirmatórios	36
3.1.4. Amostras utilizadas para a avaliação de estratégias de expansão e melhoria do diagnóstico das infecções por HTLV-1 e HTLV-2	36
3.1.5. Aspectos éticos	37
3.2. Métodos	40
3.2.1. Análise de marcadores de evolução das hepatites B e C utilizando os parâmetro de carga viral e clareamento de HBV e HCV	40
3.2.2. Caracterização molecular de HTLV-1 e HTLV-2	40
3.2.2.1. Sequenciamento genético e edição das sequências	41
3.2.2.2. Subtipagem das estirpes HTLV-1 e HTLV-2	41
3.2.2.3. Análise Filogenética	43
3.2.2.3.1. Número de acesso ao GenBank das sequências	43

utilizadas para construção das árvores filogenéticas, segundo a região genômica

3.2.2.3.1.1. HTLV-1	43
3.2.2.3.1.2. HTLV-2	45
3.2.2.4. Análise de mutações	47
3.2.2.5. Análise de partículas provirais defectivas	47
3.2.3. Avaliação do INNO-Lia (LIA) na resolução de amostras inconclusivas pelo <i>Western Blot</i> (WB)	48
3.2.4. Avaliação de estratégias para melhoria e expansão do diagnóstico das infecções por HTLV-1 e HTLV-2	49
3.2.5. Análise estatística	49
3.2.6. Conflito de interesse	50
4. Resultados	51
4.1. Marcadores de evolução das hepatites B e C	51
4.2. Caracterização molecular de HTLV-1 e HTLV-2	58
4.3. LIA na resolução de amostras inconclusivas no WB	79
4.4. Estratégias de expansão e melhoria do diagnóstico de HTLV-1 e HTLV-2	87
5. Discussão	95
6. Limitações do estudo	117
7. Conclusões	118
8. Referências	119
9. Anexos	143
9.1. Aprovações nos Comitês de Ética	

1. Introdução

1.1. Histórico e epidemiologia

Mesmo após 40 anos de sua descoberta, o vírus T-linfotrópico humano 1 (HTLV-1), o primeiro retrovírus humano descrito, ainda é um patógeno/infecção negligenciado (Poiez et al., 1980; Tagaya et al., 2019; Cook e Taylor, 2019). Agente causador de diversas manifestações clínicas (bexiga neurogênica; uveíte; bronquiectasia; dermatite seborreica, doenças autoimunes, infecções oportunistas), sendo uma de alta morbidade, a mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP, do inglês *HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesia*) e outra com elevada letalidade, a leucemia linfoma de células T adultas (ATLL, do inglês *Adult T-cell Leukaemia/Lymphoma*), que nos casos agudos pode levar o paciente a óbito em até seis meses (Haziot, et al., 2019; Gessain et al., 1985; Yoshida et al., 1982).

Também fazem parte da família *Retroviridae*, gênero *Deltaretrovirus*, outros três vírus (HTLV-2, HTLV-3 e HTLV-4), sendo que os dois últimos foram descritos apenas em tribos remotas de pigmeus em Camarões, África Central, e não têm a mesma relevância epidemiológica, tampouco associação com desenvolvimento de doença em humanos (ICTV, 2019; Kalyanamaran et al., 1982; Calattini et al., 2005; Wolfe et al., 2005). Diferentemente, o HTLV-2 foi isolado do baço de um paciente com tricoleucemia de células T pilosas, e posteriormente associado a alguns poucos casos de quadros neurológicos semelhantes a HAM/TSP, porém não foi definido como agente causal de qualquer manifestação clínica, como acontece com o HTLV-1 (Kalyanamaran et al., 1982; Murphy, 1996).

A prevalência do HTLV-1 varia ao redor do mundo, e por não ser um agravo de notificação compulsória, o número real de infectados é desconhecido. Estima-se que exista de 10 a 20 milhões de infectados distribuídos mundialmente, estando as maiores prevalências no Japão,

Caribe, algumas regiões da África Central e América do Sul (Willems et al., 2017). Já o HTLV-2 é principalmente endêmico entre os Ameríndios e, epidêmico entre usuários de droga endovenosas (UDE) em áreas urbanas das Américas do Norte e Sul, Europa e sudeste Asiático (Murphy et al., 1998).

O Brasil é uma das maiores áreas endêmicas para ambos os vírus, supõe-se que 2,5 milhões de pessoas vivem com a infecção por HTLV-1/2 no país (Catalan-Soares et al., 2005). As maiores taxas de infecção por HTLV-1 em população geral foram encontradas nas regiões nordeste (1,76% em Salvador, BA) e norte (1,4% em Belém, PA) (Dourado et al., 2003; Silva et al., 2018). Enquanto o HTLV-2 tem sido considerado endêmico em populações indígenas da Amazônia (Ishak et al., 2003) e, tem sido detectado em altas frequências em pacientes com HIV e UDE, principalmente no sudeste e sul do país (de-Araujo et al., 1994; Etzel et al., 2001; Morimoto et al., 2005).

Em relação às vias de aquisição/transmissão dos vírus T-linfotrópicos humanos, a principal exigência para uma infecção efetiva, é o contato célula-célula, que pode ocorrer pela via horizontal, durante relação sexual sem o uso de preservativo; parenteral, por compartilhamento de seringas, agulhas, ou transfusão de sangue total ou hemoderivados celulares, transplante de órgãos, auto-flagelação; e vertical, que ocorre de mãe para filho, principalmente durante o aleitamento materno por mais de seis meses (Paiva e Casseb, 2014; Rosadas e Taylor, 2019).

O fato de compartilhar as mesmas vias de transmissão com outros vírus, como o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV); vírus da hepatite B (HBV) e vírus da hepatite C (HCV), propicia a existência de indivíduos com a infecção por dois ou mais destes vírus, os coinfectados, principalmente em populações vulneráveis. Entretanto, as coinfeções por HTLV-1 ou HTLV-2 podem influenciar de formas diferentes a evolução dos agravos ocasionados por cada patógeno individualmente. A coinfeção HIV/HTLV-1 tem histórico de acelerar o desenvolvimento e instalação de aids (Brites et al., 2001; 2009; Beilke, 2012), enquanto na coinfeção HIV/HTLV-2, o tipo 2 parece

desempenhar um papel protetor, retardando os quadros de imunodeficiência, fazendo com que os pacientes se comportem como “progressor” lento para a aids (Turci et al., 2006; Beilke, 2012). Na coinfeção HBV/HTLV-1 se observou maior detecção de antígeno de superfície do HBV (HBsAg) e menor clareamento de HBV nos pacientes HTLV-1 positivos (Moreira et al., 2013; Marr et al., 2017; Turpin et al., 2018), também foi relacionado aos altos títulos de HBsAg a maior expansão de células T com características de monoclonalidade, quando comparados aos monoinfectados por HTLV-1, sugerindo maior propensão à malignidade e desenvolvimento de ATLL (Turpin et al., 2018). Ainda se encontrou antigenemia (HBsAg) elevada na coinfeção HBV/HIV em relação à monoinfecção por HBV (Moreira et al., 2013).

Alguns trabalhos brasileiros sobre a coinfeção por HCV/HTLV-1 encontraram menor lesão no fígado e formação de fibrose e diminuição das dosagens de enzimas que aferem a função hepática, comparando com paciente HCV/HIV e HCV monoinfectados (Cardoso et al., 2009; Espindola et al., 2017), enquanto a tripla infecção HCV/HIV/HTLV-1 foi associada à menor carga viral de HCV e clareamento viral (Le Marchand et al., 2015; Brites et al., 2018). Em contrapartida, um trabalho de uma coorte japonesa demonstrou que a dupla infecção HCV/HTLV-1 aumentou o desenvolvimento de doenças hepáticas e morte por carcinoma hepatocelular (Boschi-Pinto et al., 2000). Na mesma linha, Bahia e colaboradores (2011) encontraram piora nos quadros hepáticos em ambas as coinfeções por HCV/HIV e HCV/HTLV-1, concordando com os achados de carga viral (CV) de HCV aumentada e menor clareamento viral observados nas coinfeções HCV/HIV, HCV/HTLV-1 e HCV/HIV/HTLV-1 em São Paulo (Alves et al., 2018). Quanto ao impacto do HTLV-2 nas infecções por HCV, um grupo nos Estados Unidos da América (EUA) encontrou CV de HCV aumentada nas coinfeções HCV/HTLV-2 independentemente da positividade para HIV (Hisada et al., 2002). No entanto, o oposto foi observado em pacientes com HCV de São Paulo, Brasil (Alves et al., 2018) e na tripla infecção HCV/HIV/HTLV-2 em pacientes da Espanha (Ruiz-Mateos, 2019).

Diferentemente dos HTLV-1 e HTLV-2, a doença aids e as infecções por HIV, HBV e HCV são de notificação compulsórias desde 1986, 2014 e 1998, respectivamente (Brasil, MS, 2019a; Brasil, MS, 2016a), permitindo conhecer as reais prevalências globais e nacionais. Segundo dados contabilizados até o fim de 2018 no último relatório do Programa Conjunto das Nações Unidas sobre HIV/AIDS (UNAIDS, do inglês *Joint United Nations Programme on HIV/AIDS*), existem 37,9 milhões de pessoas vivendo com o HIV no mundo (UNAIDS, 2019). No Brasil, 966.058 casos de aids foram detectados no período de 1980 a junho de 2019, e 300.496 casos de infecção pelo HIV notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) de 2007 até junho de 2019, sendo a região Sudeste responsável por 136.902 (45,6%) das notificações (Brasil, MS, 2019a).

A Organização Mundial de Saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*) estima que cerca de 325 milhões de pessoas vivam com as hepatites virais B e C. Informações compiladas até o ano de 2015, mostram que aproximadamente 257 milhões eram portadores crônicos de HBV, o equivalente a 3,5% da população global, tendo como epicentros a África e a região do Pacífico oriental, que respondem por 68% dos casos. Quanto ao HCV, aproximadamente 71 milhões de pessoas apresentam a forma crônica da doença, que corresponde a 1,0% de prevalência mundial, com destaque para as regiões do oeste do Mediterrâneo (21,1%), do Pacífico ocidental e Europa (19,7% cada) (Global Hepatitis Reports, 2017). Em relação aos dados nacionais, o boletim epidemiológico de hepatites virais de 2019 detectou no período de 1999 a 2018, 233.027 casos confirmados de hepatite B no Brasil, a maioria concentrada na região Sudeste (34,9%). No mesmo período foram notificados no país 359.673 casos de hepatite C com um dos marcadores (anti-HCV ou RNA de HCV) presentes, novamente a maioria das notificações aconteceu na região Sudeste (53,5%). A coinfeção com o HIV entre as notificações de hepatite B foi observada em 5,2%, e em 9,1% de hepatite C entre os casos acumulados no período de 2007 a 2018 (Brasil, MS 2019b).

As prevalências de coinfecção por HTLV-1 e HTLV-2 são retiradas de trabalhos científicos, que muitas vezes acabam se limitando a populações específicas, exceto um estudo recente realizado na Bahia de base populacional que encontrou 14,3% de coinfecção HCV/HTLV (37,9% era HCV/HTLV-2, 13,3% HCV/HTLV-1 e 11,6% HCV/HTLV-1/HTLV-2) (Pereira et al., 2020). Mais recentemente em São Paulo as prevalências de coinfecção encontradas foram de 3,1% e 4,2% nos HIV/HTLV [1,55% e 2,1% (HIV/HTLV-1), 1,31% e 1,7% (HIV/HTLV-2), 0,25% e 0,3% (HIV/HTLV)]; 1,3% e 1,9% entre os HBV/HTLV [0,8% e 0,7% (HBV/HTLV-1), 0,5% e 1,2% (HBV/HTLV-2)]; e 5,3% e 4,0% nos HCV/HTLV [3,2% e 2,4% (HCV/HTLV-1), 2,1% e 1,6% (HCV/HTLV-2)], sendo que a tripla infecção foi de 1,1% e 9,2% nos HBV/HIV/HTLV, e de 1,4% e 14,5% entre os HCV/HIV/HTLV (Caterino-de-Araujo et al., 2015; Campos et al., 2017a; Caterino-de-Araujo et al., 2018; 2020).

1.2. Estrutura do genoma, replicação e análise filogenética dos HTLV-1/2

Os genomas dos vírus T-linfotrópicos humanos consistem em duas cópias de RNA de aproximadamente 9 Kb, organizados em cinco regiões principais que codificam as proteínas, flanqueados por regiões denominadas de repetições terminais longas (LTR, do inglês *long terminal repeat*): 5'LTR-*gag-pro-pol-env-pX*-LTR3'. Os tamanhos aproximados das proteínas traduzidas são: MA 19 kDa (matriz); CA 24 kDa (capsídeo); NC 15 kDa (núcleocapsídeo); PR 14 kDa (protease); RT 62 kDa (transcriptase reversa, do inglês *reverse transcriptase*); IN 33 kDa (integrase); SU 46 kDa (proteína de superfície do envelope); e TM 21 kDa (proteína transmembrana do envelope). Os LTR têm cerca de 750 nucleotídeos (nt) de comprimento, formados por três segmentos, dois únicos (U) e um de repetição (R), dos quais a região U3 é de 200 a 300 nt, a sequência R é de 135 a 235 nt e a região U5 é de 100 a 200 nt. Existem também genes acessórios, localizados

na região *pX*, designados *tax* e *rex* no sentido 5', e *HBZ* (*HTLV-1 basic zipper factor*) ou *APH-2* (*antisense protein HTLV-2*) no anti-senso 3', que estão envolvidos na regulação da replicação viral, e na patogênese (Seike et al., 1983; Coffin, 1996; Matsuoka e Green, 2009; ICTV, 2019).

O processo de infecção destes retrovírus inicia com a interação das proteínas SU e TM com os receptores celulares de neuropilina-1 (NRP-1), transportador de glicose-1 (GLUT1) e proteoglicanas de heparan-sulfato (HSPGs, utilizados apenas pelo HTLV-1), estes receptores são encontrados em vários tipos celulares como linfócitos e células epiteliais (Futsch et al., 2018). Entretanto existe um tropismo do HTLV-1 por células T CD4+, enquanto o HTLV-2 tem predileção por linfócitos T CD8+ (Bangham et al., 2014; Melamed et al., 2014). Ocorre a adsorção, assim, o vírus penetra na célula e libera seu RNA no citoplasma, que será transcrito em DNA linear, migrando para o núcleo, onde será inserido ao genoma da célula hospedeira por ação da enzima integrase, e a partir de então, passa a ser denominado DNA proviral. O provírus HTLV poderá utilizar mecanismos da célula hospedeira para realizar a transcrição do DNA proviral em RNA mensageiro (RNAm) que será traduzido em proteínas virais no citoplasma, e finalmente ocorre a montagem e o vírion é liberado por um processo de brotamento, em que há incorporação de parte da membrana celular do hospedeiro ao envelope viral. Esse artifício é menos comum e acaba não sendo produtivo *in vivo*, devido à lenta e quase nula replicação viral pela via clássica dos retrovírus, assim, quase nenhuma partícula viral é encontrada livre em fluídos biológicos do hospedeiro. Desta forma, a manutenção da infecção ocorre principalmente por expansão clonal das células infectadas (mitose) e, novas células também podem ser infectadas por sinapse celular (Carpentier et al., 2015; Futsch et al., 2018).

Os HTLV-1 e HTLV-2 apresentam robusta estabilidade genética, no entanto, o mapeamento de substituições nucleotídicas específicas, permite a caracterização molecular dos subtipos de HTLV-1/2 que circulam em diferentes regiões geográficas, que também podem apontar as diferentes rotas de migração dos vírus, em que a África Central é o foco inicial (Paiva e

Casseb, 2015; Ishak et al., 2017; Amoussa et al., 2017). São descritos sete subtipos para o HTLV-1, sendo a maioria deles restritos a determinadas áreas geográficas: (i) HTLV-1a: Cosmopolita com ampla distribuição mundial, apresenta cinco subgrupos (A – Transcontinental; B – Japonês; C - Oeste-Africano; D - Norte-Africano; e o E – Negros do Peru); (ii) HTLV-1b; (iii) HTLV-1d; (iv) HTLV-1f e (v) HTLV-1g, encontrados na África Central; (vi) HTLV-1c: Melanésia/Austrália; e (vii) HTLV-1e, presente na África Central e do Sul (Gessain e Cassar, 2012; Pessôa et al., 2014; Amoussa et al., 2017). No Brasil o subtipo mais frequente é o HTLV-1aA tanto em população monoinfectada (Neto et al., 2011; Aguiar et al., 2017), como em indivíduos coinfectados por HIV (Laurentino et al., 2005; Rego et al., 2010; Magri et al 2012a).

A classificação molecular do HTLV-2 o subdivide em quatro subtipos, também associados com subpopulações específicas e com região geográfica: (i) HTLV-2a e (ii) HTLV-2b encontrados na Europa e Américas, com distribuição esporádica na Ásia e África; (iii) HTLV-2c presente em população indígena da Amazônia brasileira e populações de regiões urbanas do Brasil; (iv) HTLV-2d, descoberto em tribo de pigmeus na África (Eiraku et al., 1996; Vandamme et al., 1998; Slattery et al., 1999; Ishak et al., 2003). O subtipo HTLV-2b, mesmo sendo endêmico em ameríndios da América Central, Colômbia, Venezuela, Chile e Argentina (Heneine et al., 1991; Switzer et al., 1995; Berini et al., 2012), raramente é detectado no Brasil, entre doadores de sangue (Renner et al., 2006; Santos et al., 2009), também em UDE e coinfectados com HIV (Novoa et al., 2007; Magri et al., 2013). A maioria dos estudos brasileiros encontrou o subtipo -2/c prevalente entre os infectados por HTLV-2 tanto na região Norte (Vallinoto et al., 2002), Nordeste (Barreto et al., 2014), Sudeste (Eiraku et al., 1996; Catalan-Soares et al., 2005; Silva et al., 2002) como no Sul (Renner et al., 2006).

Análises de substituições de nucleotídeos nas regiões genômicas mais variáveis dos HTLV-1/2 como a LTR e *env* e do gene responsável pela proteína transativadora (Tax), possibilitam o conhecimento de uma infinidade de informações a respeito do vírus que podem influenciar o *status* de

portador ou paciente nos hospedeiros. Mutações no genoma de HTLV-1, nas regiões LTR e *tax* podem influenciar a formação de dois agrupamentos distintos entre as amostras da América Latina, *cluster A* e *cluster B* nas árvores filogenéticas, referindo-se a diferentes períodos de entrada do vírus no continente (Magri et al., 2012a, Magri et al., 2012b). Enquanto alterações de nucleotídeos no genoma proviral em relação ao ATK, mas conservados entre determinados grupos, como na região *tax* de isolados do Brasil, conferem uma assinatura molecular característica das amostras brasileiras. A filogenia deste segmento, também permite classificar os isolados em dois genótipos denominados *taxA* e *taxB* (Kashima et al., 2006; Casseb et al., 2006; Magri et al., 2012b) .

Estudos filogenéticos do gene *tax* de HTLV-2, possibilitam classificar os isolados quanto aos subtipos e os respectivos genótipos da proteína Tax, analisando a sequência de nucleotídeos (nt) e de aminoácidos (aa) referentes à proteína traduzida (Eiraku et al., 1996; Ishak et al., 2003). Esta análise é de suma importância para identificar a variante molecular dos isolados brasileiros que genotipicamente se assemelham ao HTLV-2a, porém devido à troca de nucleotídeo na posição 8.203 em relação ao protótipo Mo, perdem o *stop códon* resultando em uma proteína com 25 aminoácidos adicionais, de tamanho semelhante à Tax do HTLV-2b (Eiraku et al., 1996). Este achado, aliado ao fato de outras regiões genômicas (LTR e *env*) de isolados do Brasil se assemelharem ao HTLV-2a (Lewis et al., 2000; Shindo et al., 2002), fez com que esta estirpe fosse classificada como HTLV-2a variante c (HTLV-2a/c) ou subtipo 2c (Ishak et al., 2003). Quanto ao tamanho e genótipos das proteínas Tax2, são classificadas em quatro: Tax-2a (331 aa), Tax-2b (356 aa), Tax-2c (356 aa) e Tax-2d (344 aa), correspondentes aos seus respectivos subtipos virais (Lewis et al., 2002; Magri et al., 2013).

Ainda, análises mais aprofundadas das proteínas Tax de HTLV-1 e HTLV-2, mostraram que elas divergem também em relação à presença de sítios importantes de ligação que determinam sua localização na célula, e estimulam a resposta imune do hospedeiro (Bertazzoni et al., 2011). Uma

comparação da sequência de aminoácidos da Tax1 com a Tax2b mostrou que a Tax2b possui menos sítios de ligação, e a análise da localização dessas proteínas em células transfectadas, mostrou que elas divergem; a Tax1 foi encontrada mais no núcleo e pouco no citoplasma, enquanto a Tax2b foi encontrada apenas no citoplasma dessas células (Bertazzoni et al., 2011). Um estudo preliminar de caracterização da Tax2c de isolados de pacientes com a infecção HIV de São Paulo e de Londrina mostrou 11 trocas de aminoácidos na Tax2c em relação à Tax2b, que podem afetar a sua localização e a pós-transcrição de proteínas envolvidas em vários processos celulares como: transporte núcleo-citosol, progressão no ciclo celular, apoptose (Caterino-de-Araujo et al., 2013). Nada mais foi publicado sobre esta matéria.

Já a região não codificante LTR é essencial para a regulação viral, retrotranscrição, integração ao genoma da célula hospedeira e transcrição. A porção U3 em específico, é responsável por regular a expressão do genoma proviral e pela terminação dos RNAm transcritos (poliadenilação), ainda apresenta três segmentos de repetição imperfeita de 21 pb, denominados *Tax-responsive elements* (TRE), subdivididos em três domínios (A, B e C), que apresentam a importante função de promotor da proteína Tax na transativação de elementos celulares (Yao e Wigdahl, 2000). O estudo de mutações pontuais nos domínios dos TRE pode demonstrar associação com aumento de carga proviral (CPV) em pacientes HTLV-1 coinfectados por HIV, ou apenas o subtipo viral que circula nesta população (Neto et al., 2011; Magri et al., 2012c). A mesma região do 5'LTR (U3RU5) de HTLV-1, foi analisada em 41 amostras de 19 países da África por Desrames et al., que encontraram quatro isolados frutos de recombinação de subtipos, o HTLV-1a-NA (recombinação entre a-WA e a-Sen), evento bastante raro entre as estirpes de HTLV-1, porém comum ao HIV (Desrames et al., 2014).

Em relação a região LTR de HTLV-2, um estudo que comparou sequências de LTR de pacientes infectados da cidade de Salvador, todos pertencentes ao subtipo HTLV-2c, com sequências depositadas em GenBank dos outros três subtipos (-2a, -2b e 2d), identificou assinaturas

subtipo-específicas, também, mutações que resultaram em perda ou ganho de sítio de ligação (*motifs*) importantes para a regulação da transcrição do provírus. Os *motifs* que mais apresentaram mutações foram CRE, SRE, ETS, Poly (A), TATA Box e o E box. Tais polimorfismos podem afetar a manutenção da infecção viral e talvez, o desenvolvimento de doenças subsequentes (Barreto et al., 2014).

Outro marcador viral que tem sido relacionado ao prognóstico, são as partículas provirais defectivas descritas na infecção por HTLV-1. Alguns estudos associaram a deleção da região 5'LTR ao desenvolvimento de ATLL (Takenouchi et al., 2011), enquanto a presença de provírus completo ou a ausência da região *pX* à HAM/TSP, enquanto a ausência da região *tax* foi encontrada em portadores assintomáticos (Bezerra, 2011). Existe a descrição de dois tipos de provírus defectivo, sendo o tipo 1 classificado quando os LTR são preservados e há deleção de segmentos genômicos internos 5'-*gag-pro-pol-env-pX-3'*; e o tipo 2 na ausência do 5'-LTR (Tamiya et al., 1996; Miyazaki et al., 2007). Katsuya e colaboradores (2019) observaram que células infectadas com partículas defectivas de HTLV-1 proliferavam mais em comparação com as células que hospedavam provírus completos. Também, foram encontrados com maior frequência nas amostras de pacientes com ATLL, em relação às amostras de casos com HAM/TSP e assintomáticos (Tamiya et al., 1996; Miyazaki et al., 2007; Takenouchi et al. 2011; Hashikura et al., 2017; Katsuya et al., 2019). Até o presente momento, nada foi descrito a respeito de partículas provirais defectivas em pacientes ou portadores da infecção por HTLV-2, o que não impossibilita sua existência.

Além disso, mutações abortivas nos genes referentes às proteínas Pol, Tax, Env, p12 ou p30 de HTLV-1 e substituições G>A ocorrendo em altas frequências em dinucleotídeos GG podem estar associadas à baixa carga proviral, e produção de antígenos, gerando falhas no desempenho do teste confirmatório de *Western blot* (WB). A terminação prematura destas proteínas e as alterações que ocorrem em GG provavelmente por ação da enzima APOBEC3G, foram consideradas interferentes na produção e

reconhecimento dos antígenos por parte dos hospedeiros e, conseqüentemente na produção de anticorpos específicos anti-HTLV-1, resultando nos WB indeterminados (Kuramitsu et al., 2017).

1.3. Diagnóstico laboratorial das infecções por HTLV-1/2

Ao longo destas quatro décadas de descobrimento do primeiro vírus T-linfotrópico humano, alguns poucos avanços foram alcançados no Brasil em relação ao diagnóstico laboratorial destas infecções. O maior deles foi a portaria N°1.376 de novembro de 1993 que tornou obrigatória a testagem para HTLV-1/2 de bolsas nos bancos de sangue de todo território nacional (Brasil, MS, 1993), infelizmente, faltou a obrigatoriedade para realização de testes confirmatórios. Desde 2009, também é imperativa a testagem de HTLV-1/2 na triagem de órgãos sólidos para doação (Brasil, MS, 2009). Em relação às populações vulneráveis e coinfectados, o Ministério da Saúde do Brasil (MS) aconselhou a testagem de HTLV-1/2 nos indivíduos infectados por HIV logo nas primeiras visitas aos serviços especializados de acompanhamento (Brasil, MS, 2014), no entanto, a última atualização do Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Manejo da infecção por HIV em Adultos (PCDT HIV) passou a indicar a testagem somente em regiões endêmicas para HTLV-1/2 (Brasil, MS, 2018). Há quatro anos, a Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias para o SUS (CONITEC) recomendou e aprovou pela Portaria N°23/2016 a realização de teste confirmatório de *Western blot* (WB) ou de reação em cadeia da polimerase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) apenas para os pacientes com suspeita de ATLL subsidiados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (Brasil, MS, 2016b).

Os testes laboratoriais disponíveis comercialmente para a triagem da infecção por HTLV-1/2 são: o de aglutinação de micropartículas de gelatina (PA, *particles agglutination*) que utilizam lisado viral de HTLV-1 purificado; os ensaios imunoenzimáticos (EIA, *enzymatic immunoassay*); e os ensaios

quimioluminescentes (CLIA, *chemiluminescence immunoassay*). Os dois últimos métodos são os mais utilizados, pertencendo à terceira geração e formato “sanduíche”, por empregarem os mesmos peptídeos sintéticos ou proteínas recombinantes tanto na fase sólida (microplacas ou microesferas), como no conjugado marcado com a enzima que revela a reação (Cassar e Gessain, 2017; Eusebio-Ponce et al., 2019). A evolução para a terceira geração, e a escolha de peptídeos da região do envelope de ambos os tipos virais (HTLV-1 e HTLV-2) conferiu aos testes maior sensibilidade e especificidade.

A comparação dos EIA Murex HTLV I+II (DiaSorin) e Gold ELISA HTLV-I/II (REM) na detecção de anticorpos específicos em soros de indivíduos com a coinfeção por HIV de São Paulo, mostrou bom desempenho para ambos, mesmo com diferentes resultados de sensibilidade (100% *versus* 98%) e especificidade (99% *versus* 100%) (Campos et al., 2015). Recentemente, um grupo de Salvador, comparou a acurácia de três EIA (Murex HTLV I+II; Gold ELISA HTLV-I/II e anti-HTLV-1/2 SYM Solution) e um conjunto de reagentes para ensaio CLIA (Architect rHTLV-1/2) no diagnóstico de população de ambulatorios e banco de sangue, todos apresentaram sensibilidade igual a 100% e especificidade superior a 90%, indicando que qualquer um dos quatro ensaios pode ser aplicado na triagem sorológica de HTLV-1/2 (da Silva Brito et al., 2018).

O problema do emprego de testes altamente sensíveis, principalmente em países economicamente subdesenvolvidos e/ou em desenvolvimento, que apresentam orçamento público restrito, é o alto custo gerado com os testes confirmatórios. Uma vez que o excesso de sensibilidade pode gerar falsos positivos, que seguem para a etapa de confirmação, em que se descarta a infecção, assim, aumentando desnecessariamente os gastos com o diagnóstico final (da Silva Brito et al., 2018; Puccioni-Sohler et al., 2019). Por esse motivo, estratégias que ajudem a diminuir os custos com as etapas de triagem das infecções por HTLV-1 e HTLV-2, como por exemplo a testagem em *pool* de soros (Andersson et al., 2001; Chang et al., 2002), são urgentemente necessárias, para impedir que

os possíveis custos excedentes gerados por amostras falso positivas seja um dos empecilhos para a implantação e continuidade deste importante diagnóstico.

Em relação aos testes confirmatórios que podem ser utilizados, têm os ensaios que pesquisam anticorpos específicos (sorológicos); e os que detectam o provírus por biologia molecular de forma qualitativa ou quantitativamente (Cassar e Geissan, 2017). Entre os sorológicos o *Western blot* (WB) é amplamente usado, a versão HTLV Blot 2.4 (MP Biomedicals) consiste em tiras de nitrocelulose com proteínas purificadas do lisado viral de HTLV-1 transferidas, e adicionadas as proteínas recombinantes de envelope MTA-1 (rgp46-I de HTLV-1), K55 (rgp46-II de HTLV-2) e a transmembrana truncada (GD21, comum aos dois vírus) (Miller, 2016). Uma alternativa sorológica é o imunoensaio de linha (LIA, *Line Immunoassay*), o conjunto de reagentes da Fujirebio (INNO-Lia HTLV I/II) se resume em tira de *nylon*, onde os peptídeos sintéticos de Gag (p19, p24) e Env (gp21, gp46) comuns aos dois tipos virais foram aderidos na região destinada a confirmação da infecção, seguida dos peptídeos específicos (p19-I, gp46-I, gp46-II) conglutinados na região discriminatória. Ambos os testes sorológicos fazem a confirmação, e discriminam qual o tipo viral responsável pela infecção, porém, podem exibir resultados indeterminados e HTLV positivos, mas não tipados (Zrein et al., 1998; Cassar e Geissan, 2017).

Os ensaios de biologia molecular para a detecção de segmentos genômicos dos provírus de HTLV-1 e HTLV-2 usam células mononucleares do sangue periférico e, baseiam-se principalmente nas reações em cadeia da polimerase (PCR, *polymerase chain reaction*) e seus diversos formatos: *nested*-PCR (reação com duas etapas de amplificação); PCR-RFLP, PCR seguida de restrição enzimática (RFLP, *Restriction Fragments Length Polymorphism*); qPCR, PCR em tempo real/quantitativa (*quantitative PCR/real time PCR*). Na maioria dos laboratórios, trata-se de metodologias de desenvolvimento próprio “*in house*” (Cassar e Geissan, 2017).

Recentemente foi desenvolvida a qPCR digital (dqPCR, *digital quantitative PCR*) que se mostrou mais sensível em relação aos outros

formatos, no entanto, sua utilização ainda é restrita a alguns grupos de pesquisa. Já foi aplicada para determinação de CPV de HTLV-1 e HTLV-2 na Suécia (Hedberg et al., 2018); e de HTLV-1 no Japão, e na Austrália, onde detectou o HTLV-1c em casos de bronquiectasia (Kuramitsu et al., 2018; Yurick et al., 2019). Outra metodologia recentemente empregada ao diagnóstico de HTLV-1/2 foi a amplificação isotérmica de ácidos nucleicos mediada por alça (LAMP, *Loop-mediated isothermal amplification*), que apresentou sensibilidade semelhante às qPCR (Gomes et al., 2020).

Dificuldades na confirmação do diagnóstico de HTLV-1 e HTLV-2 utilizando o WB são comuns no Brasil, devido ao grande número de resultados inconclusivos (indeterminados e HTLV não tipados), principalmente em pacientes verdadeiramente infectados por HTLV-2, também em pacientes com HIV (de-Araujo et al., 1994; Jacob et al., 2007; 2008). Desta forma, sugeriu-se o emprego de alguns formatos de PCR (*nested*-PCR; PCR com hibridização; PCR-RFLP) para detectar segmentos de DNA proviral (*pol*, LTR, *env* e *tax*) de HTLV-1 e HTLV-2 na tentativa de estabelecer um novo método confirmatório (Caterino-de-Araujo, 1998; Ishak et al., 2007; Morimoto et al., 2007; Novoa et al., 2007; Costa et al., 2009; Olah et al., 2010). Entretanto, não houve consenso sobre os critérios para considerar uma amostra verdadeiramente infectada por HTLV-1/2 usando essas técnicas; se diante de um ou ao menos dois segmentos provirais amplificados/positivos (Caterino-de-Araujo, 1998; Costa et al., 2009; Olah et al., 2010). Quando adotada a qPCR como ensaio confirmatório da infecção por HTLV-1/2, esta, mostrou baixa sensibilidade quando aplicada em amostras de indivíduos com HIV e em amostras de pacientes infectados com HTLV-2 no Brasil, provavelmente relacionado à baixa CPV de HTLV-2 e ao uso de antirretrovirais (Montanheiro et al., 2008; Costa et al., 2011; Campos et al., 2017a; 2017b).

Quando comparadas a atuação do INNO-Lia *versus* o WB em amostras de painéis de soros bem caracterizados, o LIA apresentou melhores resultados, demonstrando maior sensibilidade para confirmar infecções por HTLV-1 e HTLV-2 e maior especificidade, ao eliminar

resultados WB-indeterminados, que na verdade eram negativos (Zrein et al., 1998). Porém, o alto custo inicial deste teste, dificultou por um longo tempo seu uso rotineiro. Consequentemente, existem poucos estudos comparando o desempenho de ambos no Brasil; um realizado logo após a descrição do LIA usando amostras de bancos de sangue (Sabino et al., 1999) e outros dois realizados mais recentemente em amostras de soro de pacientes com HIV (Campos et al., 2017a; 2017b). Esses estudos confirmaram os resultados sorológicos obtidos com ensaios moleculares e, apontaram o LIA como o melhor teste sorológico para confirmar ou descartar infecções por HTLV-1/2.

Contudo, ainda não existe consenso sobre qual teste confirmatório deverá ser o de escolha ou a ordem a ser utilizada num algoritmo, tampouco um padrão ouro reconhecido. O WB acaba sendo o mais empregado mundialmente pelo tempo que se encontra disponível no mercado, pela praticidade de execução e por apresentar menor custo em algumas regiões geográficas em relação ao custo do LIA (Campos et al., 2015). No entanto, para laboratórios que dispõem de infraestrutura instalada para ensaios de biologia molecular, a proposta de introdução da qPCR como primeiro teste confirmatório no algoritmo laboratorial para diagnóstico dos HTLV-1/2, demonstrou melhor custo-benefício (Campos et al., 2015; Gonçalves, 2019).

Diante do acima exposto, e para dar continuidade aos estudos de estratégias de melhoria e expansão do diagnóstico das infecções por HTLV-1/2 a custo reduzido para implantação no SUS; para acrescentar informações sobre a influência do HTLV-1 e HTLV-2 na evolução das hepatites B e C; e para pesquisar marcadores genéticos virais que possam interferir no diagnóstico das infecções pelos vírus T-linfotrópicos humanos, o presente estudo foi realizado.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

- Pesquisar o impacto das infecções por HTLV-1/2 nas hepatites virais B e C, investigar marcadores virais que podem interferir nos testes sorológicos e moleculares de HTLV-1/2, realizar a vigilância de subtipos virais de HTLV, e avaliar estratégias de diagnóstico para as infecções por HTLV-1 e HTLV-2

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a influência de HTLV-1 e HTLV-2 nas hepatites virais B e C utilizando os marcadores virológicos de carga viral e clareamento de HBV e HCV
- Investigar subtipos de HTLV-1 e HTLV-2 presentes na população de estudo utilizando sequenciamento do genoma proviral
- Pesquisar genótipos de Tax1 e Tax2, analisar mutações nas regiões promotoras 5'LTR, estimar as frequências de mutações sinônimas e não sinônimas nos genes *env* e *tax*, verificar a existência de partículas provirais defectivas usando o sequenciamento genético das regiões 5'LTR, *env* e *tax* de HTLV-1 e HTLV-2, e correlacionar com os resultados obtidos no diagnóstico sorológico e molecular de HTLV-1 e HTLV-2
- Avaliar o desempenho de testes sorológicos confirmatórios de HTLV-1 e HTLV-2 em diferentes populações
- Investigar e propor estratégia de triagem das infecções por HTLV-1/2 que possibilite sua expansão em populações vulneráveis e gestantes a um custo reduzido para o Sistema Único de Saúde

3. Material e Métodos

3.1. Material

As amostras empregadas neste estudo foram de conveniência e utilizadas em estudos anteriores que faziam parte de quatro protocolos de pesquisa, todos aprovados em seus respectivos comitês técnico científico e de ética. Uma vez que não foi possível realizar todas as análises no total de amostras utilizadas, elas foram divididas em grupos, descritos a seguir, de acordo com sua aplicação e resumidos nas **Figuras 1 e 2**.

3.1.1. Amostras de pacientes com hepatite B e C para avaliação de carga viral (CV) e clareamento viral

Amostras de soro ou plasma de 3.225 indivíduos com hepatites virais B e C provenientes de serviços de Gastroenterologia e especializados em Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST) da cidade de São Paulo e região, tiveram as prevalências das infecções por HIV, HTLV-1 e HTLV-2 analisadas nos períodos de junho a novembro de 2014 (Caterino-de-Araujo et al., 2018) e junho de 2015 a junho de 2016 (Caterino-de-Araujo et al., 2020). Sendo 1.910 pessoas com hepatite B (53% do sexo masculino, mediana de idade 46 anos) e 1.315 com hepatite C (55% do sexo masculino, mediana de idade 51 anos).

De acordo com a soropositividade para HIV e HTLV-1/2, os indivíduos com HBV foram agrupadas em: HBV (n=1.738); HBV/HIV (n=140); HBV/HTLV-1 (n=14, sete HBV/HTLV-1 e sete HBV/HIV/HTLV-1) e HBV/HTLV-2 (n=18, quatro HBV/HTLV-2 e 14 HBV/HIV/HTLV-2), os dois últimos grupos formados independentes do *status* HIV para possibilitar as

análises estatísticas. Enquanto os indivíduos com HCV formaram seis grupos: HCV (n=1.127); HCV/HIV (n=127); HCV/HTLV-1 (n=28); HCV/HIV/HTLV-1 (n=9); HCV/HTLV-2 (n=9) e HCV/HIV/HTLV-2 (n=15) (**Figura 1**).

3.1.2. Amostras para a caracterização molecular de HTLV-1 e HTLV-2

A maioria dos ácidos desoxirribonucleicos (DNA) utilizados para estas análises eram provenientes de um estudo prévio de comparação de ensaios de triagem e confirmatórios, que detectou a coinfeção HIV/HTLV-1/2 em 3,61% de uma população de 2.991 indivíduos pertencentes a dois grupos, de acordo com os serviços da cidade de São Paulo e região onde faziam o acompanhamento da infecção por HIV (Caterino-de-Araujo et al, 2015; Campos et al., 2017a e 2017b). Devido ao número de ensaios realizados anteriormente, e ao volume finito das amostras, foi possível recuperar e estudar o material genético de 69 participantes da pesquisa, sendo 44 HIV/HTLV-1 e 25 HIV/HTLV-2 (50,7% homens, mediana de idade 48 anos). As coletas ocorreram entre 2012 e 2015, e até aquela data todos eram assintomáticos. Digno de nota, foi possível obter de duas a três amostras sequenciais de 29 pacientes em acompanhamento clínico-laboratorial durante este período.

Para critério de comparação, empregou-se o DNA de 26 pessoas sem a coinfeção por HIV (monoinfectados) da cidade de Recife - PE, sendo 15 assintomáticos, quatro sintomáticos sem diagnóstico de neuropatia (Oligossintomáticos) e sete HAM/TSP. Estas amostras foram gentilmente cedidas pela Dra. Patrícia Muniz Mendes Freire de Moura da Universidade de Pernambuco (**Figura 1**).

3.1.3. Amostras utilizadas na comparação dos testes sorológicos confirmatórios

Esta análise empregou amostras de soro e plasma de três estudos anteriores, e foram selecionadas quanto ao resultado inconclusivo apresentado no *Western Blot* (WB), ou seja, quando os soros eram HTLV não tipados ou com perfis indeterminados, mas que tinham a infecção por HTLV-1 ou HTLV-2 confirmadas por algum outro teste sorológico ou molecular. Foi possível recuperar 111 amostras com estas características de três populações distintas.

O grupo 1 (G1) foi composto por 62 indivíduos com a coinfeção por HIV (50% do sexo masculino, idade média 44 anos), sendo 48 com perfil indeterminado no WB (WB-Ind) e 14 HTLV não tipado (WB-HTLV) (Campos et al., 2017b). Agrupou-se no segundo grupo (G2), 24 pessoas com hepatites virais B ou C (83,3% homens, idade média de 49,5 anos), 21 WB-Ind e três WB-HTLV (Caterino-de-Araujo et al., 2017 e 2020). O último grupo (G3), foi constituído por 25 pacientes atendidos no ambulatório de HTLV de Salvador – BA (60% do sexo feminino, idade média de 41 anos), 16 WB-Ind e nove WB-HTLV (da Silva Brito et al., 2018) (**Figura 1**).

3.1.4. Amostras utilizadas para a avaliação de estratégias de expansão e melhoria do diagnóstico das infecções por HTLV-1 e HTLV-2

A avaliação de estratégia de expansão do diagnóstico a um custo reduzido para o SUS empregou a técnica de *pool* de soros para a triagem sorológica. Os resultados obtidos na padronização, validação e custo/minimização foram publicados (Silva et al., 2020) e para tanto foram

empregados 60 *pool* de soros na padronização/validação, 260 e 140 *pool* de soros de indivíduos com hepatites B e C, respectivamente, e 125 *pool* de indivíduos com HIV na análise de custo/minimização (casuísticas de acordo com Marcon et al., 2019; Caterino-de-Araujo et al., 2020) (**Figura 2**).

Finalmente, as análises de desempenho dos ensaios confirmatórios e a identificação de marcadores virais que podem interferir nos resultados (pesquisa de mutações e partículas provirais defectivas) foram realizadas com as 69 amostras de coinfeção HIV/HTLV, empregadas na caracterização molecular.

3.1.5. Aspectos éticos

As amostras utilizadas no estudo fazem parte de projetos aprovados nos Comitês Científico e de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo (CTC-IAL #106D/2013; #62H/2015, #21I/2016 e #65J/2017), da Universidade de Pernambuco e da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, cadastrados na Plataforma Brasil (números CAAE #11302512.0.0000.0059; #55837316.0.0000.0059; #52493316.1.0000.0059; #16973113.5.1001.5192 e protocolo #464.286), também estão de acordo com a Resolução Nº 466 de 12/2012 do Conselho Nacional de Saúde, a Declaração de Helsinque e as complementares de ambas.

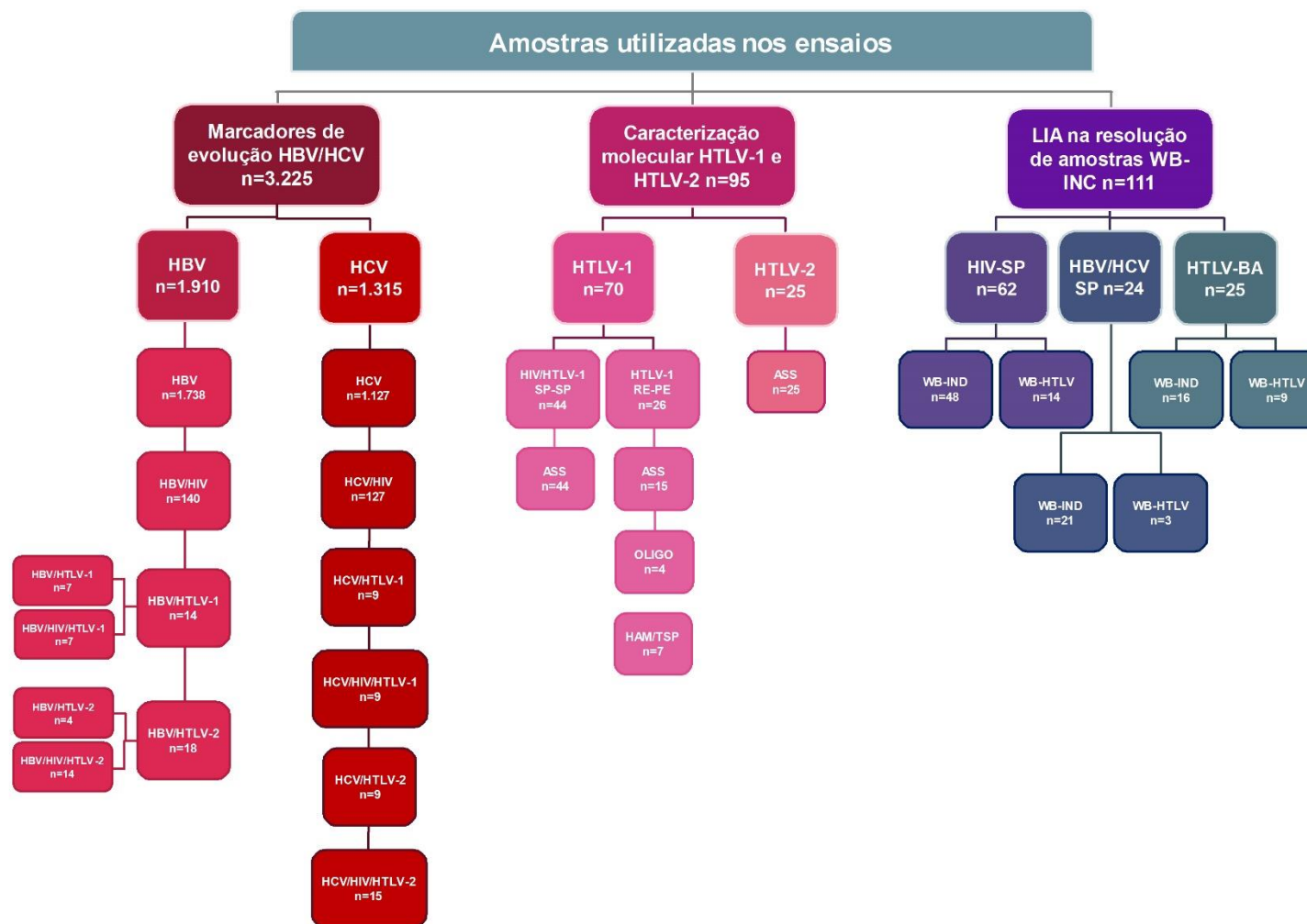


Figura 1. Fluxograma das amostras utilizadas no estudo de marcadores de evolução das hepatites B e C, caracterização molecular e comparação de testes sorológicos confirmatórios de HTLV-1 e HTLV-2

Legenda: INC, inconclusivo; ASS, assintomático; OLIGO, oligossintomáticos.

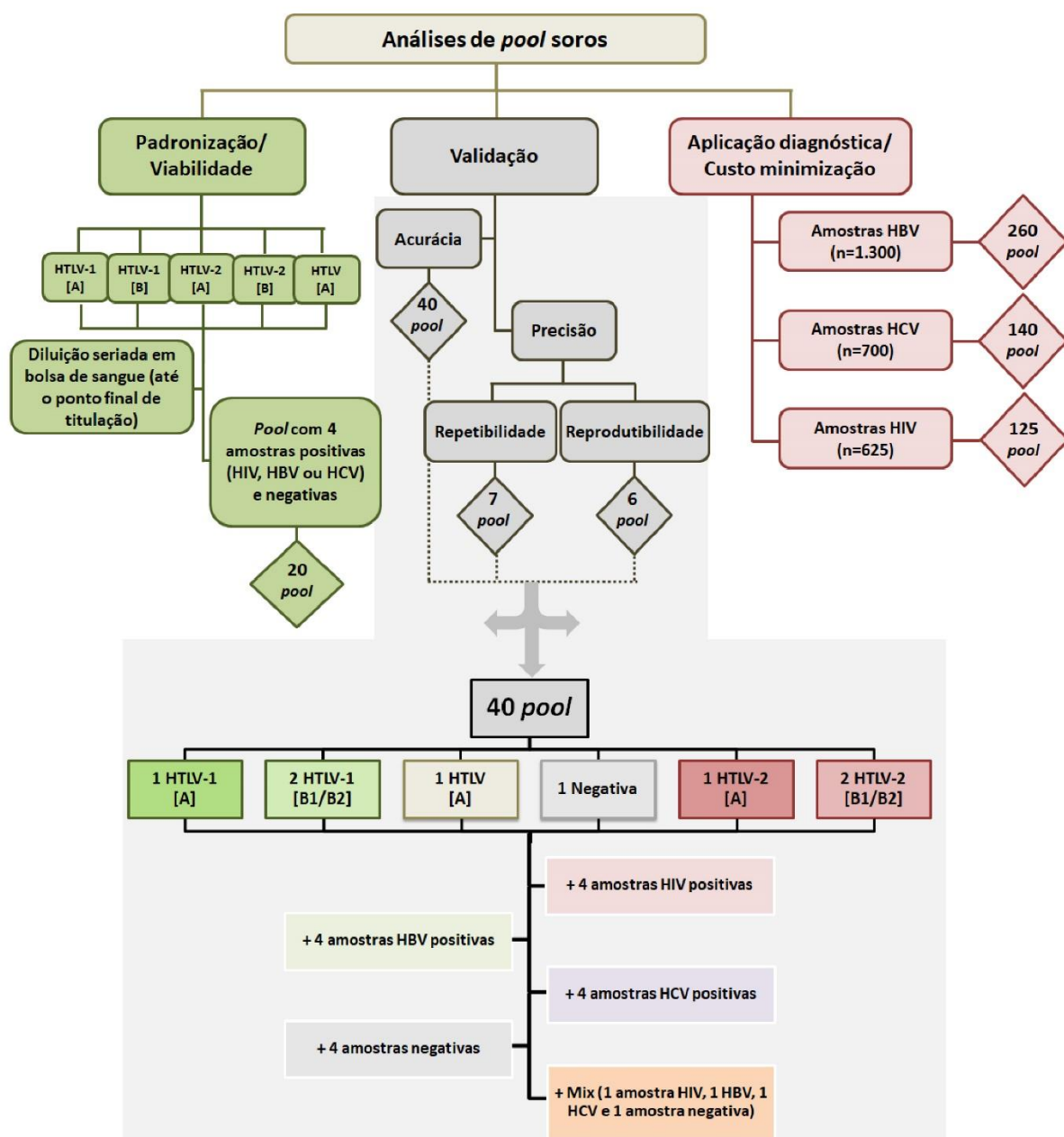


Figura 2. Fluxograma com as etapas e amostras utilizadas na estratégia de *pool* de soros aplicada para a triagem de infecção por HTLV-1/2

Legenda: A, amostras com relação densidade óptica pelo *cutoff* (DO/CO) alta; B, amostras com relação densidade óptica pelo *cutoff* (DO/CO) baixa.

3.2. Métodos

O estudo foi de corte transversal retrospectivo e abordou diferentes aspectos das infecções por HTLV-1 e HTLV-2, seja influenciando a evolução de outras viroses, ou como interferência no próprio diagnóstico, ou ainda como estratégias para expansão e melhoria dele. Para tanto, utilizou-se diferentes métodos sorológicos e moleculares, e diversos testes estatísticos.

3.2.1. Análise de marcadores de evolução das hepatites B e C utilizando os parâmetro de carga viral e clareamento de HBV e HCV

Recuperaram-se os resultados de carga viral e clareamento de HBV e HCV, também os genótipos de HCV do Sistema de Gestão Hospitalar (SIGH). As quantificações e genotipagem de HCV foram realizadas no laboratório de Hepatites Virais do IAL, por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) utilizando os conjuntos de reagentes *Abbott Real-Time HBV*, *Abbott Real-Time HCV* e *Abbott Real Time HCV Genotype II* que apresentam limites de detecção de 10 UI/mL e 12 UI/mL para HBV e HCV respectivamente (Abbott Molecular Inc., Illinois, USA). As reações e a interpretação dos resultados seguiram as recomendações dos fabricantes. Os grupos de análise foram definidos conforme as soropositividades para HIV, HTLV-1 e HTLV-2, como descrito anteriormente.

3.2.2. Caracterização molecular de HTLV-1 e HTLV-2

3.2.2.1. Sequenciamento genético e edição das sequências

As amostras de DNA foram submetidas às reações em cadeia da polimerase (PCR) e *nested*-PCR para três regiões do genoma proviral de HTLV-1 ou de HTLV-2 (5'LTR, *env* e *tax*), conforme resultado confirmatório obtido anteriormente. Consecutivamente, foram sequenciadas pelo método de Sanger em sequenciador automático ABI 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems). Os *primers* (**Quadro 1**) e protocolos utilizados para as PCR e sequenciamento genético foram adaptados e otimizados para sequências do Brasil, por Magri et al. (2010; 2012a; 2012b e 2013).

Após as reações de sequenciamento, os arquivos obtidos foram analisados no programa Sequencher 4.7 (*Gene Codes*) para verificar a qualidade dos cromatogramas e das sequências, que foram salvas no formato fasta. A ferramenta *BLAST* (NCBI) foi utilizada para checar se os arquivos correspondiam a fragmentos dos genomas de HTLV-1 ou HTLV-2.

3.2.2.2. Subtipagem das estirpes HTLV-1 e HTLV-2

Os subtipos foram obtidos pela submissão dos arquivos fasta ao *Genotyping tool web* (NCBI) e, confirmados após análise das árvores filogenéticas construídas.

Quadro 1. Sequências dos *primers* utilizados nas reações em cadeia da polimerase e de sequenciamento genético de HTLV-1 e HTLV-2

Gene	PCR	Primer	Sequência de nucleotídeos	Posição ^a
LTR HTLV-1	1° round	LTR-I.03 Forward	5'-GGC TTA GAG CCT CCC AGT GA-3'	57-76
		LTR-I.02 Reverse	5'-CGC GGA ATA GGG CTA GCG CT-3'	864-845
	nested	LTR-I.03 Forward^b	5'-GGC TTA GAG CCT CCC AGT GA-3'	57-76
		LTR-I.04 Reverse^b	5'-GCC TAG GGA ATA AAG GGG CG-3'	822-803
env HTLV-1	1° round	D498 Forward	5'-ATG GGT AAG TTT CTB GCC-3'	5202-5219
		D500 Reverse	5'-TTA CAG GGA TGA CTB AGG-3'	6668-6651
	nested	LUI 7 Forward^b	5'-CCG TCT CCA GYC CMT MCT GG-3'	5547-5567
		LUI 8 Reverse^b	5'-CCT CGT CTR TTY TGG GCW GCA-3'	6309-6289
tax HTLV-1	1° round	PXO1 Forward	5'-TCG AAA CAR CCC TRC AGA TA-3'	7280-7299
		PXO2 Reverse	5'-TGA GCT TAT GAT TTG TCT TCA-3'	8470-8490
	nested	PXI1 Forward^b	5'-ATA CAA AGT TAA CCA TGC TT-3'	7297-7316
		PXI3 Reverse^b	5'-AGA CGT CAG AGC CTT AGT CT-3'	8397-8416
	Sequenciamento	PXI2 Forward	5'-GGC CAT GCG CAA ATA CTC CC-3'	7641-7660
		PXI1 Reverse	5'-GGG TTC CAT GTA TCC ATT TC-3'	7667-7686
		PXI2 Reverse	5'-GTC CAA ATA AGG CCT GGA GT-3'	8047-8066
		PXI3 Reverse	5'-AGA CGT CAG AGC CTT AGT CT-3'	8397-8416
LTR HTLV-2	1° round	VS1 Forward	5'-CAG GGC GAG TCA TCG ACC CAA AAG-3'	35-58
		VS2 Reverse	5'-GAA GAC AAT GCT CCT AGG GCG GGC-3'	746-724
	nested	VS3 Forward^b	5'-ACC GTC TCA CAC AAA CAA TCC C-3'	64-85
		VS4 Reverse^b	5'-GCG GGC CTG CCT ATA GCG ATG-3'	729-709
env HTLV-2	1° round	E5 Forward	5'-AGC CAA GTG TCC CTT CGA CTA-3'	5612-5632
		E2 Reverse	5'-CTG CAG AAG CTA GCA GGT CTA-3'	6670-6650
	nested	E3 Forward^b	5'-TTC TCT AAG TGC GGC TCC TC-3'	5636-5655
		E2 Reverse^b	5'-CTG CAG AAG CTA GCA GGT CTA-3'	6670-6650
	Sequenciamento	GP21F1 Forward	5'-CTG CAA CAA CTC CAT TAT CCT-3'	6041-6060
tax HTLV-2	1° round	PX101 Forward	5'-GGC AAT CTC CTA AAA TAG TCT-3'	7155-7175
		Px106 Reverse	5'-GGG CCG TGG TTT CAG TTC CTA-3'	8306-8326
	nested	PX103 Forward^b	5'-TTA CAA TCC TGT CTC CTC TCA-3'	8306-8326
		Px106 Reverse^b	5'-GGG CCG TGG TTT CAG TTC CTA-3'	8306-8326
	Sequenciamento	Px105 Forward	5'-GCT YTC CCC ACC CAT GAC ATG-3'	7680-7603
		LS1 Forward	5'-GAA TAC ACC AAC ATC CCT GTC-3'	8140-8160
		Px102 Reverse	5'-TGT GTG TAG GAA CAT TTT GTA-3'	7795-7815

Legenda: ^a, posição de pareamento do *primer* em relação ao protótipo ATK (HTLV-1) ou Mo (HTLV-2); ^b, *primers* utilizados na *nested*-PCR e no sequenciamento.

3.2.2.3. Análise Filogenética

Para as análises filogenéticas, os arquivos fasta foram alinhados juntamente as sequências de HTLV-1 ou HTLV-2 disponíveis em GenBank, com o auxílio da ferramenta *ClustalW Multiple Sequence Alignment* (BioEdit 7.0.5.3). Utilizou-se os algoritmos de reconstrução filogenética *Neighbor Joining* - NJ e *Maximum Likelihood* - ML (Máxima Verossimilhança). As árvores de NJ e ML foram construídas baseadas em modelos apropriados de substituição de nucleotídeos determinados pelo *Modeltest* v3.7 [GTR+G (LTR), GTR+I+G (*env* e *tax*)] para HTLV-1 e [TVM+I+G (LTR), GTR+G (*env* e *tax*)] para HTLV-2, usando o programa PAUP versão 4.0.b10.

O índice de sustentabilidade dos ramos foi testado pelo método de *bootstrapping* com 1.000 pseudo-réplicas. As árvores filogenéticas foram visualizadas com o programa FigTree versão 1.3.1. Valores de *bootstrap* acima de 60% e *zero length* (usando *likelihood ratio test*) com $p < 0.001$ (**) e $p \leq 0.05$ (*) foram destacados nas árvores. As árvores foram enraizadas usando um grupo externo, Mel5 (LTR e *env* de HTLV-1), EL (*tax* de HTLV-1) e Efe2 (LTR, *env* e *tax* de HTLV-2). Como não houve diferença nas topologias, adotou-se as figuras obtidas com ML.

3.2.2.3.1. Número de acesso ao GenBank das sequências utilizadas para construção das árvores filogenéticas, segundo a região genômica

3.2.2.3.1.1. HTLV-1

LTR: ATK (J02029), pyg19 (L76310), ITIS (Z32527), MWMG (Z31662), T49 (L76305), GAB7 (L76311), GH78 (D23693), OD (U12805), BO (U12804), Ni3.Peru (Y16485), H5 (M37299), HTLV01 (DQ005556), HTLV20 (DQ005564), CH26 (D23690), FNN148 (DQ005548), Nar (AF063820), Me3.Peru (Y16480), FNN155 (DQ005551), Cam (AF063819), IDUSSA (DQ005555), FNN156 (DQ005552), MAQS (X88876), MASU (X88877), JCP (X88875), HKN (X88874), FCR (X88873), CMC (X88872), AMA (X88871), FNN100 (DQ005547), FNN149 (DQ005549), CA253 (EU108722), CA423 (EU108724), CA422 (EU108721), HB3120 (DQ471206), HB3203 (DQ471205), FS157 (GU225732), FS67 (GU225731), VSF842 (EF672337), VSF310 (EF672336), AC042 (EU392160), AC181 (EU392159), Mel5 (L02534), 012BR_HAM116 (KF797912), 012BR_ASY083 (KF797896), 012BR_HAM441 (KF797905), 12BR_ATL005 (KF797887), PH961 (KJ544815), PH1248 (KJ544826), PH549 (KJ544836), TBU (KJ544855), AC181 (EU392159), ES-P2 (GU126483), Caio4634 (JN655856), 1 (KC493378), BRLO14-02 (JF271836), BRLO15-02 (JF271837), BRLO34-02 (JF271839), BRLO48-02 (JF271842), BRSP134-08 (JF271843), BRSP145-08 (JF271844), BRSP206-08 (JF271845), BRSP320-09 (JF271849), BRSP414-09 (JF271850) e BRSP24890-15 (KY928514).

env: ATK (J02029), TSP-1 (M86840), MT-2 (M37747), HS35 (D13784), CH (M69044), 2036-A (AY604874), pt3ATL (U81866), pt5ATL (U81867), pt8ATL (U81868), 2306 (AY604896), MZ9-08 (HM770441), EL (M67514), Co-006 (AF405343), Co-007 (AF405344), 2049-A (AY604875), 2050 (AY604876), 2051 (AY604877), 2091-A (AY604885), 2132 (AY604887), BOI (L36905), ATL-YS (U19949), H5 (M37301), H990 (U81862), IP60-A (AY604934), PAR (AY604935), RK13-Ger (AF042071), SP (M69044), Mel5 (L02534), STLV-1-sm (U94516), 012BR_ASY083 (KF797896), 012BR_HAM441 (KF797905), 12BR_ATL005 (KF797887), BRSP320-09 (HM770437), BRSP414-09 (HM770439), BRSP42-09 (HM770438), BRSP425-09 (HM770440), BRSP01-10 (HM770431) BRLO14-02 (HM770426), BRLO15-02 (HM770427),

BRLO34-02 (HM770428), BRLO47-02 (HM770429), BRLO48-02 (HM770430), BRSP24889-15 (KY928481) e BRSP24890-15 (KY928482).

tax: ATK (J02029), TSP-1 (M86840), BRRJ017_95 (DQ323833), BRRJl69_00 (DQ323845), BRRJc127_97 (DQ323840), BRRJ3476 (DQ323834), BRRJa107_96 (DQ323835), BRRP388 (DQ323855), BRRP165 (DQ323875), BRRJa156_971 (DQ323836), BRRP004 (DQ323870), BRRP438 (DQ323862), BRRP050 (DQ323850), BRRP464 (DQ323883), ArJ13-1 (DQ227134), ArJ2-1 (DQ227130), ArJ16-1 (DQ227135), ArJ11-5 (DQ227158), ArJ55-2 (DQ227189), BOI (L36905), WHP (AF259264), htlvtax5 (AF226593), ATL150 (AB036376), RKI3-Ger (AF042071), RKI2-Rum (AF003012), HC34-13 (AB045549), MT-2 (AF292000), HC139 (AB045520), ATL-YS (U19949), HAM50 (AB045481), (AF485380), (AF485381), 31/98 (AF133525), 122/97 (AF133524), EL (M67514), BRLO14-02 (JN887698), BRLO15-02 (JN887699), BRLO34-02 (JN887700), BRLO37-02 (JN887701), BRLO48-02 (JN887702), BRSP134-08 (JN887703), BRSP206-08 (JN887705), BRSP232-08 (JN887706), BRSP320-09 (JN887709), BRSP414-09 (JN887710), 012BR_ASY036 (KF797891), 012BR_HAM441 (KF797905), 12BR_ATL005 (KF797887), 012BR_HAM016_HC (KF797893), BRSP24889-15 (KY928579) e BRSP24890-15 (KY928580).

3.2.2.3.1.2. HTLV-2

LTR: Mo (M10060), SFIFU62 (U73022), NOR2N (U10258), ATL18 (U10252), SMH2 (Y09148), SMH1 (Y05147), SFIFU55 (U73010), PUEBRB (U10262), LA8A (U10256), NAV.DS (U10257), OkInd158 (U73015), IVDUros (AF054272), PH230PCAM (Z46838), Mexy17 (L42510), GHKT (L42507), RP329 (AF326583), K96 (AF326584), Kayapo78 (AF139388), SP-WV (AF139382), Kayapo73 (L42509), BRPOA6 (DQ028606), BRPOA12

(DQ028613), BRPOA9 (DQ028608), Belem10 (AF139393), Belem02 (AF139392), BH223 (AY509600), BH339 (AY509602), BRLO7-02 (GU573730), BRLO9-02 (GU573731), BRLO12-02 (GU573732), BRLO18-02 (GU573733), BRLO19-02 (GU573734), BRLO24-02 (GU573738), BRLO26-02 (GU573739), BRLO27-02 (GU573740), BRLO31-02 (GU573743), Kayapo79 (AF1239389), BRPOA5 (DQ028605), BRPOA8 (DQ028607), BRAZA21 (U10253), BH315 (AY509601), NRA (L20734); Efe2 (Y14365).

env: Mo (M10060), BRLO21-02 (HM770399), BRLO22-02 (HM770400), BRLO37-02 (JQ435911), BRLO38-02 (HM770409), BRLO43-02 (HM770411), BRLO49-02 (HM770413), BRSP91-08 (HM770416), BRSP111-08 (HM770417), BRSP160-08 (HM770418), BRSP171-08 (HM770423), BRSP172-08 (HM770423), BRSP239-08 (HM770419), BRSP319-08 (HM770420), BRSP348-08 (HM770425), BRSP84-09 (HM770421), BRSP130-09 (HM770422), G12 (L11456), Gu (X89270), Gab (Y13051), G2 (AF074965), RP329 (AF326583), SP-WV (AF139382), AF412314 (AF412314), MO15A (K02024), FLW (S67545), NRA (L20734), Efe2 (Y14365).

tax: Mo (M10060), K96 (AF326584), G12 (L11456), BAIDU2 (AF401496), SP-WV (AF139382), SP2 (U32872), SP1 (U32873), FUC (U32882), PAR (U32880), KAY1 (U32875), KAY2 (U32874), G2 (AF074965), Gab (Y13051), Gu (X89270), PR-46 (DQ022075), BRLO03-02 (JN887713), BRLO09-02 (JN887714), BRLO21-02 (JN887717), BRLO35-02 (JN887724), BRLO37-02 (JN887725), BRLO38-02 (JN887726), BRLO45-02 (JN887729), BRLO49-02 (JN887730), BRSP171-08 (JN887731), BRSP172-08 (JN887732), BRSP239-08 (JN887733), BRSP319-08 (JN887734), BRSP348-08 (JN887735), BRSP130-09 (JN887736), NRA (L20734), Efe2 (Y14365).

3.2.2.4. Análise de mutações

A pesquisa de mutações utilizou o programa BioEdit versão 7.0.5.3, em que as sequências do estudo após alinhadas, foram comparadas principalmente com os respectivos protótipos internacionais, ATK para o HTLV-1, Mo e Consensus 2c para o HTLV-2. Os três consensos de 2c foram compilados de isolados representativos das diferentes regiões do Brasil, adquiridos do GenBank, para os segmentos LTR, *env* e *tax*. As substituições de nucleotídeos foram analisadas, assim como as alterações de aminoácidos, para identificar e contabilizar as mutações sinônimas e não sinônimas.

3.2.2.5. Análise de partículas provirais defectivas

A pesquisa de partículas provirais defectivas levou em consideração a ausência de determinada região genômica, quando foi possível obter sequências de outros segmentos. Seguindo os critérios de Tamiya (1996); Miyazaki (2007) e Katsuya (2019) e colaboradores, estas partículas podem ser classificadas em dois tipos. Tipo 1 quando há deleção de genes internos do provírus e as regiões 5'LTR e 3'LTR são preservadas, e tipo 2 quando há deleção do 5'LTR e os genes internos estão presentes.

Importante ressaltar que antes de analisar a presença de partículas defectivas, as reações de PCR e sequenciamento foram repetidas várias vezes com aumento de *input* de DNA e outras medidas que pudessem aumentar a chance de obter sequência do fragmento ausente.

3.2.3. Avaliação do INNO-Lia (LIA) na resolução de amostras inconclusivas pelo *Western Blot* (WB)

Para esta análise, recuperou-se amostras com resultado inconclusivo (HTLV não tipado e indeterminado) no *Western Blot* (HTLV Blot 2.4, MP Biomedicals Asia Pacific Pte. Ltd., Singapura) de três populações distintas e, realizou-se o ensaio de LIA (INNO-LIA HTLV I/II, Fujirebio, Europe NV, Belgium) nos soros/plasmas, para confirmar ou refutar o que foi anteriormente observado em indivíduos com a coinfeção por HIV (Campos et al., 2017b).

Os perfis de bandas e resultados obtidos com o WB e o LIA das amostras com as coinfeções por HIV, hepatites B e C e de ambulatorios de HTLV foram analisados minuciosamente, seguindo as instruções de interpretação presentes nas bulas dos fabricantes.

Resumidamente no WB, quando a amostra apresenta pelo menos as duas principais bandas de Gag (p19 e p24) e a GD21 de Env, confirma a infecção por HTLV, porém, sem a tipagem viral; em casos de positividade para as duas de Gag (p19 e p24) e duas de Env (GD21 e rgp46-I) se considera infecção por HTLV-1; quando há presença de Gag (p19 e p24) e Env (GD21 e rgp46-II) a amostra é soropositiva para HTLV-2. Qualquer resultado que não se enquadre nestes perfis, é considerado indeterminado.

No LIA primeiramente se confirma a infecção por HTLV observando a positividade de pelo menos duas bandas (p19-I/II, p24-I/II, gp21-I/II, gp46-I/II), sendo uma delas obrigatoriamente a gp21. Caso confirme a infecção, segue para discriminação dos tipos, lê-se HTLV-1 quando a somatória de intensidade das bandas p19-I e/ou rgp46-I é maior que a intensidade da rgp46-II; sendo HTLV-2 em situação contrária. As tiras apresentam bandas controles com variação de intensidade de cor de +/- até 3+ que possibilitam a validação do ensaio (detecta imunoglobulinas humanas totais), um ponto

de corte para considerar as bandas de confirmação e discriminação positivas.

3.2.4. Avaliação de estratégias para melhoria e expansão do diagnóstico das infecções por HTLV-1 e HTLV-2

Nesta secção, avaliou-se a otimização de metodologias diagnósticas já implantadas no laboratório de HTLV do IAL, com intuito de expandir a testagem destes vírus linfotrópicos em populações vulneráveis.

Um dos procedimentos analisados foi um método de triagem da infecção por HTLV-1/2 com o conjunto de reagentes de ensaio imunoenzimático (EIA) Murex (Murex HTLV I+II, DiaSorin, UK) empregando amostras em *pool* de cinco soros, padronizado e validado durante a execução deste estudo no laboratório de HTLV do IAL (Silva et al., 2020).

Também, realizou-se a pesquisa de marcadores virológicos que podem influenciar o desempenho dos testes utilizados na conclusão do diagnóstico das infecções por HTLV-1 e HTLV-2. Neste sentido, a presença de mutações e partículas provirais defectivas foram analisadas em relação à presença de anticorpos dirigidos a antígenos presentes nos ensaios imunoenzimáticos de triagem e nas tiras de *immunoblotting* (WB e LIA).

Informações dos resultados destes ensaios de diagnóstico foram recuperados de bancos de dados laboratoriais.

3.2.5. Análise estatística

Os dados coletados possibilitaram a construção de bancos utilizando o programa Excel para Windows (Excel, Microsoft Office 365, Redmond, WA,

USA). O teste do Qui-Quadrado (múltiplos grupos) ou exato de Fisher (dois grupos) foi empregado para a análise das variáveis categóricas utilizando o Epi Info 3.5.4 (Epi Info Software, CDC, Atlanta, GA, USA).

As variáveis contínuas foram avaliadas pelos testes não paramétricos U-test Mann-Whitney (dois grupos) ou ANOVA Kruskal-Wallis (múltiplos grupos) complementado pelo pós teste Dunn's multiple-comparison, usando o programa estatístico GraphPad 3.0 (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, USA).

Análise de regressão logística univariada e multivariada foi aplicada para identificar fatores associados às cargas virais e clareamento de HBV e HCV pelo cálculo de *odds ratios* (ORs) e intervalo de confiança de 95% (IC95%), utilizando o SPSS 21 (Statistical Package, Statistical Software, IBM, NY, USA).

Associações estatisticamente significantes foram consideradas quando $p \leq 0,05$.

3.2.6. Conflito de interesse

Não houve conflito de interesse com as empresas fornecedoras dos *kits* e reagentes empregados na pesquisa, tampouco com os fabricantes.

4. Resultados

4.1. Marcadores de evolução das hepatites B e C

As medianas de idade e distribuição de sexo dos grupos analisados dentro das duas populações (HBV e HCV), assim como os valores medianos e intervalos interquartis (*interquartil range*, IQR) das mensurações de carga viral (CV) são apresentados nas **Tabelas 1 e 2**, respectivamente.

A distribuição de sexo nos indivíduos com HBV mostrou maioria de homens entre os coinfectados por HBV/HIV e HBV/HTLV-2 ($p < 0,0001$; **Tabela 1**). Quanto à idade encontrou-se a maior mediana no grupo HBV/HTLV-1 (64 anos) e a menor entre os HBV/HTLV-2 (47 anos), as associações estatisticamente significativas são apresentadas na **Figura 3**. Em relação à CV de HBV, o grupo HBV/HTLV-2 exibiu a menor quantificação, independentemente de ser HIV positivo ($1,61 \log_{10}$), este valor foi $1,03 \log_{10}$ menor que a CV dos HBV monoinfectados (**Tabela 1**, coluna cinza), com diferença estatisticamente significativa (**Figura 4**).

O sexo masculino também foi mais frequente entre todos os tipos de coinfecção por HCV ($p < 0,0001$; **Tabela 2**), e a maior mediana de idade foi encontrada na coinfecção HCV/HTLV-1 (53,5 anos), enquanto as pessoas que tinham o HIV eram mais jovens, porém, diferenças estatisticamente significativas só foram observadas no grupo HCV/HIV quando comparado aos grupos HCV e HCV/HTLV-1 (**Figura 5**). Quanto à CV de HCV, já se notou diferença entre as medianas totais, a CV no sexo masculino foi $0,28 \log_{10}$ maior que a CV das mulheres (**Tabela 2**). Também, nas coinfecções por HIV houve valores mais altos mensurados, sendo estatisticamente significantes, principalmente em relação ao HCV/HTLV-2, que teve a menor CV detectada (**Tabela 2 e Figura 6**).

Tabela 1. Características dos indivíduos infectados por HBV e resultados de carga viral de acordo com as coinfeções por HIV, HTLV-1 e HTLV-2

	Total	HBV	HBV/HIV	HBV/HTLV-1	HBV/HIV/HTLV-1	HBV/HTLV-1 ^a	HBV/HTLV-2	HBV/HIV/HTLV-2	HBV/HTLV-2 ^a	<i>p</i>
N (%)	1.910	1.738	140	7	7	14	4	14	18	<0,0001 ^d
Masculino	1.013 (53,1)	877 (50,5)	116 (82,9)	3 (42,9)	4 (57,1)	7 (50,0)	2 (50,0)	11 (78,6)	13 (72,2)	
Feminino	896 (46,9)	860 (49,5)	24 (17,1)	4 (57,1)	3 (42,9)	7 (50,0)	2 (50,0)	3 (21,4)	5 (27,8)	
Idade mediana ^b (IQR)										
Masculino	47 (38 - 56)	47 (38 - 57)	47 (40 - 52)	60 (44 - 76)	47,5 (44,25 - 56)	50 (44 - 60)	55 (48 - 62)	47 (45 - 51)	47 (39 - 52)	
Feminino	45 (36 - 57)	45 (36 - 57)	45 (38,25 - 52,75)	66 (57,25 - 70,25)	62 (52 - 63)	63 (55 - 68)	46 (42 - 54)	44 (43 - 51)	44 (42,5 - 52,5)	
Total	46 (37 - 56)	46 (37 - 57)	46 (39 - 52)	64 (55 - 71)	52 (45 - 62)	59 (44 - 65)	51 (43,5 - 60)	47 (43,75 - 51)	47 (39 - 51,5)	
Carga viral mediana ^c (IQR)	n=1.349	n=1.255	n=76	n=4	n=7	n=11 ^a	n=1	n=6	n=7 ^a	
Masculino	2,67 (1,83 - 3,45)	2,68 (1,87 - 3,41)	2,59 (1,56 - 4,68)	2,45 (1,86 - 4,58)	3,79 (1,55 - 7,53)	2,50 (1,86 - 5,09)	-	1,48 (1,26 - 1,93)	1,48 (1,26 - 1,93)	
Feminino	2,60 (1,94 - 3,18)	2,61 (1,95 - 3,18)	2,36 (1,70 - 3,64)	2,37 (2,37 - 2,37)	1,95 (1,46 - 7,18)	2,16 (1,58 - 5,98)	1,74 (1,74 - 1,74)	2,19 (2,19 - 2,19)	1,96 (1,74 - 2,19)	
Total	2,63 (1,89 - 3,33)	2,64 (1,90 - 3,29)	2,48 (1,60 - 4,66)	2,41 (1,99 - 4,05)	2,50 (1,46 - 7,18)	2,45 (1,86 - 5,09)	1,74 (1,74 - 1,74)	1,61 (1,29 - 2,11)	1,61 (1,32 - 2,04)	

Legenda: N, número; %, porcentagem; ^a, grupos HBV/HTLV coinfectados independente do *status* HIV para aplicação dos testes estatísticos ^b, idade em anos; IQR, intervalos interquartis de 25% e 75%; ^c, carga viral em log₁₀. Quantificação de carga viral usando o conjunto de reagentes Abbott Real-Time HBV (Abbott 241 Molecular Inc., IL, USA); ^d, teste de qui-quadrado.

Tabela 2. Características dos indivíduos infectados por HCV e resultados de carga viral de acordo com as coinfeções por HIV, HTLV-1 e HTLV-2

	Total	HCV	HCV/HIV	HCV/HTLV-1	HCV/HIV/HTLV-1	HCV/HTLV-2	HCV/HIV/HTLV-2	<i>p</i>
N (%)	1.315	1.127	127	28	9	9	15	
Masculino	733 (55,74)	581 (51,55)	109 (85,83)	17 (60,71)	6 (66,67)	7 (77,78)	13 (86,67)	<0,0001 ^c
Feminino	582 (44,26)	546 (48,45)	18 (14,17)	11 (39,29)	3 (33,33)	2 (22,22)	2 (13,33)	
Idade mediana ^a (IQR)								
Masculino	50,0 (44 - 57)	51,0 (44 - 58)	46,0 (43 - 50)	54,0 (48 - 58)	44,0 (43 - 51,2)	46,0 (44 - 49)	47,0 (41 - 53,5)	
Feminino	53,0 (42 - 60)	53,0 (42 - 60)	47,0 (41,7 - 55)	51,0 (41 - 60)	51,0 (40 - 60)	46,50 (42 - 51)	59,50 (55 - 64)	
Total	51,0 (43 - 59)	52,0 (43 - 50)	46,0 (43 - 50)	53,5 (47 - 58)	44,0 (43 - 51,5)	46,0 (43 - 50)	49,0 (42 - 55)	
Carga viral mediana ^b (IQR)	n=925	n=787	n=90	n=25	n=5	n=8	n=10	
Masculino	5,88 (5,20 - 6,32)	5,77 (5,13 - 6,28)	6,16 (5,75 - 6,52)	5,86 (5,74 - 6,23)	6,82 (6,73 - 6,89)	5,25 (3,69 - 6,26)	6,48 (6,35 - 6,89)	
Feminino	5,60 (4,91 - 6,12)	5,56 (4,90 - 6,11)	5,81 (5,43 - 6,25)	5,59 (5,08 - 6,20)	6,52 (6,17 - 6,87)	4,81 (4,02 - 5,60)	5,71 (5,71 - 5,71)	
Total	5,75 (5,07 - 6,26)	5,66 (5,02 - 6,20)	6,10 (5,72 - 6,46)	5,84 (5,35 - 6,20)	6,82 (6,45 - 6,88)	5,25 (3,99 - 5,91)	6,48 (6,17 - 6,87)	

Legenda: N, número; %, porcentagem; ^a, idade em anos; IQR, intervalos interquartis de 25% e 75%; ^b, carga viral em log₁₀ – quantificação de carga viral usando o conjunto de reagentes Abbott Real-Time HCV (Abbott 241 Molecular Inc., IL, USA); ^c, teste de qui-quadrado.

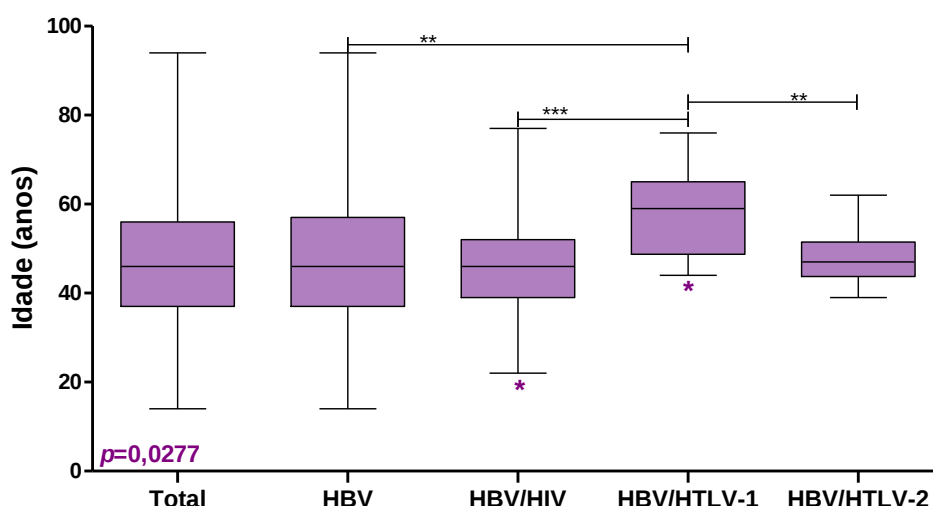


Figura 3. Medianas e intervalos interquartis das idades dos indivíduos com HBV de acordo com os tipos de infecções e coinfeções viras

Legenda: * referem-se às diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, sendo * ($p < 0,05$); ** ($p \leq 0,01$) e *** ($p \leq 0,001$). Símbolo (*) cor preta representa análise pelo teste Mann-Whitney; *cor roxa refere os resultados do teste Kruskal-Wallis complementado pelo Dunn's quando comparados ao grupo HBV (monoinfectado).

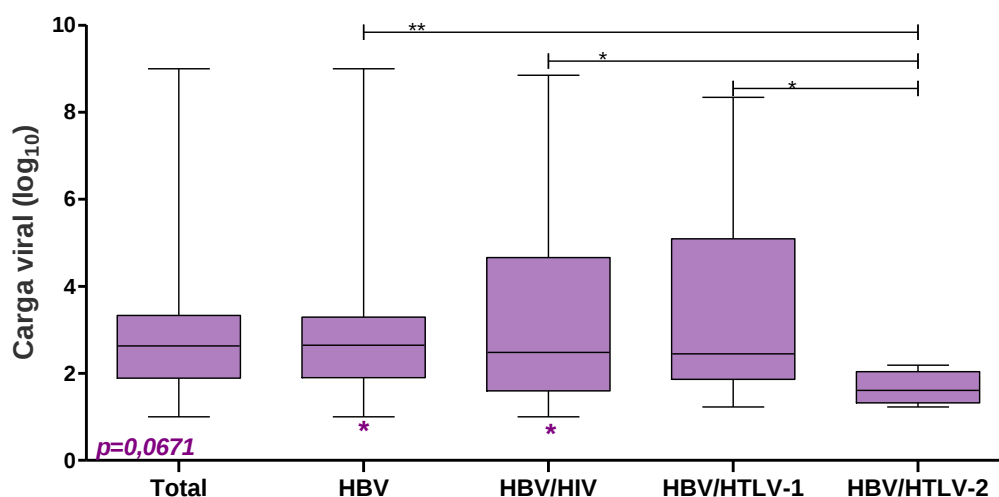


Figura 4. Medianas e intervalos interquartis dos valores de carga viral dos indivíduos com HBV de acordo com os tipos de infecções e coinfeções viras

Legenda: * referem-se às diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, sendo * ($p < 0,05$); ** ($p \leq 0,01$) e *** ($p \leq 0,001$). Símbolo (*) cor preta representa análise pelo teste Mann-Whitney; *cor roxa refere os resultados do teste Kruskal-Wallis complementado pelo Dunn's quando comparados ao grupo HBV/HTLV-2.

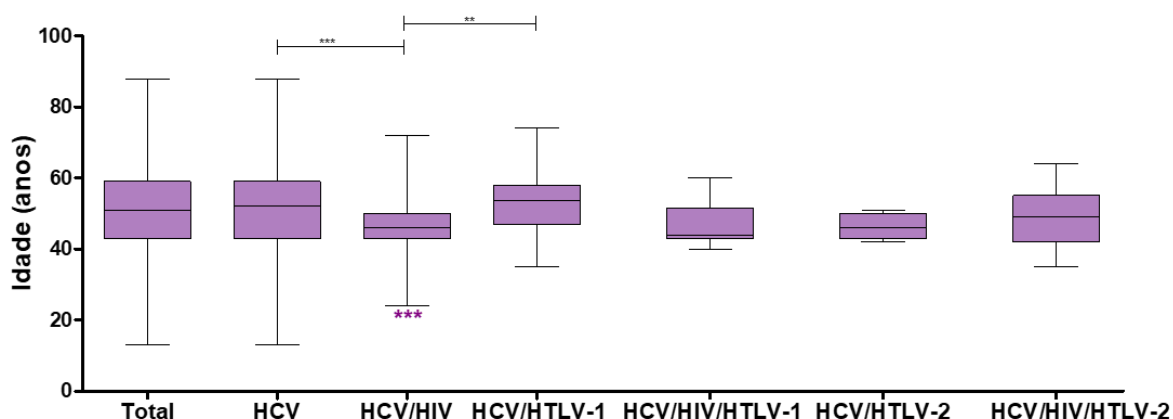


Figura 5. Medianas e intervalos interquartis das idades dos indivíduos com HCV de acordo com os tipos de infecções e coinfeções viras

Legenda: * referem-se às diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, sendo * ($p < 0,05$); ** ($p \leq 0,01$) e *** ($p \leq 0,001$). Símbolo (*) cor preta representa análise pelo teste Mann-Whitney; *cor roxa refere os resultados do teste Kruskal-Wallis complementado pelo Dunn's quando comparados ao grupo HCV (monoinfectado).

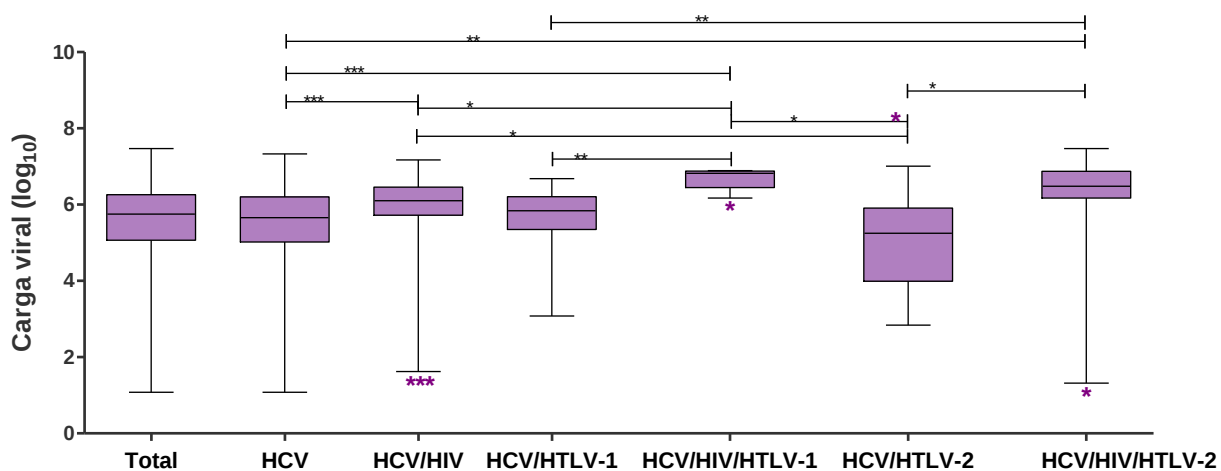


Figura 6. Medianas e intervalos interquartis dos valores de carga viral dos indivíduos com HCV de acordo com os tipos de infecções e coinfeções viras

Legenda: * referem-se às diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, sendo * ($p < 0,05$); ** ($p \leq 0,01$) e *** ($p \leq 0,001$). Símbolo (*) cor preta representa análise pelo teste Mann-Whitney; *cor roxa refere os resultados do teste Kruskal-Wallis complementado pelo Dunn's quando comparados ao grupo HCV (monoinfectado) e HCV/HIV/HTLV-1 vs. HCV/HTLV-2.

Quando analisados o número de amostras com CV de HBV detectada ou abaixo do limite de detecção do ensaio utilizado (carga viral indetectável) na primeira avaliação, encontrou-se uma porcentagem maior de amostras com CV indetectável em indivíduos com HBV/HTLV-2 (61,1%), diferentemente do grupo HBV/HTLV-1 (21,4%). Aplicando a análise de regressão logística univariada, as maiores chances de quantificações indetectáveis foram observadas nos coinfectados com HBV/HIV e HBV/HTLV-2 quando comparados ao grupo referência HBV mono infectado [OR = 2,19 (IC 95%, 1,54 - 3,10) e OR = 4,08 (IC 95%, 1,57-10,60), respectivamente] (**Tabela 3**). Durante o acompanhamento, os indivíduos HBV/HTLV-2 continuaram com 61,1% de carga viral indetectável de HBV, e o grupo HBV/HTLV-1 apresentou um pequeno aumento (35,7%) (dados obtidos de registros laboratoriais).

Tabela 3. Fatores associados com carga viral de HBV não detectada nas amostras de infecção e coinfecção por HBV

Análise univariada					
		HBV ^a n=1.738	HBV/HIV n=140	HBV/HTLV-1 n=14	HBV/HTLV-2 n=18
Masculino	OR		4,74	0,98	2,55
	[IC95%]		[3,02-7,43]	[0,34-2,81]	[0,91-7,18]
	p Wald		≤0,001	0,981	0,077
Idade ≤ 50 anos	OR		1,22	0,25	1,25
	[IC95%]		[0,85-1,76]	[0,08-0,80]	[0,47-3,34]
	p Wald		0,286	0,019	0,662
Carga viral de HBV não detectada	OR		2,19	0,71	4,08
	[IC95%]		[1,54-3,10]	[0,20-2,55]	[1,57-10,60]
	p Wald		≤0,001	0,589	0,004

Legenda: n, número; OR, *odds ratio* (razão de chance); IC95%, intervalo de confiança de 95%; ^a grupo de referência na análise de regressão.

A comparação das porcentagens de CV detectada e indetectável realizada na população com HCV, não apresentou diferença entre os coinfectados HCV/HTLV-1 (18,9%) e HCV/HTLV-2 (25,0%). Entretanto,

durante o acompanhamento, 50,0% dos pacientes HCV/HTLV-2 conseguiram suprimir o HCV, apresentando CV indetectável, contrapondo os 35,1% alcançados pelos coinfectados HCV/HTLV-1. A análise de regressão univariada e multivariada confirmou o benefício da infecção pelo HTLV-2 no clareamento do HCV [OR= 2,56; IC95% (1,14 - 5,75) e OR= 2,65 (1,17 - 5,99), respectivamente] quando comparados os indivíduos coinfectados HCV/HTLV-2 com contrapartida HCV mono infectados (**Tabela 4**).

Tabela 4. Fatores associados com o clareamento viral de HCV nas amostras de infecção e coinfecção por HCV

Análise univariada					Análise multivariada			
	HCV ^a n=1.127	HCV/HIV n=127	HCV/HTLV-1 n=37	HCV/HTLV-2 n=24		HCV ^a n=1.127	HCV/HIV n=127	HCV/HTLV-2 n=24
Masculino	OR	5,69	1,54	4,7	OR		5,29	4,66
	[IC95%]	[3,41-9,50]	[0,79-3,03]	[1,60-13,83]	[IC95%]		[3,16-8,86]	[1,58-13,79]
	<i>p</i> Wald	≤0,001	0,207	0,005	<i>p</i> Wald		≤0,001	0,005
Idade ≤ 50 anos	OR	3,7	0,73	2,4	OR		3,5	2,16
	[IC95%]	[2,43-5,64]	[0,37-1,43]	[1,02-5,63]	[IC95%]		[2,28-5,37]	[0,91-5,13]
	<i>p</i> Wald	≤0,001	0,356	0,046	<i>p</i> Wald		≤0,001	0,08
Clareamento viral de HCV	OR	0,63	1,38	2,56	OR		0,64	2,65
	[IC95%]	[0,40-0,99]	[0,70-2,75]	[1,14-5,75]	[IC95%]		[0,40-1,03]	[1,17-5,99]
	<i>p</i> Wald	0,044	0,354	0,023	<i>p</i> Wald		0,064	0,02

Legenda: n, número; OR, *odds ratio* (razão de chance); IC95%, intervalo de confiança de 95%; ^a grupo de referência na análise de regressão.

As análises univariada e multivariada, também apontaram a idade ≤50 anos e o sexo masculino como fatores associados com as coinfeções HBV/HIV, HBV/HTLV-2 (**Tabela 3**), HCV/HIV e HCV/HTLV-2 (**Tabela 4**).

Em relação aos genótipos de HCV recuperados do SIGH, o mais prevalente foi o 1a (42,8%), seguido pelo 1b (28,4%), 3 (14,1%) e 3a (6,0%). Porém, não houve diferença de genótipos entre os grupos com a infecção HCV ou coinfeções por HIV e HTLV-1/2. Todos os resultados obtidos nesta etapa do estudo foram recentemente publicados (Campos et al., 2020a).

4.2. Caracterização molecular de HTLV-1 e HTLV-2

Obtiveram-se 300 sequências com as 95 amostras de DNA, sendo 216 de HTLV-1 e 84 de HTLV-2. O sequenciamento genético de HTLV-1 resultou em: 68 sequências depositadas em GenBank da região LTR [42 (SP) e 26 (PE)] com seguimentos genômicos variando de 621 a 675 pares de base (pb); 75 da região *env* [53 (SP) e 22 (PE) com 634 a 679 pb]; e 73 da região *tax* [47 (SP) e 22 (PE)] com 996 a 1.074 pb, e quatro sequências [2 (SP) e 2 (PE)], que não foram incluídas na construção das árvores filogenéticas, por apresentarem tamanho menor que as demais (579, 626, 631 e 718 pb) (**Quadro 2**).

As sequências de HTLV-2 obtidas foram: 25 da região LTR com comprimento variando de 496 a 644 pb; 31 da região *env* (936 a 964 pb); e 28 da região *tax* com 1.089 a 1.134 pb (**Quadro 2**).

Em relação aos subtipos virais, eles foram determinados por análise das três regiões de HTLV-1 e HTLV-2 (LTR, *env* e *tax*) utilizando o *Genotyping tool* (NCBI), de acordo com as sequências obtidas para cada segmento. Todas as amostras de HTLV-1 pertenciam ao subtipo 1a Cosmopolita, enquanto o subtipo 2a foi encontrado na totalidade dos casos de HTLV-2. A **Figura 7** representa a subtipagem com a ferramenta *Genotyping* para as sequências região LTR de HTLV-1 e região *env* de HTLV-2 (**Figura 7A** e **7B**, respectivamente).

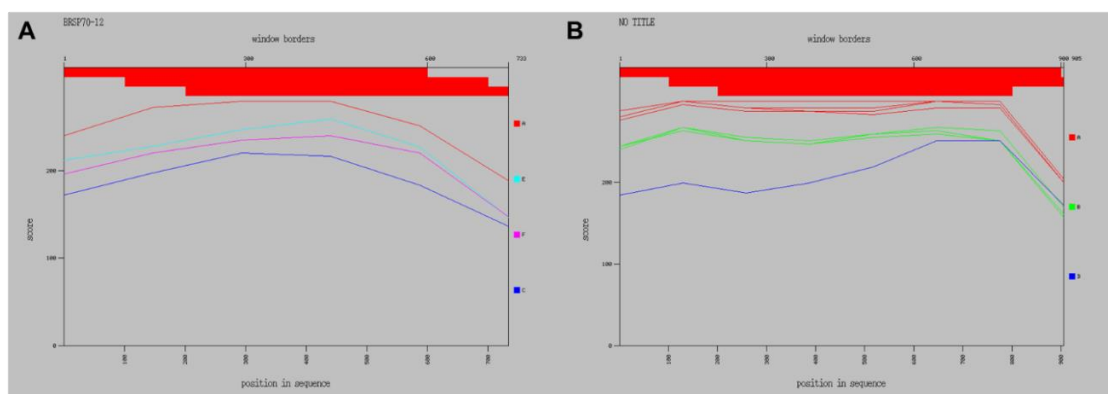


Figura 7. Representação dos subtipos HTLV-1a (**A**) e HTLV-2a (**B**) gerado pela ferramenta *Genotyping* (NCBI) com as sequências do estudo

Quadro 2. Características dos indivíduos coinfectados por HIV/HTLV-1/-2 de SP e monoinfectados por HTLV-1 de PE, e número de mutações encontradas em cada amostra de acordo com as regiões de LTR, *env* e *tax* sequenciadas

ID	Sexo	Idade ^a	Resultado	Mutações LTR				Mutações <i>env</i>					Mutações <i>tax</i>				
				GenBank	Total	Promoter	Freq.	GenBank	Total	SIN	NSIN	Freq.	GenBank	Total	SIN	NSIN	Freq.
IAL-001	M	45	HTLV-2		0	0	0	KY928504, KY928510	7	6	1	7	KT351574	12	6	6	7
IAL-003	F	49	HTLV-1	KM211972	18	2	13	KT351486	6	5	1	6	KT351543	9	6	3	6
IAL-004	M	53	HTLV-1	KM211973	16	0	14	KT351487	6	5	1	5	KY928595	20	19	1	3
IAL-005	F	59	HTLV-2	KY928545	22	4	18	KT351558	11	8	3	7	KT351579	11	6	5	7
IAL-006	F	58	HTLV-1	KM211974	15	0	14	KT351488, KT351478	6	6	0	6	KT351515	11	9	2	6
IAL-007	M	43	HTLV-1	KT351465	17	0	16	KT351503	6	6	0	6		0	0	0	0
IAL-009	F	60	HTLV-1		0	0	0	KY928491	7	6	1	6	KY928587	6	4	2	6
IAL-010	F	46	HTLV-1	KM211975	16	0	14	KT351489	8	8	0	6	KT351523	9	7	2	6
IAL-011	M	45	HTLV-1		0	0	0	KT351482	8	8	0	6		0	0	0	0
IAL-013	M	43	HTLV-1	KM211976	15	1	14	KT351491, KT351493, KT351506	8	6	2	5	KY928591, KT351526, KT351539	8	6	2	6
IAL-016	M	51	HTLV-1	KM211977	20	2	14	KT351492	8	8	0	5	KT351525	10	6	4	6
IAL-017	M	46	HTLV-2	KY928551	21	3	16	KT351563	9	8	1	7	KT351584	14	7	7	7
IAL-018	F	55	HTLV-2	KY928531	19	3	12		0	0	0	0	KY928598	12	12	0	2
IAL-020	F	45	HTLV-1	KY928523, KT351468	19	1	13	KT351490, KT351507	5	5	0	3	KT351524, KT351540	8	5	3	4
IAL-021	F	53	HTLV-1	KY928525	17	0	15	KT351501	6	6	0	6		0	0	0	0
IAL-022	M	28	HTLV-1	KM211978	17	2	14	KT351494, KY928486	6	5	1	6	KT351527, KT351522	7	5	2	6
IAL-023	F	48	HTLV-1	KT351461	17	0	15		0	0	0	0		0	0	0	0
IAL-024	M	53	HTLV-1		0	0	0		0	0	0	0	KT351531	11	9	2	6

Continuação do **Quadro 2.**

ID	Sexo	Idade ^a	Resultado	Mutações LTR				Mutações env					Mutações tax				
				GenBank	Total	Promoter	Freq.	GenBank	Total	SIN	NSIN	Freq.	GenBank	Total	SIN	NSIN	Freq.
IAL-026	F	52	HTLV-1		0	0	0	KT351496, KY928494	6	6	0	6	KY928593	10	7	3	6
IAL-027	M	41	HTLV-1	KM211979	18	2	14	KT351498, KT351480	6	5	1	6	KT351530, KT351517	6	4	2	6
IAL-028	F	68	HTLV-2	KY928536	20	6	17		0	0	0	0		0	0	0	0
IAL-029	M	43	HTLV-1	KM211980	20	2	14	KT351499	6	5	1	6	KT351532	8	6	2	6
IAL-030	M	43	HTLV-1	KM211981	19	2	14	KT351500, KT351497	6	5	1	6	KT351533, KT351529	7	5	2	6
IAL-031	M	62	HTLV-1	KM211982	16	1	14	KY928495	6	6	0	6	KT351534	7	5	2	6
IAL-032	M	48	HTLV-1	KM211983	15	0	14	KY928496, KT351483, KT351502	6	6	0	6	KT351519, KT351536	9	7	2	6
IAL-033	M	62	HTLV-1	KM211984	17	2	13	KY928497, KT351484, KY928493	6	5	1	6	KT351535, KT351520, KY928592	9	6	3	6
IAL-034	F	57	HTLV-1	KT351460	20	2	16		0	0	0	0	KY928578, KY928590	9	6	3	6
IAL-035	M	55	HTLV-1	KM211985	15	0	13	KY928498, KT351477	6	6	0	6	KT351537, KT351514	10	8	2	6
IAL-036	M	55	HTLV-1	KY928526	17	0	16		0	0	0	0		0	0	0	0
IAL-037	F	45	HTLV-2	KY928541, KY928532	21	6	18	KT351556, KT351551	8	6	2	7	KT351569	11	6	5	7

Continuação do **Quadro 2.**

ID	Sexo	Idade ^a	Resultado	Mutações LTR				Mutações env					Mutações tax				
				GenBank	Total	Promoter	Freq.	GenBank	Total	SIN	NSIN	Freq.	GenBank	Total	SIN	NSIN	Freq.
IAL-038	M	61	HTLV-2	KY928550, KY928540, KY928549	19	5	18	KT351562, KY928505, KT351561	7	6	1	7	KT351583, KT351577, KT351582	11	6	5	7
IAL-039	M	51	HTLV-1	KT351462, KT351469	17	0	16	KT351481, KT351508	6	6	0	6	KT351518, KT351541	9	7	2	6
IAL-040	M	61	HTLV-2		0	0	0	KY928500, KY928501	7	6	1	7	KT351566, KT351572	11	6	5	7
IAL-041	M	59	HTLV-2	KY928538	20	5	19	KT351548, KT351554	11	8	3	7	KY928597, KT351575	12	11	1	2
IAL-042	M	46	HTLV-2	KY928548	21	5	20	KY928503, KT351560	10	8	2	7	KT351573, KT351581	12	6	6	7
IAL-043	F	41	HTLV-2		0	0	0	KT351550	9	8	1	7	KT351568	11	6	5	7
IAL-044	F	43	HTLV-2	KY928535	21	3	16		0	0	0	0		0	0	0	0
IAL-045	M	43	HTLV-2	KY928539, KY928530	19	3	16	KT351555, KT351549	7	6	1	7	KT351576, KT351567	11	6	5	7
IAL-046	F	44	HTLV-1	KT351466, KT351459	23	2	16	KT351504, KT351479	6	5	1	6	KT351544, KT351516	8	6	2	6
IAL-047	M	48	HTLV-2	KY928537	19	3	16	KY928502	7	6	1	7		0	0	0	0
IAL-050	F	50	HTLV-2	KY928552	21	3	18	KT351557, KT351564	7	6	1	7	KT351578, KT351585	11	6	5	7
IAL-051	F	25	HTLV-1	KT351453	19	0	16		0	0	0	0		0	0	0	0
IAL-052	M	43	HTLV-1	KT351454	20	2	16	KT351470	8	7	1	4	KT351509	7	5	2	6
IAL-054	F	48	HTLV-1	KY928513	18	0	16	KT351471	6	6	0	5		0	0	0	0
IAL-055	F	45	HTLV-2	KY928528	25	6	20	KY928499	11	9	2	6	KY928596	11	11	0	0
IAL-056	M	53	HTLV-1	KT351455	21	0	16	KT351472	6	6	0	3	KT351510	11	9	2	6
IAL-057	F	51	HTLV-2		0	0	0	KT351545	7	6	1	7		0	0	0	0

Continuação do **Quadro 2.**

ID	Sexo	Idade ^a	Resultado	Mutações LTR				Mutações env					Mutações tax				
				GenBank	Total	Promoter	Freq.	GenBank	Total	SIN	NSIN	Freq.	GenBank	Total	SIN	NSIN	Freq.
IAL-060	M	18	HTLV-1		0	0	0	KT351473	6	5	1	3	KT351542	5	3	2	3
IAL-061	F	24	HTLV-1	KT351456	18	2	14	KT351474	5	4	1	5	KT351511	7	4	3	6
IAL-064	F	52	HTLV-2	KY928529	24	6	19	KT351547	7	6	1	6	KT351565	10	6	4	6
IAL-065	F	43	HTLV-1	KT351457	19	2	15	KT351475	6	5	1	5	KT351512	6	4	2	6
IAL-066	F	27	HTLV-1	KT351458	20	2	16	KT351476	7	6	1	5	KT351513	7	5	2	6
IAL-068	M	48	HTLV-1	KT351463	18	0	16	KT351485	5	5	0	4	KT351521	10	8	2	6
IAL-071	M	59	HTLV-2	KY928547	23	6	18	KT351559	9	8	1	6	KT351580	10	6	4	6
IAL-072	F	45	HTLV-1	KT351464	20	2	16	KT351495	6	5	1	6	KT351528	8	5	3	6
IAL-078	M	48	HTLV-1	KY928527	20	2	16	KT351505	8	7	1	6	KT351538	8	6	2	6
IAL-081	M		HTLV-2	KY928533	23	6	20	KT351552	9	8	1	6	KT351570	11	7	4	6
IAL-082	M	61	HTLV-2	KY928534	25	6	20	KT351553	9	8	1	6	KT351571	10	6	4	6
IAL-084	F	32	HTLV-1	KY928515	16	0	11	KY928483	3	3	0	3	KY928581	6	4	2	4
IAL-086	F	27	HTLV-1	KY928516	16	0	11	KY928484	4	4	0	4	KY928582	4	2	2	4
IAL-087	M	49	HTLV-1	KY928517	14	0	9	KY928485	4	4	0	3	KY928583	4	2	2	4
IAL-088	F	43	HTLV-1	KY928518	18	1	16	KY928487	7	6	1	6	KY928584	7	5	2	6
IAL-089	F	64	HTLV-2	KY928542	22	5	20	KY928506	8	7	1	7	KY928599	11	6	5	6
IAL-090	F	53	HTLV-2	KY928543	24	6	20	KY928507	9	8	1	6	KY928600	10	6	4	5
IAL-091	F	63	HTLV-1	KY928520	17	1	13	KY928488	7	6	1	6	KY928594	17	15	2	4
IAL-092	F	51	HTLV-1	KY928521	17	0	11	KY928489	3	3	0	3		0	0	0	0
IAL-095	F	64	HTLV-2	KY928544	22	5	20	KY928508	8	7	1	7	KY928601	11	6	5	6
IAL-100	M		HTLV-1	KY928522	13	0	13		0	0	0	0	KY928588	8	6	2	6
IAL-101	M	49	HTLV-2	KY928546	21	5	20	KY928509	7	6	1	7	KY928602	11	6	5	6
PE-01	M		HTLV-1	MF178246	16	2	14	KY928459	8	1	7	6	KY928553	6	2	4	6
PE-02	M		HTLV-1	MF178247	16	0	14	KY928460	6	0	6	6	KY928575	16	1	15	4
PE-03	M		HTLV-1	MF178248	16	0	11	KY928461	4	0	4	4	KY928554	4	2	2	4
PE-04	F		HTLV-1	MF178249	15	0	11	KY928462	6	1	5	4	KY928555	4	2	2	4

Continuação do **Quadro 2**

ID	Sexo	Idade ^a	Resultado	Mutações LTR				Mutações env					Mutações tax				
				GenBank	Total	Promoter	Freq.	GenBank	Total	SIN	NSIN	Freq.	GenBank	Total	SIN	NSIN	Freq.
PE-05	F		HTLV-1	MF178250	15	0	11	KY928463	4	0	4	4	KY928556	5	2	3	4
PE-06	M		HTLV-1	MF178251	16	0	14	KY928464	6	0	6	6	KY928557	9	2	7	6
PE-07	F		HTLV-1	MF178252	14	0	11	KY928465	4	0	4	4	KY928558	4	2	2	4
PE-09	F		HTLV-1	MF178253	17	2	14	KY928466	6	1	5	6	KY928559	7	2	5	6
PE-10	F		HTLV-1	MF178254	16	2	14		0	0	0	0		0	0	0	0
PE-11	M		HTLV-1	MF178255	17	2	14		0	0	0	0	KY928560	7	2	5	6
PE-14	F		HTLV-1	MF178256	17	2	14	KY928467	5	1	4	5	KY928561	8	2	6	6
PE-15	F		HTLV-1	MF178257	16	2	14	KY928468	8	2	6	6	KY928562	6	2	4	6
PE-16	M		HTLV-1	MF178258	15	0	14	KY928469	6	0	6	6	KY928563	10	2	8	6
PE-17	F		HTLV-1	MF178259	16	0	14	KY928470	7	0	7	6	KY928564	8	2	6	6
PE-18	M		HTLV-1	MF178260	16	0	14	KY928471	8	0	8	6	KY928565	8	2	6	6
PE-19	F		HTLV-1	MF178261	16	0	14	KY928472	6	0	6	6	KY928566	8	2	6	6
PE-20	M		HTLV-1	MF178262	19	2	14	KY928473	7	1	6	6	KY928567	7	3	4	6
PE-21	F		HTLV-1	MF178263	16	0	14		0	0	0	0	KY928568	10	2	8	6
PE-22	F		HTLV-1	KY928511	16	0	14	KY928474	5	0	5	5	KY928576	14	1	13	4
PE-23	F		HTLV-1	MF178264	15	0	11	KY928475	4	0	4	4	KY928569	4	2	2	4
PE-24	F		HTLV-1	MF178265	16	0	14	KY928476	7	0	7	6	KY928570	8	2	6	6
PE-25	F		HTLV-1	KY928512	19	0	16		0	0	0	0		0	0	0	0
PE-26	F		HTLV-1	MF178266	16	2	14	KY928477	8	2	6	6	KY928571	6	2	4	6
PE-27	M		HTLV-1	MF178267	17	2	14	KY928478	7	1	6	6	KY928572	10	3	7	6
PE-28	F		HTLV-1	MF178268	15	0	14	KY928479	6	0	6	6	KY928573	11	3	8	6
PE-30	F		HTLV-1	MF178269	17	2	14	KY928480	7	1	6	6	KY928574	8	3	5	6

Legenda: ID, Identificação da amostra; ^a, idade em anos; *Promoter*, região promotora do gene LTR; Freq., mutações mais frequentes; SIN, mutações sinônimas; NSIN, mutações não sinônimas; GenBank, número de acesso da sequência depositada no banco internacional do NCBI; Cores dos números de acesso ao GenBank: cor preta referente a primeira amostra, cor azul (segunda coleta) e cor verde (terceira coleta).

Analisando as árvores construídas com as sequências das regiões LTR e *tax* de HTLV-1, notou-se uma distribuição padrão em dois *clusters* (A e B) dentro do Subgrupo Transcontinental A (**Figuras 8 e 9**, respectivamente). A **Figura 10** (árvore da região *env*) confirma que todas as sequências de HTLV-1 do estudo pertencem ao subtipo 1a Cosmopolita.

O *cluster* B da América Latina apresentou nove isolados deste estudo, com a região LTR, em que todos têm a inserção de um C na posição 140 em relação ao ATK (IAL-084, IAL-086, IAL-087, IAL-092, PE-03, PE-04, PE-05, PE-07 e PE-23) também, possuem as substituições de nucleotídeos C387T e T595C. O isolado IAL-060 não tinha sequências de LTR, porém se agrupou no *cluster* B na árvore de *tax* de HTLV-1 (**Figura 9**).

O cálculo das frequências de substituições nucleotídicas nos três segmentos estudados (LTR, *env* e *tax*) considerou o número total de amostras com a caracterização molecular em cada região, ao invés da totalidade de sequências referentes a cada gene. Desde que as sequências obtidas do mesmo paciente e segmento genômico não apresentaram alterações de nucleotídeos quando comparadas, mesmo sendo de diferentes períodos de coleta.

As substituições dos nucleotídeos T501C, A550G e G677A no LTR, foram bem frequentes entre as sequências do *cluster* A 87,1% (SP) e 80,9% (PE), só não estavam presentes em nove isolados fora deste grupo. Ainda neste segmento, uma amostra (IAL-091) apresentou deleção de 10 nucleotídeos entre as posições 159 a 169 da ATK, mesmo assim foi agrupada no *cluster* A.

Encontraram-se mutações específicas nos *Tax Responsive Elements* (TREs) da região 5'LTR, comparando as repetições de 21 pb na ATK. No TRE-1 (AAGGCTCTGACGTCTCCCCC) a substituição de A125G no segundo nucleotídeo estava presente em 43,6% (17/39) das sequências de SP e em 38,5% (10/26) das sequências de PE. Em relação ao TRE-2 (TAGGCCCTGACGTGTCCCCCT), uma substituição no terceiro nucleotídeo (G174A) as mesmas porcentagens foram encontradas nas amostras de SP (43,6%) e PE (38,5%) (**Quadro 3**). Todos os isolados que apresentaram

mutação nos TRE1 e 2 (17 de SP e 10 de PE) tinham ambas as substituições. Quando avaliado o TRE-3 (CAGGCGTTGACGACAACCCCT), nenhuma sequência apresentou mutações nesta região.

Ao analisar as 73 sequências da região *tax* do HTLV-1 quanto à presença de mutações em comparação com o ATK, foram detectadas substituições de nucleotídeos nas posições C7401T e T7914C com uma frequência de 86% (31/36 SP) e 79% (19/24 PE), as 10 sequências que não tinham essas trocas formaram o *cluster* B da América Latina com outros três isolados do Brasil (São Paulo e Londrina). Enquanto duas sequências do mesmo indivíduo (IAL-020, KT351524 e KT351540) se agruparam entre os dois *clusters*, próximas aos isolados do Japão, Alemanha e Romênia. Detectou-se também substituições de nucleotídeos nas posições C7920T, C7982T, G8231A e A8367C com uma frequência de 100% (*cluster* A e B da América Latina), presente em todas as sequências que tinham tamanho em nucleotídeos até estas posições, possibilitando que a informação fosse verificada. Essas substituições juntamente com C7401T e T7914C (ambas presentes em 86% das amostras de SP e 79% de PE) confirmam a presença da assinatura molecular encontrada em isolados do Brasil, que caracteriza o genótipo TaxA. As substituições nas posições C7982T e G8231A resultaram em mutação não sinônima em 100% das sequências, com as trocas de aminoácido A221V e S304N. Outras trocas de nucleotídeos que ocasionaram alterações de aminoácidos foram apresentadas, mesmo quando presentes em apenas um isolado (**Quadro 3**).

As substituições de nucleotídeos mais frequentes na região *env* de HTLV-1 em relação à ATK, foram C5904 e G6270 com 100% das amostras que puderam ser analisadas, T5637G, T5730C e A6120G com 76% a 91%. Houve alteração de sete aminoácidos, sendo a maioria deles mutações pontuais (apenas uma amostra), a troca mais frequente foi de uma Valina por uma Isoleucina (V247I) em 40% dos isolados de SP (15/38) e 36% das sequências de PE (8/22). Nenhuma destas substituições influenciou a formação de *clusters* na árvore da região *env* (**Quadro 3**).

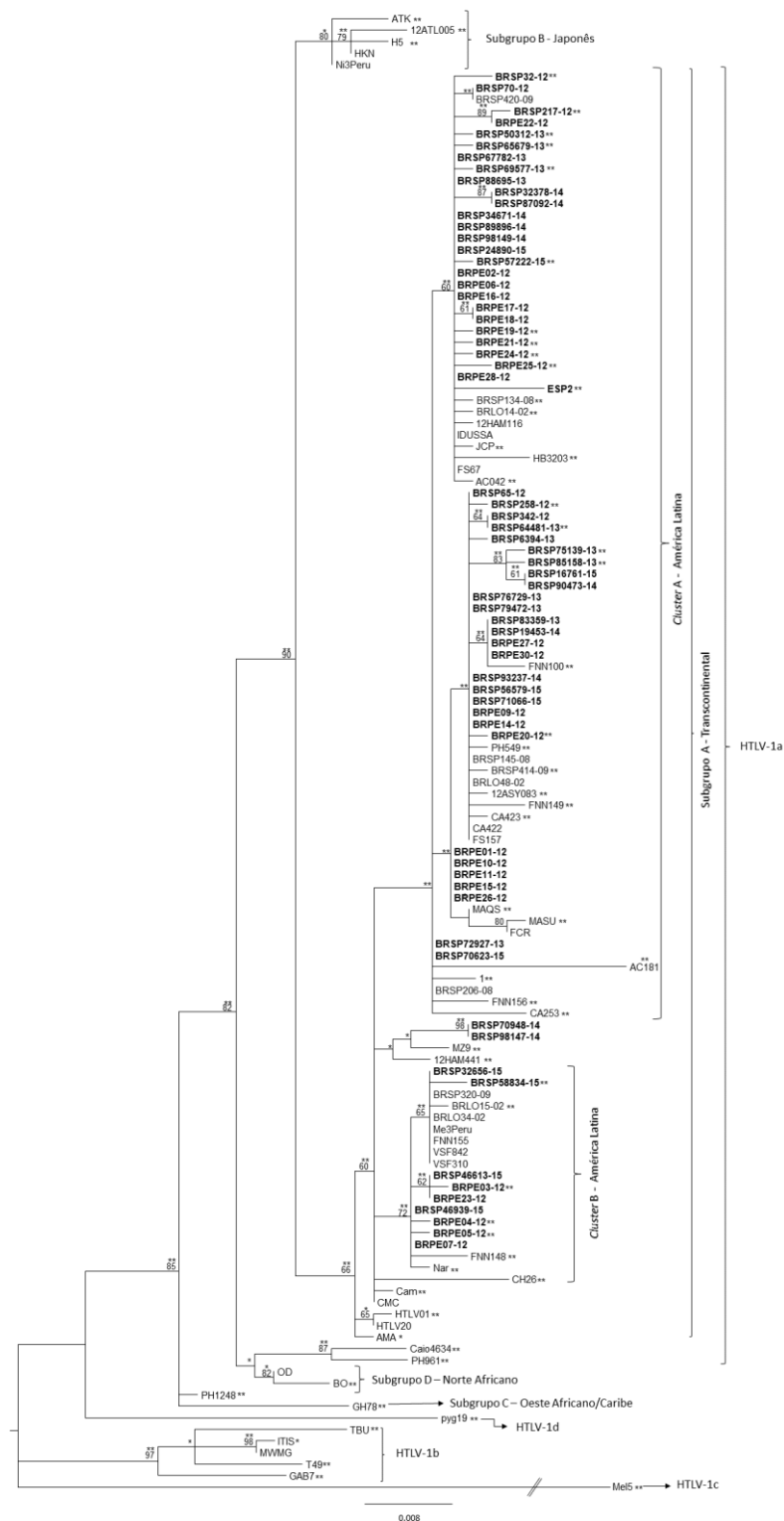


Figura 8. Árvore filogenética *Maximum Likelihood* da região LTR de HTLV-1
Legenda: Composta por 128 isolados (619 pb), incluindo 65 sequências de SP e PE (número GenBank em negrito). Valores de *bootstrap* acima de 60% e *zero length* com $p < 0.001$ (**) e $p \leq 0.05$ (*) estão retratados nos ramos. O isolado Mel5 foi usado como grupo externo.

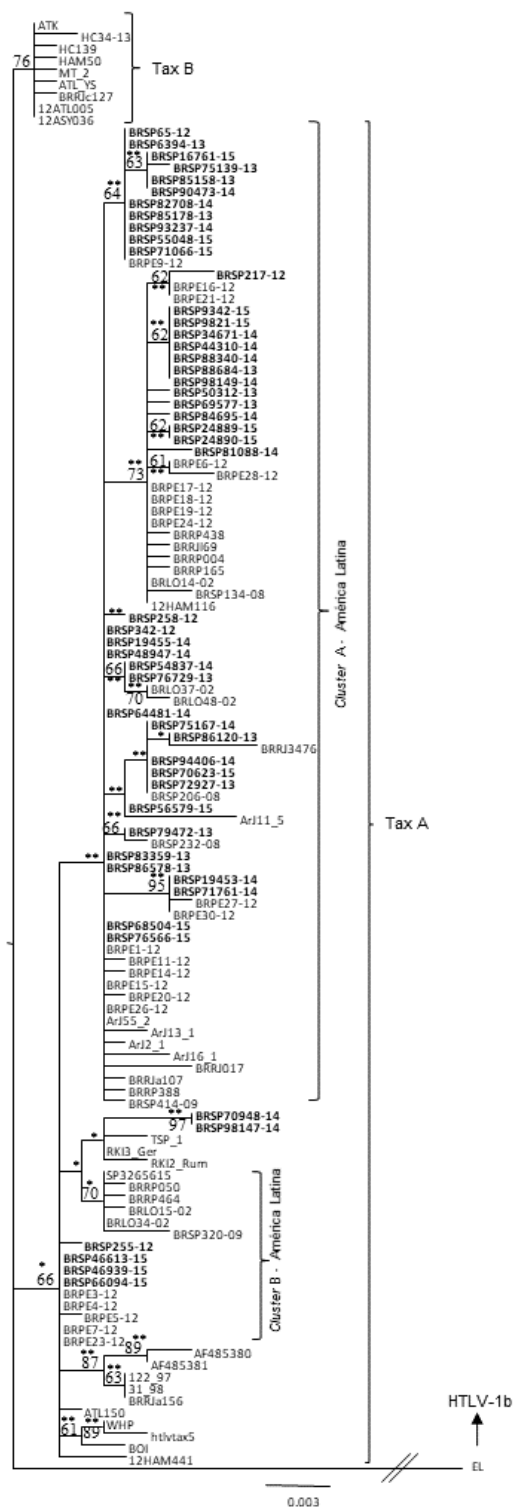


Figura 9. Árvore filogenética *Maximum Likelihood* da região *tax* de HTLV-1
Legenda: Composta por 122 isolados (972 pb), incluindo 74 sequências de SP e PE (número GenBank em negrito). Valores de *bootstrap* acima de 60% e zero *length* com $p < 0.001$ (**) e $p \leq 0.05$ (*) estão retratados nos ramos. O isolado EL foi usado como grupo externo.

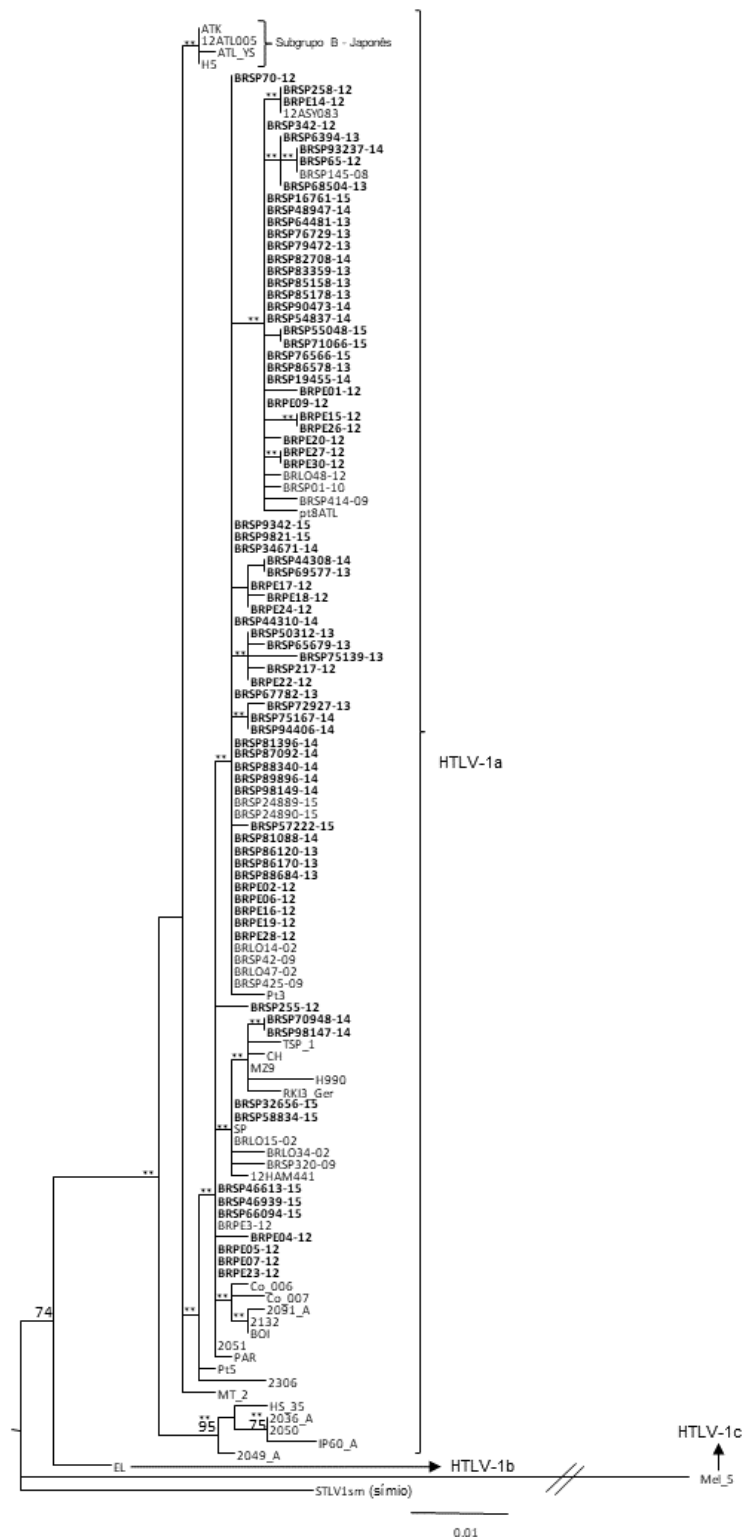


Figura 10. Árvore filogenética *Maximum Likelihood* da região *env* de HTLV-1

Legenda: Composta por 122 isolados (619 pb), incluindo 75 sequências de SP e PE (número GenBank em negrito). Valores de *bootstrap* acima de 60% e zero *length* com $p < 0.001$ (**) e $p \leq 0.05$ (*) estão retratados nos ramos. O isolado Mel5 foi usado como grupo externo.

Quadro 3. Substituições de nucleotídeos, inserções, deleções no LTR, e mutações sinônimas e não sinônimas nos genes *env* e *tax* das sequências de HTLV-1 de SP e PE

Região	LTR																			
Posição	1	1	1	1	1	2	2	3	3	5	5	5	6	6	6	6	7	7	7	7
	2	5	5	6	7	3	6	2	3	0	0	5	0	0	3	7	0	4	5	5
	5	1	9	8	4	1	8	8	8	1	3	0	1	3	4	7	4	3	7	7
ATK	A	-	10nt	G	G	A	T	C	G	T	A	A	C	A	T	G	A	C	-	-
Subst. (nt)	G	A	-	A	A	G	C	G	A	C	G	G	T	G	C	A	G	T	C	C
SP (%)	44	100	2,5	97	44	92	100	92	100	87	100	87	41	100	100	87	36	97	95	95
PE (%)	39	100	-	100	39	100	100	100	100	81	100	81	19	100	100	81	42	100	100	-
Obs.	T			T																
	R	U		R																
	E	3		E																
	1			2																
Região										<i>env</i>										
Posição										5	5	5	5	5	6	6	6	6	6	6
										6	6	7	8	9	9	0	1	1	1	2
										3	6	3	5	0	4	7	2	2	3	6
										7	7	0	8	4	1	1	0	2	3	4
ATK										T	A	T	A	C	G	A	A	G	C	T
Subst. (nt)										G	G	C	G	A	A	T	G	A	T	C
SP (%)										83	61	84	-	100	40	2,6	76	2,6	2,6	2,6
PE (%)										77	64	77	4,5	100	36	-	91	-	-	-
Subst. (aa)													Q	V	H		G	R	V	K
													↓	↓	↓		↓	↓	↓	↓
													R	I	L		E	C	A	R
Região	<i>tax</i>																			
Posição	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	3	4	6	7	9	9	9	9	9	9	9	0	1	2	2	3	3	3	3	3
	6	0	8	6	1	2	5	7	8	8	8	5	3	8	1	3	3	6	6	6
	0	1	4	5	4	0	3	4	2	5	0	1	1	3	3	3	6	6	6	7
ATK	G	C	C	G	T	C	C	C	C	G	A	A	G	T	T	G	G	G	A	A
Subst. (nt)	A	T	T	A	C	T	T	T	T	A	G	G	A	A	C	A	A	A	A	C
SP (%)	3	86	3	-	86	100	22	31	100	3	3	3	100		25	3	3	8	92	
PE (%)	-	79	-	4,2	79	100	4,2	42	100	-	-	-	100	4,6	36	9,1	-	4,6	100	
Subst. (aa)	G		P	G						A	R	T	I	S	F		G	G	R	
	↓		↓	↓						↓	↓	↓	↓	↓	↓		↓	↓	↓	
	R		S	S						V	K	A	M	N	L		E	D	H	

Legenda: Subst., [substituição de nucleotídeos (nt) ou aminoácidos (aa); ATK, protótipo internacional de HTLV-1 (J02029); TRE, *Tax responsive elements*. Posições destacadas em vermelho referem-se a mutações em regiões promotoras do 5'LTR e trocas de aminoácidos nos genes *env* e *tax*. Número de sequências analisadas da região 5'LTR (n=68), *env* (n=75) e *tax* (n=73).

Em relação às análises filogenéticas de HTLV-2, quase todas as sequências das regiões *env* e *tax* foram distribuídas em dois *clusters*, dentro de um clado maior com amostras do subtipo 2a (**Figura 11**). Neste grupo maior foi possível diferenciar os dois *clusters* formados quanto à via de

aquisição da infecção por HTLV-2 e provavelmente HIV também, sendo um deles identificado como de risco sexual e o outro parenteral, sobretudo relacionado ao uso de drogas endovenosas (**Figuras 11 e 12**). A **Figura 13** (árvore LTR) confirma que todas as sequências do estudo pertenciam ao subtipo HTLV-2a.

Na região *env* as substituições de nucleotídeos T5726C, A5794G, T6110C e C6380T foram encontradas em 100% das amostras. Três substituições (T5962, A6332G e G6607A) foram características das amostras de pacientes com exposição parenteral aos retrovírus humanos. A troca de aminoácido mais frequente ocorreu na posição T5726C, gerando alteração de uma Serina por Prolina (S183P) em todas as sequências obtidas no segmento *env*, outras sete mutações não sinônimas foram observadas pontualmente.

A análise de mutações no gene que codifica a proteína Tax mostrou frequência de 100% em sete posições de nucleotídeos (C7612T, T7686C, A7819G, A7991G, A7998G, G8053C e T8203C) em relação ao protótipo internacional Mo, quatro destas alterações levaram a troca de aminoácidos, com destaque para a T8203C, onde no protótipo se encontra um *stop codon*, nas sequências do presente estudo e em outras amostras do Brasil existe uma Glutamina, alterando o tamanho da proteína e caracterizando o genótipo TaxC dos isolados brasileiros, e o subtipo 2a variante c (HTLV-2a/c) (**Quadro 4**).

Quanto às alterações de nucleotídeos encontradas na região 5'LTR de HTLV-2, estas eram bem conservadas entre as sequências de estudo, sendo que 20 delas estava presente em 100% das amostras analisadas, destacando a substituição C401T, identificada como assinatura molecular do subtipo -2c. Também, foram encontradas deleções nas posições referentes aos *motifs* SER e ETS, Poly (A) e troca de nucleotídeos na região U3RU5 (**Quadro 4**). Enquanto as substituições T319C e C320G foram encontradas nas sequências obtidas de pacientes com exposição parenteral.

Comparando as sequências de HTLV-2 com Consensos do subtipo 2c das três regiões estudadas, notou-se, baixíssima variabilidade genética, com

cinco a sete mutações pontuais, sinônimas, presentes em uma ou duas sequências.

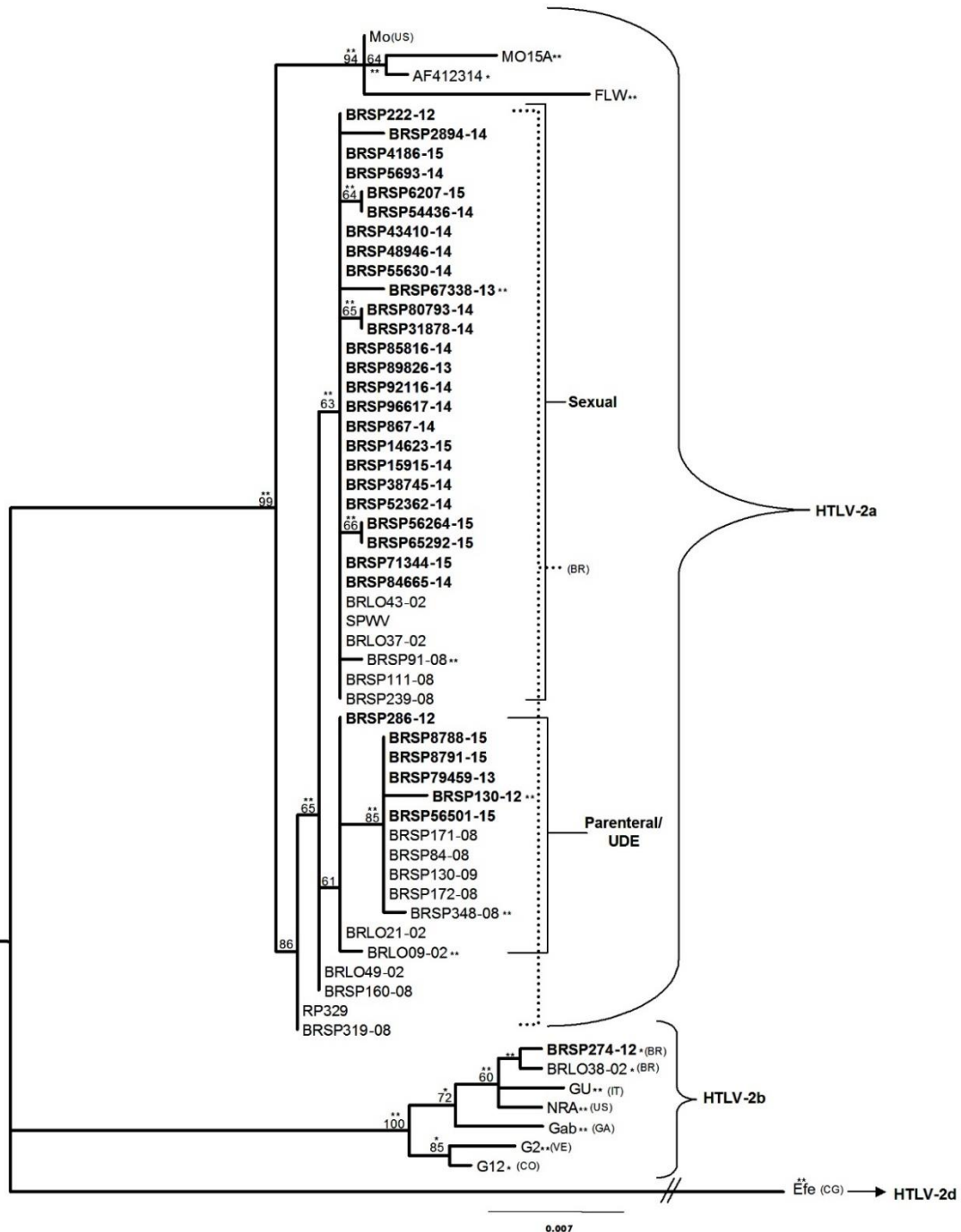


Figura 11. Árvore filogenética *Maximum Likelihood* da região env de HTLV-2

Legenda: Composta de 60 isolados (1.041 pb), incluindo 31 sequências de SP (número GenBank em negrito). Valores de *bootstrap* acima de 60% e zero *length* com $p < 0.001$ (**) e $p \leq 0.05$ (*) estão retratados nos ramos. O isolado Efe foi usado como grupo externo.

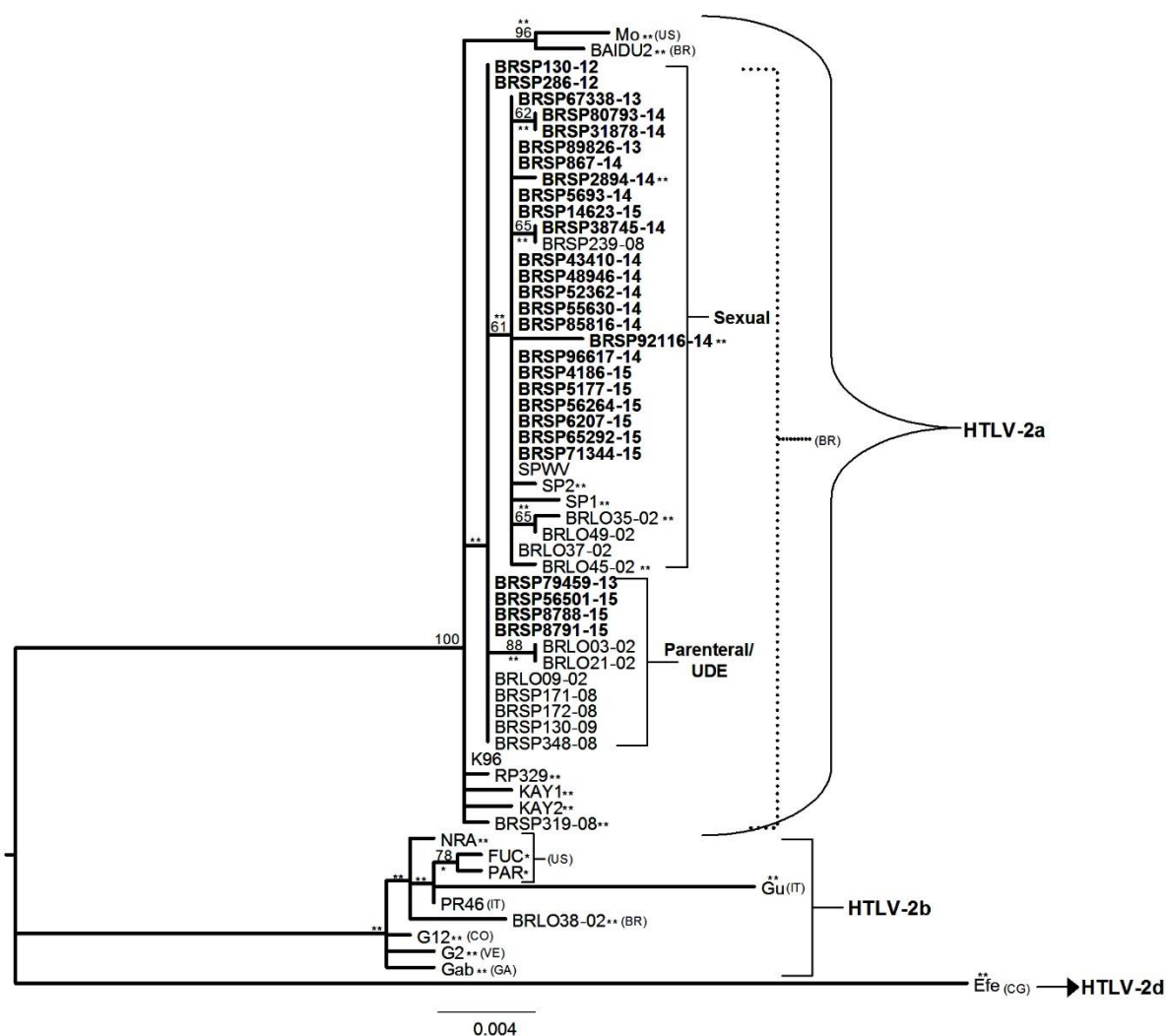


Figura 12. Árvore filogenética *Maximum Likelihood* da região *tax* de HTLV-2

Legenda: Composta por 60 isolados (894 pb), incluindo 28 sequências de SP (número GenBank em negrito). Valores de *bootstrap* acima de 60% e zero *length* com $p < 0.001$ (**) e $p \leq 0.05$ (*) estão retratados nos ramos. O isolado Efe foi usado como grupo externo.

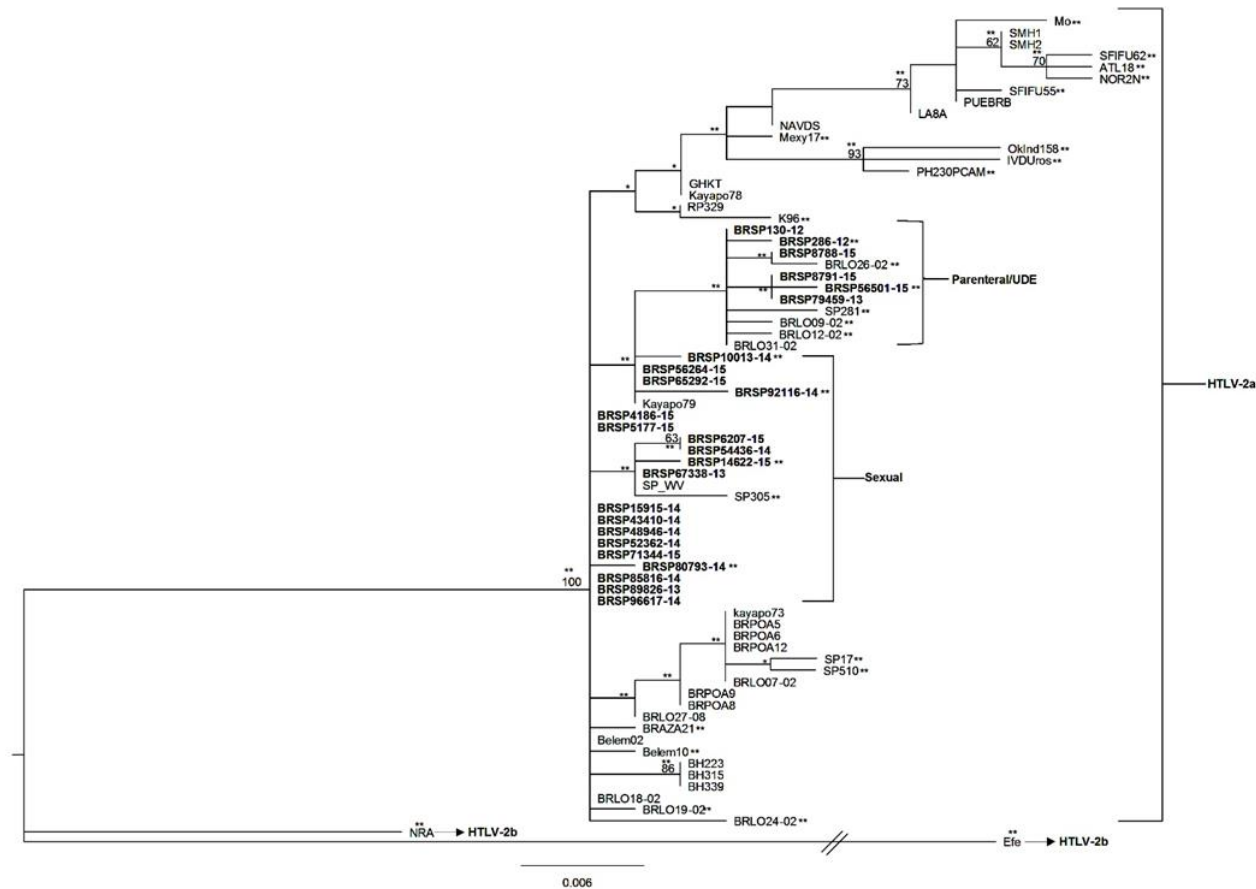


Figura 13. Árvore filogenética *Maximum Likelihood* da região LTR de HTLV-2

Legenda: Composta por 72 isolados (467 pb), incluindo 25 sequências de SP (número GenBank em negrito). Valores de *bootstrap* acima de 60% e *zero length* com $p < 0.001$ (**) e $p \leq 0.05$ (*) estão retratados nos ramos. O isolado Efe foi usado como grupo externo.

Quadro 4. Substituições nucleotídicas, inserções, deleções no LTR, e mutações sinônimas e não sinônimas nos genes *env* e *tax* das sequências de HTLV-2 de SP

Região	LTR																								
Posição	116	117	154	155	161	182	183	214	265	315	316	317	320	401	448	522	603	630	639	640	641	657	666	709	712
Mo	T	T	T	-	-	A	A	G	T	T	G	G	C	C	A	G	T	T	G	-	-	-	-	T	T
Subst. (nt)	-	-	C	C	C	-	-	A	C	G	C	T	G	T	G	A	C	C	T	G	G	T	G	C	C
SP (%)	100	100	100	95	100	100	100	100	100	33	100	100	28	100	100	28	14	100	100	100	100	100	100	100	100
Obs.	S	S				P	P							2											
	E	E				o	o							c											
	R	R				l	l																		
	/	/				y	y					←U3 R →	S					U5 →							
	E	E												i											
SP (%)	T	T				A	A							g											
SP (%)	S	S																							

Região									env																
Posição									5726	5794	5804	5856	5958	5962	6110	6114	6142	6226	6332	6355	6380	6425	6580	6607	6611
Mo									T	A	T	A	C	T	T	T	G	C	A	A	C	G	A	G	T
Subst. (nt)									C	G	C	G	T	C	C	A	A	T	G	G	T	A	G	A	C
Seq. (%)									100	100	4,5	4,5	4,5	22,7	100	4,5	73	100	23	4,5	100	4,5	100	32	4,5
Subst. (aa)									S		F	D	P			I				I		E		S	
									↓		↓	↓	↓			↓				↓		↓		↓	
									P		L	G	L			K				M		K		A	

Região														tax											
Posição														7463	7561	7612	7686	7778	7819	7825	7991	7998	8002	8053	8203
Mo														G	G	C	T	G	A	A	A	A	G	G	T
Subst. (nt)														A	A	T	C	A	G	G	G	G	A	C	C
Seq. (%)														4,7	4,7	100	100	9,5	100	62	100	100	4,7	100	100
Subst. (aa)														R	G			R	T	I	Y		G	E	*
									↓		↓	↓	↓		↓	↓	↓	↓		↓	↓	↓	↓	↓	
									K		R				O	A	V	C		R	O	O			

Legenda: Subst., substituição de nucleotídeos (nt) ou aminoácidos (aa); Mo, protótipo internacional de HTLV-2 (M10060); SER, *Serum Response Element*, ETS, *E-twenty-six transcription factor family*, Poly (A), [domínio responsável por ativar a poliadenilação do RNAm; U3, região única 3' no 5'LTR; R, região de repetição no 5'LTR; U5, região única 5' no 5'LTR; 2c Sig, assinatura das estirpes HTLV-2a/c. Substituições na região promotora e mutações não sinônimas foram destacadas em vermelho. Número de sequências LTR (n=25), *env* (n=31) e *tax* (n=28).

Uma análise mais aprofundada das mutações encontradas mostrou que das 153 substituições de nucleotídeos presentes em 216 sequências resultantes do sequenciamento das três regiões de HTLV-1 (LTR, *env* e *tax*), as mais frequentes eram de: G>A (20,9%; sendo que 50% ocorreu em dinucleotídeos GG); C>T (24,8%); T>C (18,3%) e A>G (18,9%), os demais 17,1% englobou inserções, deleções e trocas menos comuns como as que ocorrem entre purinas e pirimidinas. Esta mesma avaliação nas 84 sequências de HTLV-2 apontou que das 108 mutações, as trocas mais encontradas foram: T>C e A>G igualmente com 20,3%; G>A (17,6%; sendo 54,5% em dinucleotídeos GG); C>T (15,7%) e 26,1% de outras substituições.

Quando avaliadas estas alterações de nucleotídeos de maneira quantitativa, de acordo com os tipos de mutações, sinônimas, não sinônimas ou pontuais em regiões promotora nos LTR, notou-se diferenças estatisticamente significantes entre as amostras de HTLV-1 e HTLV-2, em quase todas as comparações de tipos possíveis de mutações nos três genes, exceto nas medianas de mutações sinônimas da região *tax* (**Figuras 14 e 15**). Há que se ressaltar que não foram detectadas mutações abortivas (*nonsense*) em todos os segmentos *env* e *tax* de HTLV-1 e HTLV-2 analisados.

Finalmente, a pesquisa de partículas provirais defectivas revelou a presença dos dois tipos de provírus defectivo na população de estudo, nas amostras de HTLV-1 e HTLV-2. Mesmo não existindo literatura sobre a existência destas partículas em HTLV-2, considerou-se os mesmos critérios descritos para HTLV-1. O provírus defectivo do tipo 1 foi encontrado em nove indivíduos com HTLV-1 de SP (20,4%), quatro de PE (15,4%) e quatro de HTLV-2 (16%). As amostras de SP também apresentaram a deleção 5'LTR, sendo 5/44 sequências de HTLV-1 e 4/25 HTLV-2 (qui-quadrado, $p=0,0403$). Nenhuma amostra de PE apresentou partículas provirais defectivas do tipo 2 e foi o grupo com mais provírus completo (22/26), seguido dos HTLV-1 de SP (30/44) e por último as 17/25 amostras de HTLV-2 (qui-quadrado, $p=0,0283$) (**Quadro 2, Figura 16**).

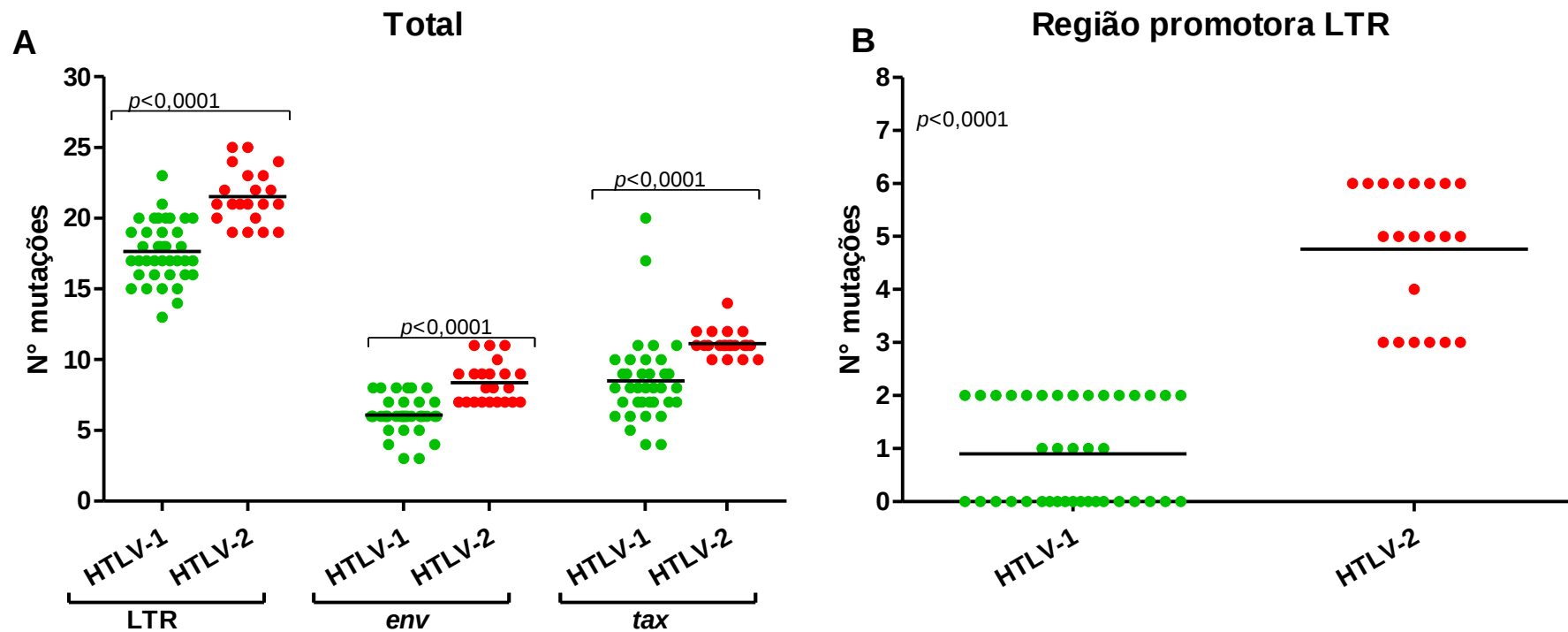


Figura 14. Comparação do número de mutações de HTLV-1 e HTLV-2 totais (A) em cada gene (LTR, *env* e *tax*) e em região promotora do LTR (B)

Legenda: O Mann-Whitney U-test foi usado para análise estatística (dois grupos).

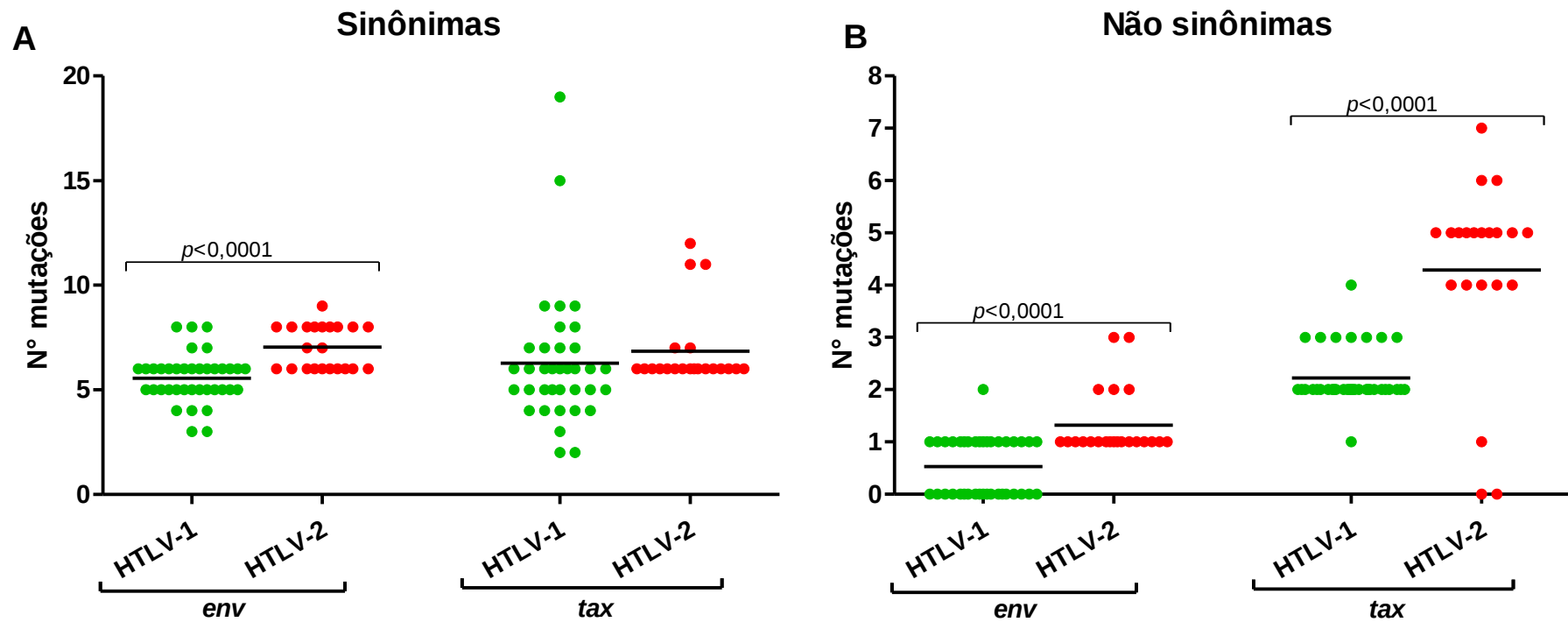


Figura 15. Comparação de mutações sinônimas (A) e não sinônimas (B) nos genes *env* e *tax* de HTLV-1 e HTLV-2

Legenda: O Mann-Whitney U-test foi usado para análise estatística (dois grupos)

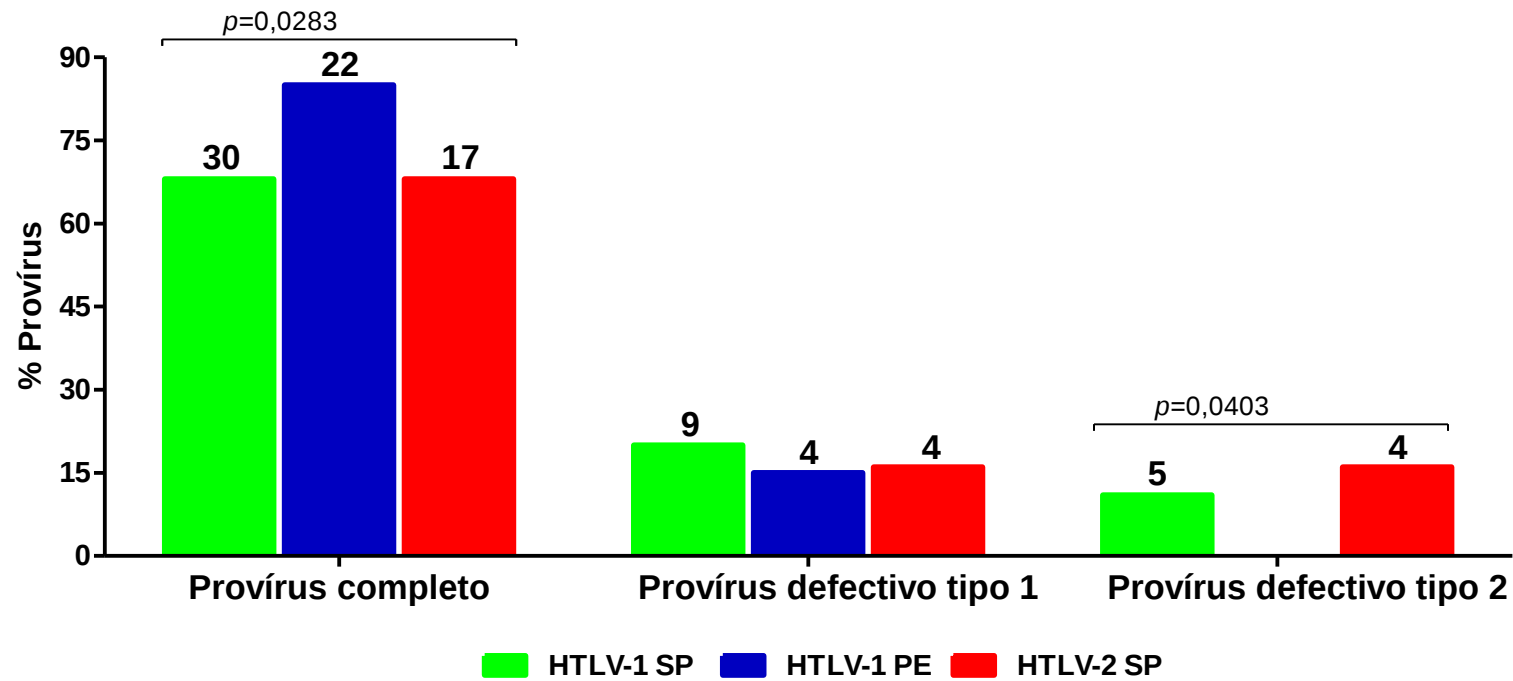


Figura 16. Partículas provirais defeitivas nas amostras de HTLV-1 (SP e PE) e de HTLV-2

Legenda: O teste qui-quadrado foi utilizado para análise estatística.

Os resultados obtidos nesta etapa da pesquisa foram publicados (Campos e Caterino-de-Araujo, 2020).

4.3. LIA na resolução de amostras inconclusivas no WB

As características dos pacientes (sexo e idade) e a distribuição dos resultados inconclusivos no WB em cada grupo de estudo são apresentadas na **Tabela 5**. Os pacientes de G2 (HBV/HCV) eram a maioria homens, com diferenças significativas em relação aos pacientes com HIV (G1) e HTLV (G3) ($p=0,0048$), e tinham a maior média de idade também (49,5 anos). Uma análise comparativa da idade entre os grupos não foi estatisticamente diferente. Em relação à distribuição de amostras inconclusivas no WB, os três grupos continham mais amostras WB-indeterminadas: G1 (77,4%); G2 (87,5%) e G3 (64,0%), do que amostras HTLV não tipadas.

Tabela 5. Características (sexo e idade) e número de indivíduos em cada grupo, cujas amostras de soro resultaram HTLV inconclusivos no WB e estavam disponíveis para análise pelo LIA

		Grupos			P
		G1 (N= 62)	G2 (N= 24)	G3 (N= 25)	
Sexo	Masculino	31 (50,00)	20 (83,30)	10 (40,00)	0,0048 ^b
	Feminino	31 (50,00)	4 (16,70)	15 (60,00)	
Idade - anos média (min - max)		44,06 (18 - 68)	49,50 (35 - 76)	41,08 (16 - 73)	
WB-Indeterminado^a		48	21	16	
WB-HTLV não tipado^a		14	3	9	

Legenda: G1, grupo de pacientes com HIV de São Paulo-SP, Brasil; G2, grupo de pacientes com hepatite B (HBV) e hepatite C (HCV) de São Paulo-SP; G3, grupo de indivíduos do ambulatório de HTLV em Salvador-BA, Brasil; N, número de indivíduos.^aWB-indeterminado e WB-HTLV não tipado de acordo com os critérios do fabricante HTLV Blot 2.4, MP Biomedicals; ^bp estatisticamente significativo pelo teste do qui-quadrado.

O LIA confirmou a infecção por HTLV-1/2 (HTLV-1, HTLV-2 ou HTLV) em 66,1% (G1); 83,3% (G2) e 76,0% (G3) das amostras analisadas. A maioria dos resultados WB-indeterminados no G1 e G2 foram confirmados como HTLV-2 pelo LIA, mas esse não foi o caso em G3. Apenas amostras

positivas para HTLV-1 (40,0%) e HTLV (36,0%) foram detectadas em amostras WB-indeterminadas e HTLV não tipadas de G3 (**Figura 17**).

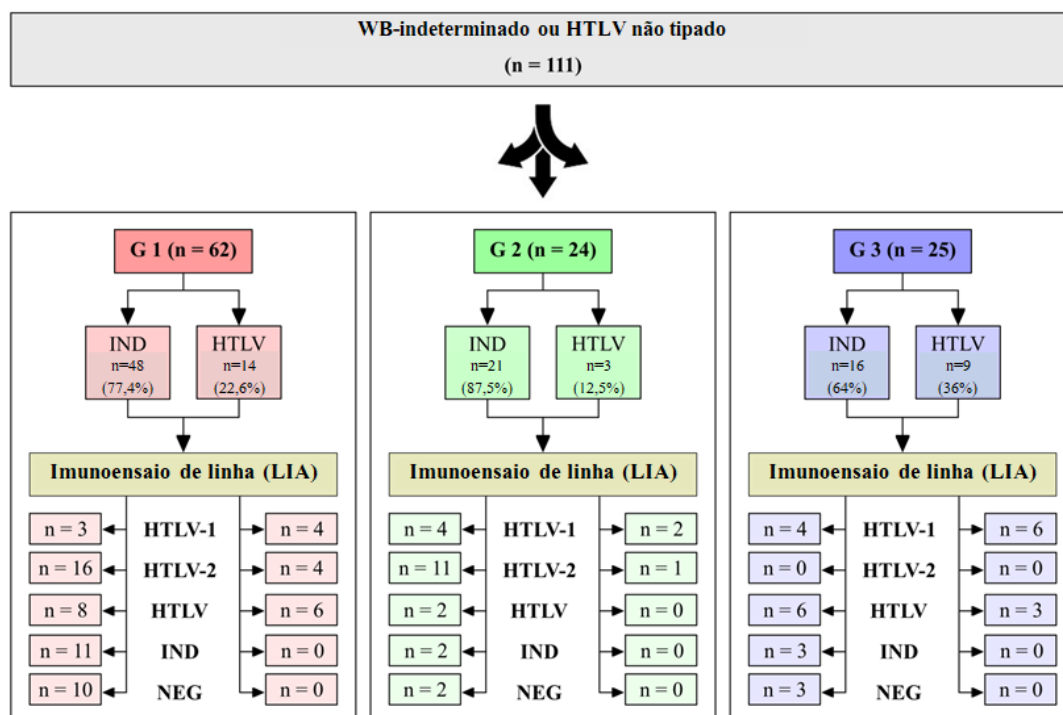


Figura 17. Número de amostras de soro em cada grupo de estudo com resultado WB-indeterminado ou HTLV não tipado em análises anteriores que confirmaram ou excluíram infecções por HTLV pelo LIA

Legenda: WB, Western Blot (HTLV Blot 2.4, MP Biomedicals); LIA, Line Immuno Assay (INNO-LIA HTLV-I/II, Fujirebio).

A **Tabela 6** mostra os perfis de WB-indeterminados detectados no estudo, o número de amostras que apresentaram cada perfil, e a porcentagem de amostras com infecção confirmada por HTLV-1/2. Esses resultados indicam que os padrões de WB que exibiram as bandas de Env (GD21 e /ou rgp46-I ou rgp46-II) mais p19 ou p24 foram confirmados como infecção por HTLV-1/2 pelo LIA. Os padrões gerais das 111 amostras inconclusivas no WB, e seus padrões exibidos pelo LIA são apresentados no **Quadro 5**, revelando que a maioria dos perfis indeterminados de WB que não foram confirmados como infecção por HTLV-1/2 pelo LIA apresentaram apenas bandas de Gag em G1, GD21 em G2 e uma das três bandas (GD21,

rgp46-II, p24) em G3. Vale ressaltar que, entre 26 amostras positivas para o HTLV, mas não tipadas (14 no G1, três no G2 e nove no G3), após análise do LIA, 28,6% confirmaram como HTLV-1, 28,6% como HTLV-2 e 42,8% permanecem HTLV não tipadas no G1. Em G2, 66,7% foram confirmadas como HTLV-1 e 33,3% HTLV-2, e no G3, 66,7% eram HTLV-1 e 33,3% permanecem HTLV não tipadas (**Figura 17 e Quadro 5**).

Tabela 6. Perfis de WB-indeterminados detectados em amostras de soro de cada grupo de estudo; número e porcentagem das amostras de soro que confirmaram infecção por HTLV-1/2 após análise pelo LIA

Perfil WB-Indeterminado ^a	G1 (N= 48)	G2 (N= 21)	G3 (N= 16)	Total	LIA-Positivo ^b N (%)
GD21, p24	10	3	-	13	12 (92,30)
rgp46 only (-I or -II)	-	5	1	6	5 (83,33)
GD21, p19	3	3	3	9	8 (88,89)
p24, rgp46-II	4	3	-	7	7 (100,00)
GD21, rgp46 (-I and/or -II)	7	1	4	12	9 (75,00)
GD21	4	4	6	14	3 (21,43)
p19	5	-	-	5	1 (20,00)
p24	4	1	1	6	1 (16,67)
GD21, p24, rgp46-I	3	-	-	3	1 (33,33)
p19, rgp46-I	1	-	1	2	2 (100,00)
GD21, gp21, rgp46-II	1	-	-	1	1 (100,00)
GD21, p19, p26	1	-	-	1	1 (100,00)
GD21, p24, p32, p36	1	-	-	1	1 (100,00)
p19, p24, rgp46-II	-	1	-	1	1 (100,00)
p24, p36, rgp46-II	1	-	-	1	1 (100,00)
p19, p24	1	-	-	1	-
p19, p26, p28, p53	2	-	-	2	-

Legenda: ^aSegundo os critérios estabelecidos pelo fabricante HTLV Blot 2.4, MP Biomedicals;

^bSegundo os critérios estabelecidos pelo fabricante INNO-LIA HTLV-I/II, Fujirebio.

Quadro 5. Resultados finais e perfis obtidos com ensaios sorológicos confirmatórios para a detecção de anticorpos HTLV-1/2 em 111 amostras de soro que resultaram inconclusivos no WB e foram testadas por LIA

Grupo	Resultado WB ^a	Perfil WB	Resultado LIA ^b	Perfil LIA	Resultado Final
G1	Indeterminado	GD21, p24	HTLV	p19/I/II, p24/I/II, gp21/I/II	HTLV
	HTLV	GD21, p19, p24	HTLV	p19/I/II, p24/I/II, gp21/I/II	HTLV
	HTLV	GD21, p19, p24, p26, p28, p32, p36, p53	HTLV	p19/I/II, gp21/I/II	HTLV
	Indeterminado	p19, p26, p28, p53	Negativo	p19/I/II	Negativo
	Indeterminado	GD21 ^c , p24 ^c	HTLV	p19/I/II, p24/I/II, gp46/I/II, gp21/I/II	HTLV
	Indeterminado	GD21, p24	HTLV	p19/I/II, p24/I/II, gp21/I/II	HTLV
	Indeterminado	p24, rgp46-II	HTLV-2	p19/I/II, p24/I/II, gp46/I/II, gp46-II	HTLV-2
	Indeterminado	GD21	Indeterminado	gp21/I/II	Indeterminado
	Indeterminado	p24	Indeterminado	p19/I/II, p24/I/II	Indeterminado
	Indeterminado	GD21, rgp46-II	HTLV-2	gp46/I/II, gp21/I/II, gp46-II	HTLV-2
	Indeterminado	GD21, p19	HTLV-1	p19/I/II, gp21/I/II, p19-I	HTLV-1
	Indeterminado	p24, p36, rgp46-II	HTLV-2	p19/I/II, p24/I/II, gp46/I/II, gp21/I/II, gp46-II	HTLV-2
	Indeterminado	GD21	Indeterminado	gp21/I/II	Indeterminado
	Indeterminado	p19, p26, p28, p53	Negativo	p19/I/II	Negativo
	Indeterminado	p24 ^c	Indeterminado	gp21/I/II	Indeterminado
	HTLV	GD21 ^c , p19 ^c , p24	HTLV-1	p19/I/II, p24/I/II, gp21/I/II, p19-I	HTLV-1
	Indeterminado	p19	Negativo	p19/I/II, p19-I	Negativo
	Indeterminado	p19, p24	Negativo	p24/I/II	Negativo
	Indeterminado	GD21 ^c , p24 ^c	Indeterminado	gp21/I/II	Indeterminado
	HTLV	GD21, p19, p24	HTLV-2	p19/I/II, p24/I/II, gp46/I/II, gp21/I/II, gp46-II	HTLV-2
	Indeterminado	GD21, gp21, rgp46-II	HTLV-2	p19/I/II, gp46/I/II, gp21/I/II, gp46-II	HTLV-2
	Indeterminado	GD21, p24	HTLV	p19/I/II, p24/I/II, gp46/I/II, gp21/I/II	HTLV

Continuação **Quadro 5.**

	Resultado WB^a	Perfil WB	Resultado LIA^b	Perfil LIA	Resultado Final
	Indeterminado	GD21, rgp46-II, rgp46-I	Negativo	no bands	Negativo
	Indeterminado	GD21, p24 ^c , rgp46-I	HTLV-1	p19I/II, gp46I/II, gp21I/II, gp46-I	HTLV-1
	Indeterminado	GD21 ^c	Negativo	p19I/II	Negativo
	HTLV	GD21, p19, p24, p26, p28, p32	HTLV	p19I/II, p24I/II, gp21I/II	HTLV
	HTLV	GD21, p19, p24	HTLV	p19I/II, gp21I/II	HTLV
	Indeterminado	p19 ^c , rgp46-I	HTLV-1	p19I/II, p24I/II, gp46I/II, gp21I/II, gp46-I	HTLV-1
	Indeterminado	p24 ^c , rgp46-II	HTLV-2	gp46I/II, gp21I/II, gp46-II	HTLV-2
	HTLV	GD21, p19, p24, p26, p32, p36, p53	HTLV	p19I/II, p24I/II, gp46I/II, gp21I/II	HTLV
	HTLV	GD21, p19, p24	HTLV-2	p19I/II, p24I/II, gp46I/II, gp21I/II, gp46-II	HTLV-2
	Indeterminado	GD21, p24	HTLV-2	gp46I/II, gp21I/II, gp46-II	HTLV-2
	Indeterminado	GD21, p19	HTLV	p19I/II, gp46I/II, gp21I/II	HTLV
	HTLV	GD21, p19, p24	HTLV	p19I/II, p24I/II, gp21I/II	HTLV
	HTLV	GD21, p19, p24	HTLV-2	p19I/II, p24I/II, gp46I/II, gp21I/II, gp46-II	HTLV-2
	Indeterminado	GD21 ^c , p24	HTLV-2	gp46I/II, gp21I/II, gp46-II	HTLV-2
	Indeterminado	GD21, p24, p32, p36	HTLV-2	p19I/II, p24I/II, gp46I/II, gp21I/II, gp46-II	HTLV-2
	Indeterminado	p24 ^c , rgp46-II	HTLV-2	gp46I/II, gp21I/II, gp46-II	HTLV-2
	Indeterminado	p24, rgp46-II	HTLV-2	gp46I/II, gp21I/II, gp46-II	HTLV-2
	Indeterminado	GD21, p24	HTLV	p19I/II, p24I/II, gp21I/II	HTLV
	Indeterminado	p24 ^c	Negativo	no bands	Negativo
	Indeterminado	GD21	Indeterminado	gp21I/II	Indeterminado
	Indeterminado	GD21, rgp46-II	HTLV-2	gp46I/II, gp21I/II, gp46II	HTLV-2
	Indeterminado	p19	Negativo	p19I/II	Negativo
	Indeterminado	GD21, p24 ^c , rgp46-I ^c	Indeterminado	gp21I/II	Indeterminado
	Indeterminado	GD21, p19, p26	HTLV	p19I/II, gp46I/II, gp21I/II	HTLV
	Indeterminado	GD21, rgp46-II	Indeterminado	gp21I/II	Indeterminado
	Indeterminado	GD21, p24 ^c , rgp46-I ^c	Indeterminado	gp21I/II	Indeterminado
	Indeterminado	GD21, rgp46-I	Indeterminado	gp21I/II	Indeterminado

Continuação **Quadro 5.**

	Resultado WB^a	Perfil WB	Resultado LIA^b	Perfil LIA	Resultado Final
G2	HTLV	GD21, p19, p24	HTLV-2	p19I/II, p24I/II, gp21I/II, gp46-II	HTLV-2
	Indeterminado	GD21, rgp46-II, rgp46-I ^c	HTLV-2	gp46 I/II, gp21I/II, gp46-II	HTLV-2
	Indeterminado	GD21, p24	HTLV-2	p19I/II, p24I/II, gp46I/II, gp21I/II, gp46-II	HTLV-2
	Indeterminado	p24	Indeterminado	p19I/II, p24I/II	Indeterminado
	Indeterminado	p19	Negativo	p19I/II	Negativo
	Indeterminado	p19 ^c	HTLV	p19 I/II, gp21 I/II	HTLV
	Indeterminado	GD21, rgp46-II	HTLV-2	gp46 I/II, gp21I/II, gp46-II	HTLV-2
	Indeterminado	GD21, p19	HTLV-2	p19 I/II, gp46 I/II, gp21 I/II, gp46-II	HTLV-2
	HTLV	GD21, p19, p24, p26, p32, p36	HTLV-1	p19 I/II, p24 I/II, gp46 I/II, gp21 I/II, p19-I, gp46-I	HTLV-1
	Indeterminado	GD21, p24	HTLV-2	p19 I/II, gp46 I/II, gp21 I/II, gp46-II	HTLV-2
	HTLV	GD21, p19, p24	HTLV-1	p19 I/II, p24 I/II, gp21 I/II, p19-I	HTLV-1
	Indeterminado	p19	Negativo	p19 I/II	Negativo
	HTLV	GD21, p19, p24	HTLV-1	p19 I/II, p24 I/II, gp21 I/II, p19-I	HTLV-1
	Indeterminado	rgp46-I	HTLV-1	p24I/II, gp46 I/II, gp21 I/II, gp46-I	HTLV-1
	Indeterminado	p24, rgp46-II	HTLV-2	p24I/II, gp46 I/II, gp21 I/II, gp46-I ^c , gp46-II	HTLV-2
	HTLV	GD21, p19, p24, p26 ^c , p28 ^c , p32 ^c , p36 ^c	HTLV-1	p19 I/II, p24I/II, gp46 I/II, gp21 I/II, p19-I, gp46-I	HTLV-1
	Indeterminado	GD21 ^c	Negativo	no bands	Negativo
	Indeterminado	rgp46-I ^c	HTLV-1	gp46 I/II, gp21 I/II, gp46-I	HTLV-1
	Indeterminado	GD21 ^c , rgp46-I	HTLV-1	gp46 I/II, gp21 I/II, gp46-I	HTLV-1
	Indeterminado	GD21, p19 ^c	Indeterminado	gp21I/II	Indeterminado
	Indeterminado	p24, rgp46-II	HTLV-2	gp46 I/II, gp21 I/II, gp46-II	HTLV-2
	Indeterminado	rgp46-II	HTLV-2	p19-I/II, gp46 I/II, gp21 I/II, gp46-II	HTLV-2
	Indeterminado	GD21 ^c	HTLV	p19-I/II, gp21 I/II	HTLV
	HTLV	GD21, p19, p24	HTLV-1	p19 I/II, p24I/II, gp46 I/II, gp21 I/II, gp46-I	HTLV-1
	Indeterminado	GD21	Negativo	no bands	Negativo
	Indeterminado	GD21, p19	HTLV	p19 I/II, p24I/II, gp21 I/II	HTLV
	Indeterminado	p24, rgp46-II	HTLV-2	p19 I/II, p24I/II, gp46 I/II, gp21 I/II, gp46-II	HTLV-2

Continuação **Quadro 5.**

	Resultado WB^a	Perfil WB	Resultado LIA^b	Perfil LIA	Grupo
G3	Indeterminado	GD21 ^c	Indeterminado	gp21 I/II	Indeterminado
	Indeterminado	p24	HTLV-2	gp46 I/II, gp21 I/II, gp46II ^c	HTLV-2
	Indeterminado	GD21, p24	HTLV-2	p19 I/II, gp46 I/II, gp21 I/II, gp46-II	HTLV-2
	Indeterminado	p19, p24, rgp46-II	HTLV-2	p19 I/II, p24I/II, gp46 I/II, gp21 I/II, gp46-II	HTLV-2
	Indeterminado	GD21, p24	HTLV-2	p19 I/II, p24I/II, gp46 I/II, gp21 I/II, gp46-II	HTLV-2
	Indeterminado	rgp46-II	HTLV-2	p19 I/II, gp46 I/II, gp21 I/II, gp46-II	HTLV-2
	Indeterminado	rgp46-II	HTLV-2	p24I/II, gp46 I/II, gp21 I/II, gp46-II	HTLV-2
	Indeterminado	GD21, p24	HTLV-2	p19 I/II, p24I/II, gp46 I/II, gp21 I/II, gp46-II	HTLV-2
	Indeterminado	GD21 ^c , p19 ^c	HTLV-1	p19 I/II, p24I/II, gp46 I/II, gp21 I/II, p19-I ^c , gp46-I	HTLV-1
	HTLV	GD21 ^c , p19 ^c , p24	HTLV-2	p19 I/II, p24I/II, gp46 I/II, gp21 I/II, gp46-II ^c	HTLV-2
	HTLV	GD21, p19, p24, p26 ^c , p28 ^c , p36 ^c	HTLV-1	p19I/II, p24I/II, gp46I/II, gp21I/II, p19-I, gp46-I	HTLV-1
	HTLV	GD21, p19, p24, p26 ^c , p28 ^c , p32 ^c , p36 ^c , gp46 ^c	HTLV-1	p19I/II, p24I/II, gp46I/II, gp21I/II, gp46-I	HTLV-1
	HTLV	GD21 ^c , p19, p24 ^c	HTLV	p19I/II, p24I/II, gp46I/II, gp21I/II	HTLV
	HTLV	GD21, p19, p24, p26c, p28c, p36, gp46	HTLV	p19I/II, p24I/II, gp46I/II, gp21I/II	HTLV
	HTLV	GD21, p19, p24, p26, p28, p32, p36, gp46, p53	HTLV-1	p19I/II, p24I/II, gp46I/II, gp21I/II, p19-I	HTLV-1
	HTLV	GD21, p19, p24, p26, p28, p32, p36	HTLV-1	p19I/II, p24I/II, gp46I/II, gp21I/II, p19-I	HTLV-1
	Indeterminado	GD21 ^c , p19 ^c	HTLV	p19I/II, gp46I/II, gp21I/II	HTLV
	HTLV	GD21, p19, p24 ^c	HTLV-1	p19I/II, p24I/II, gp46I/II, gp21I/II, p19-I	HTLV-1
	Indeterminado	GD21, rgp46-II	HTLV	p19I/II, gp21I/II	HTLV
	HTLV	GD21, p19, p24 ^c , p26, p28, p32, p36	HTLV-1	p19I/II, p24I/II, gp46I/II, gp21I/II, p19-I, gp46-I	HTLV-1
	Indeterminado	GD21, rgp46-I	HTLV-1	p19I/II, gp46I/II, gp21I/II, gp46-I	HTLV-1
	Indeterminado	GD21, p19	HTLV	p19I/II, gp21I/II	HTLV
	Indeterminado	GD21 ^c	Indeterminado	gp21I/II	Indeterminado
	Indeterminado	GD21	Indeterminado	gp21I/II	Indeterminado
	Indeterminado	GD21	HTLV-1	gp46I/II, gp21I/II, gp46-I	HTLV-1

Continuação **Quadro 5.**

Resultado WB ^a		Perfil WB	Resultado LIA ^b		Perfil LIA	Grupo
Indeterminado	GD21		Negativo	no bands		Negativo
Indeterminado	p24 ^c		Negativo	no bands		Negativo
Indeterminado	rgp46-II ^c		Negativo	no bands		Negativo
Indeterminado	GD21, rgp46-I		HTLV-1	p19/II, gp46/II, gp21/II, gp46-I		HTLV-1
HTLV	GD21, p19, p24		HTLV	p19/II, gp21/II		HTLV
Indeterminado	GD21		HTLV	p19/II, gp21/II		HTLV
Indeterminado	GD21, rgp46-II ^c		HTLV	p19/II, gp21/II		HTLV
Indeterminado	GD21		Indeterminado	gp21/II		Indeterminado
Indeterminado	GD21, p19		HTLV	p19/II, gp46/II, gp21/II		HTLV
Indeterminado	p19, rgp46-I		HTLV-1	p19/II, gp46/II, gp21/II, gp46-I		HTLV-1

Legenda: ^aWB, Western Blot (HTLV Blot 2.4, MP Biomedicals); ^bLIA, *Line Immuno Assay* (INNO-LIA HTLV-I/II, Fujirebio); ^cbanda fraca.

Os resultados obtidos nesta etapa da pesquisa foram publicados (Campos et al., 2020b).

4.4. Estratégias de expansão e melhoria do diagnóstico de HTLV-1 e HTLV-2

A estratégia avaliada para expansão do diagnóstico das infecções por HTLV-1 e HTLV-2 foi a de utilização de *pool* de soros no momento da triagem sorológica. Esta otimização ocorreu pela adaptação da etapa de diluição e aplicação das amostras no ensaio imunoenzimático (EIA) usando o conjunto de reagentes comerciais Murex (Murex HTLV I+II, DiaSorin, UK).

O processo que resultou na quantidade ótima de cinco amostras de soro para compor o *pool*, sem perda de reatividade, mesmo em amostras com relação densidade óptica pelo *cutoff* (DO/CO) baixas, envolveu vários testes e etapas, desde a padronização e verificação de viabilidade do uso desta metodologia até a validação e aplicação diagnóstica. Os procedimentos realizados seguiram os critérios requeridos pelo documento de validação de técnicas para diagnóstico laboratorial do Instituto Adolfo Lutz (P-SG-022, documento interno com reprodução proibida). Importante ressaltar, que durante todo o processo, preocupou-se com as possíveis interações de outras infecções virais, principalmente com os vírus que compartilham as mesmas vias de transmissão (HIV, HBV e HCV). Desta forma, na fase de validação, 40 *pool* de soros foram testados durante cinco dias consecutivos, e os valores de DO/CO obtidos foram comparados aos valores das amostras correspondentes, testadas individualmente (**Figura 18**). Mesmo com um *pool* resultando na zona cinza do EIA (HTLV-1 com DO/CO baixa), no quinto dia de testagem, confirmou-se a acurácia e precisão do método, uma vez que amostras *borderline* seguem para as etapas de conclusão do diagnóstico, abertura do *pool* de soros e ensaios confirmatórios (Silva et al., 2020).

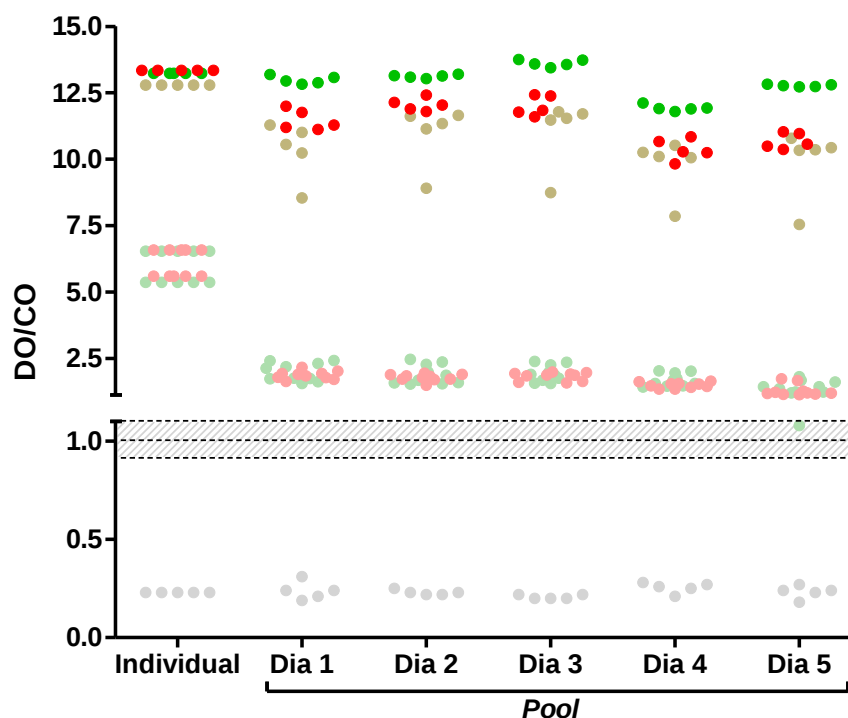


Figura 18. Acurácia da estratégia de *pool* de soros

Legenda: Comparação dos valores de densidade óptica pelo *cut off* (DO/CO) obtidos em 40 *pool* e seus respectivos soros testados individualmente no EIA Murex. Pontos verde-claro representam os *pool* contendo amostras de HTLV-1 com DO/CO baixa; pontos verde-escuro, os *pool* contendo amostras de HTLV-1 com DO/CO alta; pontos vermelho-claro representam os *pool* contendo amostras de HTLV-2 com DO/CO baixa; pontos vermelho-escuro, os *pool* contendo amostras de HTLV-2 com DO/CO alta; pontos marron-claro, indicam os *pool* com a amostra HTLV não tipado; pontos cinza, os *pool* de soros contendo amostras negativas para anticorpos HTLV.

A aplicação diagnóstica da estratégia de *pool* com soros de indivíduos com as infecções por HBV, HCV e HIV confirmou a sensibilidade e especificidade da técnica, apresentando um índice de concordância perfeita (Kappa Cohen's=1,00) quando comparada à testagem individual. Também, mostrou redução dos custos com a etapa de triagem diagnóstica, sendo variável de acordo com a prevalência de infecção por HTLV-1/2 da população avaliada.

Considerando o valor de R\$ 6,00 um teste EIA, resumidamente, as amostras de indivíduos com HBV (n=1.300 soros) foram testadas em 260 *pool*, em que 25 foram reativos no EIA, precisando ser abertos, o que

totalizou 385 testes realizados com esta metodologia e uma redução de custo de 70,4%. Entre os soros HCV, comparou-se 700 testes individuais e 275 testes (140 *pool* somado a 27 *pool* abertos) com a nova estratégia, diminuindo em 60,7% os custos. A economia foi maior (73,6%) quando analisadas as 625 amostras da população HIV individuais e 125 usando *pool*, somados aos oito *pool* abertos (totalizando 165 testes). Estes resultados foram publicados recentemente em Silva et al. (2020).

Em relação à pesquisa de interferentes virais que podem influenciar o desempenho dos testes empregados nas etapas de diagnóstico das infecções por HTLV-1 e HTLV-2, recuperou-se do banco de dados para comparação, os resultados obtidos nos ensaios de triagem e confirmatórios das 69 amostras de SP com a coinfeção por HIV (44 HIV/HTLV-1 e 25 HIV/HTLV-2), que foram caracterizadas por sequenciamento genético.

A **Figura 19** mostra os resultados da triagem sorológica utilizando dois EIA diferentes (Murex HTLV I+II, DiaSorin e GoldELISA, REM Ind. e Com. Ltda), considerando a positividade nos testes confirmatórios moleculares (qPCR – *pol* e/ou *nPCR-RFLP* – *tax*). Apenas o EIA Murex apresentou diferenças estatisticamente significantes entre os níveis de anticorpos específicos para HTLV-1/2, principalmente nas amostras HTLV-2 ($p=0,0287$).

Quando avaliado os níveis de anticorpos detectados pelos dois EIA segundo a positividade ou não do sequenciamento dos genes LTR, *env* e *tax*, apenas o REM exibiu diferenças estatisticamente significativas entre as médias de DO/CO do gene *env* ($p=0,0169$) (**Figura 20**).

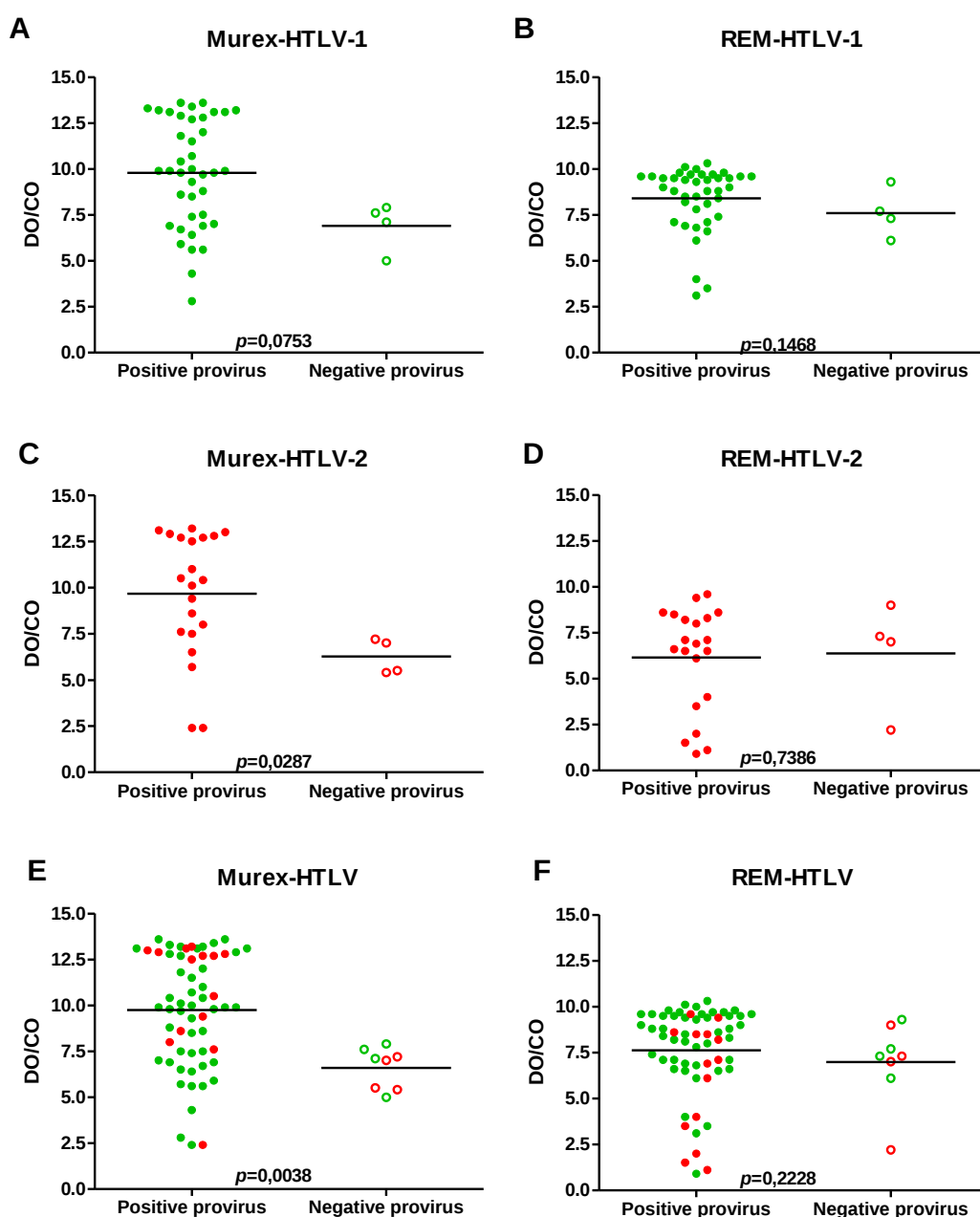


Figura 19. Resultado da triagem sorológica de 69 amostras HIV/HTLV-1/2 de acordo com a detecção de segmento proviral na qPCR (*pol*) e nPCR-RFLP (*tax*), usando U-test Mann-Whitney para avaliar as associações estatísticas

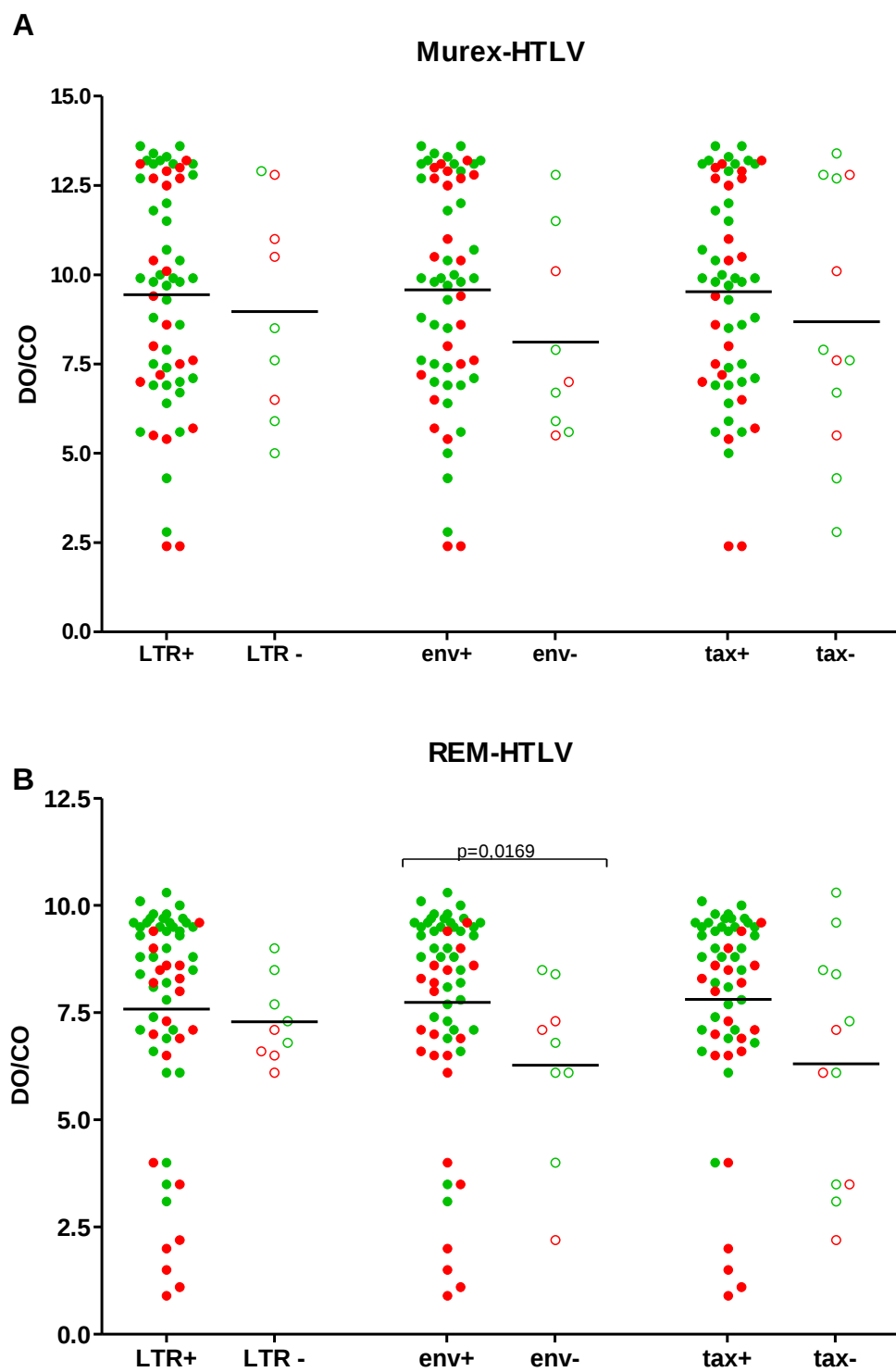


Figura 20. Médias de DO/CO detectados na triagem de 69 amostras com a coinfeção HIV/HTLV-1/2, segundo o sequenciamento dos genes LTR, *env* e *tax*, utilizando o teste estatístico U-test Mann-Whitney

Já a comparação do impacto das mutações encontradas nestas amostras, nos resultados dos ensaios utilizados para confirmar o diagnóstico das infecções por HTLV-1/2, é apresentado na **Tabela 7**. As amostras foram separadas de acordo com os resultados HTLV-1, HTLV-2 ou Inconclusivos (HTLV não tipado, soroindeterminado e negativo para os testes moleculares) obtidos em cada um dos testes sorológicos (WB e LIA) e moleculares (qPCR e *n*PCR-RFLP) confirmatórios. Houve diferenças estatisticamente significativas em quase todas as comparações, com destaque para as medianas de mutações exibidas em amostras HTLV-2.

Observou-se também que do total de 58 mutações de sete amostras HTLV-1 que apresentaram WB inconclusivo, as substituições de nucleotídeos foi bem equilibrada, entre as trocas mais comuns, ficaram empatados em 22,4% cada, as alterações C>T, T>C e G>A (sendo que 53,8% das trocas de guanina por adenosina foram em dinucleotídeos GG), e A>G com 15,5%. Já nas oito amostras HTLV-2 com resultado WB indeterminado, no total de 57 mutações, as substituições mais encontradas foram: T>C (24,5%); A>G (19,3%); G>A (10,5%, em que 50% ocorreram em dinucleotídeos GG) e C>T (7,0%). Quando analisado as mutações de maior prevalência de acordo com os resultados inconclusivos no LIA ou negativo nas PCR, não houve diferença expressiva de alterações de nucleotídeos ao compará-las às amostras que confirmaram a infecção por HTLV-1 ou HTLV-2 no mesmo teste.

Buscando relacionar a presença de partículas provirais defectivas com falhas nos ensaios confirmatórios, notou-se que as amostras com os provírus defectivos do tipo 1 apresentaram mais resultados inconclusivos que o tipo 2, tanto em amostras HTLV-1 quanto HTLV-2. Dos 14 provírus defectivos de HTLV-1, nove eram do tipo 1 e cinco do tipo 2, e apresentaram respectivamente: 33,3% e 20% de WB indeterminados; 22,2% e 0% de LIA inconclusivos; 44,4% e 40% de qPCR negativa; e 33,3% e 60% de *n*PCR-RFLP negativa. Analisando as oito partículas defectivas de HTLV-2, 50% de cada tipo, resultaram 50% e 25% WB inconclusivos; 75% e 25% qPCR negativa; e 75% e 0% *n*PCR-RFLP, para o tipo 1 e tipo 2 respectivamente.

Tabela 7. Medianas das mutações totais, pontuais em região promotora, sinônimas e não sinônimas encontradas de acordo com o resultado nos testes confirmatórios sorológicos e moleculares de 69 amostras de SP

	Mutações	Gene	WB ^a			<i>p</i> ^e	LIA ^b			<i>p</i> ^e
			HTLV-1	HTLV-2	INC		HTLV-1	HTLV-2	INC	
Mediana (Min-Máx)	Total	LTR	18 (13-23)	19,5 (19-25)	21(16-25)	<0,0001	17,5 (13-23)	21 (19-25)	18 (16-20)	<0,0001
		<i>env</i>	6 (3-8)	8,5 (7-11)	7 (3-10)	<0,0001	6 (3-8)	8 (7-11)	6 (6-8)	<0,0001
		<i>tax</i>	8 (4-17)	11 (10-14)	7 (5-20)	<0,0001	8 (4-17)	11 (10-14)	10,5 (6-20)	<0,0001
	Região promotora	LTR	0 (0-2)	5 (3-6)	3 (0-6)	<0,0001	1 (0-2)	5 (3-6)	1 (0-3)	<0,0001
	Sinônimas	<i>env</i>	6 (3-8)	7,5 (6-9)	6 (3-8)	0,0007	6 (3-8)	7 (6-9)	6 (5-8)	<0,0001
		<i>tax</i>	6 (2-15)	6 (6-11)	6 (3-19)	-	6 (2-15)	6 (6-12)	6 (4-19)	-
	Não sinônimas	<i>env</i>	0,5 (0-1)	1 (1-3)	1 (0-2)	0,0031	0,5 (0-2)	1 (1-3)	1 (0-1)	<0,0001
		<i>tax</i>	2 (2-3)	5 (0-7)	4 (0-6)	0,0002	2 (2-3)	5 (0-7)	3 (1-5)	<0,0001
	Mutações	Gene	qPCR ^c			<i>p</i> ^e	nPCR-RFLP ^d			<i>p</i> ^e
			HTLV-1	HTLV-2	INC		HTLV-1	HTLV-2	INC	
Mediana (Min-Máx)	Total	LTR	18 (13-21)	21 (19-25)	19 (15-25)	<0,0001	18 (14-23)	22 (19-25)	19 (15-22)	<0,0001
		<i>env</i>	6 (3-8)	8 (7-11)	6 (5-11)	<0,0001	6 (3-8)	8,5 (7-11)	7,5 (6-11)	<0,0001
		<i>tax</i>	8 (4-17)	11 (10-14)	11 (8-20)	<0,0001	6 (4-20)	11 (10-14)	11 (10-12)	<0,0001
	Região promotora	LTR	1 (0-2)	5 (3-6)	2 (0-6)	<0,0001	1 (0-3)	5 (3-6)	3 (0-6)	<0,0001
	Sinônimas	<i>env</i>	5,5 (3-8)	7 (6-8)	6 (5-9)	0,0002	5 (3-8)	7,5 (6-9)	6 (6-8)	<0,0001
		<i>tax</i>	5,5 (2-15)	6 (6-11)	6 (5-19)	0,023	5,5 (2-19)	6 (6-11)	7 (6-12)	0,0117
	Não sinônimas	<i>env</i>	1 (0-2)	1 (1-3)	1 (0-3)	0,0139	1 (0-2)	1(1-3)	0,5 (0-3)	0,0031
		<i>tax</i>	2 (2-4)	5 (1-7)	3 (0-3)	<0,0001	2 (1-4)	5 (0-7)	3 (0-5)	<0,0001

Legenda: Min, mínimo; Máx, máximo; ^aWB, Western blot (HTLV Blot 2.4; MP Biomedicals); ^bLIA, imunoensaio de linha (INNO-LIA HTLV-I/II; Fujirebio); ^cqPCR (PCR em tempo real, metodologia *in house* de detecção do gene *pol* de HTLV-1 e HTLV-2); ^dnPCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, metodologia *in house* para a amplificação do gene *tax* de HTLV-1 e HTLV-2); ^e*p*, *p*-value do teste estatístico de Kruskal Wallis complementado pelo pós-teste Dunn's.

Diante dos resultados acima expostos e, considerando o melhor desempenho do LIA como teste confirmatório e a exequibilidade da triagem utilizando *pool* de cinco soros no EIA Murex, sugere-se que o algoritmo de testes laboratoriais empregue ambas as metodologias para o diagnóstico das infecções por HTLV-1 e HTLV-2 (**Figura 21**). Ainda, quando possível, aplicar um ensaio molecular nos casos inconclusivos no LIA.

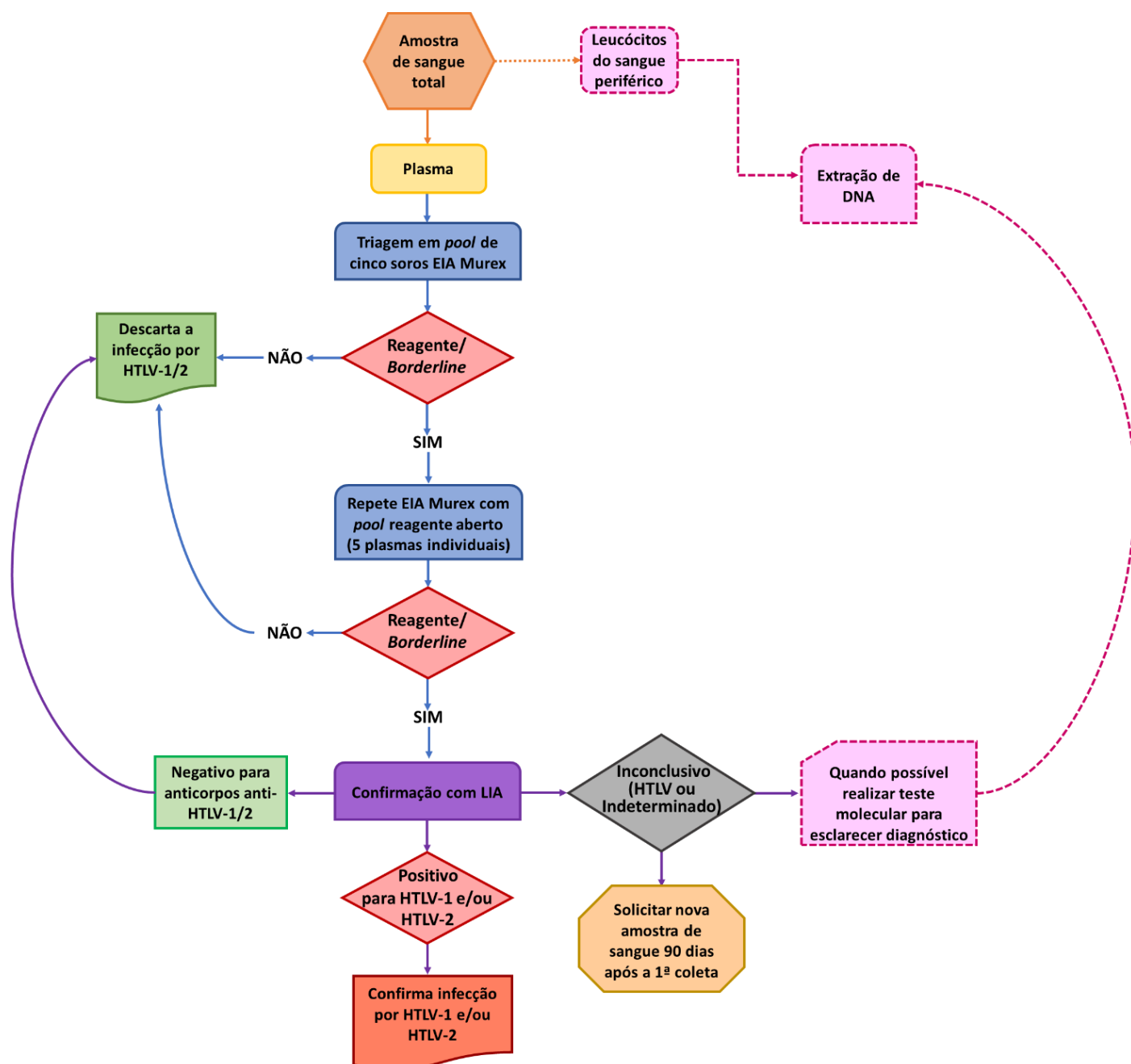


Figura 21. Algoritmo de testes laboratoriais para o diagnóstico das infecções por HTLV-1 e HTLV-2

5. Discussão

Considerando as metas globais propostas pela WHO em relação às hepatites virais B e C, de reduzir novas infecções em 90% e as mortes em 65% até o ano de 2030, e principalmente a recomendação de estudar as coinfeções que possam aumentar o risco de desenvolver infecções crônicas, cirrose e carcinoma hepatocelular, como uma das formas de alcançar estes objetivos (WHO, 2019a; 2019b), o presente estudo buscou contribuir com informações que possibilite atingir estas metas, com a realização das análises de influência dos HTLV-1 e HTLV-2 na evolução das hepatites virais B e C (Campos et al., 2020b), principalmente pelo fato de o Brasil, por intermédio do Ministério da Saúde (MS), ter se tornado signatário desta estratégia global de controle das hepatites virais no ano de 2017 (Brasil, MS, 2018b).

Diante das poucas informações relacionadas ao impacto dos HTLV-1/2 na progressão de doença pelo HBV, e clareamento viral, o presente estudo mostra resultados importantes. Entre os pacientes com a hepatite B, primeiro se confirmou mais coinfeção pelo HIV e HIV/HTLV-2 entre os homens, o que poderia ser explicado, em parte, por homens terem um número maior de parceiros sexuais durante a vida; ainda, há mais UDE entre os homens. De fato, corroborando essa hipótese, o HTLV-2 tem sido detectado e associado ao UDE, principalmente em pacientes infectados pelo HIV em São Paulo e em Londrina (Caterino-de-Araujo et al., 2015; Morimoto et al., 2007). Além disso, em Salvador, o HBV predomina nos homens coinfectados pelo HIV e por HIV/HTLV-1, e se atribuiu a via sexual como o principal fator de risco para a aquisição desses retrovírus nesta região geográfica (Moreira et al., 2013). Em relação à idade, os pacientes coinfectados pelo HBV/HTLV-1/2 foram mais velhos, e isso pode ser em parte, devido à obrigatoriedade da sorologia para HBV e HIV em bancos de sangue no Brasil desde 1988 e para HTLV-1/2 e HCV desde 1993 (Brasil,

MS, 1988; Brasil, MS, 1993). Ainda, o UDE era mais comum no país nas décadas de 1980 e 1990 (Mesquita et al., 2001).

Com relação à influência do HTLV-1 e do HTLV-2 nos resultados de CV de HBV, os maiores níveis de carga viral foram encontrados nas coinfeções por HIV e HTLV-1, confirmando o impacto negativo de ambos os vírus na replicação do HBV, o que poderia influenciar a progressão da doença hepática. Corroboram o pior prognóstico nas coinfeções HBV/HIV e HBV/HTLV-1, os estudos que detectaram altos títulos do antígeno de superfície de HBV (HBsAg) (Moreira et al., 2013; Turpin et al., 2019), também, maior positividade para anticorpos anti-HBc (anticorpos anti *core* do HBV) (Marr et al., 2017).

Por outro lado, confirmou-se pela primeira vez, o benefício da infecção por HTLV-2 no clareamento de HBV. No início do estudo, mais pacientes HBV/HTLV-2 coinfectados já apresentavam mais depuração espontânea do HBV em comparação aos pacientes HBV/HTLV-1, independentemente de seu *status* HIV. Os mecanismos pelos quais o HTLV-2 afeta a CV do HBV e seu clareamento, ainda são desconhecidos e merecem ser estudados mais profundamente. No entanto, pode-se especular que o aumento do número de linfócitos T CD8 citotóxicos na infecção pelo HTLV-2 pode controlar a replicação do HBV, conforme relatado na infecção por HIV, e no controle da replicação do HCV observados num estudo da Espanha (Beilke, 2012; Ruiz-Mateos et al., 2019).

Quanto à hepatite C, como esperado entre os pacientes coinfectados com retrovírus, predominaram os homens. Isso pode ser explicado pelos mesmos fatores de risco descritos para o HBV especialmente pelo UDE, uma vez que o HCV tem sido fortemente associado a essa via de transmissão (Proietti et al., 2005; Caterino-de-Araujo et al., 2015; Morimoto et al., 2007; Moreira et al., 2013). Em relação à idade, embora os pacientes coinfectados HCV/HTLV-1/2 apresentaram idades mais avançadas, diferenças foram detectadas apenas entre pacientes com HCV/HIV (mediana de idade mais jovem) quando

comparados às idades dos grupos HCV e HCV/HTLV-1. Esse resultado reforça a possibilidade de que a infecção pelo HIV seja mais recente, provavelmente pela via sexual, conforme documentado pelo MS, que mostrou aumento no número de indivíduos infectados pelo HIV na segunda e terceira décadas de vida, principalmente por práticas homossexuais (Brasil, MS, 2018b), no entanto, a via parenteral não pode ser excluída nesse grupo de pacientes.

Analisando as CV do HCV em indivíduos monoinfectados e coinfectados, os resultados obtidos confirmaram o impacto negativo do HIV e/ou HTLV-1 na CV e clareamento do HCV, também foram encontrados os níveis mais altos de CV nos homens, comparando às mensurações das mulheres, como descrito anteriormente (Alves et al., 2018). Embora alguns estudos em Salvador, Bahia, apontaram uma vantagem entre indivíduos coinfectados por HCV/HTLV-1 em promover depuração do HCV, provavelmente pelo aumento da produção de citocinas (Le Marchand et al., 2015; Brites et al., 2018), outras pesquisas realizadas ao redor do mundo, incluindo uma paulista e o presente estudo, encontraram o efeito oposto (Alves et al., 2018; Castro e Roger, 2016; Kishihara et al., 2001; Campos et al., 2020a). Diferenças no *background* genético dos pacientes, diversidade de estirpes dos HTLV-1, HTLV-2 e HCV; o tamanho e as características das populações recrutadas para os estudos poderiam ser responsáveis pelos resultados discordantes.

No presente estudo, analisaram-se as CV do HCV e clareamento viral em 787 infectados com HCV, sendo 90 coinfectados HCV/HIV e 48 indivíduos com HCV/HTLV-1/2 de São Paulo (um estado com população mestiça em que os subtipos HTLV-1aA, HTLV-2c e o genótipo 1 do HCV predominam). Confirmou-se maior viremia do HCV e menor clareamento entre os coinfectados por HCV/HTLV-1 durante o acompanhamento, em relação aos pacientes HCV monoinfectados e os coinfectados por HCV/HTLV-2.

Embora os valores mais baixos de CV do HCV tenham sido detectados em coinfectados por HCV/HTLV-2, quando os pacientes também

tinham a infecção por HIV, a viremia era maior, mostrando que o HIV prevaleceu na coinfeção pelo HTLV-2 em pacientes com hepatite C, provavelmente durante a infecção aguda ou primária pelo HIV, antes da introdução da terapia antirretroviral (TARV). No entanto, após o tratamento da hepatite e durante o acompanhamento, os indivíduos coinfectados HCV/HTLV-2 apresentaram maior depuração do HCV, enfatizando o papel protetor do HTLV-2 na viremia e no clareamento do HCV, e consequentemente na progressão da doença. Digno de nota, o MS fornece acesso gratuito e universal aos antivirais de ação direta sem interferon (DAAs) para tratamento da hepatite C no país desde 2014 (Mesquita et al., 2016). O mecanismo pelo qual o HTLV-2 atua na hepatite C é desconhecido, mas, novamente, uma alta contagem de células T CD8 associada ao controle da replicação do HCV foi descrito em pacientes coinfectados pelo HTLV-2 e por controladores de HIV-1, ambos com histórico de UDE, na Espanha (Ruiz-Mateos et al., 2019), corroborando o presente dado. Além disso, as diferenças entre o *fitness* viral do HIV e HTLV-2 podem ser responsáveis pelo resultado inicial obtido. Como o HTLV-2 tem sido apontado como um fator protetor para a progressão do HIV e desenvolvimento da aids, provavelmente pela produção de citocinas que bloqueiam o correceptor CCR5 do HIV (Beilke, 2012; Pilotti et al., 2007), pode-se cogitar que no início da coinfeção pelo HIV e HTLV-2 e/ou antes da TARV, o HIV prevalece ao HTLV-2 (altos níveis de carga viral de HIV, que podem interferir na replicação do HCV). Porém, durante a coinfeção crônica por HIV-1 e HTLV-2 e em pacientes em TARV, o HTLV-2 troca de posição com o HIV e controla a replicação do HCV. Corroborando esta hipótese, observou-se durante o seguimento de dois anos, mais depuração do HCV em indivíduos coinfectados com HCV/HTLV-2, independentemente da sua positividade para o HIV.

Outros fatores, como o *background* genético dos indivíduos, o subtipo da estirpe de HTLV-2, o genótipo da proteína Tax2 e a proteína *antisense* APH-2, entre outras, também podem estar relacionadas ao

benefício do HTLV-2 na hepatite C, como ocorre com o HIV/aids (Beilke, 2012; Castro e Roger, 2016; Alves et al., 2018; Ruiz-Mateos et al., 2019).

Referente aos genótipos de HCV detectados entre pacientes no presente estudo, eles condizem aos genótipos prevalentes no Brasil (Brasil, MS, 2019), e nenhuma associação foi detectada entre um genótipo específico e um grupo de pacientes mono infectados ou co infectados.

Considerando os diferentes impactos de HTLV-1 e HTLV-2 nas CV e clareamento de HBV e HCV, juntamente com o plano de alcançar as metas da WHO no Brasil, sugere-se a inclusão da sorologia HTLV-1/2 na bateria de testes utilizados em acompanhamento de pacientes com hepatite viral B e C neste país (Alves et al., 2018; Caterino-de-Araujo et al., 2018, 2020; Campos et al., 2020a).

Em relação à origem e prevalência dos HTLV-1 em populações das Américas, há apontamentos para mais de uma entrada deste vírus no continente. Uma por imigrantes no período Paleolítico através do Estreito de Bering, outra pelo tráfico de escravos no período colonial e mais recentemente pela imigração japonesa no início do século XX (Paiva e Casseb, 2015; Aguiar et al., 2017; Bandeira et al., 2018).

As análises filogenéticas dos três segmentos genômicos de HTLV-1 estudados (LTR, *env* e *tax*), classificaram todos os isolados de São Paulo (SP) e de Recife (PE) como pertencentes ao subtipo a Cosmopolita, subgrupo A - Transcontinental (HTLV-1aA), suportado por *bootstrap* de 66% para LTR e *tax*, e zero *length p*>0,001 (árvore ML) para os três segmentos analisados. Corroborando estudos brasileiros que caracterizaram isolados das regiões Norte (Laurentino et al., 2005; Aguiar et al., 2017; Nobre et al., 2018), Nordeste (Rego et al., 2010), Sul/Sudeste (Magri et al., 2012a; 2012b; 2012c) e Sudeste (Neto et al., 2011; Pessôa et al., 2014). Apenas um estudo realizado no Sudeste encontrou o subtipo HTLV-1aB entre pacientes descendentes de japoneses, porém se tratava apenas de mono infectados por HTLV-1 (Pessôa et al., 2014).

Árvores de LTR e *tax* mostraram que a maioria dos isolados foi agrupada no *cluster* A da América Latina (60/70), apesar de 10 sequências

compõem o *cluster* B. Curiosamente, não houve associação de um único clado e os pacientes HAM/TSP ou oligoassintomáticos. A distribuição em grupos distintos da América Latina sugere múltiplas entradas do HTLV-1 no Brasil, tanto entre as estirpes circulantes em indivíduos coinfectados por HIV da região Sudeste, como na monoinfecção da região Nordeste. Possivelmente uma primeira introdução na América Latina teria acontecido após a migração da população mongoloide através do Estreito de Bering, aproximadamente 10.000 a 15.000 anos atrás, mais recentemente, no período pós-colombiana, uma nova entrada do HTLV-1 na população pelo estado da Bahia, durante o tráfico de escravos, e ainda outra mais atual pela imigração japonesa (Paiva e Casseb, 2015; Ishak et al., 2017; Amoussa et al., 2017).

A presença de três mutações na região LTR (inserção de C na posição 140 da ATK, C387T, T595C) provavelmente, foi o motivo para o agrupamento das nove amostras no *cluster* B de HTLV-1 ($p \leq 0,001$). As duas mutações encontradas nos *Tax-responsive elements* (TRE), tanto nas amostras de SP como de PE não estavam relacionadas a mau prognóstico como sugerido por Neto e colaboradores (2011), pois todas as amostras de SP (17/17) que apresentaram estas mutações eram de indivíduos assintomáticos, assim como metade dos isolados de PE (5/10), concordando com os resultados de Magri et al. (2012c) em indivíduos coinfectados por HIV. Como a integridade do domínio B é essencial para iniciar a transativação de componentes celulares mediada por Tax, reforça-se a hipótese de benefício das mutações nos TRE para o *status* de portador assintomático (Yao e Wigdahl, 2000).

A deleção de 10 nucleotídeos encontrada na região U3 5'LTR em uma amostra de SP (IAL-091), também não foi relacionada à doença. Curiosamente a mesma mutação estava presente em um isolado (FS67) de coinfecção HIV/HTLV-1 de Feira de Santana, BA, (Rego et al., 2010). Ambas as sequências se agruparam no *cluster* A da América Latina.

Com a análise molecular da região *tax*, foi possível encontrar as cinco mutações que conferem a assinatura de isolados brasileiros,

característica do genótipo TaxA (Kashima et al., 2006). Outro estudo de São Paulo apresentou o mesmo padrão de mutações e uma falta de associação do genótipo de Tax e desenvolvimento de doença (Casseb et al., 2006). Corroborando estes dados e os de Magri et al. (2012b), a assinatura molecular do genótipo TaxA, também foi encontrada nos isolados de coinfeção HIV/HTLV-1, assim como em amostras de pacientes monoinfectados de Recife assintomáticos, oligossintomáticos e HAM/TSP.

Foram encontradas diversas alterações de nucleotídeos e sete trocas de aminoácidos na região *env*, sendo a mais frequente a V247I (G5941A), que foi associada com redução da antigenicidade da gp46-I por um grupo de Salvador (Araújo et al., 2020). Porém, foi possível verificar os títulos de anticorpos na triagem por EIA em 15 dos 23 isolados que apresentaram esta alteração, todos com relação DO/CO acima de 5,6; também confirmaram a infecção por HTLV-1 por WB e LIA, apenas uma amostra de uma paciente do sexo feminino de 43 anos mostrou resultado indeterminado no LIA, com positividade apenas para a gp21-I/II e soropositividade para HTLV-1 e HTLV-2 no WB. Também, alguns trabalhos associaram trocas de aminoácidos na região codificante da glicoproteína de superfície do HTLV-1 ao desenvolvimento de doenças (Mota-Miranda et al., 2013; Viana et al., 2018), enquanto outros não encontraram tal relação (Mota-Miranda et al., 2008). Entre os pacientes do presente estudo, 78% (18/23) dos que apresentaram mutações não sinônimas nesta região, eram assintomáticos.

Mesmo com as diferenças de *background* genético; hábitos sociais e fatores de risco associados à aquisição de HTLV-1, que variam no Brasil devido sua grande extensão territorial e influência dos colonizadores, todas as sequências de duas regiões brasileiras estudadas apresentaram o subtipo Cosmopolita, subgrupo Transcontinental (HTLV-1aA). Também foi possível encontrar assinatura molecular do genótipo taxA nos isolados HTLV-1 de pacientes coinfectados com HIV-1 da região Sudeste e de pacientes com a monoinfecção por HTLV-1 da região Nordeste. Ainda, foi

confirmada a hipótese de múltipla introdução do HTLV-1 no Brasil, por conta de amostras nos dois *clusters* da América Latina.

Quanto à ocorrência da variante HTLV-2c no Brasil, sua origem não foi completamente esclarecida, e ainda é intrigante. Acredita-se que o HTLV-2 também atingiu o Novo Mundo aproximadamente há 15.000 anos com a migração humana também cruzando o Estreito de Bering. Duas diferentes rotas migratórias paralelas à Cordilheira dos Andes ao longo da Costa do Pacífico e, em direção à região Amazônica poderiam ter independentemente resultado no surgimento da variante HTLV-2c, talvez de um protótipo 2a, ou da introdução de 2c exclusivamente na região amazônica (Switzer et al., 1996; Vallinoto et al., 2002; Ishak et al., 2017).

A respeito de sua dispersão, ainda há uma lacuna sobre como e quando o HTLV-2c endêmico em comunidades indígenas alcançou populações urbanas de diversas regiões do país. Sugerem que o vírus foi transmitido e difundido entre os colonizadores através do contato sexual com indígenas infectados e, foi disseminada gradativamente para as populações urbanas através do contato interétnico e, sua circulação mantida em áreas urbanas através do contato sexual, amamentação e uso de drogas endovenosas (Ishak et al., 1995; Ishak et al., 2001).

As árvores filogenéticas de HTLV-2 (*env*, *tax* e LTR) mostraram a presença de um grupo composto quase exclusivamente de UDE dentro de um clado maior do subtipo HTLV-2a/c. Especula-se que estes *clusters* poderiam representar a via de transmissão entre grupo específico ou diversidade particular destas estirpes, como descrito em UDE europeus (Roucoux e Murphy, 2004; Magri et al., 2010; 2013). Além disso, os *clusters* na árvore filogenética da região *env* e *tax*, que contêm sequências do presente estudo e, de trabalhos anteriores do laboratório (Magri et al., 2010; 2013) pertencentes à mesma região geográfica (cidade de Jundiaí distante 60 quilômetros da cidade de São Paulo), confirmam que o comportamento de risco para a aquisição de retrovírus nestes pacientes foi o uso de drogas endovenosas (Magri et al, 2010; 2013).

Encontraram-se algumas substituições de nucleotídeos e trocas de aminoácidos no segmento *env* de HTLV-2, sendo a S183P a mutação não sinônima mais frequente. Entretanto, como já esperado, houve baixa variação genética entre os isolados HTLV-2a nesta região genômica (Takahashi et al., 1993). Com relação à região *tax*, a troca de nucleotídeo mais importante foi encontrada, que resultou na perda do *stop códon* na posição 8.203 em relação ao protótipo Mo e, no ganho de 25 aminoácidos, traduzindo uma proteína Tax longa, característica dos isolados brasileiros, denominada variante molecular -2c (Eiraku et al., 1996; Magri et al., 2013). As mutações T204A, Y261C e E282Q também estavam presentes em todas as sequências de *tax* de HTLV-2. Mutações nas extremidades da proteína Tax de isolados 2a como a T204A, foram associadas com a perda da transativação de promotores do LTR, alterações estas, que poderiam repercutir na perda de função de Tax2, implicando nas suas propriedades biológicas e patogênicas (Sheehy et al., 2006). Ainda, a substituição G7778A (R110Q) presente em alguns isolados, pode interferir na localização da proteína Tax na célula hospedeira, concentrada no núcleo ou no citoplasma (Bertazzoni et al., 2011).

A análise molecular da região de LTR confirmou o subtipo HTLV-2c com a presença da assinatura molecular C401T em todas as sequências do presente estudo, corroborando os achados de Barreto et al. (2014) em isolados de Salvador. Também foram encontradas mutações em sítios de ligação dos fatores de transcrição SER (*Serum Response Element*), ETS (*Twenty-six transcription factor family*), Poly (A) (domínio responsável por ativar a poliadenilação do mRNA) e na região U3RU5 (Barreto et al., 2014). Alguns destes fatores de transcrição têm ação no ciclo celular, tais como apoptose, crescimento e diferenciação celular (Dalton et al., 1993), vários ETS também participam da malignidade de células tumorais, incluindo invasão e metástase pela ativação da transcrição de genes relacionados à angiogênese (Oikawa e Yamada, 2003). Enquanto Poly (A) apresenta papel central na regulação do RNA mensageiro, estabilidade e tradução (Gorgoni e Gray, 2004). Uma vez que estes fatores de transcrição interferem na

produção de componentes celulares e virais, especula-se, que a diminuição de tais proteínas poderia estar relacionada ao papel protetor do HTLV-2 na coinfeção por HIV, sobretudo da variante 2c. Ainda, e concordando com esta hipótese, as mutações presentes nas sequências de *tax* deste estudo, encontram-se em sítios importantes de localização da Tax na célula infectada e em regiões responsáveis pela ativação do ciclo celular, apoptose e transativação do LTR (Sheehy et al., 2006; Bertazzoni et al., 2011; Caterino-de-Araujo et al., 2013), reforçando o papel protetor do HTLV-2 na infecção por HIV e desenvolvimento da aids.

Como o subtipo HTLV-2a variante c foi o único encontrado na população de estudo, sugere-se que estes indivíduos infectados pelo HIV tiveram pouca interação com pessoas ou derivados de sangue de outras áreas geográficas fora do Brasil. Ainda, podem indicar diferentes rotas e origens do HIV e do HTLV-2 no país, com infecção primária pelo HTLV-2 entre os UDE e depois pelo HIV (Magri et al., 2013).

Mesmo não se deparando com outros subtipos além do HTLV-1aA e o subtipo HTLV-2a/c, estudos contínuos de vigilância epidemiológica são importantes e necessários, para investigar a emergência de novos subtipos virais em especial entre coinfectados por HIV de São Paulo, devido ao intercâmbio com populações oriundas de outras regiões geográficas do mundo, principalmente com a abertura das fronteiras para refugiados e imigrantes da América Latina e de outros continentes.

Ainda relacionado às substituições de nucleotídeos encontradas nos 44 isolados de HTLV-1 e 25 de HTLV-2, pode-se notar que a porcentagem de alteração G>A variou de 20,9% (HTLV-1) a 17,6% (HTLV-2). Relatos em literatura associaram estas trocas à ação da enzima APOBEC3G (A3G), principalmente quando ocorrem em dinucleotídeos GG e GA (Mangeat et al., 2003; Harris e Dudley, 2015; Kuramitsu et al., 2017). Situação bem comum na replicação do HIV, que costuma apresentar taxas mais altas deste tipo de substituição, até mesmo a chamada hipermutação, fato este que pode estar relacionado à sua forma de replicação principal, a “via clássica” dos retrovírus, utilizando a transcriptase reversa, diferentemente dos HTLV-1/2

que têm como principal forma de manutenção da infecção, a proliferação via mitose das células hospedeiras (Mangeat et al., 2003). Outro fato importante, é que a ação da A3G foi encontrada principalmente entre casos de ATL, repercutindo em algumas mutações abortivas (Fan et al., 2010, Kuramitsu et al., 2017), o que não foi observado no presente estudo. Também se associou a atividade desta enzima a falhas no diagnóstico da infecção por HTLV-1 utilizando o WB (Kuramitsu et al., 2017). Entre as amostras soroindeeterminadas no WB neste estudo, houve um aumento de cerca de 2% da mutação G>A para os isolados de HTLV-1 e, redução de 7% nas sequências de HTLV-2 comparando aos resultados obtidos com os totais de isolados. Estes resultados não podem descartar a ação da A3G nem de outras enzimas da família de apolipoproteínas, uma vez que os humanos possuem as sete variedades (3A, 3B, 3C, 3D, 3E, 3F, 3G e 3H), muito provavelmente para controlar a instabilidade genômica causada por retrovírus endógenos e retrotransposons durante a evolução dos hominídeos (Esnault et al., 2006).

A análise quantitativa das mutações pontuais em região promotora do LTR, sinônimas e não sinônimas nos segmentos *env* e *tax* foram predominantes nos isolados de HTLV-2, permitindo correlacioná-las as falhas nos testes confirmatórios tanto sorológicos como moleculares. Reforçando a já relatada maior dificuldade em concluir o diagnóstico das infecções por HTLV-2 utilizando os conjuntos de reagentes disponíveis no comércio para a detecção de anticorpos (Jacob et al., 2007; Morimoto et al., 2007; Campos et al., 2017b) e ensaios moleculares, por apresentarem cargas provirais muito baixas (Montanheiro et al., 2008; Campos et al., 2017b).

Quanto as partículas provirais defectivas de HTLV-1, elas têm sido descritas desde o início da década de 1980 e associadas principalmente com oncogênese (Kobayashi et al., 1984). Entretanto, só em 1996 houve a classificação em dois tipos de provírus defectivos quanto a preservação ou deleção dos LTR, principalmente o 5'LTR (Tamy et al., 1996). Adotando a classificação de Tamy e colaboradores para HTLV-1 e aplicando-a também

para HTLV-2, o presente estudo encontrou os dois tipos de partículas provirais defectivas entre os isolados de HTLV-1 e HTLV-2 de SP e, apenas provírus com deleção de segmentos internos (tipo 1) foi encontrado entre as amostras de PE. Neste estudo, nenhum dos dois tipos de provírus defectivos pode ser associado diretamente a doença, pois tanto as amostras de portadores de HTLV-1 e HTLV-2 de SP quanto as amostras de indivíduos assintomáticos, oligossintomáticos e HAM/TSP de PE apresentaram estas partículas defectivas, corroborando Katsuya e colaboradores (2019) que encontraram provírus defectivos independentemente do *status* de portador ou paciente. Um fato interessante, que não pode ser excluído, é a presença de pseudotipos HIV/HTLV-1 entre os provírus que tiveram apenas o segmento *env* não detectado, uma vez que os dois retrovírus infectam as mesmas células, poderia acontecer a recombinação dos genes *env*, como já documentado por Tang e colaboradores (2019), ou seja, HTLV-1 com envelope de HIV.

Além disso, notou-se maior dificuldade em concluir o diagnóstico das infecções por HTLV-1 e HTLV-2 nas amostras que apresentaram partículas defectivas do tipo 1 (deleção de segmentos virais internos), esse fato pode estar relacionado ao gene/proteína alvo utilizado nos testes, principalmente os comerciais. A maioria dos testes sorológicos detectam anticorpos dirigidos às proteínas de Env e ou Gag, cujos genes podem ter sofrido deleção ou mutação, e influenciar a produção das proteínas e anticorpos correspondentes. Corroborando a hipótese de que os provírus defectivos interferem no diagnóstico, trabalhos realizados na Argentina e Chile, obtiveram diagnóstico sorológico negativo em amostras de pacientes sintomáticos para HAM/TSP, sendo que a infecção por HTLV-1 foi confirmada pela detecção do segmento *tax* e anticorpos anti-Tax1 específicos (Ramirez et al., 2003; Gallego et al., 2020).

Confirmou-se presença de partículas provirais defectivas de HTLV-1 HTLV-2 no presente estudo, porém seu real significado permanece por ser estabelecido, com a necessidade de mais estudos para confirmar sua relação com as falhas nos testes diagnósticos e com o desenvolvimento de

doenças. Uma vez que este estudo foi conduzido principalmente com amostras de pacientes com as coinfeções HIV/HTLV-1 e HIV/HTLV-2, não se pode afirmar a presença destas deleções em casos de monoinfecção por HTLV-2, tampouco descartar uma interferência entre os dois retrovírus.

Em relação ao desempenho dos testes confirmatórios sorológicos LIA e WB, sabe-se que resultados HTLV-1 e HTLV-2 soroindeterminados no WB acontecem em diversos lugares do mundo, com variação das porcentagens de acordo com o país e o grupo de indivíduos analisados (áreas geográficas e populações endêmicas ou não endêmicas). Tentativas de melhorar a sensibilidade e especificidade do WB foram realizadas, como a adição de proteínas recombinante do envelope HTLV-1 (rgp46-I) e HTLV-2 (rgp46-II) e a proteína transmembrana (GD21) ao lisado viral de HTLV-1, esta última com a retirada das porções amino- e carboxi-terminais para o bloqueio da reatividade cruzada com o *Plasmodium falciparum* em regiões endêmicas para malária (Varma et al., 1995; Mahieux et al., 2000). Apesar desses esforços, a versão WB 2.4 continua a produzir muitos resultados HTLV indeterminados e/ou não tipados (Jacob et al., 2007; 2008; Caterino-de-Araujo et al., 1998; Ishak et al., 2007; Morimoto et al., 2007; Costa et al., 2009; Olah et al., 2010; Costa et al., 2011; Campos et al., 2017a; 2017b; Zrein et al., 1998; Sabino et al., 1999; da Silva Brito et al., 2018). O presente estudo encontrou resultados semelhantes e mostrou que nas populações com alto risco de adquirir infecções virais [grupo HIV (G1), grupo com hepatites virais (G2)], assim como na população geral [grupo de pacientes de ambulatório de HTLV de Salvador-BA, (G3)] do Brasil foram detectados muitos resultados inconclusivos no WB (Campos et al., 2020b). Várias hipóteses foram consideradas para esses resultados inconclusivos do WB, como baixas cargas provirais de HTLV-1 e HTLV-2; mutações no provírus; partículas defectivas; baixa produção de antígenos virais, levando a baixa produção específica de anticorpos; período de soroconversão; reatividade cruzada com outros antígenos ou vírus; coinfeção por HIV e uso de TARV, entre outros (Jacob et al., 2008; Montanheiro et al., 2008; Costa et al., 2011;

Campos et al., 2017a; 2017b; Rouet et al., 2001; Murphy et al., 2004; Martins et al., 2010; Kuramitsu et al., 2017).

Curiosamente, a maioria dos resultados indeterminados no WB que não foram confirmados por soroconversão ou ensaios de PCR foi devido à reatividade cruzada com antígenos Gag. Por exemplo, o padrão WB-indeterminado exibindo p19, p26, p28, p32, p36 e p53, denominado perfil HTLV-1 Gag indeterminado (HGIP), foi detectado em estudos epidemiológicos, principalmente em Camarões e no Caribe, mas não foi detectado associado à verdadeira infecção pelo HTLV-1 (Mahieux et al., 2000; Rouet et al., 2001). Esse padrão não foi frequentemente descrito em amostras brasileiras WB-indeterminadas (Jacob et al., 2008; Costa et al., 2011; Campos et al., 2017b; Martins et al., 2010) e também não foi observado em nenhuma amostra analisada no presente estudo. Apesar de duas amostras apresentarem um padrão incompleto do HGIP (sem as bandas p32 e p36), apenas a banda p19 I/II foi detectada pelo LIA, portanto foram consideradas HTLV negativas de acordo com os critérios do fabricante Fujirebio. Corroborando com o resultado do LIA, o mesmo perfil (apenas banda p19 I/II) foi detectado recentemente quando analisamos amostras de cinco pacientes atendidos em ambulatórios de HTLV em São Paulo, durante os anos de 2000 a 2006, que exibiram as bandas p19, p26, p28 e p36 no WB (Jacob et al., 2008).

Além disso, realizou-se uma análise retrospectiva de 108 amostras de sangue bem caracterizadas de pacientes de São Paulo [testadas por dois testes sorológicos (WB e LIA) e dois moleculares (qPCR *pol* e PCR-RFLP *tax*) e se confirmou uma série de mais de 10 HTLV-1 e 10 HTLV-2 como positivo pelos critérios WB e LIA, e eles foram concordantes. Além disso, revisou-se os dados de duas amostras positivas para HTLV-1+2 WB, uma das quais foi confirmada HTLV-1 e HTLV-2 pelo LIA e ensaios moleculares (Campos et al., 2017b). Ainda, testou-se pelo LIA outras duas amostras positivas para HTLV-1+ 2 no WB, e apenas o HTLV-1 foi confirmado levando em consideração a intensidade das bandas discriminatórias (p19-I e gp46-I e gp46-II). Importante ressaltar que o novo perfil indeterminado de WB (Perfil

N-Indeterminado) apresentando bandas fortes de GD21 e p28, descrito em Pigmeus e Bantus que vivem na floresta tropical do sul dos Camarões (Filippone et al., 2012), não foi detectado em nenhum estudo realizado em São Paulo (Jacob et al., 2008; Costa et al., 2011; Campos et al., 2017b) até o momento.

Embora os ensaios de PCR tenham apresentado menor sensibilidade que o WB na detecção de verdadeira infecção por HTLV-1/2 em indivíduos coinfectados pelo HIV/HTLV em São Paulo, Brasil, os ensaios moleculares foram capazes de confirmar e discriminar entre HTLV-1 e HTLV-2 em alguns pacientes, casos indeterminados e HTLV não tipados pelo WB, indicando que os testes sorológicos e moleculares são úteis e podem ser complementares para o diagnóstico de HTLV (Costa et al., 2011; Campos et al., 2017b). Devido à presença de muitas amostras WB-indeterminadas, juntamente com o alto custo de obter os conjuntos de reagentes de WB e LIA no Brasil, recentemente foi proposto um algoritmo que emprega a qPCR para confirmar a infecção pelo HTLV, seguido pelo teste de WB ou LIA em amostras negativas para PCR. Essa estratégia mostrou reduzir custos e melhorar a precisão do diagnóstico de HTLV-1/2 (Costa et al., 2011; Campos et al., 2017b). No entanto, devido às condições socioeconômicas altamente divergentes entre diferentes regiões do Brasil, em laboratórios sem meios para realizar ensaios moleculares, os testes sorológicos de alto desempenho apresentam uma alternativa oportuna.

Alguns estudos de diagnóstico de HTLV conduzidos em doadores de sangue na América Latina (considerada área endêmica para HTLV-1/2) relataram números diferentes de amostras WB-indeterminadas e que foram posteriormente confirmadas como positivas por PCR (Santos et al., 2003; Mangano et al., 2004; Berini et al., 2007). Também em doadores de sangue de outra área endêmica no nordeste do Irã, amostras indeterminadas no WB foram consideradas positivas por PCR, e as bandas de WB mais prevalentes apresentaram combinações variáveis de rgp46-I, GD21 e gp21 (Zanjani et al., 2011).

Corroborando esses achados, a maioria das amostras de soro analisadas neste estudo, que apresentaram padrões de WB GD21 e/ou gp46-I ou -II mais p19 ou p24 foram subsequentemente confirmadas como positivas pelo LIA. Esses padrões de WB foram observados no G1, e os ensaios de PCR foram positivos para HTLV-1 ou HTLV-2 (dados não mostrados, publicados em Campos et al., 2017b). Além disso, a maioria das amostras de soro que apresentaram apenas bandas de Gag na análise pelo WB resultou negativa para infecção por HTLV-1/2 pelo LIA. Uma amostra de sangue no G1 que mostrou uma banda fraca de GD21 na análise WB apresentou resultado negativo para HTLV-1/2 por LIA e PCR. Outra amostra de soro apresentando um padrão de GD21, rgp46-I e rgp-46-II WB foi negativa no LIA; infelizmente, esta amostra não pôde ser analisada por PCR porque apenas soro foi enviado ao laboratório para análise. No entanto, a repetição desta amostra de soro pelo WB e LIA confirmou os resultados discrepantes. É interessante notar que, nas amostras de soro (n=14) que resultaram HTLV não tipado pelo LIA, a PCR confirmou o HTLV-1 em cinco amostras e o HTLV-2 em outras duas amostras do G1 (dados não mostrados), enfatizando a necessidade do emprego de ensaios moleculares para concluir o diagnóstico de HTLV em pacientes com coinfeção por HIV/HTLV.

No G2, a maioria dos padrões indeterminados de WB apresentou GD21 sozinha ou em associação com uma banda de Gag ou Env. O LIA confirmou o HTLV-2 em 11/21 (52,4%) das amostras WB-indeterminadas. O alto número de amostras positivas para HTLV-2 no G2 nos leva a supor que esses pacientes tenham adquirido HBV e HCV, bem como HTLV-1/2 e HIV, ao mesmo tempo, provavelmente por via parenteral e antes dos testes sorológicos para estas infecções se tornarem obrigatórios em bancos de sangue em todo o Brasil (Brasil, MS, 1989; Brasil, MS, 1993); além disso, quando a dependência de drogas endovenosas era mais frequente no país, como descrito anteriormente (Caterino-de-Araujo et al., 2015; 2018; Alves et al., 2018). Corroborando essa hipótese, a idade avançada e o sexo masculino predominaram no G2. Com relação à falha do WB no diagnóstico

de amostras realmente infectadas por HTLV-2, essa dificuldade é relatada desde a década de 1990 (de-Araujo et al., 1994; Caterino-de-Araujo et al., 1998; Morimoto et al., 2007; Jacob et al., 2008; Costa et al., 2011; Campos et al., 2017b), também a hipótese de que o rgp46-II (K55) presente na tira do WB não é tão sensível à detecção de anticorpos para as estirpes de HTLV-2 que circulam no Brasil (subtipo HTLV-2a, variante -2c) (Magri et al., 2013), o que não parece ser o caso da gp46-II presente na tira do LIA.

Em relação às duas amostras WB-indeterminadas no G2 e HTLV soronegativa pelo LIA, ambas apresentaram reatividade para GD21 na análise pelo WB, e uma das amostras mostrou uma banda fraca. Curiosamente, o LIA demonstra o melhor desempenho nesse grupo de pacientes, com 20/24 (83,3%) de positividade para HTLV detectada entre as amostras inconclusivas pelo WB. Infelizmente, apenas amostras de plasma/soro desses pacientes estavam disponíveis para análise, o que não permitiu o uso da PCR para realizar uma análise comparativa dos resultados sorológicos e moleculares. No entanto, associações entre HTLV-1/2 e hepatite B e C foram relatadas em vários estudos realizados no Brasil e em outros países (Rouet et al., 2001; Santos et al., 2003; Morimoto et al., 2005; Caterino-de-Araujo et al., 2015; 2018; Alves et al., 2018; Campos et al., 2020a).

Os padrões WB-inconclusivos no G3 foram bastante diferentes daqueles dos demais grupos analisados. Várias amostras HTLV não tipadas mostraram a presença de quase todas as bandas correspondentes ao lisado viral do HTLV-1, sem reatividade para a rgp46-I, e seis dos nove soros foram subsequentemente confirmados como HTLV-1 pelo LIA. Doze das 25 amostras inconclusivas de WB que puderam ser submetidas à PCR (nove WB-indeterminadas e três HTLV), 11 foram confirmadas como infectadas pelo HTLV-1, seis das quais eram HTLV não tipadas pelas análises de LIA [dados não mostrados, porém descritos por da Silva Brito e colaboradores (2018)]. Além disso, as amostras de soro que foram negativas por LIA apresentaram três padrões indeterminados de WB diferentes: (i) GD21, (ii) p24 (banda fraca) e (iii) rgp46-II (banda fraca). Apenas uma dessas

amostras pôde ser testada por PCR e apresentou resultado negativo para HTLV (dados não mostrados). Em resumo, as amostras no G3 foram confirmadas como HTLV-1 ou HTLV, mas não como infecção por HTLV-2. Esse achado pode estar parcialmente relacionado à origem étnica dos indivíduos incluídos (afrodescendentes), à falta de infecção pelo HIV nesse grupo e às características dos pacientes atendidos em ambulatórios de HTLV em Salvador-BA (Dourado et al., 2003).

Digno de nota, os motivos descritos anteriormente para explicar os resultados inconclusivos no WB também podem ser aplicados aos resultados negativos para PCR em indivíduos verdadeiramente infectados por HTLV-1/2, incluindo: a baixa carga proviral em pacientes com HIV em TARV no G1 e, em alguns casos, no G2 (Costa et al., 2011; Campos et al., 2017a; 2017b); a infecção pelo HTLV-2 que sabe-se apresenta baixas cargas provirais (Montanheiro et al., 2008; Olah et al., 2010; Murphy et al., 2004); a presença de provírus defeituoso nem sempre detectado pelos *primers* empregados nos ensaios de PCR convencionais (Kuramitsu et al., 2017); a infecção por outros vírus, como HTLV-3 ou HTLV-4, que só podem ser detectados usando *primers* específicos (Calattini et al., 2005; Wolfe et al., 2005).

Vale ressaltar que, desde a descoberta dos HTLV-3 e HTLV-4 na África Central (Calattini et al., 2005; Wolfe et al., 2005), foram realizados estudos para verificar se os ensaios disponíveis comercialmente e empregados no diagnóstico do HTLV-1/2 eram capazes de detectar esses novos tipos de HTLV (Switzer et al., 2006; Calattini et al., 2009; Mahieux e Gessain, 2011). Os resultados obtidos confirmaram que os ensaios de triagem de HTLV-1/2 eram sensíveis para detectar os anticorpos contra o HTLV-3 e o HTLV-4 (Switzer et al., 2006), porém os ensaios sorológicos confirmatórios de WB e LIA mostraram resultados discordantes e classificaram erroneamente estes vírus (Calattini et al., 2005; Wolfe et al., 2005; Switzer et al., 2006; Calattini et al., 2009; Mahieux e Gessain, 2011; Zheng et al., 2010).

De fato, não se pode descartar as infecções por HTLV-3 e HTLV-4 no Brasil, uma vez que as populações da África Central migraram da África e da Austrália para o continente Americano anteriormente a migração populacional asiática e seus descendentes, como os ameríndios, que poderiam manter ou espalhar para a população geral esses vírus, o que poderia justificar a presença frequente de resultados WB-indeterminados em ameríndios, como descrito anteriormente (Kanzanki e Casseb, 2008).

Em relação ao LIA, embora tenha apresentado o melhor desempenho no diagnóstico de HTLV-1 e HTLV-2, não se pode excluir totalmente erro no diagnóstico confirmatório, uma vez que, como descrito em indivíduos infectados pelos HTLV-3 e HTLV-4, estes foram erroneamente diagnosticados como infectados por HTLV-2 (Calattini et al., 2005; Wolfe et al., 2005; Switzer et al., 2006).

Importante ressaltar que, apesar do LIA ter demonstrado melhor desempenho que o WB no diagnóstico sorológico de HTLV-1 e HTLV-2, considerações adicionais são necessárias para ambos os ensaios. Com relação ao WB, considera-se a falta de capacidade de pontuar a intensidade de uma banda positiva como um problema, pois não se sabe quando uma banda fraca deve ser considerada como verdadeiramente positiva. Os critérios (perfis de banda) estabelecidos pelo fabricante para confirmar infecções por HTLV-1 e HTLV-2 nos ensaios WB são excessivamente rigorosos e merecem revisão. Em relação aos resultados aqui obtidos, sugere-se que amostras que apresentem apenas uma banda Gag (p19 ou p24) mais GD21 e rgp46-I ou rgp-46-II sejam consideradas HTLV-1 e HTLV-2 positivas, respectivamente, uma vez que amostras que demonstraram bandas de p24, GD21 e rgp46-I foram confirmadas como positivas para HTLV-1 pelo LIA e PCR. Por outro lado, detectou-se infecção por HTLV-2 verdadeira em amostras que apresentaram bandas de p19, GD21 e rgp46-II (sem a p24). Além disso, quando as bandas de Gag não eram reativas, mas as duas bandas de Env (GD21 e rgp46-I ou rgp46-II) estavam presentes, foi impossível descartar a verdadeira infecção por HTLV-1 ou HTLV-2, pois a soroconversão poderia estar ocorrendo. Ainda, quando mostraram

reatividade a todas as bandas dos antígenos de lisado viral do HTLV-1, mesmo na ausência de rgp46-I, foi possível confirmar infecção pelo HTLV-1.

Em suma o LIA mostrou ser o melhor teste sorológico para confirmação de infecções por HTLV-1 e HTLV-2, independentemente de ser aplicado em amostras de indivíduos monoinfectados ou coinfectados por HTLV. Corroborando estes resultados, Okuma e colaboradores (2020) indicaram o LIA como o primeiro teste confirmatório de escolha para o diagnóstico no Japão. Ainda, destaca-se a necessidade de revisar alguns critérios do WB com base nos resultados aqui apresentados e nos publicados em outros trabalhos. Resta determinar se o desempenho superior do LIA se deve aos critérios menos rigorosos empregados em relação ao WB. Mais estudos são necessários para confirmar esses resultados em diferentes populações de risco no Brasil e em outras partes do mundo (Campos et al., 2020b).

Quanto a aplicação diagnóstica da estratégia de *pool* de cinco soros para a triagem diagnóstica de HTLV-1/2 em população infectada por HBV, HCV e HIV utilizando o EIA Murex (Silva et al., 2020), esta mostrou sensibilidade e especificidade de 100%, também redução acima de 60% com os custos desta etapa. Estes resultados tornam possível a aplicação desta metodologia, para dar continuidade ao diagnóstico das infecções por HTLV-1/2 principalmente em populações vulneráveis (indivíduos infectados com patógenos que compartilham as vias de transmissão dos retrovírus humanos), além de possibilitar a expansão desta testagem para as gestantes durante o pré-natal. Mesmo não tendo testado amostras de gestantes durante a validação do *pool* de soros, os resultados obtidos por Rosadas e colaboradores (2019) ao analisarem amostras de sangue de mulheres durante a gestação e após este período, e constatarem que não ocorre alteração nos títulos de anticorpos anti-HTLV-1/2 e também na CPV de HTLV-1 das mulheres infectadas, permite supor que esta nova estratégia também poderia ser aplicada às gestantes, uma vez que não ocorre diminuição de anticorpos nesta fase, o que poderia prejudicar o desempenho da triagem em *pool*. A implantação desta sorologia no pré-natal é urgente e

encontra-se muito atrasada, principalmente quando já há uma preocupação documentada de restringir a amamentação por mulheres HTLV-1/2 positivas, na cartilha de Saúde da Criança, que discorre sobre alimentação e nutrição infantil distribuída pelo MS (Brasil, MS, 2015). Reforçando a importância desta ação para o bloqueio da via de transmissão vertical, um grupo do Reino Unido avaliou diversos cenários decorrentes das infecções por HTLV-1 transmitidos de mãe para filho, comprovando que em todas as situações analisadas haveria custo benefício na implantação da sorologia de HTLV-1/2 no pré-natal, mesmo o Reino Unido não sendo uma região endêmica para estas infecções (Malik e Taylor, 2018).

Considerando os interferentes virais que poderiam influenciar o desempenho dos testes empregados nas etapas de diagnóstico das infecções por HTLV-1 e HTLV-2, foi confirmada a influência de provírus mutantes tanto nas etapas de triagem, como na aplicação dos testes confirmatórios. Estas mutações podem gerar baixa CPV, que já foi amplamente relacionada como um dos problemas para detecção de anticorpos específicos, por repercutir numa baixa produção de antígenos e consequentemente menor estímulo da produção de anticorpos (Montanheiro et al., 2008; Olah et al., 2010; Cánepa et al., 2015; Kuramitsu et al., 2017). Este fato foi observado no presente estudo pelas menores relações DO/CO apresentadas pelo EIA Murex, principalmente com as amostras HTLV-2 verdadeiramente positivas, porém negativas nas qPCR (*pol*) e nPCR-RFLP (*tax*). Enquanto no EIA da REM, esta diferença nos níveis de anticorpos anti-HTLV-1/2 ficou mais evidente quando comparada a positividade/amplificação para o gene *env*, alvo este que costuma ser o mais utilizado nos ensaios sorológicos comerciais, pois os primeiros anticorpos produzidos são direcionados às proteínas desta região genômica (Satou e Matsuoka, 2010).

Como dito anteriormente, as mutações nas regiões promotoras dos LTR, sinônimas e não sinônimas nos genes *env* e *tax*, e a presença de partículas defectivas, em especial do tipo 1, repercutiram negativamente nos testes utilizados para a detecção das infecções por HTLV-1 e HTLV-2. Uma vez que elas dificultaram a conclusão do diagnóstico nas situações já citadas

(Ramirez et al., 2003; Cánepa et al., 2015; Kuramitsu et al., 2017; Gallego et al., 2020), e também no presente estudo, principalmente para confirmar a infecção por HTLV-2.

Concluindo, o presente estudo confirmou as diferentes influências do HTLV-1 e HTLV-2 nas hepatites virais B e C, em que o papel protetor do HTLV-2 foi ressaltado em ambas as hepatites (Alves et al., 2018; Campos et al., 2020a). Também foi possível fazer a vigilância de subtipos de HTLV-1 e HTLV-2, confirmando a circulação do HTLV-1aA e HTLV-2a/c entre os isolados analisados. O estudo das mutações permitiu identificar as assinaturas moleculares de *env*, *Tax* e *LTR* das estirpes brasileiras, além da possibilidade de relacionar as mutações a falhas no desempenho dos testes diagnósticos, assim como a presença de provírus defectivos (Campos e Caterino-de-Araujo, 2020). Em relação às estratégias de melhoria e expansão do diagnóstico das infecções por HTLV-1/2, o bom desempenho do LIA como teste confirmatório sorológico, tornou-o a melhor opção para esta etapa (Campos et al., 2020b), enquanto na triagem, o *pool* de cinco soros utilizando o EIA Murex, mostrou-se exequível a sua incorporação à menor custo para o Sistema Único de Saúde (Silva et al., 2020).

Os resultados obtidos neste trabalho ressaltam a necessidade de estudos futuros, para aprofundar e expandir alguns indícios aqui encontrados. Desta forma, as análises de influência das coinfeções por HTLV-1 e HTLV-2 poderiam ser ampliadas para outras populações e regiões de estudo. Também, as pesquisas de provírus defectivos poderiam ser realizadas com ferramentas mais modernas e robustas, possibilitando aprofundar o real significado de sua presença, além dos estudos sobre a existência de pseudotipos nas amostras de coinfeção HIV/HTLV-1 e HIV/HTLV-2, e da repercussão de todos esses fatores no diagnóstico e na evolução do *status* de portador e paciente.

6. Limitações do estudo

Não foram realizados todos os testes propostos com a mesma casuística, pois as amostras biológicas eram finitas.

Utilizou-se técnica de sequenciamento de DNA convencional (Sanger) que avalia apenas estirpes majoritárias e partes do genoma proviral, não de sua totalidade, para pesquisa de partículas provirais defectivas de HTLV-1 e HTLV-2.

7. Conclusões

A influência dos HTLV-1 e HTLV-2 nas hepatites virais B e C foi confirmada, sendo que o HTLV-1 impacta negativamente nas coinfeções por HBV e HCV, aumentando os níveis de carga viral e diminuindo a depuração de HCV. Contrastado pelo impacto positivo do HTLV-2 na evolução de ambas as hepatites, com diminuição de carga viral e aumento do clareamento viral.

A vigilância de subtipos de HTLV-1 e HTLV-2 que circulam na população com coinfeção por HIV em SP, identificou a presença do HTLV-1aA, subtipo transcontinental cosmopolita, e do HTLV-2a/c variante molecular brasileira. Também foi encontrado apenas o genótipo de TaxA entre as estirpes de HTLV-1 e a TaxC entre as amostras de HTLV-2.

Foi possível analisar as mutações quanto aos tipos; se pontuais, sinônimas e não sinônimas, e a frequência encontrada nas amostras de HTLV-1 e HTLV-2, possibilitando a associação com os testes de diagnóstico.

Encontrou-se partículas provirais defectivas dos tipos 1 e 2 nas amostras de HTLV-1 e HTLV-2 de SP, e foi possível associá-las aos níveis de anticorpos específicos detectados pelos ensaios utilizados na triagem das infecções por HTLV-1 e HTLV-2.

Confirmou-se o melhor desempenho do LIA como teste confirmatório sorológico independentemente da população analisada, quer seja em amostras de indivíduos coinfectados por HIV, HBV, HCV ou de monoinfectados por HTLV-1.

Estratégias de melhoria e expansão do diagnóstico das infecções por HTLV-1 e HTLV-2 foram examinadas e aprovadas, sendo a estratégia de *pool* de soros na triagem de infecção por HTLV-1/2 exequível a um custo reduzido para o SUS.

8. Referências

Aguiar SA, França SAS, Santana BB, Santos MB, Freitas FB, Ferreira G, et al. Human T-lymphotropic virus 1aA circulation and risk factors for sexually transmitted infections in an Amazon geographic area with lowest human development index (Marajó Island, Northern Brazil). *BMC Infect Dis.* 2017; 17:758.

Alves FA, Campos KR, Lemos MF, Moreira RC, Caterino-de-Araujo A. Hepatitis C viral load in HCV-mono and HCV/HIV-1, HCV/HTLV-1/-2, and/or HCV/HIV/HTLV-1/-2 coinfecting patients from São Paulo, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2018; 22(2):123-8.

Amoussa AER, Wilkinsonb E, Giovanetti M, Rego FFA, Araujo THA, Gonçalves MS, et al. HTLV-1aA introduction into Brazil and its association with the trans-Atlantic slave trade. *Infect Genet and Evol.* 2017; 48:95-101.

Araújo THA, Barreto FK, Menezes ADL, Lima CPS, Oliveira RS, Lemos PS, et al. Complete genome sequence of human T-cell lymphotropic type 1 from patients with different clinical profiles, including infective dermatitis. *Infect Genet Evol.* 2020; 79:104166.

Andersson S, Gessain A, Taylor GP. Pooling of samples for seroepidemiological surveillance of human T-cell lymphotropic virus types I and II. *Virus Res.* 2001; 78(1-2):101-6.

Bahia F, Novais V, Evans J, Marchand CL, Netto E, Page K, et al. The impact of human T-cell lymphotropic virus I infection on clinical and immunologic outcomes in patients coinfecting with HIV and hepatitis C virus. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2011; 57(3):202-7.

Bandeira LM, Uehara NNO, Puga MAM, Rezende GR, Vicente ACP, Domingos JÁ, et al. HTLV-1 intrafamilial transmission among Japanese immigrants in Brazil. *J Med Virol.* 2018; 90:351-7.

Bangham CR, Cook LB, Melamed A. HTLV-1 clonality in adult T-cell leukaemia and non-malignant HTLV-1 infection. *Semin Cancer Biol.* 2014; 26:89-98.

Barreto FK, Rego FF, Fonseca LM, Galvão-Castro-Filho B, Araújo TH, Mota-Miranda AC, et al. Molecular characterization of the human T cell lymphotropic virus type 2 long terminal repeat region: a discussion about possible influences at viral gene expression. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2014; (30):92–6.

Beilke MA. Retroviral coinfections: HIV and HTLV: taking stock of more than a quarter century of research. *AIDS Res Human Retroviruses.* 2012; 28(2):139-47.

Berini CA, Eirin ME, Pando MA, Biglione MM. Human T-cell lymphotropic virus types I and II (HTLV-I and -II) infection among seroindeterminate cases in Argentina. *J Med Virol.* 2007; 79(1):69-73.

Berini CA, Eirin ME, Delfino CM, Weissenbacher M, Biglione MM. Predominance of human lymphotropic T cell virus type 2 subtype b in urban populations of Argentina. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2012; 28(9):1102-9.

Bertazzoni U, Turci M, Avesani F, Di Gennaro G, Bidoia C, Romanelli MG. Intracellular localization and cellular factors interaction of HTLV-1 and HTLV-2 Tax proteins: similarities and functional differences. *Viruses.* 2011; 3:541-60.

Bezerra ACS. Identificação do provírus defeituoso e classificação da sequência tax do HTLV-1 em pacientes com paraparesia espástica tropical/ mielopatia (PET/MAH) e doadores de sangue (tese de Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011; 193p.

Boschi-Pinto C, Stuver S, Okayama A, Trichopoulos D, Orav EJ, Tsubouchi H, et al. A follow-up study of morbidity and mortality associated with hepatitis c virus infection and its interaction with human T lymphotropic virus type I in Miyazaki, Japan. *J Infect Dis.* 2000; 181:35-41.

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria 1.376, de novembro de 1993. Diário Oficial da União, Brasília, 2 de dezembro de 1993. [Aprova alterações na Portaria n. 721/GM, de 9 de ago. 1989, que aprova normas técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados, e dá outras providências].

Brasil. Ministério da Saúde (MS). Decreto n.º 95.721 de 11 de fevereiro de 1988. Diário Oficial da União, Brasília. [Regulamenta a Lei n.º 7.649, de 25 de janeiro de 1988, que estabelece a obrigatoriedade do cadastramento dos doadores de sangue, bem como a realização de exames laboratoriais no sangue coletado, visando a prevenir a propagação de doenças].

Brasil, Ministério da Saúde. Portaria 2.600, de 21 de outubro de 2009. Diário Oficial da União, Brasília. [Aprova o Regulamento Técnico do Sistema Nacional de Transplantes].

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos. Brasília. 2014; 416p.

Brasil. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Saúde da criança: aleitamento materno e alimentação complementar/Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – 2. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2015.184 p.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico Hepatites Virais. Brasília. 2016a; 5(1): 72p.

Brasil, Ministério da Saúde. Portaria 23, de 31 de maio de 2016b. Diário Oficial da União, Brasília, de 6 de junho de 2016 [Torna pública a decisão de incorporar os procedimentos laboratoriais por técnicas de Western Blot e PCR em tempo real no diagnóstico de leucemia/linfoma de células T do adulto associado ao HTLV-1, no âmbito do Sistema Único de Saúde - SUS].

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para manejo da infecção pelo HIV em adultos. Brasília. 2018a; 416p.

Brasil. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e das Hepatites Virais. Boletim epidemiológico. Hepatites virais 2018. Brasília. 2018b. Vol. 49. No 31.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico de HIV/Aids. Brasília. 2019a; Número Especial:72p.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico Hepatites virais. Brasília. 2019b;7(1):76p.

Brites C, Alencar R, Gusmão R, Pedroso C, Netto EM, Pedral-Sampaio D, et al. Co-infection with HTLV-1 is associated with a shorter survival time for HIV-1-infected patients in Bahia, Brazil. AIDS. 2001; 15(15):2053-5.

Brites C, Sampaio J, Oliveira A. HIV/Human T-cell lymphotropic virus coinfection revisited: impact on AIDS progression. AIDS Rev. 2009; 11:8-16.

Brites C, Abrahão M, Bozza P, Netto EM, Lyra A, Bahia F. Infection by HTLV-1 is associated with high levels of proinflammatory cytokines in HIV-HCV–coinfected patients. J Acquir Immune Defic Syndr. 2018; 77(2):1.

Calattini S, Chevalier SA, Duprez R, Bassot S, Froment A, Mahieux R, et al. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. Retrovirology. 2005; 2:30.

Calattini S, Betsem E, Bassot S, Chevalier SA, Mahieux R, Froment A, et al. New strain of human T lymphotropic virus (HTLV) type 3 in a Pygmy from Cameroon with peculiar HTLV serologic results. J Infect Dis. 2009;199(4):561-4.

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

Campos KR, Gonçalves MG, Caterino-de-Araujo A. Failures in detecting HTLV-1 and HTLV-2 in patients infected with HIV-1. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2017a; 33(4):382-5.

Campos KR, Gonçalves MG, Costa NA, Caterino-de-Araujo A. Comparative performances of serologic and molecular assays for detecting human T lymphotropic virus type 1 and type 2 (HTLV-1 and HTLV-2) in patients infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Braz J Infect Dis*. 2017b; 21(3):297-305.

Campos KR, Alves FA, Lemos MF, Moreira RC, Caterino-de-Araujo A. The reasons to include the serology of human T-lymphotropic virus types 1 and 2 (HTLV-1 and HTLV-2) in the clinical follow-up of patients with viral hepatitis B and C in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020a; 14(5):e0008245.

Campos KR, Santos FLN, Da Silva Brito VS, Gonçalves NLS, Araujo THA, Galvão-Castro B, et al. Line Immunoassay for confirmation and discrimination of human T-cell lymphotropic virus infections in inconclusive western blot serum samples from Brazil. *J Clin Microbiol*. 2020b; 23;58(1). pii:e01384-19.

Campos KR, Caterino-de-Araujo A. Provirus mutations of human T-lymphotropic virus 1 and 2 (HTLV-1 and HTLV-2) in HIV-1 coinfecting individuals. *mSphere*. 2020; 5e:00923-20.

Cánepa C, Salido J, Ruggieri M, Fraile S, Pataccini G, Berini C, et al. Low Proviral Load is Associated with Indeterminate Western Blot Patterns in Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Infected Individuals: Could Punctual Mutations be Related? *Viruses*. 2015; 7(11):5643-58.

Cardoso DF, De Souza FV, Fonseca LAM, Duarte AJS, Casseb J. Influence of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) infection on laboratory parameters of patients with chronic hepatitis C virus. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2009; 51(6):325-9.

Carpentier A, Barez P, Hamaidia M, Gazon H, Brogniez A, Perike S, et al. Modes of human T cell leukemia virus type 1 transmission, replication and persistence. *Viruses*. 2015; 7:3603-24.

Cassar O, Gessain A. Serological and Molecular Methods to Study Epidemiological Aspects of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Infection. *Methods Mol Biol*. 2017; 1582:3-24. doi:10.1007/978-1-4939-6872-5_1

Casseb J, Fukumori LMI, Vergara MPP, Sanabani S, Marchiori PE, Duarte AJS, et al. Lack of tax diversity for tropical spastic paraparesis/human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-I) associated myelopathy development in HTLV-I-infected subjects in São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 2006; 101(3):273-6.

Castro E, Roger E. Hepatitis C virus/human T lymphotropic virus 1/2 coinfection: regional burden and virological outcomes in people who inject drugs. *World J Virol*. 2016; 5(2):68-72.

Catalan-Soares B, Carneiro-Proietti ABF, Proietti FA. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. *Cad Saúde Pública*. 2005; 21(3):926-31.

Caterino-de-Araujo A, Santos-Fortuna E, Meleiro MCZ, Suleiman J, Calabrò ML, Favero A, et al. Sensitivity of two enzyme-linked immunosorbent assay tests in relation to Western Blot in detecting human T-cell lymphotropic virus types I and II infection among HIV-1 infected patients from São Paulo, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1998; 30:173-82.

Caterino-de-Araujo A, Magri MC, Bertazzoni U, Romanelli MG. Molecular characterization of a Tax-2C protein variant identified in Brazilian subjects infected by HTLV-2C. *Retrovirology*. 2014;11(Suppl 1):P110. doi: 10.1186/1742-4690-11-S1-P110.

Caterino-de-Araujo A, Sacchi CT, Gonçalves MG, Campos KR, Magri MC, Alencar WK. Short Communication: Current prevalence and risk factors associated with human T lymphotropic virus type 1 and human T lymphotropic virus type 2 infections among HIV/AIDS patients in São Paulo, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2015; 31(5):543-9.

Caterino-de-Araujo A, Alves FA, Campos KR, Lemos MF, Moreira RC. Making the invisible visible: searching for human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2 (HTLV-1 and HTLV-2) in Brazilian patients with viral hepatitis B and C. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 2018; 113(2):130-4.

Caterino-de-Araujo A, Campos KR, Petrucci TV, Silva RX, Lemos MF, Moreira RC. Surveillance of human retroviruses (HTLV-1, HTLV-2, and HIV) in blood samples from patients with hepatitis B and C in São Paulo, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2020; 53:e20190378.

Chang CS, Wu YW, Pan YC, Chen ZY, Wang CS. Feasibility of human T-lymphotropic virus type I screening using pooled sera. *J Formos Med Assoc*. 2002; 101(11):775-8.

Coffin JM. Retroviridae and their replication In *Virology*. Raven Press, New York. 1996. pp.1767-1848.

Cook LBM, Taylor GP. HTLV-1: the silent impact revealed. *Lancet Infect Dis*. 2020; 20(1):12-4.

Costa JMP, Segurado AC. Molecular evidence of human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2 (HTLV-1 and HTLV-2) infections in HTLV seroindeterminate individuals from São Paulo, Brazil. *J Clin Virol*. 2009; 44:185-9.

Costa EAS, Magri MC, Caterino-Araujo A. The best algorithm to confirm the diagnosis of HTLV-1 and HTLV-2 in at-risk individuals from São Paulo, Brazil. *J Virol Methods*. 2011; 173:280-3.

da Silva Brito VS, Santos FLN, Gonçalves NLS, Araujo THA, Nascimento DSV, Pereira FM, et al. Performance of commercially available serological screening tests for human t-cell lymphotropic virus infection in Brazil. *J Clin Microbiol*. 2018; 56(12):e00961-18.

de-Araujo AC, Casseb JSR, Neitzert E, Xavier de Souza ML, Mammano F, Del Mistro A, et al. HTLV-I and HTLV-II infections among HIV-1 seropositive patients in São Paulo, Brazil. *Eur J Epidemiol*. 1994; 10:165-71.

Dalton S, Marais R, Wynne J, Treisman R. Isolation and characterization of SRF accessory proteins. *Phil Trans R Soc Lond B*. 1993; (340):325-332.

Desrames A, Cassar O, Gout O, Hermine O, Taylor GP, Afonso PV, et al. Northern African strains of human T-lymphotropic virus type 1 arose from a recombination event. *J Virol*. 2014; 88(17):9782-8.

Dourado I, Alcantara LC, Barreto ML, Teixeira MG, Galvão-Castro B. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2003; 34: 527-31.

Eiraku N, Novoa P, Ferreira MC, Monken C, Ishak R, Ferreira OC, et al. Identification and characterization of new and distinct molecular subtype of human T-cell lymphotropic virus type 2. *J Virol*. 1996; 70(3):1481-92.

Esnault C, Millet J, Schwartz O, Heidmann T. Dual inhibitory effects of APOBEC family proteins on retrotransposition of mammalian endogenous retroviruses. *Nucleic Acids Res*. 2006; 34(5):1522-31.

Espíndola OM, Vizzoni AG, Lampe E, Andrada-Serpa MJ, Araújo AQC, Leite ACC. Hepatitis C virus and human T-cell lymphotropic virus type 1 co-infection: impact on liver disease, virological markers, and neurological outcomes. *Int J Infect Dis*. 2017; 57:116-22.

Etzel A, Shibata GY, Rozman M, Jorge ML, Damas CD, Segurado AA. HTLV-1 and HTLV-2 infections in HIV-infected individuals from Santos, Brazil: Seroprevalence and risk factors. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2001; 26:185-90.

Eusebio-Ponce E, Anguita E, Paulino-Ramirez R, Candel FJ. HTLV-1 infection: An emerging risk. Pathogenesis, epidemiology, diagnosis and associated diseases. *Rev Esp Quimioter*. 2019;32(6):485-96.

Fan J, Ma G, Nosaka K, Tanabe J, Satou Y, Koito A, et al. APOBEC3G generates nonsense mutations in human T-cell leukemia virus type 1 proviral genomes in vivo. *J Virol*. 2010; 84(14):7278-87.

Filippone C, Bassot S, Betsem E, Tortevoeye P, Guillotte M, Mercereau-Puijalon O, et al. A new and frequent human T-cell leukemia virus indeterminate Western blot pattern: epidemiological determinants and PCR results in central African inhabitants. *J Clin Microbiol*. 2012; 50(5):1663-72.

Futsch N, Mahieux R, Dutartre H. HTLV-1, the other pathogenic yet neglected human retrovirus: from transmission to therapeutic treatment. *Viruses*. 2018; 10(1):1-25.

Gallego S, Frutos MC, Blanco S, Castro G, Balangero M, Panigo DE, et al. First Description of Seronegative HTLV-1 Carriers in Argentina. *Am J Trop Med Hyg*. 2020; 102(4):889-95.

Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A, et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet*. 1985; 2:407-10.

Gessain A, Cassar O. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. *Front Microbiol*. 2012; 3:388.

Global Hepatitis Report 2017. Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Gomes Y, Caterino-de-Araujo A, Campos KR, Gonçalves MG, Leite AC, Lima MA, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid and accurate confirmatory diagnosis of HTLV-1/2 infection. *Viruses* 2020; 12(9), 981.

Gonçalves MG. Padronização e validação da PCR em tempo real para a detecção rápida e quantificação de carga proviral de HTLV-1 e HTLV-2. Tese (Doutorado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2019; 158p.

Gorgoni B, Gray NK. The roles of cytoplasmic poly(A)-binding proteins in regulating gene expression: A developmental perspective. *Brief Funct Genom Proteo*. 2004; 3(2):125-41.

Harris RS, Dudley JP. APOBECs and virus restriction. *Virology*. 2015; 479-480:131-45.

Hashikura Y, Umeki K, Umekita K, Nomura H, Yamada A, Yamamoto I, et al. Infection of defective human T-lymphotropic virus type 1. *Hum Cell*. 2017; 30(2):117-23.

Haziot M E, Gascon MR, Assone T, Fonseca LAM, Luiz OC, Smid J, et al. Detection of clinical and neurological signs in apparently asymptomatic HTLV-1 infected carriers: Association with high proviral load. *PLOS Negl Trop Dis*. 2019; 13(5):e0006967.

Hedberg ST, Eriksson L, Demontis MA, Mölling P, Sundqvist M, Taylor G, et al. Droplet digital PCR for absolute quantification of proviral load of human T-cell lymphotropic virus (HTLV) types 1 and 2. *J Virol Methods*. 2018; 260:70-4

Heneine W, Kaplan J, Gracia F, Lai R, Roberts B, Levine PH, et al. HTLV-II endemicity among Guaymí Indians in Panama. *N Engl J Med*. 1991; 324:65.

Hisada M, Chatterjee N, Zhang M, Battjes R, Goedert J. Increased hepatitis C virus load among injection drug users infected with human

immunodeficiency virus and human T lymphotropic virus type II. *J Infect Dis.* 2003; 188:891-7.

ICTV, Comitê Internacional de Taxonomia Viral (CITV) Taxonomy - *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV). Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy>. Acessado em 30 de maio de 2020

Ishak R, Harrington WJ Jr, Azevedo VN, Eiraku N, Ishak MO, Guerreiro JF, et al. Identification of human T-cell lymphotropic virus type IIa infection in the Kayapo, an Indigenous population of Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1995; (7):813-21.

Ishak R, Vallinoto ACR, Azevedo VN, Lewis M, Hall WW, Ishak MOG. Molecular evidence of mother-to-child transmission of HTLV-IIc in the Kararao Village (Kayapo) in the Amazon Region of Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2001; 34(6):519-25.

Ishak R, Vallintoto ACR, Azevedo VN, Ihak MQ. Epidemiological aspects of retrovirus (HTLV) infection among indian populations in the Amazon region of Brazil. *Cad Saúde Pública,* 2003; 19:901-14.

Ishak R, Vallinoto ACR, Azevedo VN, Vicente ACP, Hall WW, Ishak MOG. Molecular evidence for infection by HTLV-2 among individuals with negative serological screening tests for HTLV antibodies. *Epidemiol Infect.* 2007; 135:604-9.

Ishak R, Machado LFA, Cayres-Vallinoto I, Ishak MOG, Vallinoto ACR. Infectious agents as markers of human migration toward the Amazon region of Brazil. *Front Microbiol.* 2017; 8 article 1663.

Jacob F, Santos-Fortuna E, Azevedo RS, Caterino-de-Araujo A. Performances of HTLV serological tests in diagnosing HTLV infection in high-risk population of São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop S. Paulo.* 2007; 49(6):361-4.

Jacob F, Santos-Fortuna E, Azevedo RS, Caterino-de- Araujo A. Serological patterns for HTLV-I/II and its temporal trend in high-risk populations attended at Public Health Units of São Paulo, Brazil J Clin Virol. 2008; 42(2):149-55.

Joint United Nations Program on HIV/AIDS - UNAIDS. 2019. Disponível em: <https://unaids.org.br/wpcontent/uploads/2019>. [acesso em 30 de maio 2020].

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

Kanzaki LIB, Casseb J. Human T-lymphotropic viruses evolution possibly explained by primate deltaretrovirus geographical segregation. Retrovirology. 2008; (Auckl) 1:1178–238.

Kashima S, Alcantara LC, Takayanagui OM, Cunha MA, Castro BG, Pombo-de-Oliveira MS, et al.: Distribution of human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) subtypes in Brazil: Genetic characterization of LTR and tax region. AIDS Res Hum Retroviruses. 2006; 22(10):953–9.

Katsuya H, Islam S, Tan BJY, Ito J, Miyazato P, Matsuo M, et al. The nature of the HTLV-1 provirus in naturally infected individuals analyzed by the viral DNA-capture-seq approach. Cell Reports 2019; 29:724–35.

Kishihara Y, Furusyo N, Kashiwagi K, Mitsutake A, Kashiwagi S, Hayashi J. Human T lymphotropic virus type 1 infection influences hepatitis C virus clearance. J Infect Dis. 2001; 184(9):1114-9.

Kobayashi N, Konishi H, Sabe H, Shigesada K, Noma T, Hatanaka M, et al. Genomic structure of HTLV (human T-cell leukemia virus): detection of defective genome and its amplification in MT-2 cells. EMBO J. 1984; 3(6):1339-43.

Kuramitsu M, Okuma K, Nakashima M, Sato T, Sazaki D, Hasegawa H, et al. Development of reference material with assigned value for human T-cell

leucemia virus type 1 quantitative PCR in Japan. *Microbiol Immunol*. 2018; 62:673-6.

Kuramitsu M, Sekizuka T, Yamochi T, Firouzi S, Sato T, Umeki K, et al. Proviral features of human T cell leukemia virus type 1 in carriers with indeterminate Western blot analysis results. *J Clin Microbiol*. 2017; 55:2838-49.

Laurentino RV, Lopes IG, Azevedo VN, Machado LF, Moreira MR, Lobato L, et al. Molecular characterization of human T-cell lymphotropic virus coinfecting human immunodeficiency virus 1 infected patients in the Amazon region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005 Jul;100(4):371-6.

Le Marchand C, Bahia F, Page K, Brites C. Hepatitis C virus infection and spontaneous clearance in HTLV-1 and HIV co-infected patients in Salvador, Bahia, Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2015; 19(5):486-91.

Lewis MJ, Novoa P, Ishak R, Ishak M, Salemi M, Vandamme AM, et al. Isolation, cloning, and complete sequence of a phenotypically distinct Brazilian isolate of human T-lymphotropic virus type II (HTLV-II). *Viol*. 2000; (271):142-54.

Lewis MJ, Sheehy N, Salemi M, Vandamme AM, Hall WW. Comparison of CREB- and NK-B-mediated transactivation by human T lymphotropic virus type II (HTLV-II) and type I (HTLV-I) Tax proteins. *Viol*. 2002; (295):182-9.

Magri MC, Morimoto HK, Brigido LFM, Rodrigues R, Caterino-de-Araujo A. Long terminal repeat sequence analysis of HTLV-2 molecular variants identified in Southern Brazil. *AIDS Res Human Retroviruses*. 2010; 26(12):1327-31.

Magri MC, Brigido LF, Rodrigues R, Morimoto HK, Ferreira JL, Caterino-de-Araujo A. Phylogenetic and similarity analysis of HTLV-1 isolates from HIV-coinfected patients from the south and southeast regions of Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012a; 28(1):110-4.

Magri MC, Brigido LF, Rodrigues R, Morimoto HK, Caterino-de-Araujo A. Tax gene characterization of human T-lymphotropic virus type 1 strains from Brazilian HIV-coinfected patients. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2012b; 28(12):1775-8.

Magri MC, Costa EAS, Caterino-de-Araujo A. LTR point mutations in the Tax-responsive elements of HTLV-1 isolates from HIV/HTLV-1-coinfected patients. *Virol J*. 2012c; 9:184.

Magri MC, Brigido LFM, Morimoto HK, Caterino-de-Araujo A. HTLV type 2a strains among HIV-1-coinfected patients from Brazil have originated mostly from Brazilian Amerindians. *AIDS Res Human Retroviruses*. 2013; 29: 1010-18.

Marcon CEM, Campos KR, da Silva GB, Schuelter-Trevisol F, Schlindwein AD, Trevisol DJ, et al. The first survey of human T-cell lymphotropic viruses (HTLV) in HIV/AIDS patients in Santa Catarina State, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2019; 61:e53.

Marr I, Davies J, Baird RW. Hepatitis B virus and human T-cell lymphotropic virus type 1 co-infection in the Northern territory, Australia. *Int J Infect Dis*. 2017; 58:90-5.

Mahieux R, Horal P, Maucière P, Mercereau-Puijalon O, Guillotte M, Meertens L, et al. Human T-cell lymphotropic virus type 1 gag indeterminate western blot patterns in Central Africa: relationship to *Plasmodium falciparum* infection. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(11):4049-57.

Mahieux R, Gessain A. HTLV-3/STLV-3 and HTLV-4 viruses: Discovery, epidemiology, serology and molecular aspects. *Viruses*. 2011; 3(7):1074-90.

Malik B, Taylor GP. Can we reduce the incidence of adult T-cell leukaemia/lymphoma? Cost-effectiveness of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) antenatal screening in the United Kingdom. *Br J Haematol*. 2019; 184(6):1040-43.

Mangano AM, Remesar M, del Pozo A, Sen L. Human T lymphotropic virus types I and II proviral sequences in Argentinian blood donors with indeterminate Western blot patterns. *J Med Virol*. 2004; 74(2):323-327.

Mangeat B, Turelli P, Caron G, Friedli M, Perrin L, Trono D. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature*. 2003; 424(6944):99-103.

Martins ML, Santos AC, Namen-Lopes MS, Barbosa-Stancioli EF, Utsch DG, Carneiro-Proietti AB. Long-term serological follow-up of blood donors with an HTLV-indeterminate western blot: antibody profile of seroconverters and individuals with false reactions. *J Med Virol*. 2010; 82(10):1746-53.

Matsuoka M, Green PL. The HBZ gene, a key player in HTLV-1 pathogenesis. *Retrovirology*. 2009; 6:71.

Melamed A, Witkover AD, Laydon DJ, Brown R, Ladell K, Miners K, et al.: Clonality of HTLV-2 in natural infection. *PLoS Pathog*. 2014; 10(3):e1004006.

Mesquita F, Kral A, Reingold A, Bueno R, Trigueiros D, Araujo PJ, et al.: Trends of HIV infection among injection drug users in Brazil in the 1990s: the impact of changes in patterns of drug use. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2001; 28:298-302.

Mesquita F, Santos ME, Benzaken A, Corrêa R, Cattapan E, Sereno LS, et al. The Brazilian comprehensive response to hepatitis C: from strategic thinking to access to interferon-free therapy. *BMC Public Health*. 2016; 16:1132.

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

Miyazaki M, Yasunaga J-I, Taniguchi Y, Tamiya S, Nakahata T, Matsuoka M. Preferential selection of human T-cell leukemia virus type 1 provirus lacking the 5' long terminal repeat during oncogenesis. *J Virol* 2007; 81:5714–23.

Montanheiro P, Olah I, Fukumori LM, Smid J, Oliveira AC, Kanzaki LI, et al. Low DNA HTLV-2 proviral load among women in São Paulo City. *Virus Res.* 2008; 135(1):22-5.

Moreira M, Ramos A, Netto EM, Brites C. Characteristics of co-infections by HCV and HBV among brazilian patients infected by HIV-1 and/or HTLV-1. *Braz J Infect Dis.* 2013; 17(6):661-6.

Morimoto HK, Caterino-de-Araujo A, Morimoto AA, Reiche EMV, Ueda LT, Matsuo T, et al. Seroprevalence and risk factors for human T cell lymphotropic virus type 1 and 2 infection in human immunodeficiency virus-infected patients attending AIDS Referral Center Health Units in Londrina and other communities in Paraná, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2005; 21: 256-62.

Morimoto HK, Morimoto AA, Reiche EMV, Ueda LT, Matsuo T, Reiche FV, et al. Difficulties in the diagnosis of HTLV-2 infection in HIV/AIDS patients from Brazil: comparative performances of serologic and molecular assays, and detection of HTLV-2b subtype. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2007; 49(4): 225-30.

Mota-Miranda AC, Araújo SP, Dias JP, Colin DD, Kashima S, Covas DT, et al. HTLV-1 infection in blood donors from the Western Brazilian Amazon region: seroprevalence and molecular study of viral isolates. *J Med Virol.* 2008; 80(11):1966-71.

Mota-Miranda AC, Barreto FK, Amarante MFC, Batista E, Monteiro-Cunha JP, Farre L, et al. Molecular characterization of HTLV-1 gp46 glycoprotein from health carriers and HAM/TSP infected individuals. *Virol J.* 2013; 10:75.

Murphy EL, Mahieux R, de Thé G, Tekaiia F, Ameti D, Horton J, et al. Molecular epidemiology of HTLV-II among United States blood donors and intravenous drug users: an age-cohort effect for HTLV-II RFLP type aO. *Virology.* 1998;242(2):425-34.

Murphy EL. The clinical epidemiology of human T-lymphotropic virus type II (HTLV-II). *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1996;13 Suppl 1:S215-S219.

Murphy EL, Lee TH, Chafets D, Nass CC, Wang B, Loughlin K, et al. Higher human T lymphotropic virus (HTLV) provirus load is associated with HTLV-I versus HTLV-II, with HTLV-II subtype A versus B, and with male sex and a history of blood transfusion. *J Infect Dis.* 2004; 190:504–10.

Neto WK, Da-Costa AC, Oliveira ACS, Martinez VP, Nukui Y, Sabino E, et al. Correlation between LTR point mutations and proviral load levels among Human T cell Lymphotropic Virus type 1 (HTLV-1) asymptomatic carriers. *Viol J.* 2011, 8:535.

Nobre AFS, Almeida DdS, Ferreira LC, Ferreira DL, Júnior ECS, Viana MdNdSdA, et al. Low genetic diversity of the human T-cell lymphotropic virus (HTLV-1) in an endemic area of the Brazilian Amazon basin. *PLoS ONE.* 2018; 13(3):e0194184.

Novoa P, Oliveira ACP, Posada-Vergara MP, Duarte AJS, Casseb J. Molecular characterization of human T-cell lymphotropic virus type 2 (HTLV-II) from people living in urban areas of Sao Paulo city: Evidence of multiple subtypes circulation. *J Med Virol.* 2007; (79):182-7.

Oikawa T, Yamada T. Molecular biology of the Ets family of transcription factors. *Gene.* 2003; (303):11-34.

Olah I, Fukumori LMI, Smid J, Penalva de Oliveira AC, Duarte AJS, Casseb J. Neither molecular diversity of envelope, immunosuppression status, nor proviral load causes indeterminate HTLV Western blot profiles in samples from human T-cell lymphotropic virus type 2 (HTLV-2)-infected individuals. *J Med Virol.* 2010; 82:837-42.

Okuma K, Kuramitsu M, Niwa T, Taniguchi T, Masaki Y, Ueda G, et al. Establishment of a novel diagnostic test algorithm for human T-cell leukemia virus type 1 infection with line immunoassay replacement of western blotting:

a collaborative study for performance evaluation of diagnostic assays in Japan. *Retrovirology*. 2020; 17(1):26.

Paiva A, Casseb J. Sexual transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1. *Rev Soc Bras Med Trop Sao Paulo*. 2014; 47(3):265-74.

Paiva A, Casseb J. Origin and prevalence of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and type 2 (HTLV-2) among indigenous populations in the Americas. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2015; 57(1):1-13.

Paiva A, Smid J, Haziot MEJ, Assone T, Pinheiro S, Fonseca LAM, et al. High risk of heterosexual transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1 infection in Brazil. *J Med Virol*. 2017; 89:1287-94.

Pereira FM, Almeida MdCCd, Santos FLN, Carreiro RP, Galvão-Castro B, Grass iMFR. Distribution of HumanT-Lymphotropic Virus (HTLV) and Hepatitis C Co-infectionin Bahia, Brazil. *PLos ONE*. 2020; 15(7):e0223087.

Pessôa R, Watanabe JK, Nukui Y, Pereira J, Kasseb J, Penalva de Oliveira AC, et al. Molecular characterization of human T-cell lymphotropic virus type 1 full and partial genomes by illumina massively parallel sequencing technology. *PLos ONE*. 2014; 9(3):e93374.

Pilotti E, Elviri L, Vicenzi E, Bertazzoni U, Re MC, Sonia Allibardi S, et al. Postgenomic up-regulation of CCL3L1 expression in HTLV-2–infected persons curtails HIV-1 replication. *Blood*. 2007; 109(5):1850–6

Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980; 77(12):7415-9.

Proietti FA, Carneiro-Proietti ABF, Catalan-Soares BC, Murphy EL. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene*. 2005; 24:6058–68

Puccioni-Sohler M, Grassi MFR, Galvão-Castro B, Caterino A, Carneiro-Proietti ABF, Vicente ACP, et al. Increasing awareness of human T-lymphotropic virus type-1 infection: a serious, invisible, and neglected health problem in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2019;52:e20190343.

Ramirez E, Fernandez J, Cartier L, Villota C, Rios M. Defective human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) provirus in seronegative tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM) patients. *Virus Research* 2003; 91:231-239.

Rego FFA, Mota–Miranda A, Santos ES, Galvão–Castro B, Alcantara LC. Seroprevalence and molecular epidemiology of HTLV-1 isolates from HIV-1 co-infected women in Feira de Santana, Bahia, Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2010; 26(12):1333-9.

Renner JD, Laurino JP, Menna-Barreto M, Schmitt VM. Molecular evidence of HTLV-II subtype B among an urban population living in South Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2006; (22):301-6.

Rosadas C, Taylor GP. Mother-to-Child HTLV-1 Transmission: Unmet research needs. *Front. Microbiol*. 2019; 10:999.

Rosadas C, Tosswill JHC, Tedder R, Taylor GP. Pregnancy does not adversely impact diagnostic tests for HTLV-1/2 infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019; 13(9):e0007736.

Roucoux DF, Murphy EL. The epidemiology and disease outcomes of human T-lymphotropic virus type II. *AIDS Rev*. 2004; 6(3):144-54.

Rouet F, Meertens L, Courouble G, Herrmann-Storck C, Pabingui R, Chancerel B, et al. Serological, epidemiological, and molecular differences between human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-seropositive healthy carriers and persons with HTLV-I Gag indeterminate Western blot patterns from the Caribbean. *J Clin Microbiol*. 2001; 39:1247–53.

Ruiz-Mateos E, Ruiz-León MJ, Tarancón-Díez L, Gutiérrez C, Dronda F, Domínguez-Molina B, et al. High CD8 T cell percentage and HCV replication

control are common features in HIV-1 controllers and HTLV-2-co-infected patients with a history of injection drug use. *Virus Res.* 2019; 264:40-4.

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

Santos TJT, Costa CM, Goubau P, Vandamme AM, Desmyter J, Van Doren S, et al. Western blot seroindeterminate individuals for human T-lymphotropic virus 1/2 (HTLV-1/2) in Fortaleza (Brazil): a serological and molecular diagnostic and epidemiological approach. *Braz J Infect Dis.* 2003; 7:202–9.

Santos EL, Tamegão-Lopes B, Machado LFA, Ishak MOG, Ishak R, Lemos JAR, et al. Caracterização molecular do HTLV-1/2 em doadores de sangue em Belém, Estado do Pará: primeira descrição do subtipo HTLV-2b na região Amazônica [Molecular characterization of HTLV-1/2 among blood donors in Belém, State of Pará: first description of HTLV-2b subtype in the Amazon region]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009;42(3):271-6.

Satou Y, Matsuoka M. HTLV-1 and the host immune system: how the virus disrupts immune regulation, leading to HTLV-1 associated diseases. *J Clin Exp Hematol.* 2010; 50(1):1-8.

Seiki M, Hattori S, Hirayama Y, Yoshida M. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983; 80:3618-22.

Sheehy N, Lillis L, Watters K, Lewis M, Gautie V, Hall W. Functional analysis of human T lymphotropic virus type 2 Tax proteins. *Retrovirology.* 2006; 3:20

Shindo N, Alcantara LC, Van Dooren S, Salemi M, Costa MC, Kashima S, et al. Human retroviruses (HIV and HTLV) in Brazilian Indians: seroepidemiological study and molecular epidemiology of HTLV type 2 isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2002; 18:71-7.

Silva EA, Otsuki K, Leite AC, Alamy AH, Sá-Carvalho D, Vicente AC. HTLV-II infection associated with a chronic neurodegenerative disease: clinical and molecular analysis. *J Med Virol.* 2002; 66:253-7.

Silva IC, Pinheiro BT, Nobre AFS, Coelho JL, Pereira CCC, Ferreira LSC, et al. Moderate endemicity of the human T-lymphotropic virus infection in the metropolitan region of Belém, Pará, Brazil. *Rev Bras Epidemiol.* 2018; 21:e180018.

Silva RXD, Campos KR, Caterino-de-Araujo A. Pooling of sera for human T-cell lymphotropic virus (HTLV) screening in a time of increasing health care expenditure and limited resources. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2020; 62:e27.

Slattery JP, Franchini G, Gessain A. Genomic evolution, patterns of global dissemination, and interspecies transmission of human and simian T-cell leukemia/lymphotropic viruses. *Genome Res.* 1999; 9:525-40.

Switzer WM, Owen SM, Pieniazek D, Nerurkar V, Duenas-Barajas E, Heneine W, et al. Molecular analysis of human T-cell lymphotropic virus subtype II from Wayu Indians of Colombia demonstrates two subtypes of HTLV-IIb. *Virus Gene.* 1995; (10):153-62

Switzer WM, Black FL, Pieniazek D, Biggar RJ, Lal RB, Heneine W. Endemicity and phylogeny of the Human T cell lymphotropic virus type II subtype A from the Kayapo Indians of Brazil: Evidence for limited regional dissemination. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 1996; (12):635-40.

Switzer WM, Hewlett I, Aaron L, Wolfe ND, Burke DS, Heneine W. Serologic testing for human T-lymphotropic virus-3 and -4. *Transfusion.* 2006; 46(9):1647-8.

Tagaya Y, Matsuoka M, Gallo R. 40 years of the human T-cell leukemia virus: past, present, and future. *F1000Res.* 2019; 8(F1000 Faculty Rev):228.

Takahashi H, Zhu SW, Ijichi S, Vahlne A, Suzuki H, Hall WW. Nucleotide sequence analysis of human T cell leukemia virus, type II (HTLV-II) isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1993; 9(8):721-32.

Takenouchi H, Umeki K, Sasaki D, Yamamoto I, Nomura H, Takajo I, et al. Defective human T-lymphotropic virus type 1 provirus in asymptomatic carriers. *Int J Cancer*. 2011; 128:1335-43.

Tamiya S, Matsuoka M, Etoh K-I, Watanabe T, Kamihira S, Yamaguchi K, et al. Two types of defective human T-lymphotropic virus type I provirus in Adult T-cell Leukemia. *Blood*, 1996; 88:3065-73.

Tang Y, George AM, Petrechko O, Nouvet FJ, Sweet SD, Tanaka Y, et al. Pseudotyping of HIV-1 with human T-lymphotropic virus 1 (HTLV-1) envelope glycoprotein during HIV-1–HTLV-1coinfection facilitates direct HIV-1 infection of female genital epithelial cells: Implications for sexual transmission of HIV-1. *mSphere*. 2018; 3:e00038-18.

Turci M, Pilotti E, Ronzi P, Magnani G, Boschini A, Parisi SG, et al. Coinfection with HIV-1 and human T-cell lymphotropic virus type II in intravenous drug users is associated with delayed progression to AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*. 2006; 41(1):100-6.

Turpin J, Yurick D, Khoury G, Pham H, Locarnini S, Melamed A, et al. Impact of Hepatitis B virus coinfection on human T-lymphotropic virus type 1 clonality in an Indigenous population of Central Australia. *J Infect Dis*. 2019; 219(4):562-7.

Vallinoto ACR, Ishak MOG, Azevedo VN, Vicente ACP, Otsuki K, Hall WW, et al. Molecular epidemiology of human T-lymphotropic virus type II infection in Amerindian and urban populations of the Amazon region of Brazil. *Hum Biol*. 2002; (74):633-44.

Vandamme AM, Salemi M, Van Brussel M, Liu HF, Laethem KV, Ranst MV, et al. African origin of human T-lymphotropic virus type 2 (HTLV-2) supported

by a potential new HTLV-2d subtype in Congolese Bambuti Efe Pygmies. *J Virol*. 1998; 72:4327-40.

Varma M, Rudolph DL, Knuchel M, Switzer WM, Hadlock KG, Velligan M, et al. Enhanced specificity of truncated transmembrane protein for serologic confirmation of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 infections by Western blot (immunoblot) assay containing recombinant envelope glycoproteins. *J Clin Microbiol*. 1995; 33:3239–44.

Viana MNSA, Nobre AFS, Costa-Júnior E, Silva IC, Pinheiro BT, Pereira CCC, et al. Stability of the HTLV-1 glycoprotein 46 (gp46) gene in an endemic region of the Brazilian Amazon and the presence of a significant mutation (N93D) in symptomatic patients. *Virol J*. 2018; 15:80.

Willems L, Hasegawa H, Acola R, Bangham C, Bazarbachi A, Bertazzoni U, et al. Reducing the global burden of HTLV-1 infection: an agenda for research and action. *Antiviral Res*. 2017; 137:41-8.

Wolfe ND, Heneine W, Carr JK, Garcia AD, Shanmugam V, Tamoufe U, et al. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005, 102(22):7994-9.

World Health Organization (WHO). Hepatitis C. 2019a [acessado em 18 de julho de 2019]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>

World Health Organization (WHO). Hepatitis C. 2019b [acessado em 18 de julho de 2019]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>

Yao J, Wigdahl B. Human T cell lymphotropic virus type i genomic expression and impact on intracellular signaling pathways during neurodegenerative disease and leukemia. *Front Biosc*. 2000; 5:138-68.

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 U S A*. 1982; 79:2031–5.

Yurick D, Khoury G, Clememns B, Loh L, Pham H, Kedzierska K, et al. Multiplex droplet digital PCR assay for quantification of human T-cell leukemia virus type 1 subtype c DNA proviral load and T cells from blood and respiratory exudates sampled in a remote setting. *J Clin Microbiol*. 2019; 57(2):e01063-18.

Zanjani DS, Shahabi M, Talaei N, Afzalaghaee M, Tehranian F, Bazargani R. Molecular analysis of human T cell lymphotropic virus type 1 and 2 (HTLV-1/2) seroindeterminate blood donors from northeast Iran: evidence of proviral tax, env, and gag sequences. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2011; 27:131–135.

Zheng H, Wolfe ND, Sintasath DM, Tamoufe U, Lebreton M, Djoko CF, et al. Emergence of a novel and highly divergent HTLV-3 in a primate hunter in Cameroon. *Virology*. 2010; 401:137–45.

Zrein M, Louwagie J, Boeykens H, Govers L, Hendrickx G, Bosman F, et al. Assessment of a new immunoassay for serological confirmation and discrimination of human T-cell lymphotropic virus infections. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1998; 5:45-9.



CENTRO DE REFERÊNCIA E TREINAMENTO DST/AIDS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Vigilância e diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 em indivíduos infectados pelo HIV

Pesquisador: Adele Caterino de Araujo

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 11302512.0.3002.5375

Instituição Proponente: Instituto Adolfo Lutz

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO
CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO
Instituto Adolfo Lutz
Centro de Referência e Treinamento DST/AIDS
Ministério da Saúde

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 598.565-0

Data da Relatoria: 29/11/2013

Apresentação do Projeto:

O projeto avaliará pacientes com HIV/Aids atendidos no CRT-DST/Aids de São Paulo. Determinará a taxa de co-infecção HIV/HTLV-1/2 e o desempenho dos testes confirmatórios imunocromatográfico e PCR em tempo real no diagnóstico do HTLV, assim como serão realizadas a caracterização molecular dos vírus e a avaliação do papel das células T reguladoras na co-infecção. Será realizada a determinação de polimorfismos no gene da IL 28B, com finalidade de associação com HTLV-1, HTLV-2, HAM/TSP e o Virus da Hepatite C.

Objetivo da Pesquisa:

Conhecer a prevalência da infecção pelo HTLV-1 e HTLV-2 em pacientes soropositivos para o HIV em serviço especializado do Estado de São Paulo. Pesquisar marcadores imunológicos e virológicos de valor diagnóstico e prognóstico na co-infecção HIV/HTLV-1 e HIV/HTLV-2.

Contribuir para o desenvolvimento da vigilância desse agravo na população. Identificar o melhor teste confirmatório de infecção por HTLV-1/2 na co-infecção com o HIV. Detectar possíveis flutuações de carga proviral de HTLV na co-infecção. Caracterizar cepas de HIV e HTLV-1/2 nos

Endereço: SANTA CRUZ 81 Anexo Pesquisa 1º andar

Bairro: VILA MARIANA

CEP: 04.121-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)5087-9837

Fax: (11)5087-9837

E-mail: cep@crt.saude.sp.gov.br



CENTRO DE REFERÊNCIA E TREINAMENTO DST/AIDS



Continuação do Parecer: 598.565-0

co-infectados. Avaliar o número e entender a função das células T reguladoras na co-infecção. Correlacionar os resultados obtidos com variáveis sócio-econômicas, clínicas e laboratoriais usando ferramentas de estatística e de Bioinformática.

Apresentada uma emenda que tem por objetivo incluir no projeto de vigilância e diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 em indivíduos infectados pelo HIV atendidos no CRT-DST/Aids de São Paulo, a determinação de polimorfismos no gene da IL28B com vistas a associá-los a carga proviral de HTLV-1 e HTLV-2, a presença de HAM/TSP, e o Virus da Hepatite C.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O estudo não implica em risco adicional aos pacientes, uma vez que as coletas das amostras de sangue para a pesquisa serão feitas durante a mesma punção venosa utilizada para a coleta de células CD4 e aferição da carga viral. O projeto trará benefícios para a saúde pública por gerar conhecimento sobre a epidemiologia e a biologia da infecção pelo HTLV em portadores de HIV/AIDS, assim como por definir o melhor teste confirmatório do HTLV a ser usado nesta população. A inclusão da pesquisa de polimorfismo de IL28B, poderá ser útil no monitoramento e na adequação do tratamento ao paciente no CRT DST/Aids.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O presente estudo apresenta relevância do ponto de vista da saúde pública, pois fornecerá informações sobre a prevalência, epidemiologia e comportamento biológico da infecção por HTLV-1 e 2 em pacientes portadores de HIV/AIDS. Esses vírus causam infecção crônica no hospedeiro e podem interferir com o início do tratamento antiretroviral e com a evolução para AIDS, além de poderem causar doenças hematológicas e neurológicas graves, justificando a importância de se melhorar seu diagnóstico e conhecer suas interações com o organismo afetado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido adequado a emenda ao projeto.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há impedimento ético para a realização do projeto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: SANTA CRUZ 81 Anexo Pesquisa 1º andar

Bairro: VILA MARIANA

CEP: 04.121-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)5087-9837

Fax: (11)5087-9837

E-mail: cep@crt.saude.sp.gov.br



CENTRO DE REFERÊNCIA E TREINAMENTO DST/AIDS



Continuação do Parecer: 598.565-0

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Encaminhar para este Comitê relatórios parciais e final do projeto, como previsto na Resolução CNS 466/12 XI. -2d.

SAO PAULO, 11 de Abril de 2014

Assinador por:
Eduardo Ronner Lagonegro
(Coordenador)

Este parecer reemitido substitui o parecer número 598565 gerado na data 26/11/2013 13:58:47, onde o número CAAE foi alterado de 11302512.0.0000.0059 para 11302512.0.3002.5375.

Endereço: SANTA CRUZ 81 Anexo Pesquisa 1º andar
Bairro: VILA MARIANA **CEP:** 04.121-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5087-9837 **Fax:** (11)5087-9837 **E-mail:** cep@crt.saude.sp.gov.br

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Prevalência de infecção pelos vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 (HTLV-1) e 2 (HTLV-2) em população infectada pelos vírus da hepatite B (HBV) e hepatite C (HCV)

Pesquisador: Adele Caterino de Araujo

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 55837316.0.0000.0059

Instituição Proponente: Instituto Adolfo Lutz

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.624.918

Apresentação do Projeto:

O presente projeto tem como objetivo conhecer a prevalência de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 em pacientes com hepatite B e C, e auxiliar no acompanhamento e tratamento dos pacientes com hepatite B e C coinfectados pelos HTLV-1 e HTLV-2.

Os vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 (HTLV-1) e 2 (HTLV-2) assim como o vírus da imunodeficiência humana (HIV) apresentam mecanismos de transmissão superponíveis aos vírus da hepatite B (HBV) e hepatite C (HCV), pelo exposto a coinfecção por estes vírus é esperada. Sabe-se que em pacientes com HIV/aids as taxas de coinfecção podem ser elevadas dependendo da região geográfica e de fatores de risco da população de estudo. As coinfeções HIV/HTLV-1/-2/HCV ou HIV/HTLV-1/-2/HBV estão associadas principalmente ao uso de drogas injetáveis (UDI) ou a relações sexuais com UDI, porém outras formas de infecção vêm sendo descritas. O impacto das coinfeções na evolução das doenças relacionadas a estes vírus é pouco estudado. No entanto, sabe-se, por exemplo, que a coinfecção HIV/HTLV-1 faz com que o paciente evolua mais rapidamente para aids, enquanto a coinfecção HIV/HTLV-2 está associada ao estado de "progressor lento" para aids. Paradoxalmente, a coinfecção HCV/HTLV-1 foi relacionada com melhor evolução da hepatite C (menor carga viral-CV de HCV e menos lesão hepática), enquanto a

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 1.624.918

coinfecção HCV/HTLV-2 com maior CV de HCV. Nada foi descrito em relação à infecção HBV/HTLV-1/-2 exceto que é frequente em população com HIV/aids. No Instituto Adolfo Lutz de São Paulo (IAL) existe um grupo de Vigilância e Diagnóstico de Infecção por HTLV-1 e HTLV-2 que busca por marcadores de valor prognóstico e um Laboratório de Hepatites Virais que é Referência Nacional e realiza a genotipagem e a determinação de CV de HBV e HCV. Com estas expertises, decidiu-se realizar um estudo piloto de pesquisa de anticorpos anti-HTLV-1/-2, em amostras de soro/plasma da rotina de CV de HBV e HCV, com vistas a determinar sua frequência.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário

Determinar a prevalência de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 em pacientes com hepatite do tipo B e C.

Objetivos secundários

- Realizar a triagem sorológica de infecção por HTLV-1/2 usando ensaio imunoenzimático para pesquisa de anticorpos.
- Confirmar e discriminar infecção por HTLV-1 de HTLV-2 usando o teste sorológico confirmatório de Western Blot.
- Determinar a prevalência de infecção por HTLV-1/-2 na infecção por HBV e HCV.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos

A pesquisadora relata não haver riscos, pois empregará amostras de biorrepositório.

Este projeto apresenta riscos mínimos aos pacientes por utilizar amostras já colhidas com dados associados; estão asseguradas a confidencialidade e a privacidade das informações clínicas, laboratoriais e a identificação dos pacientes.

Benefícios

Conhecer a prevalência de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 em pacientes com hepatite B e C, e caso seja alta, entrar em contato com serviços especializados de São Paulo e região para elaborar projeto e monitorar os casos de coinfecção.

Auxiliar na melhor condução do tratamento dos pacientes com a coinfecção HTLV/HBV e HTLV/HCV que poderá ser personalizado, reduzindo custos desnecessários ao SUS com o uso de medicamentos inadequados.

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 1.624.918

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto de pesquisa submetido a este comitê é de importância em Saúde Pública.

Trata-se de um estudo de corte transversal descritivo, utilizando como material soro/plasma enviado ao Laboratório de Hepatites Virais do IAL para determinação de CV, HBV e HCV. Estima-se a utilização de 920 amostras a serem avaliadas quanto à presença de anticorpos anti-HTLV-1/-2 (460 de infecção por HBV e 460 por HCV). O projeto propõe dispensa do TCLE e justifica por ser um estudo anônimo não vinculado, sendo mantidos os aspectos relativos a confidencialidade e a privacidade das informações clínicas, laboratoriais e a identificação dos pacientes. Não haverá retenção de amostras para esta pesquisa.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos apresentados e de acordo a seguir.

1. Folha de rosto.
2. Justificativa de dispensa do TCLE.
3. Aprovação do CTC/IAL, corroborada pela diretoria geral da instituição.
4. Termos de Compromisso, Responsabilidade e Sigilo de todos os participantes da pesquisa.
5. Regras Básicas de Biorrepositório do Laboratório de Hepatites Virais do Centro de Virologia do IAL, assinado por Dra. Regina Célia Moreira, sem data.

Recomendações:

1. Refletir do ponto de vista ético a categoria dos riscos.
2. Em próxima edição do protocolo de pesquisa na Plataforma Brasil, anexar termo de conhecimento da Portaria DG IAL 16/2010 sobre Normas de temporalidade das amostras biológicas e dos produtos armazenados no IAL.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Protocolo de pesquisa aprovado do ponto de vista ético e coerente com as normas institucionais.

Considerações Finais a critério do CEP:

O protocolo de pesquisa foi aprovado do ponto de vista ético à luz da Resolução CNS 466/2012

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 1.624.918

pelo colegiado do CEPIAL com base nas deliberações da reunião ordinária de 16 de junho de 2016.

Em conformidade com a Resolução CNS 466 de 12/12/2012, o pesquisador responsável deverá cumprir o item transcrito integralmente a seguir.

XI - Do pesquisador responsável

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

XI.2 - Cabe ao pesquisador:

a) apresentar o protocolo devidamente instruído ao CEP ou à CONEP, aguardando a decisão de aprovação ética, antes de iniciar a pesquisa; b) elaborar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; c) desenvolver o projeto conforme delineado; d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento; f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa; g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Os relatórios deverão ser adicionados ao protocolo de pesquisa na Plataforma Brasil para análise do CEPIAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_710328.pdf	06/05/2016 12:01:54		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_HTLV_hepatites.pdf	06/05/2016 12:00:19	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_Plataforma_Brasil.pdf	06/05/2016 11:51:15	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Sigilo_Compromisso_MOB.pdf	04/05/2016 09:19:39	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Sigilo_Compromisso_KRC.pdf	04/05/2016 09:19:22	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Sigilo_Compromisso_FCA.pdf	04/05/2016 09:19:08	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de	Declaracao_Sigilo_Compromisso_BVA	04/05/2016	Adele Caterino de	Aceito

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 1.624.918

Pesquisadores	.pdf	09:18:53	Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_Sigilo_Compromisso_ACLA.pdf	04/05/2016 09:18:34	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_responsabilidade_Marcilio.pdf	03/05/2016 15:28:45	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_responsabilidade_Regina.pdf	03/05/2016 15:28:30	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_responsabilidade_sigilo_Adele.pdf	03/05/2016 15:28:17	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_Sigilo_Compromisso_Adele.pdf	03/05/2016 15:28:00	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_anuencia_Regina_LB.pdf	03/05/2016 15:27:35	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biorepositorio_Regina.pdf	03/05/2016 15:26:54	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Outros	Aprovacao_CTC_DG_inicial.pdf	03/05/2016 15:26:33	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Outros	Equipe.pdf	03/05/2016 15:25:55	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Orçamento	anexo_3_orcamentos_ctc2.pdf	03/05/2016 15:25:16	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Orçamento	anexo_3_orcamentos_ctc1.pdf	03/05/2016 15:24:58	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Cronograma	anexo_1_cronograma_ctc_2017.pdf	03/05/2016 15:24:40	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Cronograma	anexo_1_cronograma_ctc_2016.pdf	03/05/2016 15:24:27	Adele Caterino de Araujo	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 06 de Julho de 2016

Assinado por:
Luz Marina Trujillo
(Coordenador)

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Marcadores genéticos virais e do hospedeiro que podem influenciar o curso da infecção pelo HIV-1 e da coinfeção HIV-1/HTLV-1 e HIV-1/HTLV-2

Pesquisador: Adele Caterino de Araujo

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 52493316.1.0000.0059

Instituição Proponente: Instituto Adolfo Lutz

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.412.892

Apresentação do Projeto:

Os vírus linfotrópicos de células T humanas (HTLV-1, HTLV-2 e HIV-1) compartilham as mesmas vias de transmissão e têm potencial patogênico distinto. O HTLV-1 é responsável pela leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL) e pela paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 (TSP/HAM), já o HTLV-2 não está associado a um tipo particular de doença, embora algumas manifestações clínicas semelhantes à TSP/HAM tenham sido descritas. Já o HIV-1 é o responsável pela pandemia mundial de AIDS. Estes vírus podem infectar o mesmo indivíduo e a coinfeção pode tanto acelerar como retardar o desenvolvimento de doenças a eles relacionadas. Sabe-se que a coinfeção HIV-1/HTLV-1 pode acelerar o desenvolvimento da AIDS enquanto a coinfeção HIV/HTLV-2 pode prorrogar o surgimento da AIDS. Vários fatores genéticos dos vírus e do hospedeiro podem estar envolvidos na progressão destas infecções para doença. No presente projeto, pretende-se determinar a frequência de determinados marcadores genéticos de valor prognóstico na infecção HIV-1 e na coinfeção HIV-1/HTLV-1 e HIV-1/HTLV-2. Serão pesquisados: tropismo de HIV-1 (R5 e X4), deleção no gene que codifica o correceptor de HIV-1 CCR5 (32), mutação no receptor CCR2-V64I e

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 1.412.892

no ligante natural do receptor CXCR4 (SDF-1-3'A), além de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) nos genes que codificam as citocinas da resposta imune inata IL28B e IL17A e o perfil de citocinas Th1/Th2/Th17 e de quimiocinas em pacientes do CRT DST/AIDS-SP. Ainda, serão investigadas partículas virais defectivas de HTLV-1 e HTLV-2, genótipos de proteínas transativadoras de HTLV-1 e HTLV-2 (Tax1 e Tax2) e determinada carga proviral (CPV) de HTLV-1 e HTLV-2. Os resultados obtidos poderão auxiliar no melhor acompanhamento e tratamento aos pacientes.

Objetivo da Pesquisa:**Objetivo Primário**

Pesquisar marcadores imunológicos e virológicos de valor prognóstico na coinfeção HIV-1/HTLV-1 e HIV-1/HTLV-2 e determinar suas frequências usando plasma e ou células do sangue.

Objetivos Secundários

- Determinar tropismo HIV-1 por sequenciamento de parte do envelope viral.
- Pesquisar deleção (32) no gene que codifica o CCR5 por técnica de PCR.
- Pesquisar polimorfismos nos genes que codificam o CCR2 (CCR2-64I), SDF1 (SDF-1-3'A), IL28B e IL17A usando a técnica de PCR-RFLP.
- Quantificar por citometria de fluxo citocinas humanas do perfil Th1/Th2/Th17 e quimiocinas em plasma.
- Verificar se existem partículas provirais defectivas de HTLV-1 e HTLV-2 usando o sequenciamento das regiões 5' LTR, env e tax.
- Pesquisar genótipos de Tax1 e Tax2 de HTLV-1 e HTLV-2 por sequenciamento da região pX.
- Padronizar a qPCR tax para determinar CPV de HTLV-1 e HTLV-2 e comparar com a qPCR pol.
- Analisar os resultados obtidos na coinfeção HIV-1/HTLV-1 e HIV-1/HTLV-2 e relacionar com dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais.
- Avaliar os mesmos marcadores e sua frequência em indivíduos infectados pelo HIV-1, com e sem tratamento antirretroviral, e controles sadios HIV-1 soronegativos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:**Riscos**

Mínimos, considerando que o material biológico já foi coletado após o consentimento formal do participante por meio do TCLE, está armazenado com responsabilidade e será gerenciado segundo as normativas vigentes.

Também, há a declaração da pesquisadora responsável de sigilo e confidencialidade com os dados

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90**Bairro:** Cerqueira César**CEP:** 01.246-902**UF:** SP**Município:** SAO PAULO**Telefone:** (11)3068-2859**Fax:** (11)3085-3505**E-mail:** cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 1.412.892

da pesquisa.

Benefícios

Aprimoramento de diagnóstico e em decorrência a melhoria de tratamento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa séria com compromisso do conhecimento aprofundado da coinfeção por HTLV-1, HTLV-2 e HIV, e ainda, com possibilidade de melhoria da assistência dos indivíduos infectados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos apresentados e de acordo, a seguir.

1. Folha de rosto, assinada por Dra. Carmem Aparecida de Freitas Oliveira, Diretora Substituta do Instituto Adolfo Lutz (IAL), de 12/01/2016.

2. TCLE

No preenchimento do campo "Propõe dispensa do TCLE" no documento "PB Informações básicas do projeto" está respondido "Não".

Na análise ética entendeu-se que o TCLE do protocolo "Vigilância e diagnóstico de infecção por HTLV-1 HTLV-2 em indivíduos infectados pelo HIV" já contemplava este estudo atual.

A resposta deveria ser sim e apresentar a justificativa.

3. Aprovação quanto ao mérito científico pelo Conselho Técnico Científico (CTC) do IAL, corroborada pela diretoria geral da instituição, de 16/12/2015.

Neste documento consta o orçamento do projeto de pesquisa (valor estimado de R\$ 267.257,50) com a informação que este será apresentado às agências de fomento para financiamento.

4. Termo de responsabilidade e sigilo, assinado por Dra. Adele Caterino Araújo, pesquisadora responsável, de 07/10/2015.

5. Declaração de sigilo e compromisso, com definição das atribuições no projeto de pesquisa, assinada por Lucila Okuyama Fukasawa, pesquisadora do Centro de Imunologia do IAL, de 16/09/2013.

A declaração faz referência ao protocolo de pesquisa "Vigilância e diagnóstico de infecção por HTLV-1 HTLV-2 em indivíduos infectados pelo HIV".

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 1.412.892

Este documento foi aceito em consideração ao seguimento dos trabalhos da pesquisadora na área de pesquisa deste protocolo, e por ser este estudo atual relacionado ao protocolo referenciado na declaração.

7. Declaração de sigilo e compromisso, com definição das atribuições no projeto de pesquisa, assinada por Paula Ordonhez Rigato, pesquisadora do Centro de Imunologia do IAL, de 13/01/2016.

8. Declaração de sigilo e compromisso, com definição das atribuições no projeto de pesquisa, assinada por Luana Portes Ozório Coelho, pesquisadora do Centro de Virologia do IAL, de 13/01/2016.

9. Declaração de sigilo e compromisso, assinada por Nadia Aparecida Costa, Biomédica no IAL, de 13/01/2016.

10. Declaração de sigilo e compromisso, assinada por Suélen Aparecida Teixeira, Bolsista de Iniciação Científica no IAL, de 13/01/2016.

11. Declaração de sigilo e compromisso, assinada por Débora Lima Duarte, Bolsista de Iniciação Científica no IAL, de 13/01/2016.

12. Normas de biorrepositório do material biológico humano oriundo do protocolo de pesquisa "Vigilância e diagnóstico de infecção por HTLV-1 HTLV-2 em indivíduos infectados pelo HIV", protocolo este aprovado do ponto de vista ético de acordo com a Resolução CNS 466/2012 em 22/01/2013, e sua Emenda aprovada em 18/10/2013, onde estavam previstas as etapas do protocolo em análise.

Estão descritos os procedimentos de guarda, preservação, gerenciamento e temporalidade do material biológico humano de acordo com a Resolução CNS 441/2011.

Documentos apresentados com apontamento de revisão, a seguir

13. Declaração de sigilo e compromisso, com definição das atribuições no projeto de pesquisa, assinada por Maria Gisele Gonçalves, pesquisadora do Centro de Imunologia do IAL, de

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 1.412.892

20/06/2012.

14. Declaração de sigilo e compromisso, com definição das atribuições no projeto de pesquisa, assinada por Cláudio Tavares Sacchi, pesquisador do Centro de Imunologia do IAL, de 20/06/2012.

15. Declaração de sigilo e compromisso, com definição das atribuições no projeto de pesquisa, assinada por Luis Fernando de Macedo Brígido, pesquisador do Centro de Virologia do IAL, de 20/06/2012.

16. Declaração de sigilo e compromisso, com definição das atribuições no projeto de pesquisa, assinada por Karoline Rodrigues Campos, aprimoranda do Centro de Imunologia do IAL, de 20/06/2012.

Os documentos de números 13, 14, 15 e 16 fazem referência ao protocolo de pesquisa "Vigilância e diagnóstico de infecção por HTLV-1 HTLV-2 em indivíduos infectados pelo HIV", e o sigilo e o compromisso baseiam-se em normativa revogada.

Devem ser substituídos.

Recomendações:

1. Em próxima edição do protocolo de pesquisa atualizar os documentos de declaração de sigilo e compromisso dos pesquisadores Lucila O. Fukasawa, Maria G. Gonçalves, Claudio T. Sacchi, Luis F. M. Brígido, a da aprimoranda Karoline R. Campos, e para esta última atualizar sua função/atividade no IAL.

2. TCLE

Refletir a análise ética deste documento e manifestar-se na próxima edição do protocolo de pesquisa.

Verificar a submissão na Plataforma Brasil do "TCLE rev 2 CEPIAL" de 23/09/2013.

3. No documento "PB informações básicas do projeto" há citação errônea da Resolução CNS 196/1996 já revogada, a qual deve ser substituída na próxima edição do protocolo de pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As recomendações deste parecer devem ser consideradas anteriormente à execução da pesquisa

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 1.412.892

mesmo com o entendimento claro que não há impedimento ético.

Protocolo de pesquisa aprovado com recomendações, e em consonância com as diretrizes institucionais.

Considerações Finais a critério do CEP:

O protocolo de pesquisa, pela análise do conjunto dos documentos, foi considerado aprovado do ponto de vista ético à luz da Resolução CNS 466/2012 pelo colegiado do CEPIAL na reunião ordinária de 21 de janeiro de 2016.

Em 17 de fevereiro de 2016, Dra. Adele Caterino Araújo, pesquisadora responsável, em reunião presencial com Luz Marina Trujillo, coordenadora do CEPIAL, definitivamente esclareceu que o protocolo de pesquisa atual contempla as etapas previstas e não realizadas do protocolo de pesquisa “Vigilância e diagnóstico de infecção por HTLV-1 HTLV-2 em indivíduos infectados pelo HIV”, o qual por razão a declarar deverá ser encerrado após o envio do relatório final. Informou, também, que o material biológico humano armazenado foi colhido com consentimento individual para o propósito do estudo atual, e guarda todos os TCLEs assinados. Aproveitando o encontro, Dra. Adele Caterino Araújo tomou conhecimento de aspectos éticos da dispensa do TCLE e sua justificativa.

O protocolo de pesquisa “Vigilância e diagnóstico de infecção por HTLV-1 HTLV-2 em indivíduos infectados pelo HIV” foi aprovado do ponto de vista ético em 22/01/2013, sua Emenda em 18/10/2013, suas Notificações de relatório parcial “1º Relatório Técnico” em 09/06/2014, e outro relatório parcial em 28/04/2015.

Em conformidade com a Resolução CNS 466 de 12/12/2012, o pesquisador responsável deverá cumprir o item transcrito integralmente a seguir.

XI - Do pesquisador responsável

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

XI.2 - Cabe ao pesquisador:

a) apresentar o protocolo devidamente instruído ao CEP ou à CONEP, aguardando a decisão de aprovação ética, antes de iniciar a pesquisa; b) elaborar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; c) desenvolver o projeto conforme delineado; d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento; f)

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 1.412.892

manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa; g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Os relatórios deverão ser adicionados ao protocolo de pesquisa na Plataforma Brasil para análise do CEPIAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_651098.pdf	15/01/2016 12:03:51		Aceito
Declaração de Pesquisadores	termo_de_responsabilidade_e_sigilo_Adele.pdf	15/01/2016 12:03:17	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_compromisso_sigilo_SAT.pdf	13/01/2016 15:09:23	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_compromisso_sigilo_POR.pdf	13/01/2016 15:08:57	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_compromisso_sigilo_NAC.pdf	13/01/2016 15:08:26	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_compromisso_sigilo_LPOC.pdf	13/01/2016 15:08:04	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_compromisso_sigilo_LOF.pdf	13/01/2016 15:07:37	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_compromisso_sigilo_DLD.pdf	13/01/2016 15:07:08	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Outros	encaminhamento_projeto.pdf	13/01/2016 15:06:17	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rostoassinada.pdf	13/01/2016 09:11:29	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Outros	Questionario_2_prontuario.pdf	12/01/2016 11:30:38	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Aprovacao_CTC_2013.pdf	12/01/2016 11:10:20	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Outros	PARECER_CEP_28_05_2015.pdf	12/01/2016 11:09:32	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Outros	Questionario_1_entrevista.pdf	12/01/2016 11:02:53	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_compromisso_sigilo_MGG.jpg	12/01/2016 10:59:09	Adele Caterino de Araujo	Aceito

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 1.412.892

Declaração de Pesquisadores	Termo_compromisso_sigilo_LB.pdf	12/01/2016 10:57:06	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_compromisso_sigilo_KRC.pdf	12/01/2016 10:56:34	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Termo_compromisso_sigilo_CTS.jpg	12/01/2016 10:55:30	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	termo_de_comprometimento_Adele.pdf	12/01/2016 10:54:23	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Aprovacao_DG.pdf	12/01/2016 10:52:29	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Aprovacao_CTC.pdf	12/01/2016 10:52:02	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biorrepositorio_Adele.pdf	12/01/2016 10:50:45	Adele Caterino de Araujo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_2013.pdf	12/01/2016 10:48:16	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Plataforma_Brasil_2016.pdf	12/01/2016 10:44:18	Adele Caterino de Araujo	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 17 de Fevereiro de 2016

Assinado por:
Luz Marina Trujillo
(Coordenador)

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Análise crítica de custo/efetividade na utilização de pool de soros para a triagem de infecção por HTLV-1/2

Pesquisador: Adele Caterino de Araujo

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 80902317.0.0000.0059

Instituição Proponente: Instituto Adolfo Lutz

Patrocinador Principal: Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis - DEVIT

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.548.064

Apresentação do Projeto:

O Brasil é um país endêmico para as infecções por HTLV-1 e HTLV-2, com cerca de 2 a 2,5 milhões de infectados. As prevalências variam dependendo da região geográfica e população de estudo. Desde 1993 a sorologia para HTLV-1/2 tornou-se obrigatória em Bancos de Sangue do Brasil e isto fez diminuir os casos de infecção por transfusão sanguínea. Atualmente, as vias sexual e vertical são as principais responsáveis pela manutenção destas infecções no país. A triagem de HTLV-1/2 não faz parte do rol de exames do pré-natal no SUS, tampouco é recomendada em outros serviços, sendo totalmente negligenciada apesar do grande número de infectados. Em gestantes as prevalências de HTLV-1/2 variam de 0,1% a 1,1%, sendo que 70% das mães amamentam seus filhos até os seis meses. Assim, introduzir a triagem HTLV-1/2 no pré-natal é de suma importância. Para reduzir custos dos exames para o SUS a triagem usando pool de soros sem perda de sensibilidade, pode ser uma alternativa.

Para analisar custo/efetividade do uso de pool de soros na triagem de infecção por HTLV-1/2, serão utilizados amostras de soro/plasma provenientes de projetos de pesquisa pertencentes ao biorrepositório que se encontram estocadas na sala 1119 do Centro de Imunologia do IAL, em freezer -20 °C, sob a guarda/responsabilidade de Dra. Adele Caterino de Araujo.

Serão utilizados o ensaio imunoenzimático de 3ª geração (Murex HTLV-I+II, Diasorin) e soros HTLV-1 e HTLV-2 reagentes com diferentes valores de densidades ópticas. Primeiramente os soros serão diluídos em soro não reagente de bolsa de sangue. Com base nos resultados obtidos

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 2.548.064

os mesmos soros serão diluídos em pool de soros de diferentes indivíduos (HTLV-1/2 soronegativos) e determinada a maior diluição que resulte reagente em amostras fracamente positivas no ELISA. Com isto será possível avaliar custo/efetividade do uso de pool de soros na triagem de HTLV-1/2. Com isso, pretende-se auxiliar a Secretaria de Estado da Saúde-SP e o Ministério da Saúde na recomendação da sorologia para HTLV no pré-natal evitando a perpetuação dessa infecção na população.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário

- Avaliar o custo/efetividade do uso de pool de soros na triagem de infecção por HTLV-1/2, com uso de ensaio imunoenzimático de 3ª geração e soros HTLV-1 e HTLV-2 reagentes com diferentes valores de densidades ópticas diluídos em soro não reagente de bolsa de sangue.

Objetivo Secundário

- Diminuir custo sem perda de sensibilidade.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos

A pesquisadora afirma que não há riscos por ser estudo com amostras de biorrepositório.

É importante refletir sobre esta afirmativa, pois há o risco mínimo relacionado à confidencialidade e ao sigilo dos dados secundários referentes às amostras clínicas mesmo em repositório, nesse caso quesitos garantidos pela pesquisadora.

Benefícios

Os benefícios estão bem estabelecidos, frente ao que se espera alcançar com a referida pesquisa, que é a redução de custos da triagem de infecção por HTLV-1/2 para o Sistema Único de Saúde (SUS), e a possibilidade de sua implementação em acompanhamento de gestantes no pré-natal.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo de grande importância em saúde pública que busca uma alternativa viável para reduzir custos dos exames da triagem de infecção por HTLV-1/2 para o SUS a ser utilizado no futuro no pré-natal, usando pool de soros sem perda de sensibilidade.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória para este protocolo de pesquisa foram apresentados e

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 2.548.064

estão de acordo.

- Aprovação do Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz e anuência da direção geral da instituição: CTC-IAL 65-J/2017 de 28/11/2017.

- Folha de rosto.

- A justificativa para dispensa do TCLE foi aceita pelo colegiado, pois está fundamentada na utilização de amostras de biorrepositórios de projetos anteriores, devidamente cadastrados e aprovados por este comitê para uso em pesquisas futuras.

- Termo de responsabilidade e sigilo da pesquisadora responsável.

- Declarações de sigilo e compromisso dos pesquisadores.

- Normas básicas para uso de material biológico em biorrepositório.

O documento contempla os procedimentos de guarda do material biológico humano (soros), o compromisso de sigilo e confidencialidade das informações pessoais associadas, explicita o local e endereço do repositório, o material de acondicionamento, as condições de armazenamento, o controle de acesso, a temporalidade, e a responsabilidade; ainda, o documento cita os protocolos de pesquisa anteriores e aprovados pelo CEPIAL que originaram o biorrepositório.

Recomendações:

Em próxima edição do protocolo de pesquisa na Plataforma Brasil, revisar avaliação do risco. Em casos de utilização de amostras de biorrepositório os riscos são mínimos relacionados à confidencialidade e ao sigilo dos dados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Protocolo de pesquisa muito bem instruído, aprovado quanto a eticidade, e coerente com as normas institucionais.

Considerações Finais a critério do CEP:

O protocolo de pesquisa foi aprovado do ponto de vista ético à luz da Resolução CNS 466/2012 pelo colegiado do CEPIAL na reunião ordinária de 18 de janeiro de 2018.

O CEPIAL faz valer esta aprovação desde 18/01/2018 quando da deliberação da conclusão do parecer em reunião ordinária do colegiado.

Em conformidade com a Resolução CNS 466 de 12/12/2012, o pesquisador responsável deverá cumprir o item transcrito integralmente a seguir.

XI - Do pesquisador responsável

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 2.548.064

XI.1 - A responsabilidade do pesquisador é indelegável e indeclinável e compreende os aspectos éticos e legais.

XI.2 - Cabe ao pesquisador:

a) apresentar o protocolo devidamente instruído ao CEP ou à CONEP, aguardando a decisão de aprovação ética, antes de iniciar a pesquisa; b) elaborar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; c) desenvolver o projeto conforme delineado; d) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; e) apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento; f) manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa; g) encaminhar os resultados da pesquisa para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico integrante do projeto; e h) justificar fundamentadamente, perante o CEP ou a CONEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Os relatórios deverão ser adicionados ao protocolo de pesquisa na Plataforma Brasil para análise do CEPIAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1047613.pdf	07/12/2017 11:47:11		Aceito
Folha de Rosto	Folha_Rosto_Pool.pdf	07/12/2017 11:45:27	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Outros	APROVACAO_CTC_65J.pdf	05/12/2017 10:03:41	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO_DE_SIGILO_E_COMPROMISSO_RAFAEL.pdf	05/12/2017 10:02:27	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO_DE_SIGILO_E_COMPROMISSO_ELLEN.pdf	05/12/2017 10:02:13	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DECLARACAO_DE_SIGILO_E_COMPROMISSO_KAROL.pdf	05/12/2017 10:01:59	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TERMO_DE_RESPONSABILIDADE_SIGILO_ADELE.pdf	05/12/2017 10:01:43	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TERMO_DE_COMPROMETIMENTO_ADELE.pdf	05/12/2017 10:00:29	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	BIORREPOSITORIO_SOB_A_GUARDA_DE_ADELE_CATERINO_DE_ARAUJO.pdf	05/12/2017 09:59:16	Adele Caterino de Araujo	Aceito

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-902

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3068-2859

Fax: (11)3085-3505

E-mail: cepial@ial.sp.gov.br

Continuação do Parecer: 2.548.064

Orçamento	a_ctc_0008_000_planejamento_orcamentario.pdf	05/12/2017 09:58:33	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Cronograma	a_ctc_0007_001_cronograma_de_desenvolvimento.pdf	05/12/2017 09:58:16	Adele Caterino de Araujo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_POOL_DE_SOROS.pdf	05/12/2017 09:57:29	Adele Caterino de Araujo	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 16 de Março de 2018

Assinado por:
Luz Marina Trujillo
(Coordenador)

Endereço: Av. Dr. Arnaldo 355 - 3º andar - Sala 90**Bairro:** Cerqueira César**CEP:** 01.246-902**UF:** SP**Município:** SAO PAULO**Telefone:** (11)3068-2859**Fax:** (11)3085-3505**E-mail:** cepial@ial.sp.gov.br