



UFAM

Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Instituto de Ciências Biológicas – ICB



Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada - PPGIBA

**EPIDEMIOLÓGIA DA INFECÇÃO PELO HTLV-1/2 NA REGIÃO METROPOLITANA DE
MANAUS E AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS MINIMAMENTE INVASIVAS PARA
DIAGNÓSTICO E MONITORAMENTO DO PERFIL INFLAMATÓRIO**

JEAN DE MELO SILVA

MANAUS – AMAZONAS

2025



UFAM

Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Instituto de Ciências Biológicas – ICB



Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada - PPGIBA

JEAN DE MELO SILVA

**EPIDEMIOLOGIA DA INFECÇÃO PELO HTLV-1/2 NA REGIÃO METROPOLITANA DE
MANAUS E AVALIAÇÃO DE ESTRATÉGIAS MINIMAMENTE INVASIVAS PARA
DIAGNÓSTICO E MONITORAMENTO DO PERFIL INFLAMATÓRIO**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas, como parte de pré-requisito para defesa e obtenção do título de Doutor em Imunologia, área de concentração: Genômica, imunogenética e epidemiologia de doenças infecciosas e inflamatórias.

Orientador: Gemilson Soares Pontes

Coorientadores: Antônio Carlos Rosário Vallinoto

Carolina Rosadas de Oliveira

MANAUS – AMAZONAS

2025

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

-
- S586e Silva, Jean de Melo
Epidemiologia da infecção pelo HTLV-1/2 na região metropolitana de Manaus e avaliação de estratégias minimamente invasivas para diagnóstico e monitoramento do perfil inflamatório / Jean de Melo Silva. - 2025.
131 f. : il., color. ; 31 cm.
- Orientador(a): Gamilson Soares Pontes.
Coorientador(a): Carolina Rosadas de Oliveira.
Coorientador(a): Antônio Carlos Rosário Vallinoto.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Amazonas,
Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada,
Manaus - AM, 2025.
1. HTLV. 2. Prevalência. 3. Amazonas. 4. Filogenia. 5.
Epidemiologia. I. Pontes, Gamilson Soares. II. Oliveira, Carolina
Rosadas de. III. Vallinoto, Antônio Carlos Rosário. IV. Universidade
Federal do Amazonas. Programa de Pós-Graduação em
Imunologia Básica e Aplicada. V. Título
-

JEAN DE MELO SILVA

**INFECÇÃO POR HTLV-1/2 NA REGIÃO METROPOLITANA DE MANAUS:
PERFIL EPIDEMIOLÓGICO E ESTRATÉGIAS MINIMAMENTE INVASIVAS
DE DIAGNÓSTICO E MONITORAMENTO INFLAMATÓRIO**

Esta tese foi julgada para a obtenção do título de Doutor em Imunologia Básica e Aplicada e aprovada em sua versão final pelo Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas.

Prof. Dr. Allyson Guimarães da Costa

Coordenador do PPGIBA

Apresentada perante a Banca Examinadora composta por:

Dr. Gemilson Soares Pontes - INPA
(Presidente e Membro Titular Interno do Programa)

Dra. Ana Rita Coimbra - UFMS
(Membro Titular Externo do Programa)

Dr. Fernando Rosado Spilki - Feevale
(Membro Titular Externo do Programa)

Dr. Eurico de Arruda Neto - FMRP - USP
(Membro Titular Externo do Programa)

Dr. Luiz Fernando de Almeida Machado - UFPA
(Membro Titular Externo do Programa)

Manaus, 26 de maio de 2025

Agradecimentos

Agradeço imensamente ao meu orientador, **professor Dr. Gamilson Soares Pontes**, por todos os ensinamentos e por me acompanhar desde o mestrado. Você é um pesquisador exemplar e tenho certeza de que todos os seus alunos são inspirados pela sua inteligência e dedicação. Muito obrigado por todas as orientações, conselhos e por ter conseguido uma oportunidade para a realização do meu doutorado sanduíche.

À minha coorientadora, **doutora Carolina Rosadas**. Expresso minha profunda gratidão por ter me aceitado como aluno de doutorado sanduíche em seu laboratório. Aprendi muito ao seu lado e agradeço por todos os ensinamentos. Sempre lembrei com alegria dos momentos que passei no Imperial College, recordando com carinho cada experiência que obtive.

Ao meu coorientador, **doutor Antônio Carlos Rosário Vallinoto**, que acreditou no meu potencial e permitiu que eu contribuisse com esse maravilhoso projeto desenvolvido no Amazonas. Foi uma honra ser coorientado por um dos principais pesquisadores que investigam a infecção por HTLV no Brasil.

Ao renomado **pesquisador Graham P. Taylor**, por ter me aceitado como aluno em seu laboratório, juntamente com a dra. Carolina. Foi uma grande honra conhecê-lo e desenvolver um projeto no seu grupo de pesquisa. A oportunidade de aprender e colaborar com sua equipe foi enriquecedora e contribuiu significativamente para minha formação acadêmica e científica. Sou imensamente grato pela experiência e pela troca de conhecimento que tive durante esse período.

Aos meus amigos de laboratório que tanto me ajudaram durante o projeto, principalmente na coleta de amostras. Muito obrigado **Enzo, Carlos Eduardo, Luma, Paulo, Leonardo** e todos que contribuíram para este projeto.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM)** e à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão da bolsa e apoio financeiro.

À **Universidade Federal do Amazonas (UFAM)**, especialmente à coordenação e secretaria do Programa de Pós-graduação em **Imunonologia Básica e Aplicada (PPGIBA)**, por todo o suporte e acompanhamento durante meu doutorado. Muito obrigado também aos

professores do programa, que compartilharam seus conhecimentos, contribuindo para o meu crescimento profissional.

Agradeço também ao **CNPq** (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), **OPAS** (Organização Panamericana de Saúde), **OMS** (Organização Mundial de Saúde), **MCTI** (Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação) e **Ministério da Saúde**, por todo o apoio dado a este projeto.

Agradeço à **SEMSA** (Secretaria Municipal de Saúde) e **SES-AM** (Secretaria de Estado de Saúde do Amazonas), por permitirem o recrutamento dos participantes deste estudo principalmente nas unidades básicas de saúde e comunidades ribeirinhas do Amazonas.

O Dado mais importante que separa o ser humano de todos os seus irmãos e primos na escala filogenética é o conhecimento; só o conhecimento liberta o homem; só através do conhecimento o homem é livre.

Enéas Ferreira Carneiro

Resumo

Introdução: A infecção pelo HTLV-1/2 tem distribuição mundial com prevalências variando regionalmente. No Brasil, há cerca de 2 milhões de infectados, mas ainda há poucos estudos epidemiológicos e a maioria não reflete de forma fidedigna a prevalência da infecção, especialmente na região amazônica. Além disso, a ausência de testes acessíveis dificulta o diagnóstico e adoção de medidas de prevenção. Este estudo estimou a prevalência e caracterizou molecularmente a infecção pelo HTLV-1/2 na região metropolitana de Manaus, além de avaliar métodos minimamente invasivos (saliva e DBS/DPS) como alternativa à coleta por punção venosa. **Métodos:** Foram recrutados 1.604 indivíduos residentes na região metropolitana de Manaus, os quais foram submetidos a um ensaio imunoenzimático para detecção da infecção pelo HTLV-1/2. Amostras reagentes foram submetidas à confirmação por western blot ou INNO-LIA. A caracterização molecular foi feita por nested-PCR, sequenciamento e análise filogenética. Dados sociodemográficos e possíveis fatores de risco foram obtidos por inquérito epidemiológico. Na avaliação do uso de amostras minimamente invasivas, foram recrutados pacientes atendidos no hospital Saint Mary's, Inglaterra. **Resultados:** Foi observada uma prevalência de 0,3% (4/1.314) para a infecção por HTLV em Manaus, sendo maior entre as mulheres em comparação aos homens. Os possíveis fatores de risco observados entre os infectados, foram: possuir tatuagem, ter sido submetido a transfusão sanguínea, ter sido amamentado e não usar preservativo. Foram identificados 3 infectados por HTLV-1 e um por HTLV-2. As análises filogenéticas demonstraram a presença do HTLV-1aA (n=2), HTLV-1aC (n=1) e HTLV-2c (n=1). Quanto ao uso de amostras minimamente invasivas, foi possível detectar IgG anti-HTLV-1 em saliva e detectou-se em amostras de DBS e DPS, IgG anti-HTLV-1/2 e o biomarcador inflamatório neopterina. **Conclusão:** Os resultados deste estudo revelaram a emergência do subtipo HTLV-1aC na Amazônia brasileira, tratando-se de um achado inédito no Brasil, assim como validaram o uso de métodos alternativos e acessíveis (DBS/DPS) para o monitoramento de marcadores inflamatórios em PVHTLV. Esses achados fortalecem a vigilância epidemiológica do HTLV-1/2 no Brasil, ampliam o conhecimento sobre a diversidade viral na região e oferecem ferramentas práticas e viáveis para o diagnóstico e acompanhamento da infecção em populações de áreas remotas com acesso limitado aos serviços de saúde.

Palavras-chave: HTLV, prevalência, Amazonas, filogenia, epidemiologia.

Abstract

Introduction: HTLV-1/2 infection has a global distribution, with prevalence rates varying by region. In Brazil, an estimated 2 million individuals are infected; however, epidemiological studies remain scarce, and most do not accurately reflect the true prevalence of the infection, particularly in the Amazon region. Moreover, the lack of accessible diagnostic tools hampers both detection and the implementation of preventive measures. This study aimed to estimate the prevalence and perform molecular characterization of HTLV-1/2 infection in the metropolitan region of Manaus, as well as to evaluate the use of minimally invasive sampling methods (saliva and DBS/DPS) as alternatives to conventional venous blood collection. **Methods:** A total of 1,604 individuals residing in the Manaus metropolitan area were recruited and screened for HTLV-1/2 infection using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Reactive samples were confirmed by Western blot or INNO-LIA. Molecular characterization was conducted using nested PCR, sequencing, and phylogenetic analysis. Sociodemographic data and potential risk factors were obtained through an epidemiological questionnaire. For the evaluation of minimally invasive methods, patients from Saint Mary's Hospital, United Kingdom, were also recruited. **Results:** The prevalence of HTLV infection in Manaus was found to be 0.3% (4/1,314), with higher frequency in women compared to men. Potential risk factors identified among infected individuals included having tattoos, receiving blood transfusions, being breastfed, and not using condoms. Among the infected individuals, three were positive for HTLV-1 and one for HTLV-2. Phylogenetic analyses revealed the presence of HTLV-1aA (n=2), HTLV-1aC (n=1), and HTLV-2c (n=1) subtypes. Regarding the use of minimally invasive samples, anti-HTLV-1 IgG was successfully detected in saliva, and both anti-HTLV-1/2 IgG and the inflammatory biomarker neopterin were detected in DBS and DPS samples. **Conclusion:** The findings of this study revealed the emergence of the HTLV-1aC subtype in the Brazilian Amazon, an unprecedented finding in Brazil, and validated the use of alternative and accessible sampling methods (DBS/DPS) for monitoring inflammatory markers in PVHTLV. These results enhance the epidemiological surveillance of HTLV-1/2 in Brazil, broaden the understanding of viral diversity in the region, and offer practical and feasible tools for the diagnosis and follow-up of infection in populations living in remote areas with limited access to healthcare.

Keywords: HTLV, prevalence, Amazonas, phylogeny, epidemiology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas do HTLV-1/2.....	25
Figura 2. Estruturas genômicas do HTLV-1 e HTLV-2	26
Figura 3. Ciclo replicativo do HTLV	30
Figura 4. Formas de transmissão do HTLV-1/2.....	32
Figura 5. Algumas patologias e manifestações observadas em infectados por HTLV-1	35
Figura 6. Prevalências da infecção por HTLV-1/2 em diversas populações brasileiras	38
Figura 7. Diagnóstico da infecção por HTLV-1/2: testes laboratoriais	42
Figura 8. Localização geográfica da população estudada e quantidade de amostras positivas de acordo com as zonas da cidade	58
Figura 9. Padrões sorológicos dos participantes positivos para HTLV-1/2	66
Figura 10. Eletroforese em gel de agarose revelando os fragmentos amplificados	67
Figura 11. Árvore filogenética de isolados de HTLV-1.....	68
Figura 12. Árvore filogenética de isolados de HTLV-2.....	69
Figura 13. Binding ratio do IgG anti-HTLV-1 na saliva e no FGC	81
Figura 14. Preparação das amostras em cartões de papel filtro.....	85
Figura 15. Etapas de eluição para recuperação de amostras dos cartões	86
Figura 16. Teste de estabilidade	89
Figura 17. Níveis de IgG anti-HTLV-1/2 no ensaio in-house em DBS, DPS e plasma e correlação entre as amostras.....	91
Figura 18. Níveis de IgG anti-HTLV-1/2 de acordo com as manifestações clínicas de pacientes infectados pelo HTLV	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 19. Níveis de IgG anti-HTLV-1/2 no ensaio Murex em DBS, DPS e plasma e correlação entre as amostras	93
Figura 20. Quantificação da neopterina em DBS, DPS e plasma e correlação entre as amostras	99
Figura 21. Níveis de neopterina de acordo com as manifestações clínicas de pacientes infectados pelo HTLV	100

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Tipos e subtipos do HTLV	28
Quadro 2. Tipos de LLTA e principais alterações/manifestações causadas pela doença	34
Quadro 3. Teste de estabilidade de IgG anti-HTLV-1/2 nos cartões 3 meses após a coleta	94
Quadro 4. Teste de estabilidade da neopterina 3 meses após o preparo dos cartões	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores utilizados nas reações de Nested PCR da região 5' LTR do HTLV-1	53
Tabela 2. Iniciadores utilizados nas reações de Nested PCR da região 5' LTR do HTLV-2	54
Tabela 3. Prevalência da infecção pelo HTLV-1/2 em Manaus de acordo com o sexo.....	56
Tabela 4. Características sociodemográficas da população estudada em Manaus	57
Tabela 5. Distribuição da população de estudo de acordo com a zona/local de coleta.....	59
Tabela 6. Possíveis fatores de risco associados ao aumento da suscetibilidade à infecção por HTLV-1/2	60
Tabela 7. Características sociodemográficas dos indivíduos soropositivos para HTLV-1/2	61
Tabela 8. Possíveis fatores de risco observados entre os indivíduos soropositivos para HTLV-1/2	62
Tabela 9. Indivíduos testados para a infecção por HTLV-1/2 em municípios da região metropolitana de Manaus de acordo com o sexo	62
Tabela 10. Características sociodemográficas da população estudada em municípios da região metropolitana de Manaus	63
Tabela 11. Distribuição da população de acordo com o município/local de coleta.....	64
Tabela 12. Estratificação da população de acordo com os possíveis fatores de risco associados ao aumento da suscetibilidade à infecção por HTLV-1/2.....	65
Tabela 13. Comparação da similaridade genética entre as cepas de HTLV-1 com sequências depositadas no GenBank	67
Tabela 14. Comparação da similaridade genética entre as cepas de HTLV-2 com sequências depositadas no GenBank	68
Tabela 15. Estratificação da população estudada.....	84
Tabela 16. Estratificação da população estudada.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 17. Comparação entre médias e desvio padrão dos níveis de IgG entre indivíduos assintomáticos e MAH.....	92
Tabela 18. Comparação entre os níveis de IgG (BR) detectados no ensaio de captura in-house e ensaio Murex em amostras de indivíduos não infectados .	93
Tabela 19. Comparação entre médias e desvio padrão de neopterina entre indivíduos assintomáticos e MAH.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARV - AIDS-associated Retrovirus

LLTA – Leucemia/Linfoma de células T do Adulto

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EDTA – Etilenodiamino tetra-acético

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

MAH – Mielopatia Associada ao HTLV

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HTLV – Vírus Linfotrópico de células T Humanas

LAV - Lymphadenopathy Associated Virus

LTR - Repetição terminal longa

NC - Nucleocapsídeo

PVHTLV – Pessoas Vivendo com HTLV

PET – Paraparesia Espástica Tropical

RNA – Ácido ribonucleico

TR - Transcriptase reversa

ESTRUTURAÇÃO DA TESE

A presente tese está estruturada em dois capítulos, refletindo diferentes abordagens metodológicas e contextos de estudo para a investigação do HTLV.

Capítulo 1: Perfil epidemiológico e caracterização molecular da infecção por HTLV-1/2 na região metropolitana de Manaus

São apresentados os testes realizados na região metropolitana de Manaus, com o objetivo principal de estimar a prevalência do HTLV-1/2 e subtipos circulantes. São fornecidas as características sociodemográficas dos participantes, resultados dos testes sorológicos, moleculares e possíveis fatores de risco associados à infecção por HTLV-1/2 em Manaus, Iranduba, Presidente Figueiredo e Rio Preto da Eva, onde os dados epidemiológicos sobre esse vírus ainda são escassos ou até mesmo inexistentes.

Capítulo 2: Estratégias minimamente invasivas no diagnóstico da infecção por HTLV-1/2 e monitoramento inflamatório em indivíduos infectados

São apresentados os resultados das atividades realizadas durante o período de Doutorado Sanduíche, no departamento de doenças infecciosas, seção de virologia do Imperial College London, Inglaterra. Este capítulo apresenta duas metodologias que compartilham o objetivo comum de investigar o uso de amostras minimamente invasivas no contexto da infecção por HTLV-1/2.

O primeiro método aborda a validação de um ELISA utilizando saliva para o diagnóstico da infecção por HTLV-1.

O segundo método explora a aplicabilidade de amostras de Dried Blood Spots (DBS) e Dried Plasma Spots (DPS) na detecção de IgG anti-HTLV-1/2 e detecção de marcadores precoces da inflamação em indivíduos infectados.

SUMÁRIO

1.1. INTRODUÇÃO.....	20
1.2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	23
1.2.1. Histórico	23
1.2.2. Estrutura do HTLV.....	24
1.2.3. Heterogeneidade do HTLV-1 e HTLV-2.....	27
1.2.4. Ciclo de replicação do HTLV	29
1.2.5. Transmissão do HTLV-1/2.....	31
1.2.6. Principais patologias associadas à infecção por HTLV-1/2	33
1.2.7. Epidemiologia	36
1.2.7.1. Distribuição mundial do HTLV-1/2.....	36
1.2.7.2. Distribuição do HTLV-1/2 no Brasil	37
1.2.8. Diagnóstico da infecção por HTLV-1/2	41
1.2.9. Amostras minimamente invasivas	43
1.3. JUSTIFICATIVA	46

CAPÍTULO 1

PERFIL EPIDEMIOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA INFECÇÃO POR HTLV-1/2 NA REGIÃO METROPOLITANA DE MANAUS

1.4. OBJETIVOS.....	49
1.4.1. Objetivo geral	49
1.4.2. Objetivos específicos.....	49
1.5. MATERIAL E MÉTODOS	50
1.5.1. Aspectos éticos.....	50
1.5.2. Caracterização da população investigada	50
1.5.3. Sorologia.	51
1.5.4. Western Blot e INNO-LIA.....	51
1.5.5. Extração de DNA.....	52
1.5.6. Amplificação da região 5'LTR do HTLV-1	53
1.5.7. Amplificação da região 5'LTR do HTLV-2.....	53
1.5.8. Eletroforese	54

1.5.9. Sequenciamento	54
1.5.10. Análise filogenética.....	55
1.5.11. Análise dos dados	55
1.6. RESULTADOS	53
1.6.1. Prevalência da infecção por HTLV-1/2 em Manaus e perfil sociodemográfico da população estudada	56
1.6.2. Investigação da infecção por HTLV-1/2 em municípios da região metropolitana de Manaus	62
1.6.3. Identificação dos tipos virais	66
1.6.4. Identificação dos subtipos virais	67
1.7. DISCUSSÃO.....	70
1.8. Conclusões.....	77

CAPÍTULO 2

ESTRATÉGIAS MINIMAMENTE INVASIVAS NO DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR HTLV-1/2 E MONITORAMENTO INFLAMATÓRIO EM INDIVÍDUOS INFECTADOS

2.1. OBJETIVOS	79
2.1.1. Objetivo geral.....	79
2.1.2. Objetivos específicos	79
2.2. Validação de um teste de ELISA para o diagnóstico da infecção por HTLV-1/2 usando saliva.....	80
2.2.1. Material e métodos.....	80
2.2.1.1. Caracterização da população investigada.....	80
2.2.1.2. Amostras clínicas	80
2.2.1.3. Ensaio imunoenzimático para a detecção de IgG	80
2.2.1.4. Análise estatística	81
2.2.2. Resultados	81
2.2.3. Discussão	82
2.2.4. Conclusões	83
2.3. Avaliação do uso de Dried Blood Spot (DBS) e Dried Plasma Spot (DPS) para detecção de IgG anti-HTLV-1/2 E QUANTIFICAÇÃO DE NEOPTERINA	84
2.3.1. Material e métodos.....	84
2.3.1.1. Caracterização da população investigada para o teste de	

detecção de IgG anti-HTLV-1/2	84
2.3.1.2. Caracterização da população investigada para o teste de quantificação da neopterina	84
2.3.1.3. Amostras clínicas	85
2.3.1.4. Recuperação de sangue e plasma dos cartões de papel filtro.	86
2.3.1.5. Ensaio imunoenzimático para detecção de IgG	87
2.3.1.6. Ensaio imunoenzimático para quantificação da neopterina	88
2.3.1.7. Teste de estabilidade	88
2.3.1.8. Análise estatística	89
2.3.2. Resultados do teste de detecção de IgG	90
2.3.3. Discussão	95
2.3.4. Conclusões	98
2.3.5. Resultados do teste de quantificação de neopterina	99
2.3.6. Discussão	101
2.3.7. Conclusões	106
3. REFERÊNCIAS	107
ANEXOS.....	125

1.1. INTRODUÇÃO

O vírus T-linfotrópico humano 1 (HTLV-1) foi o primeiro retrovírus humano descrito, sendo isolado de um paciente com linfoma de células T pelo médico pesquisador estadunidense Robert Charles Gallo e colaboradores, na década de 80 (Poiesz et al., 1980). Na realidade, esse vírus foi descoberto em 1979, nos Estados Unidos, mas a publicação da descoberta ocorreu em 1980, sendo seguida por descrições de algumas proteínas do HTLV-1 e o desenvolvimento de ensaios sorológicos para detecção desse vírus (Gallo, 2005).

Dois anos após a descoberta do HTLV-1, foi identificado o HTLV-2 (Kalyanaraman et al., 1982). Em 2005, o HTLV-3 e HTLV-4 foram descritos (Gessain; Mahieux, 2005). Desta forma, atualmente são conhecidos 4 tipos de HTLV: HTLV-1, HTLV-2, HTLV-3 e HTLV-4.

O HTLV é um retrovírus pertencente ao gênero *Deltaretrovirus* que possui várias proteínas que requerem processamento transcricional mais complexo, comparado a outros retrovírus (ICTV, 2017; Hoshino, 2012). Possui um envelope derivado da célula hospedeira, contendo a glicoproteína de superfície (SU) e a proteína transmembrana (TM) (Delamarre et al., 1996).

As principais doenças correlatas ao HTLV-1 são Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto (LLTA) e Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia associada ao HTLV-1 (PET/MAH), que evoluí de forma progressiva causando paralisia (Eusebio-Ponce et al., 2019). Cerca de 1 a 5% dos infectados pelo HTLV-1 poderão desenvolver essas patologias (Giam; Semmes, 2016; Zuo et al., 2022). Indivíduos com HTLV-1 também podem desenvolver formas mais graves de algumas doenças infecciosas, tais como tuberculose e estrongiloidíase (Eusebio-Ponce et al., 2019).

A nível mundial, estima-se que há cerca de 20 milhões de infectados pelo HTLV-1 (Willems et al., 2017). No Brasil, esse número pode chegar a 2,5 milhões (Brasil, 2020). A maioria dos estudos de prevalência sobre o HTLV realizados no Brasil investigaram a infecção em populações específicas. Em São Paulo, um estudo relatou que a prevalência do HTLV entre os 1.608 pacientes com HIV/AIDS analisados foi de 3,11% (Caterino-de-Araujo et al., 2015).

Outras frequências encontradas em estudos realizados em diferentes populações do Brasil, são de 0,13% entre doadores de sangue em Manaus, Amazonas (De Moraes et al., 2017); 1,05% e 0,3% em gestantes na Bahia e Pará, respectivamente (Mello et al., 2014; Sequeira et al., 2012); 0,53% em adultos de Vitória, Espírito Santo (Orletti et al., 2021) e 8,2% em populações indígenas no Pará (Abreu et al., 2022).

Em relação ao HTLV-2, estima-se que cerca de 800.000 pessoas estejam infectadas em todo o mundo, sendo que no Brasil o número estimado de infectados é de 200 a 250.000, havendo maiores taxas de prevalência em populações indígenas e usuários de drogas injetáveis (Murphy; Cassar; Gessain, 2015). No norte do Brasil, relatou-se uma prevalência superior a 30% para a infecção por HTLV-2 na comunidade indígena Kayapó (Ishak et al., 1995). Ainda não há evidências conclusivas sobre patologias associadas ao HTLV-2, ou seja, esse vírus ainda não foi associado a doenças específicas, havendo apenas relatos de plaquetose e leucocitose persistentes causadas pelo HTLV-2, por exemplo (Bartman et al., 2008).

Apesar do HTLV ter sido o primeiro retrovírus humano descrito, ainda há poucos dados epidemiológicos disponíveis. A maioria dos estudos epidemiológicos foram realizados em populações específicas, tais como gestantes, pacientes hospitalizados ou doadores de sangue. Dessa forma, torna-se muito difícil extrapolar a epidemiologia da infecção por HTLV-1/2 para a população em geral devido a escassez de estudos com amostras heterogêneas representativas (Gessain; Cassar, 2012).

Por muito tempo observou-se a ausência de uma vigilância epidemiológica adequada no Brasil, em relação ao HTLV, dificultando a elaboração de estratégias públicas de saúde para combater essa infecção, impossibilitando a identificação de indivíduos infectados e o diagnóstico precoce relacionado às doenças correlatas ao HTLV. Esse cenário tem mudado aos poucos, e recentemente foi determinada a obrigatoriedade da triagem e confirmação do HTLV no pré-natal a nível nacional, instituída em fevereiro de 2024 (Brasil, 2024).

Apesar do avanço em relação à notificação de casos de HTLV em gestantes, parturientes, puérperas e crianças expostas ao risco de transmissão vertical no Brasil, o diagnóstico dessa infecção ainda representa um desafio

significativo, especialmente em regiões com recursos limitados. A dificuldade no acesso a testes diagnósticos, seus custos que são elevados (principalmente os testes confirmatórios) e a ausência de programas de rastreamento em larga escala contribuem para a subnotificação de casos e o diagnóstico tardio da infecção. Essa limitação, entre outras situações, também dificulta o manejo clínico adequado dos indivíduos infectados, impactando negativamente sua qualidade de vida e prognóstico.

Considerando a limitação do diagnóstico da infecção por HTLV, é essencial o desenvolvimento de novas metodologias que facilitem o acesso ao diagnóstico, utilizando por exemplo, amostras minimamente invasivas, que poderiam ser vantajosas principalmente em áreas de difícil acesso, como em diversas regiões da Amazônia.

Como já mencionado anteriormente, apesar de existirem estudos epidemiológicos sobre essa infecção no Brasil, são pesquisas que não abrangem todas as regiões, mesmo o Brasil sendo considerado o país com o maior número absoluto de indivíduos infectados com HTLV-1/2 no mundo (Viana et al., 2014). Dessa forma, este estudo investigou a prevalência da infecção pelo HTLV-1/2 e identificou os tipos e subtipos circulantes na região metropolitana de Manaus, Amazonas, assim como investigou a utilidade de amostras minimamente invasivas no diagnóstico da infecção por HTLV-1/2 e seu uso na quantificação de um marcador inflamatório que poderá ser utilizado no acompanhamento dos infectados por esse vírus.

1.2. REFERENCIAL TEÓRICO

1.2.1. Histórico

Tanto o HTLV-1 quanto o HTLV-2 foram descritos pela primeira vez na década de 80, antes mesmo da descoberta do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Poiesz et al., 1980; Kalyanaraman et al., 1982). Contudo, é inegável que a descoberta do HTLV permitiu a posterior identificação do HIV, uma vez que em 1983, a virologista Françoise Brun-Vezinet detectou a enzima transcriptase reversa em cultura de células T provenientes de um paciente homossexual com linfadenopatia, e esse achado evidenciou que o vírus causador da AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) era um retrovírus. Até aquele momento, eram conhecidos apenas dois retrovírus: o HTLV-1 e HTLV-2 (Montagnier, 2002).

Embora houvessem outras hipóteses sobre possíveis fatores causadores da AIDS, tais como autoimunidade, produtos químicos ou infecção fúngica, as evidências sugeriam um retrovírus. Além disso, a epidemiologia da AIDS demonstrava que a transmissão ocorria da mesma forma que o HTLV: por via sanguínea, atividade sexual e transmissão vertical (Gallo; Montagnier, 2003).

Dois anos após a descoberta do HTLV-2, Gallo e sua equipe relataram a descoberta do HTLV-3. Eles acreditavam que esse era o vírus causador da AIDS (Broder; Gallo, 1984). Posteriormente, descobriu-se que a AIDS não era causada pelo HTLV-3, mas por um retrovírus distinto, que passou a ser chamado de HIV (Yokoyama; Gojobori, 1987). Sabendo-se que o HTLV podia ser transmitido através do sangue, diversos países começaram a realizar a triagem sorológica para detecção desse vírus em serviços de hemoterapia (Lopes; Proietti, 2008).

O Japão iniciou a triagem sorológica para detecção do HTLV em 1986, sendo o primeiro país a realizar esse procedimento em serviços de hemoterapia. Posteriormente, outros países reconheceram a importância dessa triagem em doadores de sangue, como o Brasil, que implementou a triagem sorológica para a detecção do HTLV em 1993 (Lopes; Proietti, 2008).

Em 2005, foram descobertos o HTLV-3 e HTLV-4, por pesquisadores que detectaram os vírus em indivíduos assintomáticos residentes na República de Camarões, na região ocidental da África Central (Calattini et al., 2005; Wolfe et

al., 2005). As amostras desses infectados apresentaram positividade para HTLV-1/2 no teste de triagem (ELISA – Ensaio de Imunoadsorção ligado à enzima), porém, observou-se resultado indeterminado no teste confirmatório (Western Blot) (Mahieux; Gessain, 2011).

Acredita-se que a transmissão do HTLV-3 e 4 tenha ocorrido de símios para humanos, uma vez que esses vírus foram isolados de indivíduos da África Central que viviam em contato próximo com primatas não humanos (Gessain et al., 2013). Até o momento, não há evidências de doenças associadas a esses dois vírus em humanos (Mahieux; Gessain, 2011).

Tanto o HTLV-1 como o HTLV-2 foram classificados em subtipos a partir de análises filogenéticas das regiões *LTR* e *env*, havendo atualmente 7 subtipos do HTLV-1 (a-g) e 4 subtipos do HTLV-2 (a-d) (Eirin et al., 2011; Anyanwu et al., 2018). A identificação dos subtipos do HTLV torna-se importante para a vigilância epidemiológica, pois permite verificar em quais regiões determinado subtipo está mais presente (Casseb et al., 2006).

O subtipo HTLV-1a (chamado de cosmopolita) foi identificado em diferentes regiões geográficas, podendo ser dividido em subgrupos de acordo com sua distribuição: A ou Transcontinental; B ou Japonês; C ou Oeste-africano; D ou Norte-africano; E isolado de negros do Perú e F isolado em Senegal, na África Ocidental (Gasmí et al., 1994; Miura et al., 1994; Van Dooren et al., 1998; Diop et al., 2006). O HTLV-2 possui quatro subtipos conhecidos: a, b, c e d (Anyanwu et al., 2018).

1.2.2. Estrutura do HTLV

O HTLV é um retrovírus que pertence à família *Retroviridae*, gênero *Deltaretrovirus* (ICTV, 2017; Eusebio-Ponce et al., 2019). O HTLV-1 e o HTLV-2 são homólogos no que concerne às suas estruturas genômicas, assim como apresentam homologia em seus componentes estruturais e replicativos (Ciminale et al., 2014).

O HTLV é um vírus envelopado, apresentando genoma composto por duas cópias de ssRNA (fita única e polaridade positiva), envoltas por um capsídeo de formato icosaédrico (Haseltine; Sodroski; Patarca, 1985).

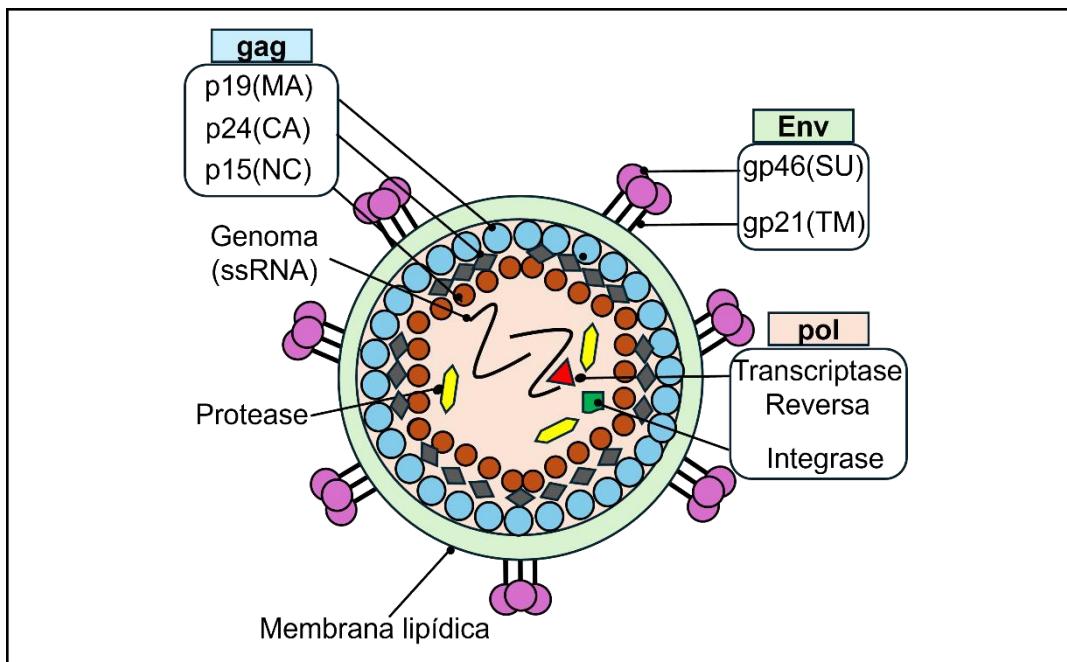


Figura 1. Estruturas do HTLV-1/2.
Adaptado de (Kalinichenko; Komkov; Mazurov, 2022).

As proteínas estruturais do HTLV são codificadas pelos genes *gag*, *pro*, *pol* e *env*. O gene *gag* codifica uma proteína de 53kDa que é clivada pela protease resultando em proteínas menores que participam do processo de montagem das novas partículas virais, e as proteínas que atuam na entrada do HTLV na célula são codificadas pelo gene *env* (Le Blanc et al., 2001; Maldonado et al., 2016).

As proteínas da matriz (MA p19), capsídeo (CA p24) e nucleocapsídeo (NC p15) são codificadas pelo gene *gag*. As proteínas gp46 (proteína de superfície - SU) e gp21 (proteína transmembrana - TM) são codificadas pelo gene *env*. As enzimas integrase e transcriptase reversa são codificadas pelo gene *pol* (Hoshino, 2012).

A integrase é uma enzima essencial no ciclo replicativo do HTLV, tendo como função a inserção do DNA viral no genoma da célula hospedeira (Bertola et al., 2001). As glicoproteínas do envelope do HTLV, gp46(SU) e gp21 (TM), medeiam a ligação do vírus (adsorção) aos receptores presentes na superfície da célula hospedeira, permitindo a subsequente fusão do envelope viral com a membrana celular (Mota-Miranda et al., 2013).

O gene *pro* codifica a protease do HTLV, que está envolvida na maturação das partículas virais (Bernard-Valnet et al., 2012). A região genômica pX possui

genes que codificam proteínas virais acessórias, dentre as quais estão incluídas as proteínas reguladoras Tax e Rex (Eusebio-Ponce et al., 2019).

Os genomas do HTLV-1 e HTLV-2 possuem cerca de 9.030 a 9.040 nucleotídeos, possuindo em suas extremidades sequências de repetições terminais longas, chamadas de LTR (Long Terminal Repeats). A LTR é dividida em três regiões: U3 (unique 3), R (repeated) e U5 (unique 5) (Hoshino, 2012; Martinez; Al-Saleem; Green, 2019), funcionando como um promotor viral, sendo importante para o início da transcrição (Nakano; Watanabe, 2012).

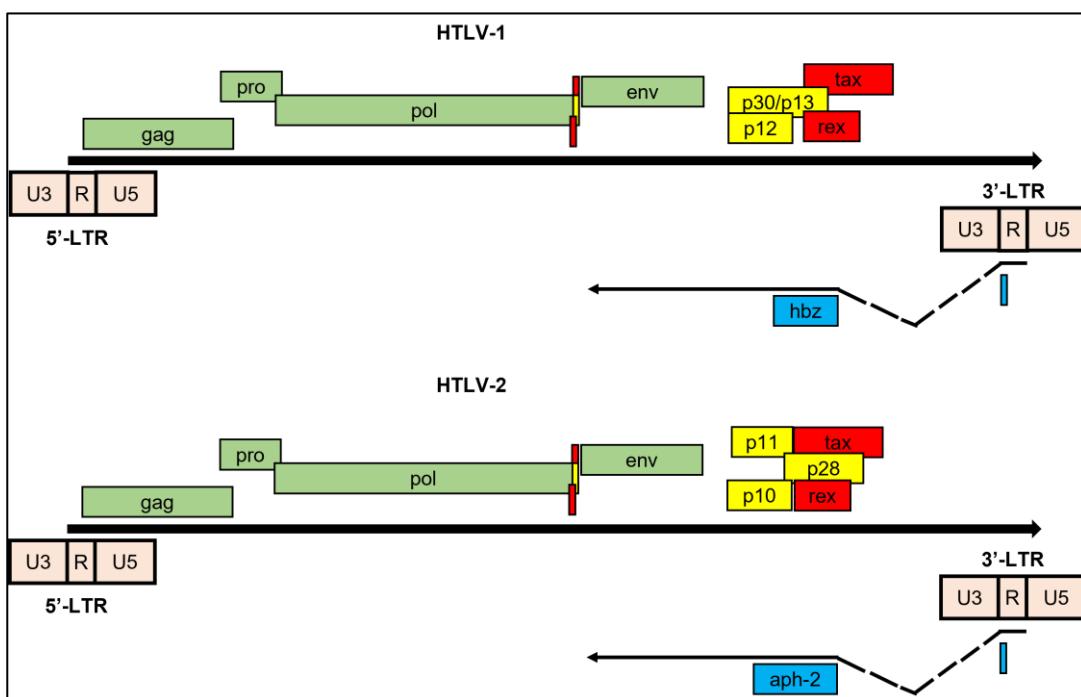


Figura 2. Estruturas genômicas do HTLV-1 e HTLV-2.

Adaptado de Barbeau; Peloponese; Mesnard, 2013.

O HTLV-2 possui cerca de 70% de similaridade genômica com o HTLV-1. Ambos codificam as proteínas Tax e Rex, além de enzimas e proteínas estruturais compartilhadas por outros retrovírus (Martinez; Al-Saleem; Green, 2019). Tax e Rex regulam a produção viral. A Tax ativa a transcrição viral e celular e promove a proliferação de células T, o que, posteriormente, pode resultar em uma transformação maligna da célula infectada (Younis et al., 2004).

Rex atua pós-transcricionalmente, facilitando a expressão citoplasmática de mRNAs virais responsáveis pela tradução de proteínas estruturais e funcionais, que controlam a replicação viral (Younis et al., 2004). Em resumo, a Tax regula a transcrição proviral, indiretamente, pela interação com proteínas regulatórias da célula hospedeira, induzindo a expressão de genes celulares,

enquanto que a Rex atua como regulador pós-transcricional, controlando o processamento do mRNA viral (Wattel et al., 1995; Ye; Xie; Green, 2003).

Em relação às diferenças genômicas e transpcionais, o HTLV-1 codifica as proteínas acessórias p12, p13 e p30, enquanto o HTLV-2 codifica a p10, p11 e p28 (em amarelo) (Figura 2) (Barbeau; Peloponese; Mesnard, 2013).

Os transcritos antisense iniciam a partir da região 3'LTR, ocorrendo splicing para produção das proteínas HBZ e APH-2 (Barbeau; Peloponese; Mesnard, 2013). HBZ (HTLV-1 bZIP factor) é um fator nuclear transicional codificado pelo HTLV-1 e possui um importante papel no processo oncogênico da LLTA (Wu et al., 2016).

A proteína APH-2 (Antisense Protein of HTLV-2) codificada pelo HTLV-2 está envolvida na latência viral, na regulação de processos transpcionais e na modulação de vias celulares. Essa proteína afeta a sinalização do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) e do fator regulador de interferon 1 (IRF-1) (Halin et al., 2009; Panfil et al., 2016).

Além das diferenças genômicas demonstradas anteriormente, existem diferenças no tropismo e patogenicidade entre o HTLV-1 e HTLV-2 (Kannian et al., 2012), que serão abordadas nos tópicos posteriores.

É interessante destacar que o genoma do HTLV possui alta estabilidade, apresentando uma variabilidade genotípica inferior a 4% (Ratner; Philpott; Trowbridge, 1991). Devido o HTLV apresentar maior variabilidade na região LTR, essa região é utilizada com mais frequência para caracterização dos subtipos virais (Komurian-Pradel et al., 1992).

1.2.3. Heterogeneidade do HTLV-1 e HTLV-2

Como mencionado anteriormente, apesar da similaridade genômica, existem diferenças entre o HTLV-1 e 2. Por exemplo, o HTLV-1 infecta preferencialmente os linfócitos TCD4+, enquanto o HTLV-2 possui maior tropismo por linfócitos TCD8+ (Kannian et al., 2012).

Quanto à patogenicidade, embora tanto o HTLV-1 como o HTLV-2 codifiquem as proteínas Tax, as quais apresentam cerca de 85% de similaridade na sequência de aminoácidos, observa-se que a Tax-1 (HTLV-1) e Tax-2 (HTLV-2) possuem diferenças quanto à capacidade de transformação celular (Shoji et

al., 2009).

Com base na variabilidade genética, o HTLV-1 e 2 podem ser classificados em diferente subtipos (Quadro 1). O HTLV-1 apresenta sete subtipos (a-g), sendo que o subtipo **a** apresenta distribuição mundial, enquanto os outros subtipos são restritos a algumas regiões específicas (Eirin et al., 2011). O HTLV-2 possui quatro subtipos conhecidos: a, b, c e d (Anyanwu et al., 2018).

Quadro 1. Tipos e subtipos do HTLV

Tipo	Subtipo	Tipo	Subtipo
HTLV-1	HTLV-1a (Cosmopolita) HTLV-1b (Centro-africano) HTLV-1c (subtipo da Melanésia) HTLV-1d (isolado de pigmeus em Camarões e região do Gabão) HTLV-1e (isolado na República Democrática do Congo) HTLV-1f (isolado de um indivíduo no Gabão) HTLV-1g (isolado em Camarões)	HTLV-2	HTLV-2a HTLV-2b HTLV-2c HTLV-2d

O HTLV-1a, também conhecido como Cosmopolita, é o subtipo mais disseminado geograficamente, estando presente endemicamente no Japão, Caribe, Américas Central e Sul, África do Norte e Ocidental e Oriente Médio (Gessain; Cassar, 2012). Os outros subtipos do HTLV-1 são mais restritos a algumas regiões, principalmente na África Central (Camarões, República Centro-Africana e Gabão) (Afonso; Cassar; Gessain, 2019).

Casseb et al. (2006) verificaram que a variabilidade do HTLV provavelmente não tem uma influência significativa na progressão das doenças causadas por esse vírus. Observou-se que variações genéticas do HTLV-1 não estão correlacionadas com diferentes desfechos clínicos em pacientes com PET.

O HTLV-2a e b são frequentes entre usuários de drogas injetáveis nos Estados Unidos e na Europa. O subtipo HTLV-2a é mais disseminado na América do Norte e Europa Oriental, enquanto o subtipo HTLV-2b circula na Europa Ocidental, principalmente na Itália e Espanha (Abad et al., 2011).

O HTLV-2b também é prevalente em populações indígenas na América do Sul (Paiva; Casseb, 2015). Abreu et al. (2022) relataram uma elevada prevalência de HTLV-1/2 entre indígenas Warao (etnia que habita a Venezuela)

vivendo em Belém, Pará. Nesse estudo, observou-se uma prevalência de 2% para a infecção por HTLV-2, subtipo HTLV-2b.

Na região Amazônica brasileira, foi detectada uma ampla distribuição do HTLV-2c em grupos indígenas do estado do Pará (Ishak et al., 2007). Os autores desse estudo destacaram que esse é o único subtipo molecular ocorrendo entre várias tribos indígenas da região Amazônica. Ainda no estado do Pará, um estudo realizado por Braço et al. (2019) detectou uma elevada prevalência da infecção por HTLV-2 no grupo indígena Kayapó. A análise filogenética confirmou a presença do HTLV-2c.

Pontes e colaboradores (2020) relataram a primeira descrição do HTLV-2c em uma área urbana da Amazônia Ocidental. O estudo recrutou indivíduos com doenças hematológicas atendidos em uma fundação hospitalar localizada em Manaus, Brasil. Os autores alertaram que a detecção do HTLV-2c em novas áreas urbanas demonstra a necessidade da ampliação da vigilância em saúde pública, em relação à infecção por HTLV.

Identificar as variantes genéticas do HTLV-1 e 2 circulantes no Brasil e principalmente no Amazonas, possui grande importância para a vigilância epidemiológica desses vírus e, consequentemente, para a saúde pública.

1.2.4. Ciclo de replicação do HTLV

Ao contrário de outros retrovírus, os vírions livres do HTLV são pouco eficientes na infecção da maioria dos tipos celulares e, devido a isso, a disseminação viral no hospedeiro ocorre principalmente por meio do contato célula-célula (sinapse viral) (Pique; Jones, 2012).

A baixa infectividade das partículas livres do HTLV pode estar associada não apenas à instabilidade das proteínas do envelope, como também às propriedades intrínsecas do próprio vírus e às barreiras celulares que impedem a propagação efetiva do vírus (Futsch; Mahieux; Dutartre, 2018).

Embora as células TCD4+ sejam os principais alvos do HTLV-1, diversas outras células podem ser infectadas, pois a subunidade de superfície (SU) do HTLV (presente no envelope viral) pode interagir com três receptores de superfície presentes em uma grande variedade de células: o transportador de glicose (GLUT-1), o proteoglicano sulfato de heparina (HSPG) e o receptor

neuropilina 1 (NRP-1) (Manel et al., 2003; Jones et al., 2005; Ghez et al., 2006).

O HTLV realiza um ciclo lisogênico (integra seu material genético no genoma da célula hospedeira). A Figura 3 a seguir ilustra as etapas desse ciclo, que se inicia com a adsorção viral, que é um mecanismo que permite a entrada do HTLV na célula hospedeira devido a interação entre a proteína viral (gp46) e outra proteína encontrada na superfície celular (GLUT-1) (Figura 3A)(Manel et al., 2003; Erez et al., 2017).

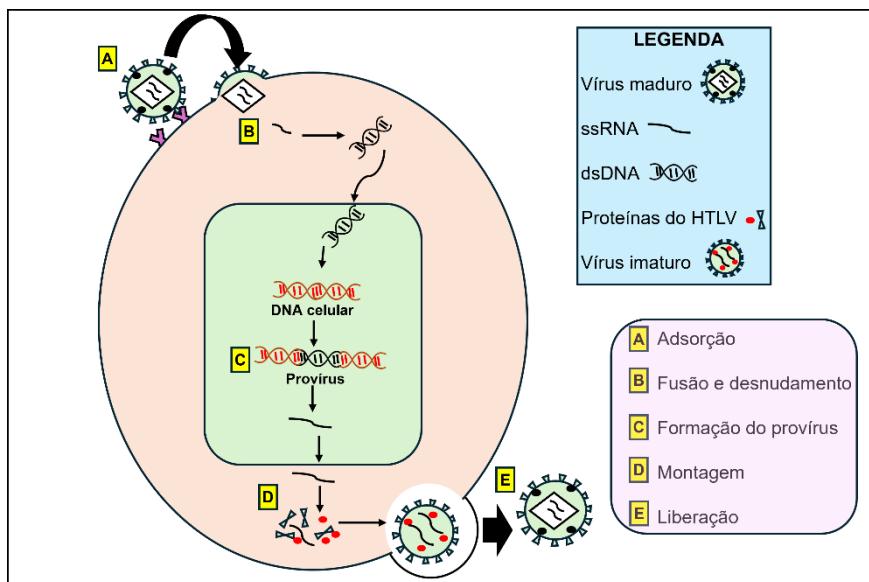


Figura 3. Ciclo replicativo do HTLV.

Fonte: elaborada pelo autor (2024).

A etapa seguinte é chamada de fusão, que é a união entre o envelope do HTLV e a membrana da célula hospedeira, havendo nessa etapa interações entre as proteínas transmembrana celulares NRP-1 (Neuropilina-1), HSPG (Heparan sulfato proteoglicano) e GLUT-1 (Transportador de glicose 1) e as proteínas virais SU (glicoproteína de superfície) e gp21 (glicoproteína transmembrana) (Manel et al., 2004; Eusebio-Ponce et al., 2019).

Seguindo a etapa de fusão, o capsídeo que agora se encontra livre no citoplasma, sofre desnudamento e libera o RNA do HTLV, que sob ação da enzima transcriptase reversa, é convertido em DNA dupla fita (Figura 3B) (Martin et al., 2016). A partir desse momento, o DNA dupla fita é transportado ao núcleo celular e por ação da enzima integrase, é integrado ao genoma da célula (sendo chamado de provírus) (Figura 3C) (Martin et al., 2016).

O provírus é definido como o material genético viral incorporado no genoma da célula hospedeira e, dessa forma, pode ser replicado juntamente com o genoma celular (Galperin, 1994).

O complexo multiproteico celular RNA polimerase II realiza a transcrição do provírus, que sofre modificação após a transcrição (processo conhecido como splicing de RNA), dando origem aos genomas e mRNAs (Eusebio-Ponce et al., 2019; Martin et al., 2016).

O splicing é um processo que remove os íntrons de um pré-mRNA (RNA recém-sintetizado), unindo os éxons para formar uma molécula de mRNA madura (funcional) (Hoogenhof; Pinto; Creemers, 2016). Há um segundo tipo de splicing, denominado splicing alternativo, que torna possível a produção de uma maior variedade de proteínas a partir de um número limitado de genes. Esse mecanismo de expressão gênica permite a formação de mRNAs distintos a partir de um único gene (Baralle; Giudice, 2017).

A célula processa os mRNAs virais no citoplasma, possibilitando a formação da partícula viral imatura (montagem) após ocorrer o transporte do RNA viral (duas cópias) e proteínas do HTLV (Figura 3D)(Martin et al., 2016).

As novas partículas são liberadas por brotamento e as poliproteínas do HTLV são clivadas pela protease viral, dando origem a partículas virais infecciosas (Figura 3E) (processo chamado de maturação) (Martin et al., 2016).

É interessante destacar que o genoma do HTLV-1/2 possui uma alta estabilidade genética quando comparado a outros retrovírus, como o HIV, por exemplo. Isso ocorre porque, no ciclo de replicação do HTLV, as cargas provirais são estabelecidas através da expansão clonal, a partir da mitose, evitando erros (mutações) no material genético viral (Matsuoka; Jeang, 2007).

1.2.5. Transmissão do HTLV-1/2

A infecção pelo HTLV-1/2 pode ocorrer por via vertical, que é a transmissão da mãe para o filho, podendo ocorrer no momento do parto (contato com sangue e secreções vaginais), por via transplacentária ou aleitamento (Hisada et al., 2002). Também pode ser transmitida por via horizontal, através da contaminação com objetos perfurocortantes contaminados, transfusões de sangue, transplantes de órgãos, assim como é considerada uma infecção

sexualmente transmissível (IST), podendo ser transmitida por via sexual (Pique; Jones, 2012)(Figura 4).

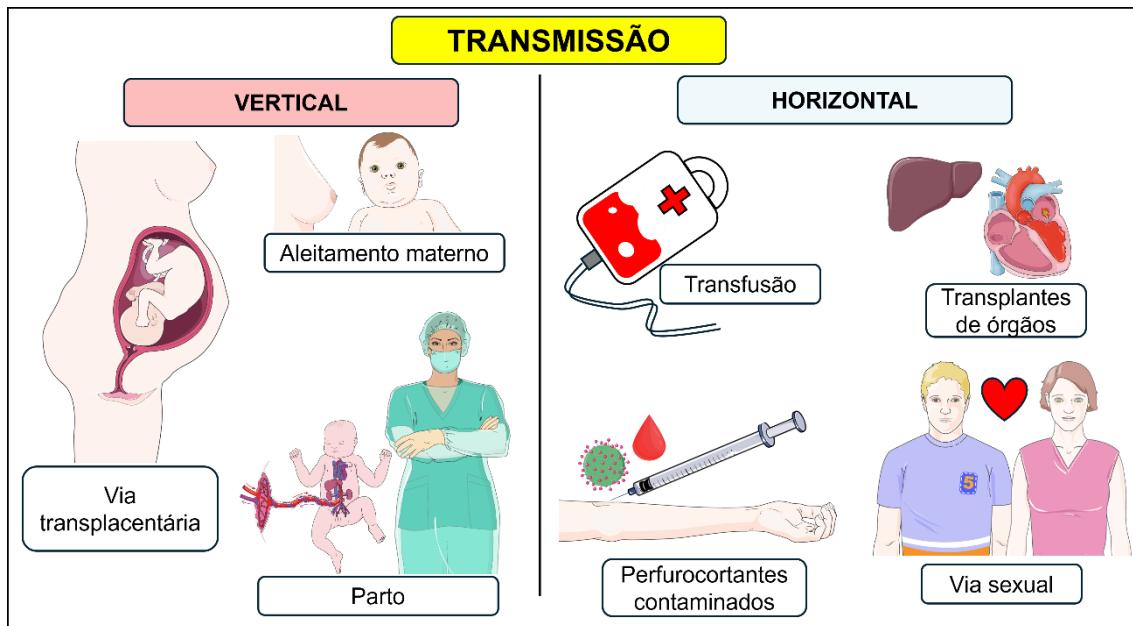


Figura 4. Formas de transmissão do HTLV-1/2.

Fonte: elaborada pelo autor (2024).

Quanto à transmissão sexual do HTLV-1, observa-se um maior risco de transmissão desse vírus por essa via quando há presença de elevada carga proviral nos leucócitos do sangue periférico, uma vez que essas células também podem estar presentes nas secreções seminais e vaginais, além de diversos outros fatores facilitarem a transmissão, como sexo desprotegido, possuir múltiplos parceiros sexuais e possuir histórico de infecções sexualmente transmissíveis (Paiva e Casseb, 2014).

A transmissão através da amamentação pode ocorrer devido a possibilidade da presença de algumas células infectadas pelo HTLV no leite materno (tais como células epiteliais e linfócitos) (Martin-Latil et al., 2011; Millen;Thoma-Kress, 2022).

Transfusões sanguíneas foram uma importante forma de transmissão do HTLV antes de 1993, no Brasil. A partir desse ano, o Ministério da Saúde implantou a obrigatoriedade de testes sorológicos em bancos de sangue nacionais, para a pesquisa de anticorpos contra o HTLV-1/2. Devido a isso, foi possível evitar a transmissão do HTLV entre os doadores e receptores sanguíneos (Brasil, 1993; Lima et al, 2010).

1.2.6. Principais patologias associadas à infecção pelo HTLV-1/2

A Paraparesia Espástica Tropical (PET)/Mielopatia associada ao HTLV-1 (MAH) e a leucemia/linfoma de células T do adulto (LLTA) são as duas principais patologias associadas à infecção por HTLV-1. Contudo, outras doenças como uveíte, artropatia, dermatite, exocrinopatia, miosite e pneumopatia também já foram associadas à infecção por esse vírus (Watanabe, 1997). Por outro lado, não existe registro concreto de patologias associadas ao HTLV-2 (Giam, 2021).

A LLTA é uma neoplasia de células T que pode comprometer diversos locais do organismo, tais como baço, fígado, tecido epitelial, pulmões, linfonodos e ossos. Nesses pacientes, é comum a ocorrência de lesões cutâneas e supressão do sistema imune (Tsukasaki; Tobinai, 2012).

É importante enfatizar que a infecção pelo HTLV-1 por si só não é condição suficiente para o desenvolvimento de LLTA, sendo necessário haver outros fatores como anormalidades moleculares nas células T infectadas por esse vírus e suscetibilidades do hospedeiro (por exemplo, idade avançada) (Iwanaga, 2020). No Japão, condições imunossupressoras foram reconhecidas como importantes causas de suscetibilidade associada ao desenvolvimento de LLTA, em pacientes infectados com HTLV-1 (Iwanaga, 2020).

É mais comum a ocorrência de LLTA em idosos (>60 anos), sendo rara a ocorrência na infância ou adolescência (Bittencourt; Primo; Oliveira, 2006). É classificada em subtipos de acordo com critérios diagnósticos que incluem hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatia, hipercalcemia, envolvimento cutâneo e infiltração de órgãos. Esses quatro subtipos clínicos são: aguda, crônica, latente e linfomatosa (Malpica et al., 2018).

Pacientes com LLTA geralmente possuem um mau prognóstico devido essa patologia apresentar resistência à quimioterapia, além de não haver até o momento, tratamento específico (Bittencourt; Primo; Oliveira, 2006).

Os sintomas irão depender do tipo de LLTA. As principais manifestações estão elencadas a seguir (Quadro 2).

Quadro 2. Tipos de LLTA e principais alterações/manifestações causadas pela doença.

Tipo de LLTA	Características
Latente	Poucos linfócitos anormais no sangue periférico (<5%), ausência de linfocitose e hipercalcemia, níveis de LDH podem estar normais ou elevados, pode haver presença de lesões cutâneas e/ou pulmonares, não havendo envolvimento de outros órgãos.
Aguda (leucêmica)	Febre, tosse, linfadenopatia, lesões cutâneas, hepatoesplenomegalia, leucocitose acentuada, hipercalcemia, níveis séricos de LDH elevados, presença de linfócitos atípicos (células em flor).
Linfomatosa	Linfonodomegalia com ou sem lesões extranodais, ausência de linfocitose e hipercalcemia, poucos linfócitos atípicos circulantes (<1%).
Crônica	Linfocitose, níveis elevados de LDH, ausência de hipercalcemia, 5% ou mais de linfócitos atípicos.

Fonte: Bittencourt; Primo; Oliveira (2006)

A MAH/PET é resultante de uma inflamação crônica que possui evolução lenta (Izumo; Umehara; Osame, 2000). Há infiltração de células T e outras células mononucleares nas áreas perivascular e no parênquima da medula espinhal e degeneração difusa e simétrica envolvendo mielina e axônios (Izumo; Umehara; Osame, 2000). No Azerbaijão, Ásia Ocidental, verificou-se a ocorrência de 11 casos de MAH/PET entre os anos de 2004 a 2007 (2 homens e 9 mulheres) (Boostani; Ardakani; Ashrafi, 2011).

Em um estudo que investigou as características clínico-epidemiológicas de 206 pacientes com MAH/PET, observou-se que os pacientes apresentaram como principais sintomas: fadiga muscular dos membros inferiores, bexiga neurogênica, constipação intestinal, aumento involuntário da contração muscular (espasticidade) e dores (Champs et al., 2010). Entre os sinais neurológicos, observou-se principalmente neuropatia periférica e hiperreflexia.

Embora a LLTA e a MAH/PET sejam as doenças mais graves e reconhecidas da infecção pelo HTLV-1, esse vírus está associado a uma ampla gama de outras condições clínicas (Figura 6), tais como uveíte(Nakao, Abematsu e Sakamoto, 2018), dermatite infecciosa(Bittencourt e Farre, 2024), artrite(Motokawa et al., 1996), síndrome de Sjögren(Eguchi et al., 1992), alveolite linfocítica(Dias et al., 2018; Yamazato et al., 2003), polimiosite(Smadja et al., 1995) e disfunções do trato urinário(Castro et al., 2007).

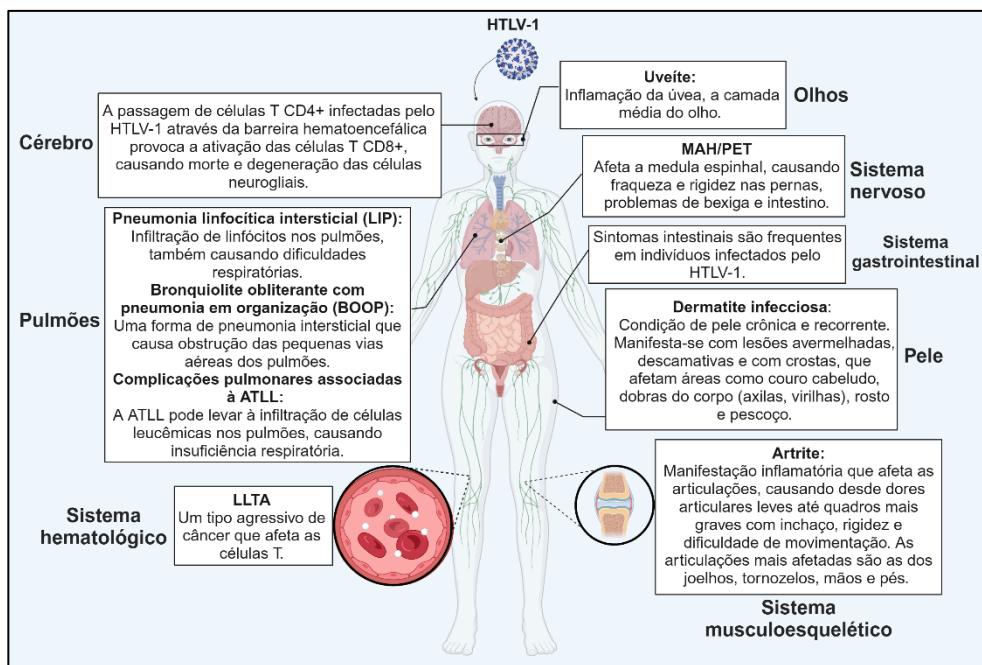


Figura 5. Algumas patologias e manifestações observadas em infectados por HTLV-1.

Fonte: Criado com BioRender.com

Faz-se necessária e de extrema importância a criação de campanhas e políticas públicas que favoreçam não apenas o diagnóstico, mas também a disseminação de conhecimento sobre o HTLV, que é um vírus desconhecido por grande parte da população e profissionais da saúde (Santos; Soares; Rivemales, 2017). Esse desconhecimento sobre o HTLV e patologias correlatas leva à demora no diagnóstico e, dessa forma, influencia no prognóstico dos infectados (Santos; Soares; Rivemales, 2017).

O diagnóstico precoce dos infectados com HTLV-1/2 é fundamental, permitindo o aconselhamento psicológico e clínico adequado e identificação das manifestações precoces observadas em patologias correlatas ao HTLV. Além disso, o acompanhamento dos infectados pode prevenir a transmissão do HTLV e assim, novas infecções, uma vez que esse vírus está presente em células no sangue, leite materno, fluido vaginal e sêmen (Brasil, 2021; Brasil, 2004).

Desta forma, a vigilância epidemiológica da infecção por HTLV-1/2 é necessária e fundamental na elaboração de estratégias públicas de saúde, pois permite que um conjunto de ações sejam tomadas para detectar e prevenir a transmissão desse vírus.

1.2.7. Epidemiologia

1.2.7.1. Distribuição mundial do HTLV-1/2

Como já mencionado anteriormente, estima-se que há cerca de 20 milhões de infectados pelo HTLV-1 no mundo (Brasil, 2021). A maior soroprevalência a nível mundial para essa infecção é observada no Japão, segundo dados de 2006-2007 que reportaram aproximadamente 1,08 milhão de infectados (Iwanaga, 2020). Contudo, sabe-se que o Brasil possui a maior quantidade de infectados em números absolutos (Brasil, 2020; Carneiro-proietti et al., 2002).

Em 2016, a incidência da infecção por HTLV-1 foi de 3,8 por 100.000 pessoas-ano no Japão. Além disso, estimou-se cerca de 4.000 novas infecções anualmente entre adolescentes e adultos (Iwanaga, 2020). Além do Japão, são áreas endêmicas para a infecção por HTLV-1: África subsaariana, América do Sul, Caribe, Melanésia e Oriente Médio (Gessain; Cassar, 2012).

Em um estudo que investigou a infecção por HTLV-1/2 em doadores de sangue dos Estados Unidos, observou-se que a soropositividade para o HTLV foi associada ao sexo feminino, idade avançada, raça/etnia negra e asiática, menor nível educacional e residência no oeste e sudoeste dos Estados Unidos (Chang et al., 2014). Isso demonstra que a distribuição do HTLV depende de muitos fatores, fazendo com que a distribuição dos tipos e suptipos do HTLV ocorra de forma heterogênea (Catalan-Soares et al., 2005).

Em comparação ao HTLV-1, observa-se que o HTLV-2 possui uma distribuição mais restrita, infectando principalmente usuários de drogas intravenosas, indígenas (América do Norte à América do Sul) e pigmeus da África (Ishak; Vallinoto, 2020; Braço et al., 2019; Zunt et al., 2006b; Vallinoto; Ishak, 2017).

É interessante destacar que a prevalência para a infecção por HTLV pode ser categorizada em: baixa (menos de 1%), média ou moderada (1% a 5%) e elevada (superior a 5%) (Anyanwu et al., 2018). Em relação a grupos específicos, como profissionais do sexo, um estudo realizado na cidade de Kinshasa, Zaire, recrutou 377 dessas profissionais para avaliar possíveis fatores de risco associados às infecções por HIV e HTLV. Doze amostras (3,2%) foram soropositivas para HTLV-1, enquanto 101 amostras (26,8%) apresentaram

positividade para HIV-1. Observou-se que a prevalência do HTLV-1 aumentou proporcionalmente à idade (Wiktor et al., 1990).

Em um estudo que recrutou 400 profissionais do sexo em uma clínica de IST's na cidade de Lima, Peru, observou-se que a taxa de prevalência da infecção era diretamente proporcional ao tempo de atividade profissional, ou seja, quanto mais prolongado o tempo da atividade profissional, mais elevada era a prevalência do HTLV-1 entre esses profissionais (Gotuzzo et al, 1994).

Em um estudo realizado no Perú, que investigou a infecção por HTLV em 2.703 homens peruanos que relataram fazer sexo com homens, observou-se prevalência de 1,3% (n=35) para HTLV-2 e 2,1% (n=56) para HTLV-1. Os autores do estudo hipotetizaram que a elevada positividade pode ter ocorrido devido ao maior risco de traumatismo local durante as relações sexuais. Além disso, o número de parceiros sexuais, idade e sexo anal desprotegido também mostraram ser fatores que podem potencializar a prevalência da infecção por HTLV nesse grupo (Zunt et al, 2006a).

De forma geral, há poucos estudos que permitem uma estimativa global da infecção por HTLV, pois a maioria das pesquisas utilizam amostragem com baixa representatividade, limitando-se a grupos específicos, tais como doadores de sangue ou gestantes, impossibilitando uma análise epidemiológica da população geral de uma região ou país.

1.2.7.2. Distribuição do HTLV-1/2 no Brasil

Assim como são escassos os estudos epidemiológicos sobre o HTLV a nível mundial, pesquisas mais abrangentes sobre a prevalência desse vírus no Brasil também são raras, sendo a maioria voltadas para grupos populacionais específicos, tais como gestantes, populações indígenas e doadores de sangue (Figura 6).

A cidade brasileira de Salvador, na Bahia, apresenta a maior taxa de positividade para a infecção por HTLV-1 (1,48%), tendo ocorrido provável infecção por transmissão horizontal entre adultos (via sexual) (Nunes et al., 2017).

Na população adulta de Vitória, Espírito Santo, observou-se uma prevalência de 0,53% (8/1.502) para a infecção por HTLV-1/2. Entre os

indivíduos soropositivos, a taxa de positividade para o HTLV-1/2 foi de 0,7% entre os homens (5/711) e 0,38% entre as mulheres (3/791) (Orletti, et al., 2021).

A infecção por HTLV-1/2 também foi detectada em populações ribeirinhas e rurais do Estado do Pará, observando-se uma positividade geral para a infecção de 0,8% (7/907) (Lima et al., 2022).

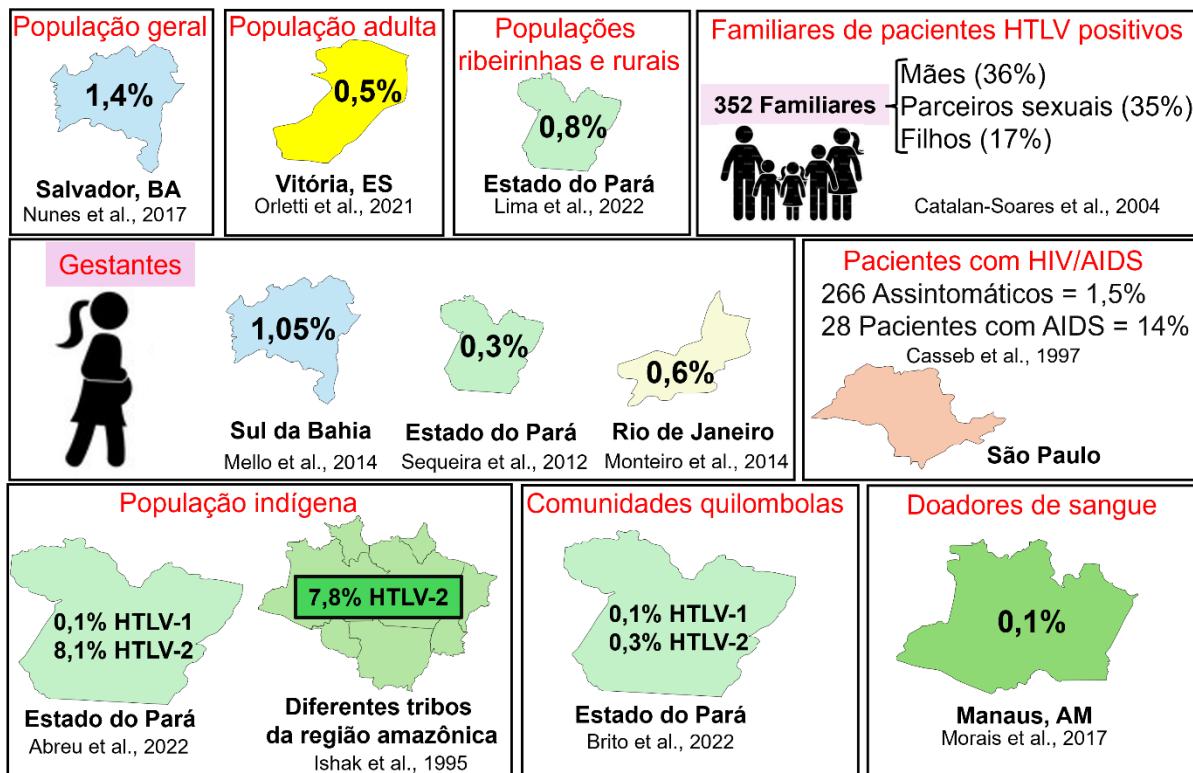


Figura 6. Prevalências da infecção por HTLV-1/2 em diversas populações brasileiras.

Fonte: elaborada pelo autor (2024).

Um estudo de prevalência realizado no sul da Bahia investigou a infecção por HTLV-1 em 2.766 gestantes. A prevalência encontrada foi de 1,05% (29/2.766). Quando se investigou a infecção por HTLV entre os familiares das gestantes soropositivas, observou-se positividade de 32,56% entre os 43 indivíduos que concordaram em participar do estudo (Mello et al., 2014).

Em gestantes do Estado do Pará, a prevalência encontrada para a infecção por HTLV-1/2 foi de 0,3% (43/13.382) (Sequeira et al., 2012). O estudo recrutou gestantes em unidades básicas de saúde e destacou-se a importância de estratégias de controle e prevenção da infecção por HTLV, evitando-se assim a transmissão vertical, principalmente via aleitamento materno.

Monteiro et al. (2014) relataram uma prevalência para a infecção por HTLV-1/2 em gestantes residentes na área metropolitana do Rio de Janeiro de

0,66% (8/1.240). Sete gestantes apresentaram positividade para HTLV-1 e uma gestante para HTLV-2.

Em Belo Horizonte, Minas Gerais, verificou-se que as vias vertical e sexual são importantes formas de transmissão do HTLV, pois relatou-se que entre 352 familiares de 343 pacientes soropositivos para HTLV, as taxas de positividade em mães, parceiros sexuais e filhos dos pacientes soropositivos foram de 36,6%, 35,9% e 17,5%, respectivamente (Catalan-Soares et al., 2004).

Quanto à coinfecção HTLV/HIV, as taxas de positividade variam entre 2,25% a 21,11% no Brasil (Ribeiro et al., 2019). Um estudo que analisou pacientes com HIV em São Paulo, relatou positividade para a infecção por HTLV em 1,5% dos pacientes assintomáticos e 14% dos pacientes com AIDS, destacando como principal fator de risco para a coinfecção, o uso de injetáveis (Casseb et al., 1997). Esses e outros dados demonstram que a coinfecção HTLV/HIV é algo que ocorre com frequência em usuários de drogas injetáveis (Casoli; Pilotti; Bertazzoni, 2007).

Em relação à coinfecção HTLV/HIV, acredita-se que casos podem ocorrer com mais frequência do que se imagina, pois a testagem para detecção do HTLV não é feita rotineiramente em pacientes com HIV (Isache et al., 2016). Em um estudo realizado no Rio de Janeiro, Brasil, observou-se que 10,9% (47/428) dos pacientes com HIV estudados possuíam coinfecção pelo HTLV. A coinfecção foi associada com um maior risco de doenças neurológicas nesses indivíduos, detectando-se uma prevalência de neuropatia periférica mais elevada em coinfetados com HIV/HTLV, quando se comparou com pacientes infectados somente pelo HTLV (Silva et al., 2012).

Quanto à infecção por HTLV em populações indígenas da Amazônia Brasileira, há um estudo publicado por Abreu et al. (2022). Os autores recrutaram participantes em 15 comunidades (n=3.350), relatando uma positividade de 0,1% para HTLV-1 e 8,1% para HTLV-2. O HTLV-2 é endêmico em populações indígenas, como as Tribos Kayapó e Krahô onde observou-se prevalências de 33,3% e 12,2% respectivamente. A prevalência foi maior entre indivíduos do sexo feminino e com idade avançada (Maloney et al., 1992).

Em um estudo que analisou 1.324 amostras provenientes de 25 comunidades indígenas, observou-se 7,8% (n=104) de positividade para o HTLV-2. Elevadas taxas de prevalência foram observadas nas comunidades

Kayapó, Munduruku, Arara do Laranjal e Tiriyó, revelando que há áreas endêmicas para a infecção por HTLV-2 na região amazônica (Ishak et al., 1995).

Em um estudo mais abrangente sobre o HTLV-2 em comunidades indígenas da Amazônia brasileira, 5.429 indivíduos de 41 comunidades indígenas foram acompanhados ao longo de 56 anos (1967-2022), com o objetivo de avaliar a prevalência do HTLV-2 nessa população(Ishak et al., 2023). Entre essas comunidades, 24 apresentaram infecções pelo HTLV-2, com taxas de prevalência atingindo até 41,2% em algumas aldeias. Além disso, foi relatado um aumento da prevalência entre as mulheres, com a transmissão vertical permanecendo como uma via importante de disseminação do HTLV-2. Esses achados reforçam a importância de estratégias específicas de vigilância e prevenção voltadas às populações indígenas da região amazônica.

Em comunidades quilombolas do estado do Pará, foi realizado um estudo que analisou 859 indivíduos, observando-se uma prevalência de 0,11% (1/859) para HTLV-1 e 0,34% (3/859) para HTLV-2 (Brito et al., 2022). Os autores destacaram a importância da continuidade de estudos de prevalência da infecção por HTLV-1/2 nessa população, com o objetivo de caracterizar a distribuição da infecção por HTLV nesses indivíduos e com isso, ser possível a criação de medidas de combate a esse vírus e patologias correlatas.

Em doadores de sangue da cidade de Manaus, Amazonas, observa-se prevalência tanto do HTLV-1 como do HTLV-2. Em um estudo, verificou-se que entre 87.402 doadores, 116 deles (0,13%) apresentaram positividade para o HTLV-1/2 no teste ELISA, utilizado na triagem. Após a coleta de novas amostras e realização do teste confirmatório, as taxas de positividade encontradas foram: HTLV-1 (66%), HTLV-2 (21%) e indeterminado (13%)(De Morais et al., 2017).

Em um estudo retrospectivo realizado no estado do Pará, a soroprevalência média do HTLV foi de 0,2% entre doadores de sangue que apresentaram resultados reagentes na triagem para HTLV entre 2010 e 2020. A maior taxa de positividade foi observada entre doadores em sua primeira doação, mulheres, pessoas com mais de 30 anos, solteiros e que possuíam baixo nível de escolaridade(Maneschy et al., 2022).

Todos esses dados demonstram a importância da realização de estudos epidemiológicos sobre a infecção por HTLV-1/2, principalmente por se tratar de uma infecção pouco conhecida pela população. A escassez de pesquisas

epidemiológicas mais abrangentes no Amazonas impossibilita estimar a prevalência dessa infecção, assim como identificar os grupos populacionais mais vulneráveis, subtipos virais mais prevalentes, possíveis comportamentos de risco associados ao aumento de susceptibilidade e, como consequência, impedem a implementação de estratégias de saúde pública de combate a essa infecção em nossa região.

Dados epidemiológicos são a base central na elaboração de políticas públicas contra infecções. Levando em consideração que não se sabe a prevalência da infecção por esse vírus na região metropolitana de Manaus, o presente estudo mostrou-se necessário para a geração de novos dados de interesse científico e para a saúde pública do Brasil e do Amazonas.

1.2.7.3. Diagnóstico da infecção por HTLV-1/2

Apesar do enorme benefício dos testes sorológicos no diagnóstico da infecção por HTLV, esses testes possuem limitações. A principal se deve ao fato da necessidade de soroconversão e, assim, se o indivíduo foi infectado pelo HTLV e estiver no período de janela imunológica (período entre a infecção e o surgimento de anticorpos), há a possibilidade de resultados indeterminados ou falso negativos na sorologia (Martins et al., 2010).

Os testes moleculares possuem como principal vantagem em relação à sorologia, a capacidade de detectar o material genético do HTLV poucos dias após a infecção, pois são testes que não dependem da soroconversão, uma vez que não detectam anticorpos, mas o genoma viral (Ishihara et al., 2014).

A principal forma de detecção do HTLV (diagnóstico) é através da busca de anticorpos contra esse vírus, utilizando-se testes sorológicos de triagem, tais como o ELISA, que é um ensaio imunoenzimático, além de ensaios automatizados, como o teste de quimioluminescência (Brasil, 2021) (Figura 7).

A confirmação dos resultados reagentes (positivos) nos testes de triagem é feita através de testes mais específicos, capazes de identificar se o indivíduo está infectado com HTLV-1 ou HTLV-2. Os testes confirmatórios mais utilizados são: Western Blot (WB), imunoensaio em linha (INNO-LIA) e o teste molecular conhecido como PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) (Gessain, 2011).

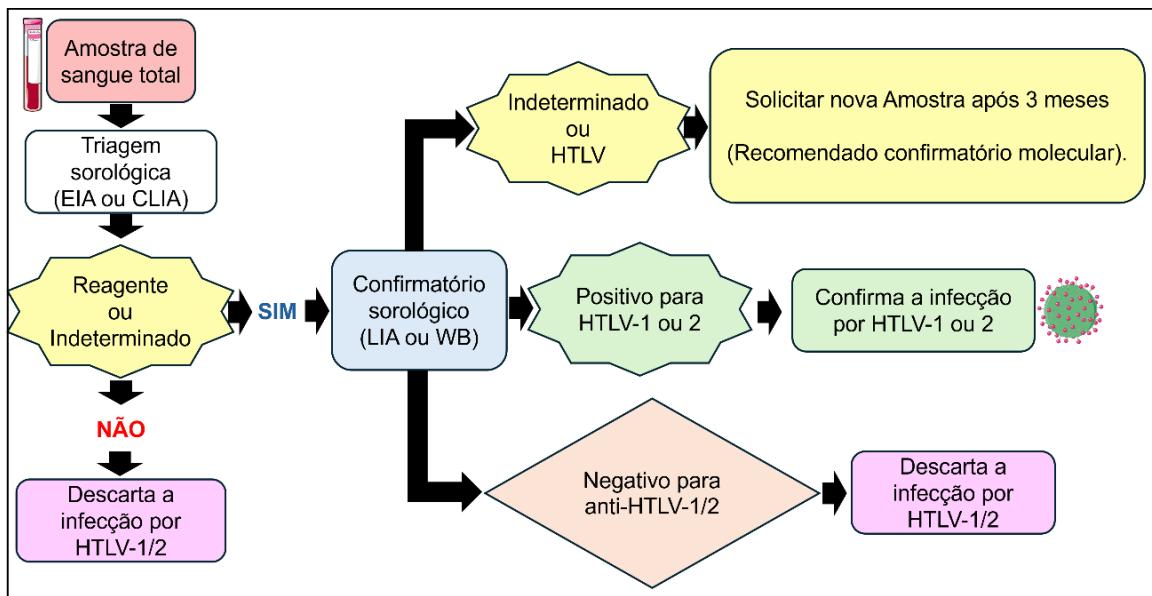


Figura 7. Diagnóstico da infecção por HTLV-1 e 2: testes laboratoriais.

Fonte: Adaptado de Brasil, 2021.

Legenda: EIA = Imunoensaio enzimático (Enzyme-linked Immunosorbent Assay); CLIA = Imunoensaio de quimioluminescência (Chemiluminescent Assay); LIA = imunoensaio em linha (Line immunoassay); WB = Western blotting

Em casos de resultados indeterminados no Western Blot, a PCR é a técnica mais indicada (Abrams; Akahata; Jacobson, 2011). Trata-se de um teste molecular que permite a amplificação de um fragmento específico de DNA, sendo bastante utilizada na detecção de patógenos, como o HTLV (Garibyan; Avashia, 2013).

O diagnóstico laboratorial da infecção por HTLV-1/2 é essencial para identificar pessoas vivendo com o vírus e para controlar a disseminação viral. No entanto, esses métodos diagnósticos disponíveis atualmente requerem amostras de sangue obtidas por punção venosa, um procedimento invasivo que pode dificultar a adesão, especialmente em estudos populacionais e em grupos vulneráveis. Essa limitação na obtenção de amostras dificulta a determinação da prevalência do HTLV em algumas populações.

Apesar dos avanços no diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV, ainda existem desafios significativos relacionados à acessibilidade e aceitabilidade dos testes utilizados no diagnóstico, especialmente em populações vulneráveis ou que vivem em áreas de difícil acesso. Diante desse fato, torna-se notório que há a necessidade do desenvolvimento e validação de estratégias diagnósticas mais simples, acessíveis e menos invasivas, que possam ampliar o alcance dos programas de triagem e vigilância do HTLV-1/2.

1.2.7.4. Amostras minimamente invasivas

Diante das limitações associadas à coleta de sangue venoso, uma alternativa promissora é a utilização de amostras de fluido oral para a detecção de anticorpos contra o HTLV-1/2, por ser um método não invasivo, indolor e de fácil coleta, favorecendo a ampliação do acesso ao diagnóstico, principalmente em contextos onde a coleta de sangue representa um desafio logístico ou clínico.

Em 2019, o grupo de pesquisa do Dr. Graham P. Taylor, pesquisador que há décadas realiza estudos sobre o HTLV-1/2 e possui ampla experiência clínica e científica dedicada ao diagnóstico, tratamento e acompanhamento de indivíduos infectados por esse vírus, desenvolveu em 2019 um ELISA in-house para detectar IgG anti-HTLV-1/2 em fluido gengival crevicular (FGC)(Woo et al., 2019). O FGC é rico em anticorpos, estando presente no sulco gengival (espaço entre o dente e a gengiva)(Subbarao et al., 2019). Tanto o FGC quanto a saliva são amostras de fluido oral. Entre as diferenças principais em relação a essas amostras, podem ser citadas a origem e composição: enquanto a saliva é produzida nas glândulas salivares e contém água, enzimas digestivas, células epiteliais, micro-organismos, eletrólitos e proteínas, o FGC é um exsudato do sulco gengival, sendo derivado do plasma sanguíneo e possui em sua composição citocinas, leucócitos, enzimas e proteínas plasmáticas (Ghallab, 2018).

No entanto, para a coleta do FGC há a necessidade de um dispositivo chamado Oracol, que aumenta os custos dos testes e pode ser uma barreira em áreas onde o Oracol não está disponível. Além disso, a coleta de FGC requer etapas de processamento da amostra (tais como, centrifugação) antes do teste.

Diante dessas limitações, o uso de amostras de saliva representa uma alternativa de substituição do FGC, com o intuito de facilitar a obtenção da amostra e reduzir custos.

Outra alternativa promissora para superar o problema da dificuldade de obtenção de amostras por técnicas invasivas pode ser por meio da utilização de DBS (Dried Blood Spot) e DPS (Dried Plasma Spot), pois permitem uma coleta sanguínea minimamente invasiva por punção digital, transporte mais simples e armazenamento em temperatura ambiente, além dessa metodologia reduzir custos operacionais(Baietto, Simiele e D'Avolio, 2014).

A utilização de amostras de sangue em papel de filtro tem se mostrado uma estratégia valiosa em diversas áreas de pesquisa e prática clínica, podendo ser utilizada para monitoramento terapêutico de medicamentos(Zailani e Ho, 2023), incluindo antirretrovirais e imunossupressores(Castillo-Mancilla et al., 2019; Duthaler et al., 2018), permitindo a avaliação da adesão ao tratamento e da eficácia farmacológica de forma menos invasiva. Além disso, essa metodologia tem sido explorada na triagem neonatal para a detecção de doenças metabólicas e genéticas(Clausen et al., 2024; Moat, George e Carling, 2020), bem como na detecção de algumas infecções, como HIV, hepatite viral e sífilis(Boa-Sorte et al., 2014).

A utilização de sangue ou plasma em papel de filtro (DBS e DPS) é uma alternativa interessante devido à estabilidade dessas amostras à temperatura ambiente, à praticidade no transporte e à menor necessidade de volume sanguíneo, tornando essa metodologia particularmente vantajosa para estudos populacionais e diagnósticos em regiões de difícil acesso. Assim, a aplicação de DBS e DPS no diagnóstico da infecção por HTLV-1/2 através da pesquisa de anticorpos contra esse vírus, pode representar uma alternativa viável e inovadora para ampliar o rastreamento da infecção, especialmente em populações com acesso restrito aos serviços de saúde.

Além do uso das amostras de DBS e DPS no diagnóstico da infecção por HTLV-1/2, essa metodologia poderia ser utilizada na quantificação de biomarcadores inflamatórios, dentre os quais se destaca a neopterina.

A neopterina é uma molécula produzida por células dendríticas, monócitos e macrófagos mediante estimulação por interferon gama (IFN- γ), sendo um biomarcador valioso para avaliar e monitorar o estado de saúde, particularmente em doenças infecciosas e inflamatórias, incluindo HIV(Eisenhut, 2013), dengue(Chan et al., 2006), hepatite B(Kalkan, Ozden e Akbulut, 2005), gripe(Pizzini et al., 2019), febre hemorrágica da Crimeia-Congo(Onguru et al., 2008), citomegalovírus(Leng et al., 2011), SARS-CoV-2(Hailemichael et al., 2021), malária(Blankson et al., 2023) e diversas infecções bacterianas(Kamińska et al., 2016).

Levando em consideração que a neopterina é um biomarcador inflamatório que aumenta predominantemente durante a fase aguda das infecções e níveis elevados dessa molécula estão associados a mau prognóstico

em diversas doenças infecciosas, seu monitoramento na infecção por HTLV utilizando-se métodos mais acessíveis poderia trazer muitos benefícios aos indivíduos infectados por esse vírus, principalmente em relação ao prognóstico.

Sabe-se que pessoas com MAH apresentam níveis mais elevados de neopterina no LCR (Líquido cefalorraquidiano) e plasma quando se compara com indivíduos assintomáticos infectados por HTLV-1(Souza et al., 2021). Além disso, foi proposto que a concentração de neopterina no LCR fosse usada para estratificar o risco de desenvolvimento de HAM, avaliar a atividade da doença e prever a resposta ao tratamento(Sato et al., 2018).

O diagnóstico precoce de doenças inflamatórias é importante, particularmente no contexto de danos neuronais, para permitir o tratamento precoce e obter melhores resultados. Portanto, a quantificação de neopterina pode ser útil para identificar pessoas vivendo com HTLV-1 com alto risco de desenvolver doenças inflamatórias, incluindo MAH. Metodologias de coleta mais acessíveis que facilitem a avaliação de biomarcadores são cruciais.

1.3. JUSTIFICATIVA

Apesar de alguns avanços no Brasil, no que se refere ao controle da infecção por HTLV-1/2, essa infecção ainda é negligenciada em muitos aspectos, bem como as doenças associadas a esse vírus. Devido a isso, ainda não há um tratamento ou vacina disponível para combater essa infecção, havendo apenas alternativas para minimizar os sintomas em indivíduos que desenvolvem as doenças associadas ao HTLV-1, como a mielopatia (MAH) e leucemia/linfoma de células T do adulto (LLTA).

Um dos motivos que leva ao atraso no desenvolvimento de alternativas de tratamento ou estratégias de combate à infecção por HTLV-1/2, que é um vírus desconhecido por grande parte da população, é a escassez de estudos epidemiológicos mais abrangentes sobre esse vírus, principalmente no Brasil. Além disso, a maioria desses estudos investigou a infecção por HTLV somente em grupos específicos, como doadores de sangue e gestantes, impossibilitando uma descrição mais aproximada da realidade sobre a prevalência do HTLV-1/2.

Na literatura, alguns estudos epidemiológicos sobre o HTLV-1/2 utilizaram amostragens inadequadas (n amostral pequenos), e alguns dados obtidos são divergentes, impossibilitando que sejam utilizados para a tomada de decisões em relação à saúde pública. Além disso, apenas recentemente, em fevereiro de 2024, a infecção por HTLV começou a ser notificada de forma compulsória no Brasil, havendo ainda poucos dados sobre essa infecção, o que contribui para a dificuldade no enfrentamento do HTLV.

Diante disso, há uma grande necessidade de estudos epidemiológicos sobre o HTLV, que possam fornecer dados que poderão contribuir para a prevenção da infecção, além de gerar dados epidemiológicos que poderão ser utilizados em estudos prospectivos com diferentes abordagens. Além disso, estudos epidemiológicos são essenciais para fornecer dados necessários para a elaboração de estratégias de saúde pública que permitam um melhor enfrentamento da infecção por HTLV, principalmente em regiões do Brasil com vários estratos populacionais pouco assistidos por políticas públicas de promoção à saúde, como o estado do Amazonas.

Outra situação que limita o combate à infecção por HTLV refere-se ao diagnóstico, uma vez que os métodos utilizado requerem amostras de sangue

obtidas por punção venosa, que é considerado um procedimento invasivo que dificulta principalmente a realização de estudos epidemiológicos em locais de difícil acesso, tornando mais difícil a obtenção de amostras em algumas populações e, com isso, dificultando a determinação da prevalência do HTLV.

O desenvolvimento de métodos menos invasivos também pode contribuir para o acompanhamento clínico de infectados pelo HTLV-1/2, permitindo por exemplo, a dosagem de biomarcadores inflamatórios que poderão auxiliar no prognóstico desses indivíduos.

Assim, levando em consideração que o Brasil possui o maior número absoluto de indivíduos infectados com HTLV no mundo; sabendo-se da elevada morbidade e mortalidade causada pelas doenças associadas ao HTLV-1, considerando a escassez de dados sobre essa infecção no Brasil (principalmente em Manaus, Amazonas) e, ciente da necessidade do desenvolvimento de novos métodos diagnósticos menos invasivos que possam facilitar a detecção do HTLV-1/2, o presente estudo investigou diferentes aspectos relacionados a essa infecção, que poderão contribuir com o diagnóstico e vigilância epidemiológica desses vírus em nossa região, considerando que a descrição do perfil epidemiológico da infecção pelo HTLV-1/2 é uma ferramenta essencial para nortear a elaboração de estratégias de políticas públicas de saúde de combate a essa infecção.

CAPÍTULO 1

**PERFIL EPIDEMIOLÓGICO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA INFECÇÃO
POR HTLV-1/2 NA REGIÃO METROPOLITANA DE MANAUS**

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. Geral

Estimar a prevalência e caracterizar molecularmente a infecção pelo HTLV-1/2 em indivíduos residentes da região metropolitana de Manaus, Amazonas.

1.4.2. Específicos

- Investigar a prevalência da infecção por HTLV-1/2;
- Identificar e caracterizar a diversidade genética dos tipos, subtipos e subgrupos do HTLV-1/2 circulantes na população estudada;
- Realizar a caracterização sociodemográfica da população estudada, e indentificar os fatores de riscos que possam estar relacionadas à suscetibilidade à infecção pelo HTLV-1/2.

1.5. MATERIAL E MÉTODOS

1.5.1. Aspectos éticos

O presente pesquisa tratou-se de um estudo epidemiológico transversal e foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA, CAAE: 39320120.2.3001.0006) de acordo com o que determina a resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, a qual preconiza as diretrizes e Normas Regulamentares da Pesquisa Envolvendo Seres Humanos.

1.5.2. Caracterização da população investigada

As amostras utilizadas no presente estudo foram obtidas a partir de indivíduos residentes na região metropolitana de Manaus, entre os meses de maio de 2021 a novembro de 2023. Os locais de coleta incluíram universidades, centros comunitários, associações, policlínicas e unidades básicas de saúde.

Aqueles que concordaram em participar do estudo foram convidados a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), sendo assinado pelo próprio (maior de 18 anos) ou pelo responsável legal (menor de idade – TALE – Termo de Assentimento Livre e Esclarecido).

Foi aplicado um inquérito epidemiológico para coleta de dados sociodemográficos (tais como sexo, idade, escolaridade, renda familiar, etc.) e comportamental (tais como idade da primeira relação sexual, número de parceiros, uso de preservativo, etc.).

Foram selecionados indivíduos de ambos os sexos, crianças (a partir de 7 anos) e adultos. O tamanho amostral foi calculado utilizando a ferramenta online OpenEpi (www.openepi.com) considerando um intervalo de confiança de 95%. A amostragem é do tipo heterogênea e probabilística. O tamanho amostral foi definido pelo cálculo para prevalência em populações infinitas. Em decorrência de não haver dados sobre a prevalência do HTLV-1/2 no Amazonas, utilizou-se a frequência máxima de 50% e um nível de confiança de 95% e erro amostral de 2%. Adicionou-se uma taxa de não resposta (percentual de perda de elementos amostrais) de 20%. Com isso, estimou-se um n amostral mínimo de n=776 para o estudo, para que fosse representativo da população do Amazonas.

Foram recrutados neste estudo um total de 1.604 indivíduos residentes em Manaus (n=1.397), Presidente Figueiredo (n=99), Iranduba (n=75) e Rio Preto da Eva (n=33).

Critérios de inclusão: **1.** indivíduos de ambos os sexos, crianças (responsáveis legais), jovens, adultos e idosos após aceitarem participar voluntariamente do estudo; **2.** indivíduos que assinaram o TCLE ou TALE e coletaram a amostra biológica necessária para a realização da pesquisa.

Critérios de exclusão: **1.** Indivíduos que não coletaram a amostra biológica de uma única vez e que não foram localizados novamente durante o período do estudo; **2.** Indivíduos que não concordaram em responder as perguntas do questionário epidemiológico; **3.** indivíduos com qualquer tipo de déficit mental ou cognitivo.

Um profissional devidamente treinado foi responsável pela coleta de amostras sanguíneas. As amostras foram coletadas em tubos contendo EDTA como anticoagulante para a obtenção de plasma e de células mononucleadas do sangue periférico (PMBC). Após a coleta, as amostras foram encaminhadas ao laboratório de Virologia e Imunologia do INPA, sendo processadas e armazenadas em -80°C até o momento do uso.

1.5.3. Sorologia

As amostras de plasma foram testadas para a presença de anti-HTLV-1/2 por meio de um ensaio imunoenzimático (DiaSorin Murex HTLV-I+II ELISA Test, Italy), utilizado como teste de triagem. O teste utiliza peptídeos sintéticos do envelope do HTLV-1/2 e regiões imunodominantes, bem como uma proteína transmembrana do HTLV-2. O teste foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante.

1.5.4. Western Blot e INNO-LIA

As amostras que apresentaram resultado reagente no ELISA, tiveram seus resultados confirmados pelos testes Western Blot 2.4 (MP diagnostics, Singapore) ou INNO-LIA HTLV I/II Score (Fujirebio, Belgium). Ambas as técnicas permitem a confirmação e diferenciação do tipo de HTLV, pois possuem proteínas recombinantes do HTLV-1 e 2 fixadas em uma membrana. Os testes

foram realizados conforme as informações do fabricante.

Amostras que apresentaram resultados indeterminados no Western Blot e INNO-LIA foram submetidas à confirmação molecular.

1.5.5. Extração de DNA

A extração de DNA total a partir das PMBCs contendo o provírus foi realizada segundo protocolo para extração de DNA celular utilizando reagente Brazol (Fenol Clorofórmio). O processo consiste em 2 fases: extração e precipitação do DNA. Em resumo, 200µL de “buffy coat” (papa de leucócitos) dos pacientes foram homogeneizados com 400µL de Brazol e 100µL de clorofórmio a 4°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 12 minutos a 10.000rpm em temperatura ambiente (fase de extração).

Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e repassado para um microtubo contendo 500µL de Etanol 100% a 4°C. A mistura foi homogeneizada até o surgimento do precipitado de DNA. Logo após, a mistura foi centrifugada nas mesmas condições descritas acima (fase de precipitação).

Ao final de centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os microtubos contendo o DNA extraído, submetidos à temperatura de 56°C por 12 minutos para eliminação de etanol, evitando assim a contaminação ou degradação do DNA pelo etanol residual. Por fim, foram adicionados 100µL de água estéril DNA/RNAase free. As amostras foram quantificadas no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), por meio do equipamento NanoDROP 1000, com o intuito de verificar o rendimento da extração e garantir a pureza do material extraído.

1.5.6. Amplificação da região 5'LTR do HTLV-1

Após a extração do DNA genômico a partir das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), foi realizada a detecção molecular do HTLV-1 através da técnica de Nested PCR, direcionada à amplificação da região 5'LTR do provírus. O sequenciamento de nucleotídeos e a construção das árvores filogenéticas foram realizados a partir do produto da amplificação dessa região (579pb).

As reações foram realizadas em um volume total de 50µL, contendo

300ng de DNA extraído, 1µL de cada iniciador a 10µM e 25µL de Master mix Taq Pol (2x) Green (Cellco, Cat. NºPOL-102XL).

Em cada reação de amplificação, após a desnaturação inicial a 95ºC por 10 minutos, foram efetivados 30 ciclos de 50 segundos a 95ºC, 45 segundos a 58ºC e 3 minutos a 72ºC. Os 30 ciclos foram seguidos por uma extensão final de 5 minutos a 72ºC. Na etapa seguinte da amplificação (Nested PCR), foi utilizado 1µL do produto da primeira amplificação nas mesmas condições de reação.

Para a amplificação da região 5'LTR do HTLV-1, foram utilizadas sequências de primers previamente descritas (Pashabayg et al., 2020). Os iniciadores internos e externos utilizados estão listados na Tabela 1.

Tabela 1. Iniciadores utilizados nas reações de Nested PCR da região 5'LTR do HTLV-1

INICIADORES	SEQUÊNCIA 5'-3'	ETAPAS
LTR-1.ExF	GTC GCG CTA CTC CTT CTT GT	1º
LTR-1.ExR	AAC GGC GCA GAA CAG AAA AC	1º
LTR-1.inF	GAC AAT GAC CAT GAG CCC CA	2º
LTR-1.inR	AGA GTT GAG CAA GCA GGG TC	2º

1.5.7. Amplificação da região 5'LTR do HTLV-2

As reações para a amplificação da região 5'LTR foram executadas em um volume final de 50µL, contendo 500ng de DNA extraído, 1µL de cada iniciador a 20µM e 25µL de Master mix Taq Pol (2x) Green (Cellco, Cat. NºPOL-102XL).

Em cada reação de amplificação, após desnaturação inicial a 94ºC por 5 minutos, foram realizados 35 ciclos de 40 segundos a 94ºC, 30 segundos a 57ºC e 1 minuto a 72ºC. Os 35 ciclos foram seguidos por uma extensão final de 10 minutos a 72ºC. Em seguida, foi realizada uma segunda reação de PCR (Nested PCR) utilizando 6µL do produto da amplificação nas mesmas condições de reação descritas anteriormente.

Para a amplificação da região 5'LTR do HTLV-2, foram utilizadas sequências de primers previamente descritas (PONTES et al., 2020). Os iniciadores internos e externos utilizados nas reações estão descritos na Tabela 2. O produto da amplificação da região 5'LTR (788pb) foi posteriormente utilizado no sequenciamento de nucleotídeos e construção de árvores filogenéticas.

Tabela 2. Iniciadores utilizados nas reações de Nested PCR da região 5'LTR do HTLV-2

INICIADORES	SEQUÊNCIA 5'-3'	ETAPAS
F-IILTR	TCG CGA TGA CAA TGG CGA CTA GCC TC	1º
Long Gag	GGG GGC TTT GGG TAT TGG AGT TGG G	1º
Mo16	GCC TCC CAA GCC AGC CAC	2º
MSW-Gag	GGG AAA GCC CGT GGA TTT GCC CCA T	2º

1.5.8. Eletroforese

Os produtos da amplificação foram visualizados, após eletroforese (100V/50 minutos) em gel de agarose a 2%, em tampão TAE 1x (TAE 40x estoque - TrisBase 1,6M, Acetato de Na 0,8M e EDTA-Na2 40mM/1000mL água deionizada), mediante a utilização de um transiluminador com fonte de luz ultravioleta.

1.5.9. Sequenciamento

Uma vez obtido o produto da amplificação da região LTR, foi realizado o sequenciamento da amostra pelo método de Sanger, utilizando-se o kit BigDyer Terminator v3.1 Cycle Sequencing da Applied Biosystems, de acordo com as instruções do fabricante. Antes do sequenciamento, os produtos foram purificados utilizando o método de separação por beads magnéticas, a fim de remover primers residuais, nucleotídeos livres e outras impurezas. A integridade e o tamanho esperado dos amplicons purificados foram verificados por eletroforese em gel de agarose, seguida de visualização em transiluminador. Os produtos purificados e confirmados foram então sequenciados.

O sequenciamento foi realizado utilizando-se o analisador genético ABI 3130xl, da empresa Applied Biosystems. Utilizou-se 1µL do DNA purificado na reação de sequenciamento. No momento do sequenciamento, as amostras foram ressuspensas em 10µL de formamida Hi-Di, vortexadas por 15 minutos em velocidade 4 e aquecidas a 95ºC por 3 minutos e colocadas no sequenciador. Todo o procedimento foi realizado no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), por meio da plataforma para sequenciamento disponível no Laboratório Temático de Biologia Molecular-LTBM/INPA.

1.5.10. Análise filogenética

Para realizar a análise comparativa entre as sequências foi necessário primeiramente o alinhamento das sequências obtidas, levando em consideração o pareamento das bases homólogas. O alinhamento foi realizado no programa BioEdit 7.2, no qual foi possível construir as fitas consenso de cada amostra, alinhando as leituras forward e reverse e removendo regiões de baixa qualidade. As sequências consenso resultantes foram então salvas em formato FASTA e reunidas em um banco de dados no Microsoft Excel, juntamente com outras sequências de referência dos vírus HTLV-1 e HTLV-2, disponíveis no GenBank.

As relações filogenéticas entre as sequências descritas no presente estudo e aquelas previamente descritas e disponíveis no Genbank, foram efetuadas por meio do programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis software – MEGA version 12. A construção da árvore filogenética foi realizada utilizando-se o método de Máxima Verossimilhança (Maximum Likelihood - ML), com 1.000 réplicas de bootstrap para avaliar a confiabilidade dos ramos. Essa abordagem permitiu a visualização das relações evolutivas entre as amostras analisadas e as sequências de referência, auxiliando na identificação dos subtipos de HTLV-1 e 2 presentes nas amostras encontradas neste estudo.

As cepas utilizadas na filogenia e seus códigos de acesso no GenBank foram: WDM1168BrMao (PV647910); WQC1199BrMao (PV647909); SSS850BrMao (PV647908) e JDC1001BrMao (PV742404).

1.5.11 Análise dos dados

Foi obtida estatística descritiva de todas as características sociodemográficas. Os resultados das análises foram categorizados conforme a normalidade e as variáveis categóricas foram expressas por valor absoluto (n) e frequência relativa (%). As análises estatísticas foram realizadas no programa Graphpad Prism 8.0 (2018). Para a criação de mapas referenciando os locais de coleta, foi utilizado o software QGIS v.3.22.14, que permite a visualização, edição e análise de informações espaciais. Os dados sobre os locais de coleta foram obtidos no plano diretor urbano e ambiental de Manaus, disponibilizado pela Prefeitura de Manaus (Implurb, 2021).

1.6. Resultados

1.6.1. Prevalência da infecção por HTLV-1/2 em Manaus e perfil sócio

demográfico da população estudada

Foi realizada sorologia em 1.397 indivíduos residentes em Manaus-AM. Como resultado geral, observou-se uma prevalência de 0,3% (4/1.397) para a infecção por HTLV-1/2, sendo 3 indivíduos do sexo feminino e um do sexo masculino (Tabela 3).

Tabela 3. Prevalência da infecção pelo HTLV-1/2 em Manaus de acordo com sexo

Sexo	N (%)	HTLV1/2 (%)	IC 95%
Mulher	1.008 (72)	3 (0,3)	0,06 – 0,87
Homem	389 (28)	1 (0,25)	0,01 – 1,45
Total	1.397 (100)	4 (0,3)	0,08 – 0,74

Em relação à faixa etária, a maioria dos indivíduos possuia entre 20 a 59 anos de idade. A média de idade entre os participantes foi de 38 anos (Tabela 4). Houve um maior número de participantes que se autodeclarou pardos (69,87%), o que é característico da região amazônica.

Quanto ao estado civil, a maior parte dos indivíduos eram solteiros ou casados/"vivem junto". A distribuição foi homogênea em relação à variável renda familiar, sendo que a maior parte dos indivíduos apresentou baixo poder aquisitivo, com renda familiar de cerca de um cerca salário mínimo (30,3%) ou entre 2 a 3 salários mínimos (33,71%)(Tabela 4). Quanto ao grau de escolaridade, a maioria dos participantes declarou possuir ensino médio completo (35,57%), observando-se um menor número de indivíduos com ensino superior completo (13,67%) (Tabela 4).

Tabela 4. Características sociodemográficas da população estudada em Manaus

Faixa etária	N Total (%)	Anti-HTLV-1/2 (%)[*]
---------------------	--------------------	--------------------------------------

MÉDIA DE IDADE (Em anos)		38
07-09	3 (0,21)	
10-19	85 (6,10)	
20-29	424 (30,35)	
30-39	284 (20,32)	
40-49	264 (18,90)	2 (0,75)
50-59	192 (13,75)	
60-69	107 (7,65)	2 (1,86)
70-79	36 (2,57)	
≥80	2 (0,15)	
COR		
Negro(a)	119 (8,51)	1 (0,84)
Branco(a)	257 (18,40)	
Pardo(a)	976 (69,87)	3 (0,30)
Outros	45 (3,22)	
ESTADO CIVIL		
Solteiro(a)	675 (48,31)	2 (0,29)
Casado(a)/Vive junto	586 (41,94)	1 (0,17)
Separado(a)	83 (5,94)	
Viúvo(a)	36 (2,60)	1 (2,77)
Outros	17 (1,21)	
RENDA FAMILIAR		
<1 salário mínimo	175 (12,52)	2 (1,14)
1 salário mínimo	423 (30,30)	1 (0,23)
2 salários mínimos	306 (21,90)	1 (0,32)
3 salários mínimos	165 (11,81)	
4 salários mínimos	65 (4,65)	
5 salários mínimos	37 (2,64)	
>5 salários mínimos	169 (12,10)	
Não responderam	57 (4,08)	
ESCOLARIDADE		
Analfabeto(a)	1 (0,10)	
Fundamental completo	69 (4,93)	1 (1,44)
Fundamental incompleto	116 (8,30)	2 (1,72)
Médio completo	497 (35,57)	1 (0,20)
Médio incompleto	76 (5,44)	
Superior completo	191 (13,67)	
Superior incompleto	299 (21,40)	
Pós-graduação completa	111 (7,94)	
Pós-graduação incompleta	28 (2,0)	
Não responderam	9 (0,65)	

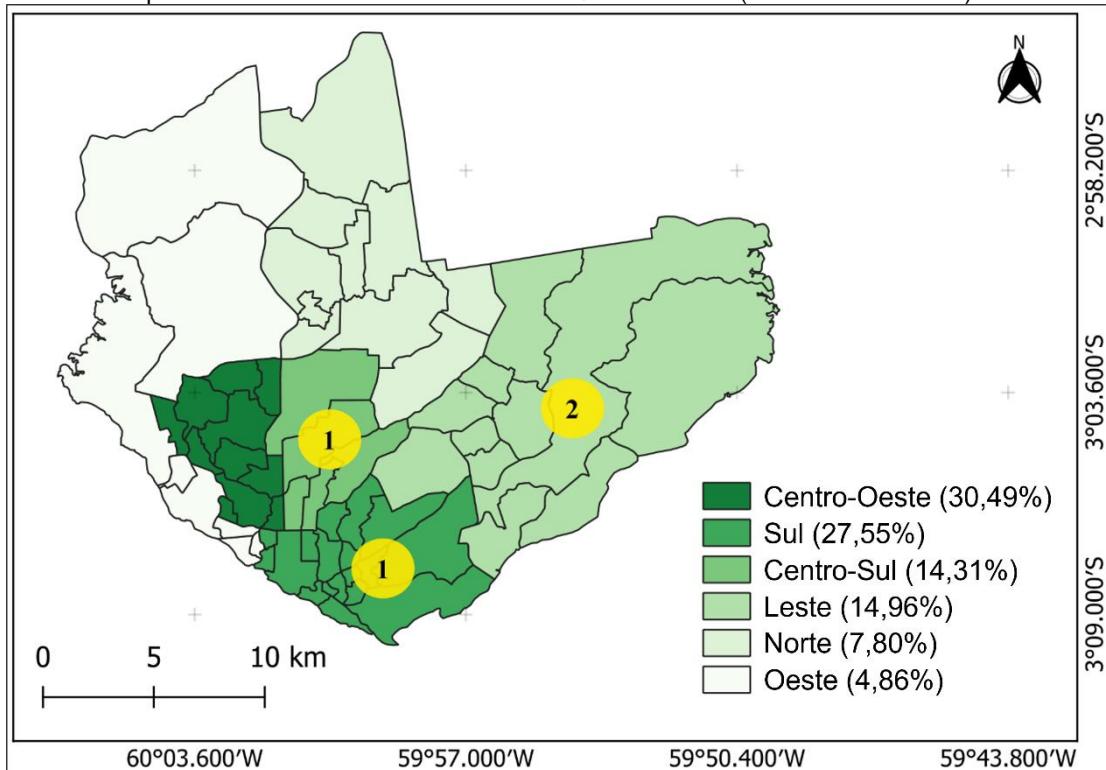
*Prevalência em relação ao n amostral do subgrupo

Os participantes foram recrutados nas seguintes áreas da cidade de Manaus: Centro-Oeste (30,49%), Sul (27,55%), Centro-Sul (14,31%), Leste

(14,96%), Norte (7,80%) e Oeste (4,86%) (Figura 8). Dessa forma, as coletas abrangeram todas as zonas da cidade.

Figura 8. Localização geográfica da população estudada e quantidade de amostras positivas de acordo com as zonas da cidade (em amarelo).

O mapa foi construído usando-se o software QGIS v.3.22.14 (SIRGAS2000 datum).



Conforme demonstrado na figura 8, dois indivíduos positivos para infecção por HTLV-1/2 foram recrutados na zona Leste de Manaus, enquanto os restantes eram provenientes das zonas Sul e Centro-Sul. A maior parcela de indivíduos foi recrutada em Unidades Básicas de Saúde-UBS (39,72%), laboratórios privados (17,39%) e faculdades (15,10%) (Tabela 5). Todos os indivíduos com sorologia positiva para HTLV-1/2 foram recrutados na rede de saúde pública de Manaus, sendo 3 em UBS e 1 em uma policlínica.

Tabela 5. Distribuição da população de estudo de acordo com a zona/local de coleta.

LOCAL	N (%)	Anti-HTLV-1/2
-------	-------	---------------

Zona Sul		
Unidade Básica de Saúde (UBS)	234 (60,80)	1 (0,42)*
Laboratório privado	63 (16,35)	-
INPA	88 (22,85)	-
Zona Centro-Sul		
Faculdade	99 (49,5)	-
Policlínica pública	101 (50,5)	1 (0,99)*
Zona Leste		
Unidade Básica de Saúde (UBS)	136 (65,10)	2 (1,47)*
Igreja	46 (22,0)	-
Quadra de esportes (Ação social)	27 (12,90)	-
Zona Oeste		
Igreja	68 (100)	-
Zona Centro-Oeste		
Laboratório privado	176 (41,31)	-
Faculdade	112 (26,29)	-
Unidade Básica de Saúde (UBS)	80 (18,80)	-
Shopping	43 (10,09)	-
HEMOAM	12 (2,81)	-
Residência	3 (0,70)	-
Zona Norte		
Unidade Básica de Saúde (UBS)	105 (96,33)	-
Laboratório privado	4 (3,67)	-

No que *Prevalência em relação ao n amostral do subgrupo se refere aos comportamentos de risco, a maioria dos participantes declarou não possuir tatuagem (72,5%) ou piercing (88,5%) (Tabela 6). Quanto à transfusão sanguínea, apenas 8,4% dos participantes declararam terem sido submetidos a esse procedimento ao menos uma vez na vida. Em relação ao aleitamento materno, 86,5% dos participantes relataram terem sido amamentados. A maior parte da população também declarou ser sexualmente ativa (73,44%). Entre aqueles que informaram ser sexualmente ativos, 3,78% possuíam dois ou mais parceiros.

Quanto ao uso de preservativo, 637 participantes (45,59%) declararam não usar preservativo ou usá-lo às vezes. Diagnóstico anterior de IST foi relatado por 7,65% da população. A tabela 6 sumariza os principais comportamentos de risco que podem estar associados ao aumento da suscetibilidade à infecção por HTLV.

Tabela 6. Possíveis fatores de risco associados ao aumento da suscetibilidade à infecção por HTLV-1/2.

Fatores	N	*%
POSSUI TATUAGEM		
Sim	378	27,05
Não	1.013	72,50
Não responderam	6	0,45
POSSUI PIERCING		
Sim	143	10,25
Não	1.237	88,54
Não responderam	17	1,21
TRANSFUSÃO SANGUÍNEA		
Sim	118	8,44
Não	1.269	90,85
Não responderam	10	0,71
FOI AMAMENTADO		
Sim	1.209	86,54
Não	106	7,60
Não sabem	59	4,22
Não responderam	23	1,64
SEXUALMENTE ATIVO		
Sim	1.026	73,44
Não	345	24,70
Não responderam	26	1,86
USO DO PRESERVATIVO		
Sim	663	47,45
Não	437	31,30
Às vezes	200	14,31
Não responderam/Não aplicável	97	6,94
DIAGNÓSTICO DE IST		
Sim	107	7,65
Não	1.214	86,90
Não sabem	48	3,43
Não responderam	28	2,0

*Frequência em relação ao N total (1.397)

Entre os quatro indivíduos soropositivos (três para HTLV-1 e um para HTLV-2), três possuíam baixa renda (1 salário mínimo ou menos) e baixa escolaridade (ensino fundamental) (Tabela 7). Três deles declararam não estar em relacionamento conjugal e todos recebiam algum auxílio ou benefício do governo (Tabela 7). O participante 850 declarou ter nascido no município de Alenquer, no estado do Pará, região Norte do Brasil. Atualmente, reside na cidade de Manaus há mais de sete anos. Todos os participantes positivos para a infecção por HTLV possuíam idade superior a 40 anos.

Tabela 7. Características sociodemográficas dos indivíduos soropositivos para HTLV-1/2.

Variáveis	ID dos participantes			
	850	1168	1199	1001
Área	Urbana	Urbana	Urbana	Urbana
Idade (anos)	46	45	63	68
Sexo	F	F	F	M
Cor	Parda	Parda	Parda	Negro
País de nascimento	Brasil	Brasil	Brasil	Brasil
Estado de nascimento	Pará	Amazonas	Amazonas	Amazonas
Tempo de residência em Manaus	>7 anos	>7 anos	>7 anos	>7 anos
Estado civil	Casada/vive junto	Solteira	Solteira	Viúvo
Escolaridade	Médio completo	Fundamental completo	Fundamental incompleto	Fundamental incompleto
Renda familiar (salário mínimo)	1	<1	<1	2
Recebe auxílio governamental?	Sim	Sim	Sim	Sim
Tipo de auxílio	Auxílio Brasil	Auxílio Brasil	Auxílio Brasil	Aposentadoria
Já ficou gestante?	Sim	Sim	Sim	Não aplicável
Quantas gestações?	3	4	6	Não aplicável
Amamentou? Por quanto tempo?	Sim. >6 meses	Sim. <6 meses	Sim. >6 meses	Não aplicável
Idade da primeira relação sexual	18 anos	18 anos	14 anos	Não lembra
Quantidade de parceiros sexuais	1	1	Não respondeu	1
Diagnóstico de IST	Não	Não	Não	Não

As principais variáveis que poderiam ser consideradas como possíveis fatores de risco para a infecção por HTLV-1/2, indentificadas entre os indivíduos soropositivos foram: possuir tatuagem (n=1), ter sido submetido a transfusão (n=2), ter sido amamentado (n=4) e não utilizar preservativo nas relações sexuais (n=2)(Tabela 8).

Tabela 8. Possíveis fatores de risco observados entre os indivíduos soropositivos para HTLV-1/2.

Participantes	Tatuagem	Transfusão	Foi amamentado	Uso de preservativo
850	Não	Não	Sim	Sim
1001	Não	Sim	Sim	Não
1168	Sim	Não	Sim	Sim
1199	Não	Sim	Sim	Não

Todos os participantes com resultado positivo para a infecção por HTLV-1/2 foram devidamente orientados quanto ao resultado do exame, incluindo informações sobre a infecção, possíveis implicações clínicas e formas de prevenção da transmissão. Esses participantes também foram informados sobre a importância da triagem familiar, considerando o potencial de transmissão intrafamiliar do vírus. Contudo, ao serem consultados sobre a possibilidade de testagem de seus familiares, todos os quatro participantes optaram por não autorizar a realização desses exames.

1.6.2 Investigaçāo da infecção por HTLV-1/2 em municípios da região metropolitana de Manaus

Foi realizada sorologia em 207 indivíduos residentes em Iranduba (n=75), Presidente Figueiredo (n=99) e Rio Preto da Eva (n=33). Não foram detectados indivíduos infectados pelo HTLV-1/2 nesses municípios. O sexo dos participantes recrutados é apresentado a seguir (Tabela 9).

Tabela 9. Indivíduos testados para a infecção por HTLV-1/2 em municípios da região metropolitana de Manaus de acordo com sexo

Sexo	N (%)
Mulher	137 (66,2)
Homem	70 (33,8)
Total	207 (100)

Em relação à faixa etária, observa-se que a maior parte dos indivíduos possuia entre 30 a 49 anos de idade. A média de idade entre os participantes foi de 41 anos (Tabela 10).

Tabela 10. Características sociodemográficas da população estudada em municípios da região metropolitana de Manaus

Faixa etária	N Total (%)
MÉDIA DE IDADE (Em anos)	41
10-19	23 (11,10)
20-29	26 (12,60)
30-39	47 (22,70)
40-49	44 (21,25)
50-59	30 (14,49)
60-69	26 (12,56)
70-79	9 (4,34)
≥80	2 (0,96)
COR	
Negro(a)	25 (12,10)
Branco(a)	27 (13,04)
Pardo(a)	147 (71,0)
Outros	8 (3,86)
Estado civil	N Total (%)
Solteiro(a)	56 (27,05)
Casado(a)/Vive junto	113 (54,60)
Separado(a)	29 (14,0)
Viúvo(a)	6 (2,90)
Outros	3 (1,45)
RENDAS FAMILIAR	
<1 salário mínimo	54 (26,10)
1 salário mínimo	89 (42,99)
2 salários mínimos	33 (15,95)
3 salários mínimos	10 (4,83)
4 salários mínimos	6 (2,89)
5 salários mínimos	5 (2,41)
Não responderam	10 (4,83)
ESCOLARIDADE	
Analfabeto(a)	9 (4,35)
Fundamental completo	11 (5,31)
Fundamental incompleto	62 (29,95)
Médio completo	74 (35,75)
Médio incompleto	21 (10,15)
Superior completo	16 (7,72)
Superior incompleto	5 (2,41)
Pós-graduação completa	7 (3,40)
Não responderam	2 (0,96)

Assim como foi observado em Manaus, nesses municípios houve um maior número de pardos (71%). Quanto ao estado civil, os participantes em sua maioria declararam ser casados/”vivem junto” (54,6%) ou solteiros (27,05%). Em relação à renda familiar, a maior parte dos indivíduos declarou receber um salário mínimo (42,99%) ou menos (26,10%) (Tabela 10).

Quanto ao grau de escolaridade, a maioria dos participantes possuia ensino médio completo (35,75%) ou fundamental incompleto (29,95%), observando-se um menor número de indivíduos com ensino superior completo (7,72%) (Tabela 10). Os locais em cada município onde os participantes foram recrutados são apresentados a seguir (Tabela 11).

Tabela 11. Distribuição da população de acordo com o município/local de coleta.

LOCAL	N (%)	População
Iranduba		
Comunidade flutuante Catalão	41 (54,66)	Ribeirinha
Comunidade Camaleão	24 (32)	Ribeirinha
Comunidade Barcelona	2 (2,66)	Rural
Comunidade Novo Renascer	1 (1,35)	Rural
Área urbana	7 (9,33)	Urbana
Presidente Figueiredo		
Laboratório LACEN	99 (100)	Urbana
Rio Preto da Eva		
Sítio (Ramal Sucurijú)	33 (100)	Rural

Em Iranduba, 86,66% dos indivíduos recrutados residiam em comunidades ribeirinhas, onde as coletas foram realizadas em uma escola flutuante localizada à margem do rio Solimões. Em Presidente Figueiredo e Rio Preto da Eva, todos os indivíduos (100%) residiam na área urbana e rural, respectivamente.

No que se refere aos comportamentos de risco, 86,47% dos participantes declararam não possuir tatuagem ou piercing (97,1%) (Tabela 12). Em relação à transfusão sanguínea, 11,11% dos participantes foram submetidos a esse procedimento ao menos uma vez. Quanto ao aleitamento materno, 90,35% dos participantes relataram terem sido amamentados.

Observa-se que a maior parte da população declarou ser sexualmente ativa (78,74%) e, assim como ocorreu entre os participantes residentes em Manaus, quase metade da população (47,34%) declarou não usar preservativo ou usá-lo somente às vezes. Entre aqueles que informaram ser sexualmente ativos, todos informaram possuir apenas um parceiro.

Relatou-se algum diagnóstico anterior de IST por 5,31% dos participantes. A tabela 12 apresenta os principais comportamentos de risco citados acima e abordados no questionário epidemiológico dos participantes, que geralmente estão associados ao aumento da suscetibilidade à infecção por HTLV-1/2.

Tabela 12. Estratificação da população de acordo com os possíveis fatores de risco associados ao aumento da suscetibilidade à infecção por HTLV-1/2.

Variáveis	N	*%
POSSUI TATUAGEM		
Sim	28	13,53
Não	179	86,47
POSSUI PIERCING		
Sim	6	2,9
Não	201	97,1
TRANSFUSÃO SANGUÍNEA		
Sim	23	11,11
Não	184	88,89
FOI AMAMENTADO		
Sim	187	90,35
Não	10	4,83
Não sabem	9	4,34
Não responderam	1	0,48
SEXUALMENTE ATIVO		
Sim	163	78,74
Não	44	21,26
USO DO PRESERVATIVO		
Sim	93	44,92
Não	80	38,64
Às vezes	18	8,69
Não responderam/Não aplicável	16	7,75
DIAGNÓSTICO DE IST		
Sim	11	5,31
Não	193	93,25
Não sabem	2	0,96
Não responderam	1	0,48

*Prevalência em relação ao N total (207)

1.6.3 Identificação dos tipos virais

Conforme recomendação do ministério da Saúde, uma nova coleta de sangue periférico foi realizada em todos os indivíduos com sorologia positiva (n=4), para repetição e confirmação do diagnóstico por meio das técnicas Western-blot ou INNO-LIA (BRASIL, 2021). A figura a seguir mostra os padrões sorológicos observados nos testes confirmatórios INNO-LIA e Western-blot (Figura 9). Na parte A da figura, é possível observar que a amostra de número 850 apresentou padrão positivo para o HTLV-1 no teste INNO-LIA. As amostras de número 1001, 1168 e 1199 foram testadas utilizando-se a metodologia western-blot (figura 9B), apresentando os seguintes resultados: HTLV-2, indeterminado e HTLV-1, respectivamente.

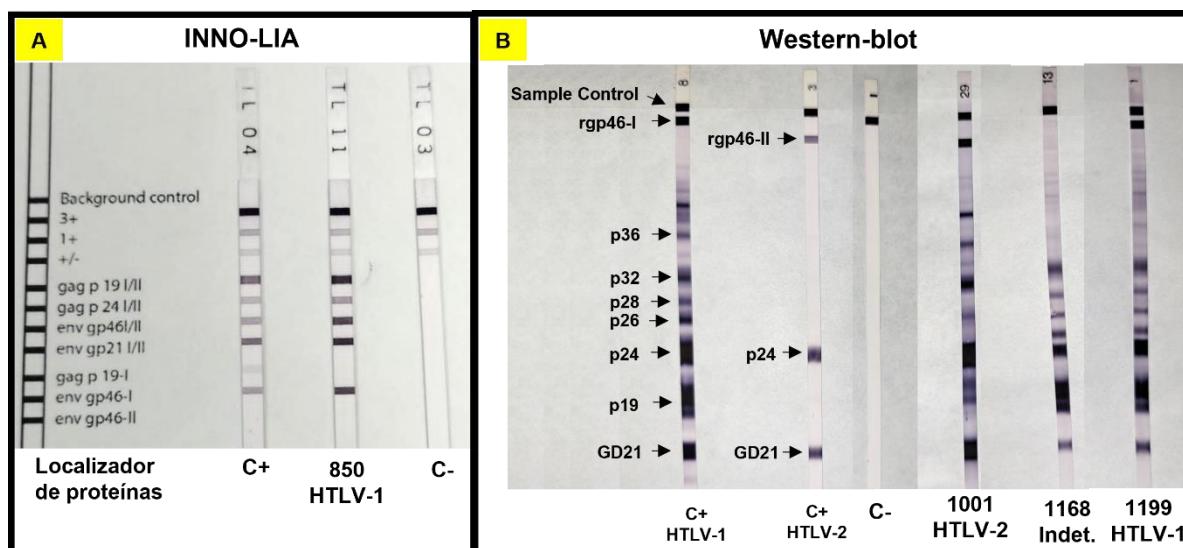


Figura 9. Padrões sorológicos dos participantes positivos para HTLV-1/2.

(A) Imunoensaio em linha (INNO-LIA HTLV I/II Score Jujirebio) e (B) Western-blot da MP Diagnostics (HTLV Blot 2.4 version). C+ = controle positivo; C- = controle negativo. "Indet." = resultado indeterminado. Numerações 850, 1001, 1168 e 1199 = número de identificação dos participantes.

A próxima etapa consistiu na realização da Nested-PCR para confirmação do tipo de HTLV na amostra 1168 (que apresentou padrão indeterminado no WB) e, posteriormente, identificar os subtipos presentes nas quatro amostras positivas. A análise do padrão de migração por eletroforese dos produtos amplificados (com tamanhos esperados de 579 pb para o HTLV-1 e 788 pb para o HTLV-2) confirmou a presença do HTLV-1 nas amostras 850, 1168 e 1199 (Figura 10A). Adicionalmente, a amostra do paciente 1001 foi confirmada como positiva para HTLV-2 (Figura 10B).

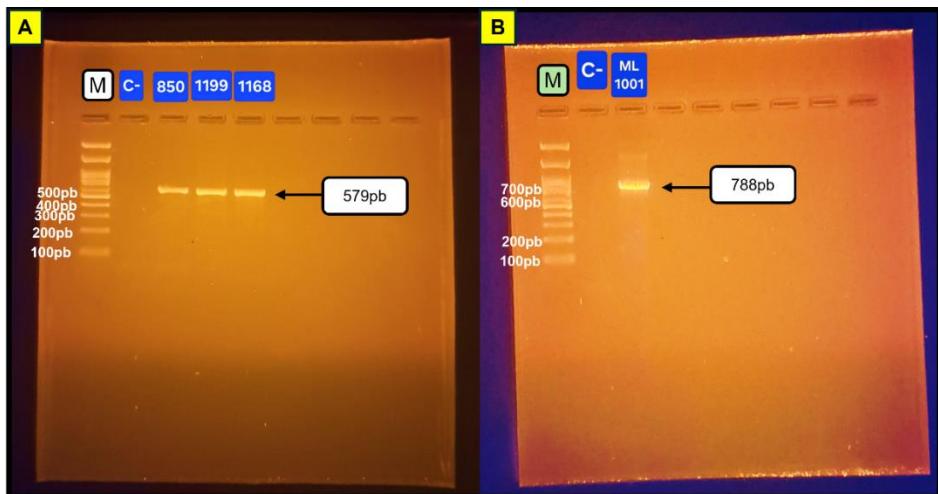


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose revelando os fragmentos amplificados.

A = Amostras positivas para HTLV-1. **B** = Amostra positiva para HTLV-2. **M**: marcador de peso molecular (100pb). **C-** = Controle negativo. Numerações 850, 1199, 1168 e 1001 = número de identificação dos participantes.

1.6.4 Identificação dos subtipos virais

A similaridade genética entre as sequências das cepas de HTLV-1 encontradas neste estudo comparadas com aquelas representativas de diferentes subgrupos estão apresentadas na Tabela 13. As amostras WDM1168BrMao e WQC1199BrMao apresentaram maior similaridade com a cepa BBD2420, representativa do subgrupo HTLV-1aA (Transcontinental), com valores de identidade de 99,71% e 99,42%, respectivamente. Esses resultados corroboram sua classificação filogenética dentro do grupo HTLV-1aA. A amostra SSS850BrMao apresentou similaridade de 99,04% com a cepa KOA, pertencente ao subtipo HTLV-1aC (Oeste-africano).

Tabela 13. Comparação da similaridade genética entre as cepas de HTLV-1 com sequências depositadas no GenBank.

Isolado	Fragmento	HTLV-1aA BBD2420	HTLV-1aB ATK	HTLV-1aC KOA	HTLV-1aD OD	HTLV-1c Mel5	HTLV-1e Efe1
WDM1168 BrMao	5'LTR	99,71%	97,32%	97,27%	97,10%	91,94%	95,01%
WQC1199 BrMao	5'LTR	99,42%	97,66%	97,62%	97,45%	91,54%	94,99%
SSS850 BrMao	5'LTR	98,27%	95,88%	99,04%	97,33%	91,16%	94,77%

Quanto à similaridade genética entre a sequência da cepa de HTLV-2 encontrada neste estudo (JDC1001BrMao), observou-se 100% de similaridade nucleotídica da região 5'LTR com a cepa JLM151BrMao, confirmando que a amostra pertence ao subtipo HTLV-2c (Tabela 14).

Tabela 14. Comparação da similaridade genética entre a cepa de HTLV-2 com sequências depositadas no GenBank.

Isolado	Fragmento	HTLV-2a M10060	HTLV-2b L11456	HTLV-2c JLM151	HTLV-2d Y14365
JDC1001BrMao	5'LTR	97,18	95,22	100%	93,02%

A árvore filogenética do HTLV-1 foi obtida por meio da comparação com 38 sequências nucleotídicas da região LTR de cepas de HTLV-1 depositadas no GenBank (Figura 11).

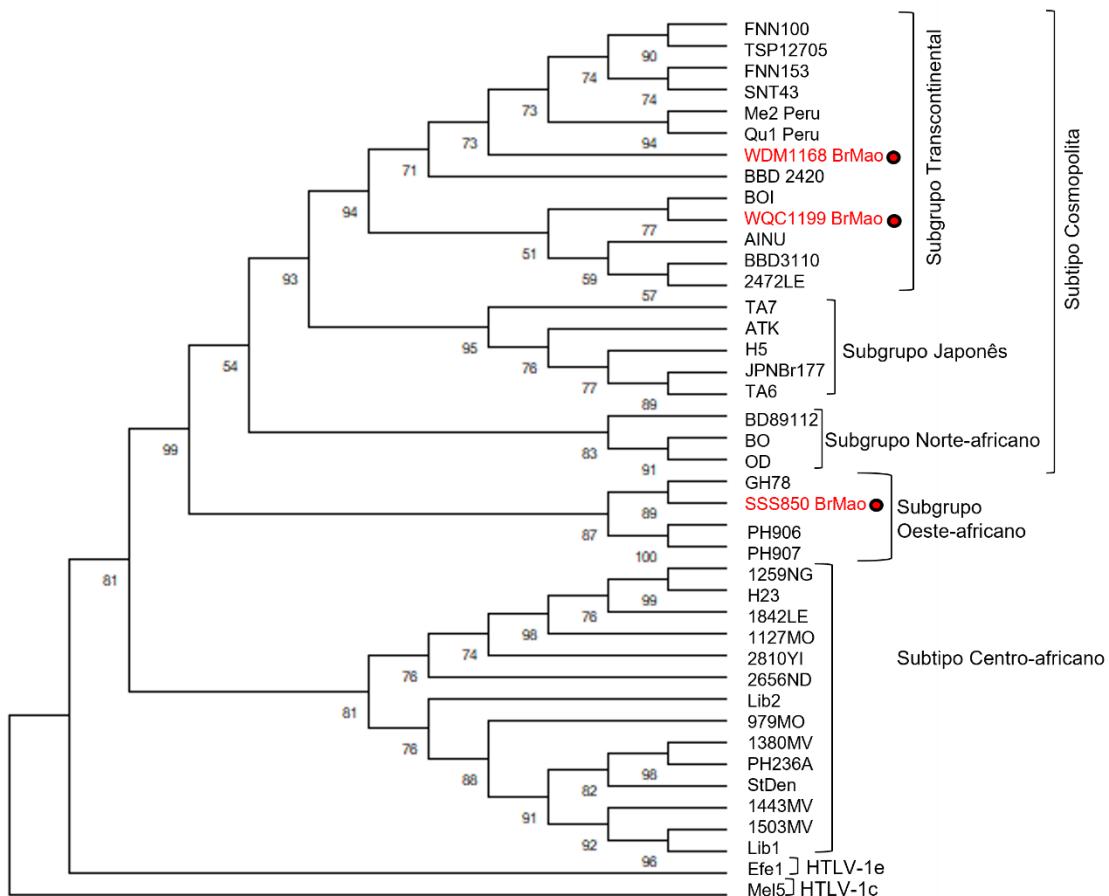


Figura 11. Árvore filogenética de isolados de HTLV-1. A árvore mostra as relações evolutivas entre as cepas de HTLV-1 isoladas neste estudo (em vermelho) e 38 outras do GenBank. As amostras de Manaus se agrupam no subtipo Cosmopolita, subgrupos Transcontinental (WDM1168 BrMao, WQC1199 BrMao) e Oeste-africano (SSS850 BrMao). A árvore foi construída utilizando-se o método de Máxima Verossimilhança (Maximum Likelihood - ML) baseado no modelo de substituição Kimura de 2 parâmetros (Kimura 2-parameter model). A árvore com o maior logaritmo de verossimilhança (-14.6101) foi selecionada a partir de uma busca heurística, iniciada com as melhores topologias obtidas por métodos de Neighbor-Joining (NJ) e Maximum Parsimony (MP). O suporte estatístico dos agrupamentos foi avaliado por meio de 1.000 réplicas de bootstrap.

É possível observar na figura 11 que dois isolados deste estudo, WDM1168 e WQC1199 estão inseridos no subgrupo Transcontinental, pertencendo assim ao subtipo HTLV-1aA (Cosmopolita). Esse é o subtipo mais comum no mundo e frequentemente encontrado nas Américas, inclusive no Brasil. O isolado SSS850 está agrupado no subgrupo oeste-africano, sendo classificado como HTLV-1aC. Este é o primeiro registro desse subtipo de HTLV-1 no Brasil e na região da Amazônia Ocidental.

Em relação ao HTLV-2, a amostra JDC1001 agrupou-se dentro do subtipo HTLV-2c (destacada em vermelho) (Figura 12).

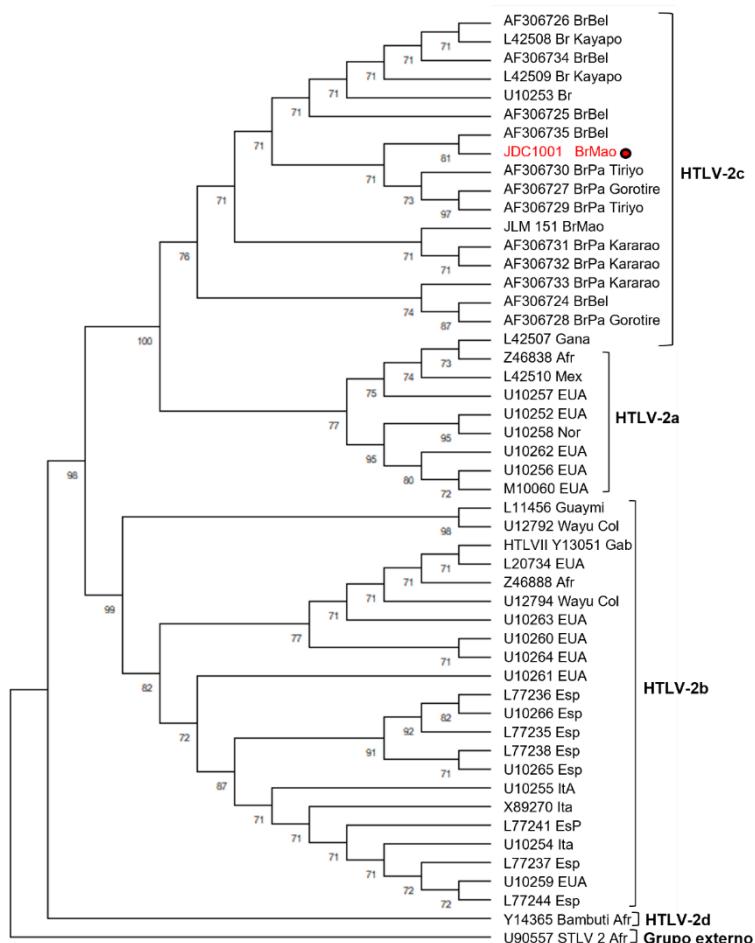


Figura 12. Árvore filogenética de isolados de HTLV-2. A árvore mostra a posição da cepa de HTLV-2 identificada em Manaus (JDC1001BrMao, em vermelho) em relação a 49 outras cepas disponíveis no GenBank. A amostra agrupa-se no subtipo HTLV-2c. A árvore foi construída utilizando-se o método de Máxima Verossimilhança (Maximum Likelihood) com o modelo de substituição de Kimura de 2 parâmetros (Kimura 2-parameter model). A árvore com o maior logaritmo de verossimilhança (-2.247,45) foi selecionada após busca heurística iniciada com árvores geradas pelos métodos Neighbor-Joining (NJ) e Maximum Parsimony (MP). O suporte estatístico dos ramos foi estimado por meio de 1.000 réplicas de bootstrap.

Esse achado representa a segunda descrição documentada da presença do subtipo HTLV-2c em uma área urbana da Amazônia Ocidental brasileira. A primeira identificação foi realizada por Pontes et al. (2020) ao investigar a infecção por HTLV-1/2 em pacientes com doenças hematológicas residentes na cidade de Manaus.

1.7. Discussão

A compreensão da prevalência do HTLV-1/2 em diferentes regiões é fundamental para orientar políticas públicas de saúde e estratégias de controle da infecção. No contexto amazônico, dados sobre a circulação desses vírus ainda são escassos, o que torna estudos locais especialmente relevantes para preencher lacunas epidemiológicas.

A prevalência geral da infecção por HTLV-1/2 em Manaus, encontrada no presente estudo, foi de 0,3% (IC95%: 0,08-0,74%), o que pode ser categorizada como uma baixa prevalência (menos de 1%), comparada a outras regiões do Brasil como em Salvador, Bahia, onde a prevalência encontrada para a infecção por HTLV-1 na população geral foi de 1,76% (Dourado et al., 2003) e a principal forma de transmissão do HTLV-1 nessa cidade é através da via horizontal entre adultos, provavelmente por meio do contato sexual (Nunes et al., 2017).

A mesma taxa de positividade encontrada neste estudo (0,3%) foi observada em gestantes de São Luís, Maranhão (Souza et al., 2012). Por outro lado, em um estudo que investigou a infecção por HTLV-1/2 em doadores de sangue de Manaus, encontrou-se uma prevalência de 0,13% para a infecção, menos da metade da prevalência observada no presente estudo (Morais et al., 2017). No entanto, o estudo de Morais e colaboradores não investigou a infecção por HTLV-1/2 na população geral de Manaus, mas apenas em doadores de sangue, o que pode justificar a diferença entre as prevalências, uma vez que a população de doadores é submetida a um processo de seleção nos hemocentros, que inclui critérios de exclusão, como histórico de doenças infecciosas e comportamentos de risco, fazendo com que indivíduos com maior probabilidade de estarem infectados pelo HTLV sejam excluídos.

É importante destacar, como já mencionado anteriormente, que a maioria dos estudos disponíveis na literatura investigou a infecção por HTLV em

populações específicas, como gestantes ou doadores de sangue. Dessa forma, o presente estudo se torna o primeiro a investigar essa infecção com uma amostra mais representativa da população residente na região metropolitana de Manaus, fornecendo dados que contribuem para a epidemiologia do HTLV na região Norte do Brasil.

Na presente estudo, a maioria dos participantes recrutados em Manaus pertencia ao sexo feminino (72%). Isso também foi observado nos outros municípios pertencentes à área metropolitana de Manaus. Uma das justificativas se deve ao fato de que homens costumam frequentar menos os serviços de saúde do que as mulheres (Gomes; Nascimento; Araújo, 2007). Como a maior parcela de participantes foi recrutada em Unidades Básicas de Saúde, isso pode ter influenciado na proporção de homens e mulheres observadas em nosso amostral.

Outros fatores que podem ter influenciado na participação masculina incluem: enfrentamento de longas filas e poucas fichas disponíveis para atendimento, além da precarização dos serviços públicos, o que desmotiva a busca por um serviço de saúde público. Esses fatores foram observados em outros estudos, realizados por Gomes, Nascimento e Araújo (2007) e Silva *et al.*, 2023.

Em relação à positividade para infecção por HTLV-1/2 em Manaus de acordo com o sexo, verificou-se que a prevalência para a infecção foi discretamente maior entre as mulheres (0,3%) comparada aos homens (0,25%). Esse resultado é similar ao encontrado em outros estudos, que observaram uma maior positividade para essa infecção entre as mulheres (Pinto *et al.*, 2016; Yousefi *et al.*, 2020). Nos outros municípios investigados no presente estudo (Iranduba, Presidente Figueiredo e Rio Preto da Eva) não foram detectados indivíduos positivos para a infecção por HTLV-1/2.

Em um estudo realizado em Salvador, relatou-se uma maior positividade para o HTLV em mulheres, principalmente aquelas que possuíam idade avançada e histórico de IST's (Nunes *et al.*, 2017). Acredita-se que a maior prevalência da infecção por HTLV-1/2 em mulheres ocorra principalmente por fatores biológicos. Observa-se que há uma maior eficiência da transmissão do HTLV dos homens para as mulheres, que pode ocorrer devido a presença de concentrações maiores de linfócitos no sêmen, quando se compara com

secreções vaginais(Firmino et al., 2023). Além disso, uma elevada carga proviral aumenta o risco de transmissão do HTLV-1/2 por via sexual(Roucoux et al., 2005), assim como lesões penianas ou vaginais causadas por IST's (tais como, sífilis, herpesvírus e hepatite B)(Boulos et al., 1992).

Em relação aos possíveis fatores de risco associados ao aumento da suscetibilidade à infecção por HTLV, um dado que merece destaque se refere ao uso de preservativo, uma vez que 637 participantes (45,59%) declararam não usar preservativo ou usá-lo às vezes. Esse é um dado preocupante, pois o preservativo protege contra uma série de IST's, incluindo o HTLV-1/2. A via sexual é uma importante forma de transmissão do HTLV-1/2, principalmente entre indivíduos com múltiplos parceiros sexuais, que praticam sexo desprotegido e possuem histórico de IST (Nunes et al., 2017; Eusebio-Ponce et al., 2019; Rosadas et al., 2021).

No que concerne aos participantes positivos para a infecção por HTLV neste estudo, todos declararam ser assintomáticos no momento da coleta da segunda amostra. Essa informação demonstra uma das importâncias deste estudo, uma vez que indivíduos infectados, ainda que não apresentem sintomas, podem transmitir o vírus principalmente aos parceiros sexuais e familiares (Zihlmann; Alvarenga; Casseb, 2012; Rosadas et al., 2024).

O rastreio de familiares de indivíduos infectados pelo HTLV é fundamental para o controle da disseminação desse vírus, pois permite identificar outros portadores assintomáticos, além de possibilitar a inferência de possíveis rotas de transmissão, como a vertical, sexual ou parenteral. Além disso, o diagnóstico precoce contribui para orientações clínicas e preventivas, como o aconselhamento sobre amamentação. No entanto, apesar das tentativas realizadas durante este estudo, não foi possível investigar se os familiares dos participantes com sorologia positiva também possuíam infecção pelo HTLV, o que limitou a compreensão sobre as formas de transmissão desse vírus nessas famílias.

Entre os possíveis fatores de risco observados entre os participantes positivos para a infecção por HTLV, estavam: possuir tatuagem (n=1), ter sido submetido a transfusão (n=2), ter sido amamentado (n=4) e não usar preservativo (n=2). Essas variáveis são descritas na literatura como fatores que aumentam a suscetibilidade à infecção por HTLV (Eusebio-Ponce et al., 2019;

Lima et al., 2022).

Neste estudo foram identificados 3 participantes infectados pelo HTLV-1 e um infectado pelo HTLV-2. A predominância do HTLV-1 é observada em diversos outros estudos realizados em populações urbanas (Amianti et al., 2024; Botelho et al., 2024; Carneiro et al., 2024). Em relação aos subtipos de HTLV-1 detectados na população de Manaus, dois indivíduos possuíam infecção por HTLV-1a, Subgrupo A (transcontinental) e um deles por HTLV-1a, Subgrupo C (oeste-africano).

O HTLV-1a é o mais prevalente mundialmente e, assim, já era esperado que pelo menos uma das três amostras positivas para HTLV-1 encontradas neste estudo fossem agrupadas nesse subtipo. Dados indicam que o subgrupo transcontinental está associado a um risco aumentado de MAH quando se compara com a infecção com o subgrupo B (Furukawa et al., 2000), revelando que diferentes subgrupos de HTLV-1 podem apresentar distintos padrões de expressão gênica. Um estudo relatou que pacientes com MAH infectados por HTLV-1aA apresentaram níveis de CXCL10 mais elevados quando comparado a pacientes com MAH infectados com HTLV-1aB, observando-se que essa citocina foi até 1,5 vezes mais fortemente induzida por Tax-A do que por Tax-B(Naito et al., 2018) . Associa-se o nível de CXCL10 no LCR com a progressão da MAH, sendo um importante biomarcador de inflamação do SNC(Zargari et al., 2020).

Em relação ao HTLV-1aC (subgrupo Oeste-africano) identificado neste estudo, trata-se de um achado inédito no Brasil, representando a emergência de um subtipo até então não descrito no país. Esta é também a primeira detecção registrada na região Amazônica. Até o momento, os estudos filogenéticos realizados no Brasil indicavam predominância do subtipo HTLV-1aA e HTLV-1aB(Abreu et al., 2024; Amianti et al., 2022; Frutos et al., 2022; Amoussa et al., 2017).

Em um estudo realizado na Bahia, estado brasileiro com as maiores taxas de positividade para a infecção por HTLV, os autores levantaram uma questão ainda não respondida: "Por que todas as sequências identificadas na Bahia são HTLV-1aA, considerando que, segundo registros históricos, a maioria dos escravizados trazidos para o Brasil por meio do porto de Salvador era originária da África Ocidental, região onde predominam cepas de HTLV-1aC (Oeste-

africano)(Mota et al., 2007)? Essa pergunta continua sem resposta.

Em um estudo publicado em 2012 que investigou a epidemiologia molecular do HTLV-1 na República da Guiné-Bissau, os autores fizeram a mesma pergunta, sobre a origem dos subgrupos do HTLV-1 nas Américas. Embora a maioria dos indivíduos de ascendência africana na América do Sul possua infecção pelo HTLV-1aA (transcontinental), esse subgrupo é raro na África Ocidental, que é a região de onde vieram grande parte dos escravos levados para a América do Sul. Ou seja, isso é uma inconsistência e um enigma, pois na África Ocidental apenas os subgrupos C e D foram identificados até o momento desse estudo, e talvez essa questão ainda não tenha sido respondida devido a escassez de estudos investigando as sequências do HTLV-1 circulantes na África Ocidental, limitando a compreensão dessa dinâmica evolutiva e epidemiológica(Tienen et al., 2012).

A identificação do HTLV-1aC em Manaus, região Norte do Brasil, pode ser explicada por duas hipóteses: (i) uma introdução antiga do subgrupo C no país, ainda não documentada, possivelmente ocorrida durante o período do tráfico transatlântico de pessoas escravizadas oriundas da África Ocidental; ou (ii) uma introdução mais recente, associada a fluxos migratórios contemporâneos. Entretanto, a investigação dessas hipóteses requereria a análise detalhada do histórico epidemiológico do indivíduo em questão, bem como estudos filogeográficos, os quais não puderam ser realizados até o momento. Ainda assim, a detecção deste subtipo reforça a necessidade de vigilância molecular contínua e de estudos moleculares ampliados sobre o HTLV-1 em diferentes regiões do Brasil, visando uma compreensão mais aprofundada da dinâmica evolutiva do vírus no país.

Neste estudo foi identificado um participante infectado pelo HTLV-2c. Esse é o segundo registro desse subtipo de HTLV-2 na área urbana da Amazônia Ocidental. A primeira descrição ocorreu em Manaus, sendo detectado em um paciente com anemia falciforme, que foi submetido a múltiplas transfusões sanguíneas durante a vida(Pontes et al., 2020). No presente estudo, o participante infectado por esse subtipo de HTLV-2 declarou ter sido submetido ao menos a uma transfusão sanguínea, mas informou não saber o ano da transfusão e nem a quantidade de vezes submetido a esse procedimento. Apenas com os dados obtidos através do inquérito epidemiológico, não foi

possível afirmar a provável forma de infecção desse indivíduo, podendo ter ocorrido por transmissão vertical ou horizontal, por exemplo.

No estado do Piauí, localizado na região nordeste do Brasil, o HTLV-2c já foi detectado em uma área urbana (Oliveira et al., 2012). Na região amazônica, o HTLV-2c é predominantemente encontrado entre populações indígenas (Vallinoto et al., 2002, 2017). O HTLV-2c já foi detectado não apenas em comunidades indígenas, mas também entre doadores de sangue e pacientes positivos para HIV-1 residentes na área urbana do estado do Pará, Brasil (Vallinoto et al., 2002; Braço et al., 2019). A presença do HTLV-2c na área urbana poderia ser resultado da miscigenação ocorrida durante a colonização das Américas, sendo assim, um evento antigo, ou uma segunda possibilidade seria a introdução do HTLV-2c na área urbana por transmissão sexual, uma vez que relações sexuais entre homens indígenas e mulheres não indígenas são relativamente frequentes (Vallinoto; Ishak, 2017).

Além ser prevalente em comunidades indígenas, o HTLV-2 também é frequentemente detectado em usuários de drogas injetáveis (Treviño et al., 2012). No estado do Pará, norte do Brasil, entre os 826 usuários de drogas ilícitas avaliados em um estudo, detectou-se o HTLV-2 em 19 participantes (2,3%), observando-se a presença do HTLV-2c em 44,8% das amostras (Oliveira-Filho et al., 2019).

Neste estudo, o participante positivo para HTLV-2c declarou nunca ter utilizado drogas ilícitas. Contudo, assim como foi explicado anteriormente, não é possível afirmar de que forma esse indivíduo foi infectado, ainda que sejam excluídas as possibilidades de transmissão por uso de drogas injetáveis ou devido transfusões, uma vez que a transmissão do HTLV pode ocorrer por outras vias, tais como através do sexo desprotegido e via vertical (durante o nascimento ou aleitamento) (Rosadas et al., 2024b; Kalinichenko, Komkov, Mazurov, 2022).

Além da importância epidemiológica, este estudo representou um impacto social positivo para a sociedade, pois possibilitou de forma gratuita, o acesso ao diagnóstico dessa infecção. Ressaltamos que a infecção por HTLV é frequentemente negligenciada e desconhecida inclusive por muitos profissionais de saúde e, considerando disso, este estudo permitiu a esses indivíduos o acesso a um teste diagnóstico que geralmente possui alto custo, e que dificilmente seria solicitado por médicos.

Embora os quatro participantes positivos para a infecção por HTLV não tenham sido encaminhados diretamente a um médico especialista, em virtude da ausência de um profissional médico na equipe deste projeto, todos receberam o laudo com o resultado positivo, seguido de orientações sobre o significado do resultado e a importância da procura por um médico infectologista para acompanhamento, respeitando a autonomia dos participantes e acesso às informações necessárias para a busca de acompanhamento médico adequado.

Outro impacto social relevante deste estudo foi a ampla disseminação de informações sobre a infecção por HTLV-1/2. Durante o recrutamento dos participantes, o estudo foi divulgado por meio de diversos canais de comunicação, incluindo reportagens em telejornais, publicações em redes sociais (Instagram e Facebook), no site institucional do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), além da realização de palestras informativas em instituições de ensino superior e em igrejas.

Uma das principais limitações deste estudo foi a dificuldade logística para o deslocamento até comunidades mais afastadas de Manaus, como áreas rurais e comunidades flutuantes. Esse desafio impactou diretamente na representatividade amostral dessas populações, resultando em um número reduzido de amostras provenientes desses locais. Considerando a relevância epidemiológica dessas regiões, estudos futuros devem priorizar estratégias que viabilizem o acesso a essas comunidades, como parcerias com agentes de saúde locais e incorporação de metodologias menos invasivas e de fácil transporte, como amostras em papel filtro.

De forma geral, os resultados aqui demonstrados fornecem dados novos e importantes para a saúde pública, que poderão ser úteis na implementação de políticas públicas com o objetivo de combater essa infecção no Brasil e principalmente no Amazonas.

1.8. Conclusões

- 1 – A prevalência para a infecção por HTLV-1/2 na região metropolitana de Manaus é baixa: 0,3%(IC95% 0,08 – 0,74);
- 2 – Mulheres demonstraram maior positividade para a infecção por HTLV-1/2 em comparação aos homens, achado que está em concordância com o observado em estudos anteriores;
- 3 - A população estudada apresenta perfil socioeconômico caracterizado predominantemente por escolaridade de ensino médio completo e renda familiar mensal entre 1 e 3 salários mínimos;
- 4 – A baixa adesão ao uso regular de preservativos observada neste estudo reforça a necessidade de intensificar ações de educação em saúde sexual e ampliar o acesso à informação sobre a prevenção de infecções sexualmente transmissíveis na região;
- 5 – Os possíveis fatores de risco para a infecção por HTLV-1/2 presentes na população recrutada em Manaus foram: possuir tatuagem, ter sido submetido a transfusão, ter sido amamentado e não utilizar preservativo nas relações sexuais;
- 6 – A identificação dos subtipos HTLV-1aA e HTLV-1aC, variante inédita na região, aponta para uma diversidade genética maior do que a previamente conhecida e reforça a importância da vigilância molecular contínua para compreender melhor a dinâmica de circulação do vírus em Manaus;
- 7 - A recorrente detecção do subtipo HTLV-2c em ambiente urbano indica que sua circulação pode estar sendo subestimada, evidenciando falhas na vigilância epidemiológica e a necessidade de ampliar os esforços de monitoramento para essa variante.

CAPÍTULO 2

ESTRATÉGIAS MINIMAMENTE INVASIVAS NO DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR HTLV-1/2 E MONITORAMENTO INFLAMATÓRIO EM INDIVÍDUOS INFECTADOS

2.1. OBJETIVOS

2.1.1. Objetivo Geral

Avaliar a aplicabilidade de amostras minimamente invasivas (saliva, DBS e DPS) para o diagnóstico da infecção por HTLV-1/2 e quantificação de um biomarcador inflamatório (neopterina) em indivíduos infectados.

2.1.2. Objetivos específicos

- Validar um teste de ELISA in-house para a detecção de IgG anti-HTLV-1 usando amostras de saliva;
- Avaliar o uso de DBS e DPS na detecção de IgG anti-HTLV-1/2;
- Avaliar o uso de DBS e DPS como um método mais acessível para quantificar a neopterina sérica em pacientes infectados pelo HTLV-1.

2.2. VALIDAÇÃO DE UM TESTE DE ELISA PARA O DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR HTLV-1/2 USANDO SALIVA

2.2.1. Material e métodos

2.2.1.1. Caracterização da população investigada

Um total de 48 adultos participaram deste estudo, após assinatura do termo de consentimento. Os participantes foram recrutados no Centro Nacional de Retrovírologia Humana do Hospital Saint Mary's, Londres, entre os meses de abril a setembro de 2024. Trinta e sete indivíduos tiveram a infecção por HTLV-1 confirmada por Western Blot e PCR, e 11 eram indivíduos soronegativos para HTLV-1 (testados por ELISA anti-HTLV-1/2 Murex [Diasorin] em plasma).

2.2.1.2. Amostras clínicas

Cada participante doou amostras pareadas de saliva e FGC, após instruções da equipe clínica, seguidas de autocoleta das amostras. Saliva não estimulada foi coletada por expectoração direta em um recipiente de poliestireno estéril (Bijou de 7,0 ml). O FGC foi coletado utilizando-se o dispositivo Oracol (Malvern Medical Developments, Worcester, Reino Unido), de acordo com as instruções do fabricante. O swab de FGC foi processado seguindo o protocolo publicado anteriormente (Woo et al., 2019), com o fluido sendo extraído em até 24 horas após a coleta. Os eluatos foram armazenados a -80°C até a análise.

2.2.1.3. Ensaio imunoenzimático para a detecção de IgG

Os tubos contendo saliva não necessitaram de processamento e foram armazenados no mesmo dia da coleta a -80°C até a análise. Um ELISA in-house desenvolvido anteriormente (Woo et al., 2019) foi utilizado para a detecção de IgG anti-HTLV-1 nas amostras de saliva e FGC. Resumidamente, o teste foi desenvolvido para detectar anticorpos contra proteínas dos genes **env** (gp46, gp21) e **gag** (p19, p24) do HTLV-1 e 2, disponíveis comercialmente (Murex HTLV-1/2, Diasorin). Esse teste foi desenvolvido para ser altamente sensível e específico por usar anticorpos anti-IgG humanos (Affinipure Rabbit anti-human IgG, Fcγ fragment specific antibody, Jackson ImmunoResearch) na fase sólida e抗ígenos recombinantes do HTLV-1/2 conjugados com HRP (*Horse Radish Peroxidase*) na fase líquida.

2.2.1.4. Análise estatística

As densidades ópticas (DOs) foram determinadas utilizando o analisador de microplacas SpectraMax M2 (Molecular Devices, San Jose, CA, EUA) a um comprimento de onda de 450nm. O valor de corte foi calculado como a DO média das triplicatas do controle negativo mais 0,1. Para normalizar as DOs entre as placas, uma razão de ligação (Binding Ratio - BR) foi calculada para cada amostra, dividindo sua DO pelo valor de corte. Amostras com $BR \geq 1,00$ foram consideradas reativas e aquelas que apresentaram $BR < 1,00$, não reagentes.

2.2.2. Resultados

A primeira questão respondida foi quanto à validação do ELISA in-house desenvolvido, uma vez que a sensibilidade e a especificidade deste teste utilizando-se saliva ainda não eram conhecidas.

O ensaio apresentou excelente desempenho utilizando saliva, com sensibilidade (IC de 95%: 90,5-100%) e especificidade (IC de 95%: 71,5-100%) de 100%. Foi observada alta concordância entre saliva e GCF (índice kappa = 1). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre o BR médio detectado na saliva em comparação com FGC (saliva: média 12,2, DP 9,0; FGC: média 12,4, DP 8,7) (Figura 13A).

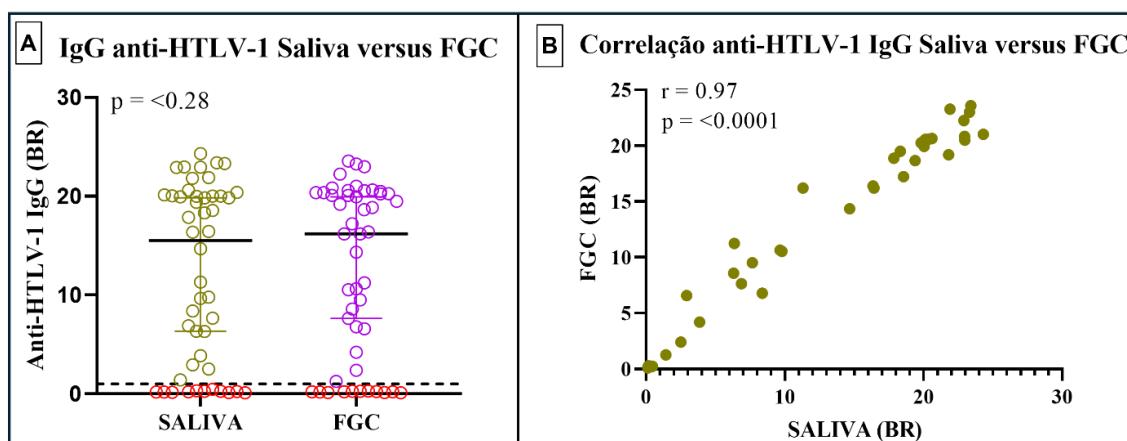


Figura 13. (A) Binding Ratio do IgG anti-HTLV-1 na saliva e no FGC. Os controles negativos são representados em vermelho. As barras pretas horizontais representam a mediana. A linha pontilhada representa o limiar de positividade. O teste de Wilcoxon foi utilizado para comparar as médias. **(B) Correlação entre o Binding Ratio (BR) do IgG anti-HTLV-1 no FGC e na saliva.** Foi utilizado o teste de correlação de Spearman.

Uma alta correlação foi observada entre o BR em amostras de saliva e FGC ($r = 0,97$, $p<0,0001$) (Figura 14B), confirmando que o sinal médio de IgG contra o HTLV detectado na saliva e no FGC é equivalente, sugerindo que ambas as amostras podem ser usadas para detectar esses anticorpos. Dessa forma, demonstra-se que também é possível detectar IgG contra esse vírus na saliva, comparando esses resultados com o FGC.

2.2.3. Discussão

A coleta de saliva oferece vantagens significativas como alternativa não invasiva e indolor, aumentando o conforto do paciente e facilitando a implementação de estratégias de triagem em larga escala. O uso de saliva na detecção de IgG anti-HTLV-1, em comparação ao fluido gengival, permite a coleta de amostras não invasivas em bebês, uma vez que o FGC é encontrado apenas em crianças que já possuem dentes (Subbarao et al., 2019). Além disso, a saliva também tem o potencial de ser utilizada no monitoramento clínico de bebês mais jovens nascidos de mulheres portadoras do HTLV-1. Essa abordagem poderá subsidiar pesquisas futuras e facilitar o atendimento pediátrico.

A eliminação da transmissão vertical do HTLV-1 é agora a meta da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). O uso da metodologia aqui proposta, utilizando saliva, poderia acelerar a meta de eliminação desse tipo de transmissão, considerando que a OPAS informa que para alcançar esse objetivo, é essencial que os países testem mais de 90% dos bebês expostos, nascidos de mães soropositivas (Pan American Health Organization, 2021). No entanto, o acompanhamento de bebês continua desafiador e raramente realizado. Além disso, o FGC é coletado com o kit Oracol, que custa aproximadamente £9 por unidade (cerca de 68 reais) e não está disponível em muitos países.

Outros métodos de obtenção do FGC podem ser utilizados, como tiras de papel absorvente (Periopaper®) (Dias et al., 2022) e túbulos microcapilares ou micropipetas (Meharwade, Gayathri e Mehta, 2014). No entanto, esses métodos apresentam a desvantagem de que o volume coletado pode ser insuficiente, dificultando a obtenção de um volume adequado para a realização do ELISA, enquanto o ORACOL é otimizado para maximizar a absorção de FGC,

minimizando também a diluição da amostra com saliva, evitando a interferência de células epiteliais ou bactérias e facilitando a extração para testes como o ELISA. A metodologia com saliva apresentada aqui não requer processamento após a coleta e utiliza recipientes estéreis (bijous) para coletar essa amostra biológica, reduzindo custos, pois um pacote com 700 recipientes custa 1.390 reais, ou seja, cada unidade de bijou tem o valor aproximado de 1,50 reais.

A relação custo-efetividade é crucial para qualquer estratégia de rastreamento, mas é particularmente importante no cenário do HTLV-1. Essa infecção é altamente concentrada em áreas geográficas onde as populações enfrentam desvantagens socioeconômicas, incluindo baixo índice de desenvolvimento humano, produto interno bruto per capita reduzido e distribuição desigual de renda (Sampaio et al., 2023). Assim, próximas etapas do presente estudo irão avaliar o desempenho deste ensaio em um número maior de indivíduos, incluindo pessoas vivendo com HTLV-2. Estudos clínicos serão conduzidos para confirmar a validade do ensaio em áreas altamente endêmicas para o HTLV-1/2 e em pacientes pediátricos.

2.2.4. Conclusões

- 1 - Os resultados deste estudo indicam que a saliva pode ser usada como amostra alternativa para detectar IgG anti-HTLV-1;
- 2 - A forte correlação entre os resultados dos dois tipos de amostra, aliada à ausência de diferenças estatisticamente significativas, reforça o potencial da saliva como alternativa viável para o diagnóstico do HTLV-1;
- 3 - A coleta de saliva oferece vantagens significativas como alternativa não invasiva e indolor, quando se compara à coleta de sangue venoso para obtenção de plasma ou soro, aumentando o conforto do paciente e facilitando a implementação de estratégias de triagem em larga escala, possuindo potencial para ser utilizada especialmente no acompanhamento pediátrico;

2.3. AVALIAÇÃO DO USO DE DRIED BLOOD SPOT (DBS) E DRIED PLASMA SPOT (DPS) PARA DETECÇÃO DE IgG anti-HTLV-1/2 E QUANTIFICAÇÃO DE NEOPTERINA

2.3.1. Material e métodos

2.3.1.1. Caracterização da população investigada para o teste de detecção de IgG anti-HTLV-1/2

Amostras de sangue periférico coletadas em tubos contendo EDTA foram obtidas de 100 PVHTLV atendidos no Centro Nacional de Retrovírologia Humana do Hospital Saint Mary's, Londres, entre abril e setembro de 2024. Entre esses 100 participantes, 98 possuíam infecção por HTLV-1 (61 assintomáticos, 28 com MAH, 7 com LLTA e 2 com poliartrite) e 2 por HTLV-2 (Tabela 15).

Tabela 15. Estratificação da população estudada.

Participantes do estudo	N	Média de idade em anos (variação)
Portador assintomático (HTLV-1)	61	54 (20-84)
MAH	28	64 (38-84)
LLTA	7	60 (40-76)
Poliartrite	2	48 (29-67)
Portador assintomático (HTLV-2)	2	44 (33-55)
Não infectado por HTLV (controles negativos)	7	45 (28-70)
Total	107	

A média de idade dos indivíduos portadores de HTLV-1 foi de 57 anos (variando entre 20 a 89 anos). Sete indivíduos sem infecção por HTLV-1/2 (controles negativos) também foram recrutados. Todos os indivíduos que concordaram em participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, autorizando a doação das amostras.

2.3.1.2. Caracterização da população investigada para o teste de quantificação da neopterina

Amostras de sangue foram obtidas de 62 indivíduos portadores de HTLV-1 atendidos no Centro Nacional de Retrovírologia Humana do Hospital St. Mary's, Londres, entre abril e setembro de 2024. Entre os 62 indivíduos portadores de HTLV-1, 41 eram assintomáticos e 21 apresentavam MAH (Tabela 16).

Tabela 16. Estratificação da população estudada.

Participantes do estudo	N	Idade em anos (média)
Indivíduos assintomáticos (HTLV-1)	41	55
MAH	21	61
Total	62	

A média de idade dos indivíduos portadores de HTLV-1 foi de 57 anos (25 a 79 anos). Todos os participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, autorizando a doação das amostras.

2.3.1.3. Amostras clínicas

As amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos contendo anticoagulante EDTA. Após a coleta, as amostras foram enviadas ao laboratório de virologia, localizado no departamento de doenças infecciosas do Imperial College London, e processadas em até 24 horas. O DBS foi preparado pela adição de 60 μ L de sangue total em EDTA em cada um das 5 áreas circulares (spots) do cartão de papel filtro (Ahlstrom-Munksjö BioSample TFN CE perforated, Germany) (Figura 14A).

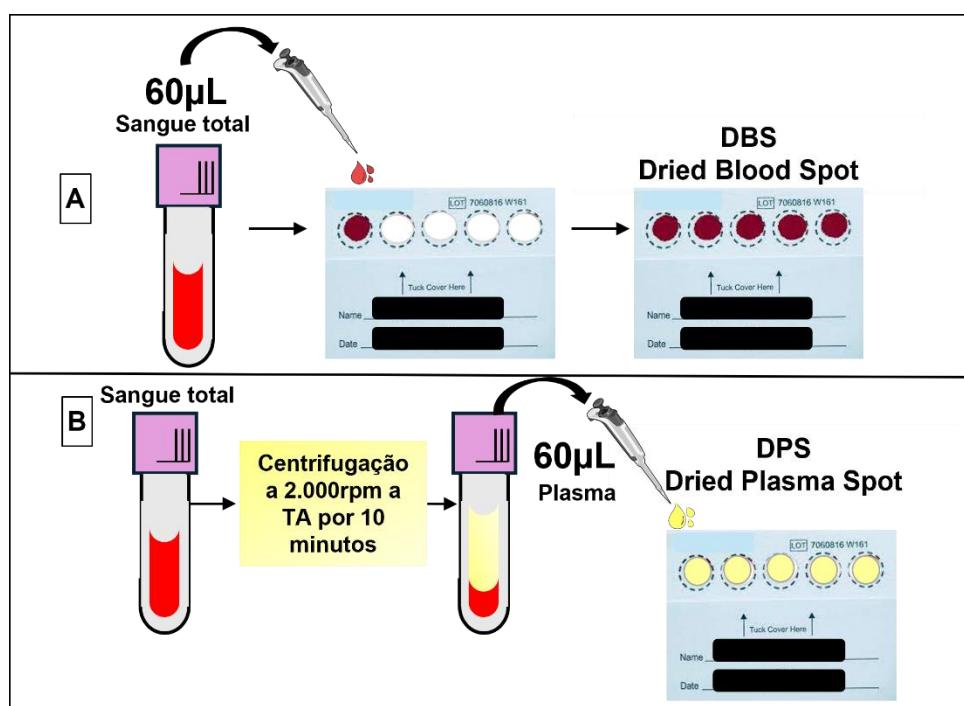


Figura 14. Preparação das amostras em cartões de filtro. (A) O DBS é obtido pipetando-se 60 μ L de sangue total em cada uma das áreas circulares (spots) do cartão. (B) Após a preparação do DBS, a amostra de sangue total do mesmo paciente é centrifugada e o plasma é pipetado em outro cartão da mesma maneira (60 μ L), obtendo-se o DPS.

Após a preparação do DBS, a amostra de sangue com EDTA restante foi centrifugada para obtenção do plasma, que foi pipetado ($60\mu\text{L}$) em um cartão de papel filtro, obtendo-se assim o DPS (Figura 14B). O plasma restante foi transferido para um microtubo e armazenado a -80°C até o uso. Assim, dois cartões foram preparados para cada participante (um DBS e outro DPS).

Os cartões foram deixados em temperatura ambiente até o dia seguinte, para que a amostra secasse completamente. Após essa etapa, os cartões foram armazenados em envelopes plásticos com dessecante.

2.3.1.4. Recuperação de sangue e plasma dos cartões de papel filtro

Para recuperar as amostras de sangue total (DBS) e plasma (DPS) absorvidas nos cartões de papel filtro, um spot de cada cartão foi removido com o auxílio de uma pinça e colocado dentro de um tubo bijou. A figura 15 mostra as etapas de eluição usando DBS como exemplo (a eluição de DPS seguiu as mesmas etapas).

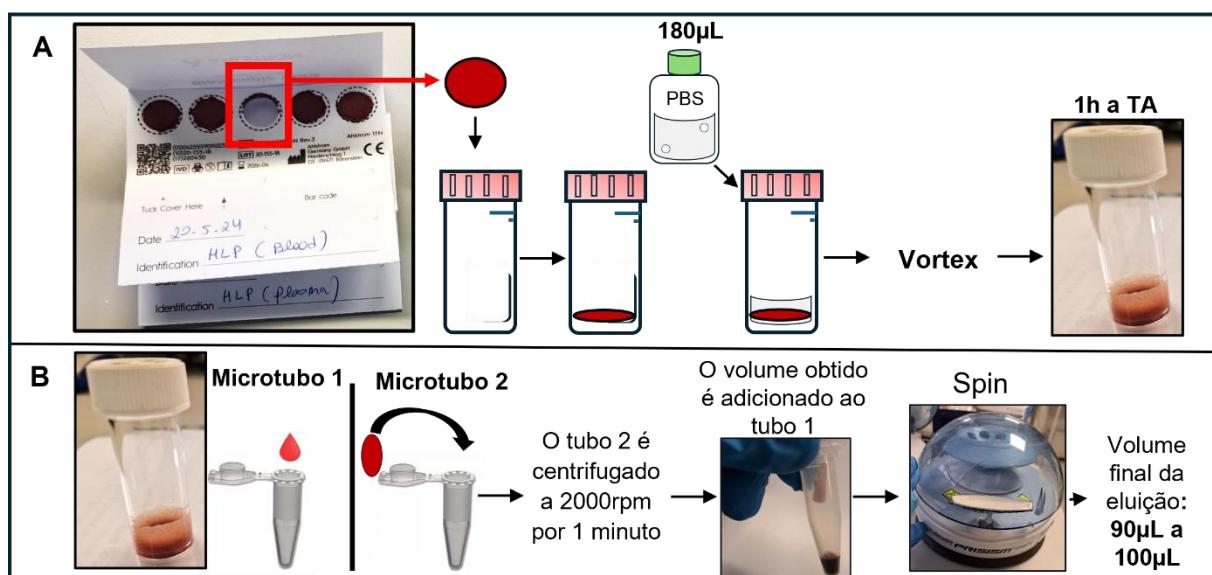


Figura 15. Etapas de eluição para recuperação de amostras dos cartões. (A) 1 spot de DBS ou DPS foi usado e colocado dentro de um recipiente Bijou com $180\mu\text{L}$ de PBS, agitado em vórtice e deixado por 1h em temperatura ambiente. (B) Após 1 hora, a amostra eluída presente no tubo foi transferida para um microtubo (microtubo 1). Um segundo microtubo foi usado para recuperar a amostra restante que ainda estava absorvida no spot. Assim, o spot foi colocado na parede do microtubo 2, centrifugando-se esse tubo 2 com o spot. Após a centrifugação, a amostra recuperada no microtubo 2 foi adicionada ao microtubo 1. Uma centrifugação adicional foi realizada e a amostra eluída foi armazenada a -80°C até o uso.

Após colocar o spot dentro do tubo bijou, 180 μ L de PBS foram adicionados. O tubo foi então agitado em vórtex por alguns segundos e deixado a temperatura ambiente por 1 hora (A). O spot foi transferido para um microtubo e centrifugado a 2.000rpm por 1 minuto para recuperação completa da amostra. (B). O eluato total foi submetido a uma breve centrifugação para reduzir a quantidade de bolhas. Após a eluição das amostras de DBS e DPS, os microtubos contendo essas amostras foram armazenados a -80°C até o uso.

2.3.1.5. Ensaio imunoenzimático para detecção de IgG

Um ELISA de captura de IgG foi desenvolvido e utilizado de acordo com metodologia publicada anteriormente(Woo et al., 2019). Esse formato de ELISA in-house foi o mesmo utilizado na detecção de IgG anti-HTLV-1 em amostras de saliva, descrito na seção anterior. Para a testagem do DBS e DPS por ELISA, após extraí-las dos cartões e armazená-las, as amostras foram diluídas 1:100 em meio de transporte (10% de soro fetal bovino, 0,5% de gentamicina e 0,2% de anfotericina B em solução salina tamponada com fosfato [PBS])(Woo et al., 2019). Em seguida, 100 μ l das diluições foram adicionados aos poços da microplaca. Como o plasma é a amostra padrão utilizada em testes sorológicos, o plasma de cada indivíduo também foi testado, na diluição de 1:200, utilizando-se meio de transporte, para posterior comparação do resultado com DBS e DPS. A microplaca foi então incubada por 1h a 37°C.

A solução de lavagem foi preparada com tampão de lavagem a 10% (Microimmune) em água destilada. Os poços foram lavados cinco vezes e, simultaneamente, foram adicionados aos poços 25 μ l de conjugado marcado com peroxidase, contendo a proteína transmembrana recombinante de HTLV-1 e peptídeos sintéticos do envelope do HTLV-1 e HTLV-2 do kit Murex HTLV I+II EIA (DiaSorin, Dartford, Reino Unido) e 25 μ l/poço de diluente de conjugado (Clin-Tech, Guildford, Reino Unido).

Após incubação por 2h a 37°C, a placa foi lavada cinco vezes e 100 μ l/poço de substrato TMB (Clin-Tech) foram adicionados, seguidos por mais 30 minutos de incubação a 37°C. As reações foram interrompidas com 50 μ l/poço de ácido sulfúrico 0,5M (Microimmune). As densidades ópticas (DOs) foram

determinadas pelo analisador de microplacas SpectraMax M2 (Molecular Devices, San Jose, CA, EUA) a 450nm. Um valor de corte foi calculado a partir da densidade óptica média (DO) da triplicata de controles negativos da microplaca mais 0,1. Para normalizar as DOs entre as placas, uma razão de ligação (Binding Ratio - BR) foi calculada para cada amostra, dividindo sua DO pelo valor de corte. Amostras com $BR \geq 1,00$ foram consideradas reativas.

Amostras pareadas de DBS, DPS e plasma de 53 indivíduos com HTLV (35 assintomáticos, 15 HAM, 1 ATL, 1 com poliartrite e 1 HTLV-2) e 7 indivíduos não infectados foram selecionadas aleatoriamente e também testadas no kit Murex HTLV I+II EIA, disponível comercialmente (DiaSorin, Dartford, Reino Unido). O ensaio foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

2.3.1.6. Ensaio imunoenzimático para quantificação da neopterina

A neopterina foi quantificada nas amostras de DBS, DPS e plasma utilizando-se um ensaio imunoenzimático comercial da empresa IBL International GmbH, Alemanha, seguindo as instruções do fabricante. Em resumo, trata-se de um ELISA competitivo no qual uma quantidade desconhecida de antígeno na amostra e uma quantidade fixa de antígeno marcado com enzima competem pelos sítios de ligação do anticorpo. Ambos os complexos antígeno-anticorpo se ligam aos poços das tiras de microtitulação revestidas com um anticorpo anti-IgG de coelho produzido em cabra (goat anti-rabbit IgG). A intensidade da cor desenvolvida após a incubação do substrato é inversamente proporcional à quantidade de antígeno na amostra, e os resultados das amostras podem ser determinados diretamente utilizando a curva padrão.

2.3.1.7. Teste de estabilidade

Para verificar a estabilidade do IgG e neopterina nos cartões de papel filtro, amostras pareadas de DBS e DPS de 10 indivíduos foram armazenadas em duas condições: temperatura ambiente (18-22°C) e -20°C por 3 meses. Após esse tempo, foram testadas por ELISA (Figura 16).

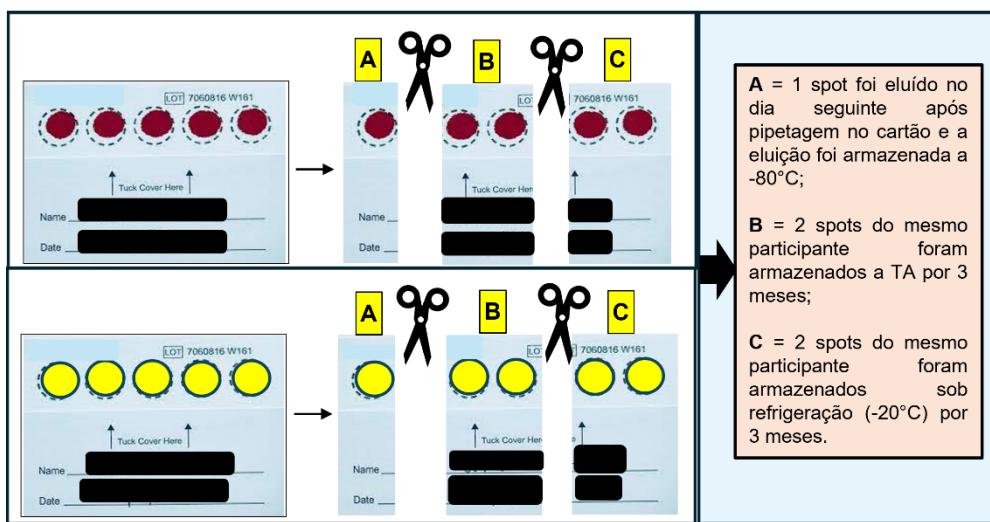


Figura 16. Teste de estabilidade. Os spots de DBS e DPS foram separados e mantidos sob diferentes condições. Cada cartão continha 5 spots. Um deles foi destacado com o auxílio de uma tesoura, eluído e armazenado a -80 °C (A). Os spots restantes não foram eluídos, mas foram separados e armazenados à temperatura ambiente (B) e a -20°C (C) por 3 meses.

2.3.1.8. Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando-se o software Prism 8 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). Em relação às análises dos testes de detecção de IgG anti-HTLV-1/2, o teste de correlação de Spearman foi realizada para comparar os valores de S/CO entre amostras pareadas de DBS, DPS e plasma. Nos casos em que amostras pareadas foram analisadas, o teste de Wilcoxon foi realizado para comparar as diferenças nos valores de S/CO. Os valores de S/CO de pacientes infectados com diferentes fenótipos clínicos foram comparados utilizando o teste U de Mann-Whitney. Resultados com valor de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Quanto às análises de neopterina, o teste de Friedman foi utilizado para comparar a concentração de neopterina entre diferentes tipos de amostra. O teste T não pareado ou o teste de Mann-Whitney foram utilizados para comparar a concentração de neopterina entre indivíduos com infecção assintomática por HTLV-1 e pessoas com MAH, de acordo com a distribuição dos dados. A comparação dos níveis de IgG ou neopterina entre as matrizes plasma, DPS e DBS foi realizada utilizando o Coeficiente de Correlação de Concordância (CCC) de Lin, que avalia simultaneamente a precisão (por meio da correlação linear) e a exatidão (desvio em relação à linha de identidade, $x = y$). Os dados foram

apresentados em gráficos de dispersão bivariada, nos quais os pares de valores entre as diferentes matrizes foram comparados. Um nível de significância abaixo de 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

2.3.2. Resultados do teste de detecção de IgG anti-HTLV-1/2

Detectou-se IgG anti-HTLV-1/2 em todas as amostras de DBS, DPS e plasma de indivíduos infectados pelo HTLV, enquanto os controles negativos (sem infecção pelo HTLV) apresentaram resultados negativos no ELISA. Assim, a sensibilidade (IC de 95%: 96,38-100%) e a especificidade (IC de 95%: 59,04-100%) do ensaio de captura in-house foram de 100% (Figura 17A).

Os valores do Coeficiente de Correlação de Concordância (CCC) indicaram altíssima concordância entre as diferentes matrizes testadas. A comparação entre plasma e DPS revelou uma concordância praticamente perfeita, com mínima dispersão em relação à linha de identidade (CCC = 0,99; IC95%: 0,9895 – 0,9906), o que indica que os valores obtidos são praticamente intercambiáveis. Resultados semelhantes foram observados nas comparações entre plasma e DBS (CCC = 0,98; IC95%: 0,9901 – 0,9910) e entre DPS e DBS (CCC = 0,99; IC95%: 0,9954 – 0,9957) (Figura 17B).

A concentração dos pontos ao longo da linha de identidade ($x = y$) reforça a ausência de viés sistemático e a confiabilidade dos dados obtidos (Figura 17B). A análise demonstrou excelente concordância na dosagem de IgG entre plasma, DPS e DBS, evidenciando que tanto o DPS quanto o DBS são alternativas viáveis e confiáveis ao uso de plasma para quantificação de IgG, especialmente relevante para contextos de coleta em regiões de difícil acesso, onde o uso de amostras secas facilita o transporte e armazenamento, garantindo a qualidade das análises.

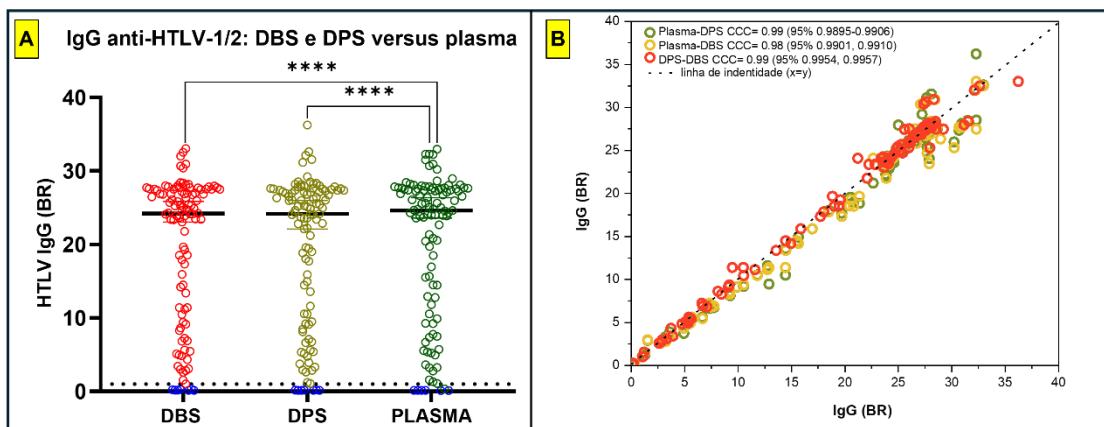


Figura 17. Níveis de IgG anti-HTLV-1/2 no ensaio in-house em DBS, DPS e plasma e correlação entre as amostras. (A) Níveis de IgG anti-HTLV-1/2 detectados no DBS, DPS e plasma dos participantes; teste de Wilcoxon. **(B)** Gráfico de dispersão comparando as concentrações de IgG (unidades BR) entre plasma, DPS e DBS. Cada ponto representa uma amostra analisada por dois métodos. A linha tracejada indica a linha de identidade ($x = y$). Os coeficientes de correlação de concordância (CCC) de Lin e seus ICs 95% evidenciam excelente concordância entre os métodos.

Indivíduos com HAM apresentaram níveis mais elevados de IgG anti-HTLV-1/2 em DBS, DPS e plasma, em comparação com aqueles que possuíam infecção assintomática (Figura 18).

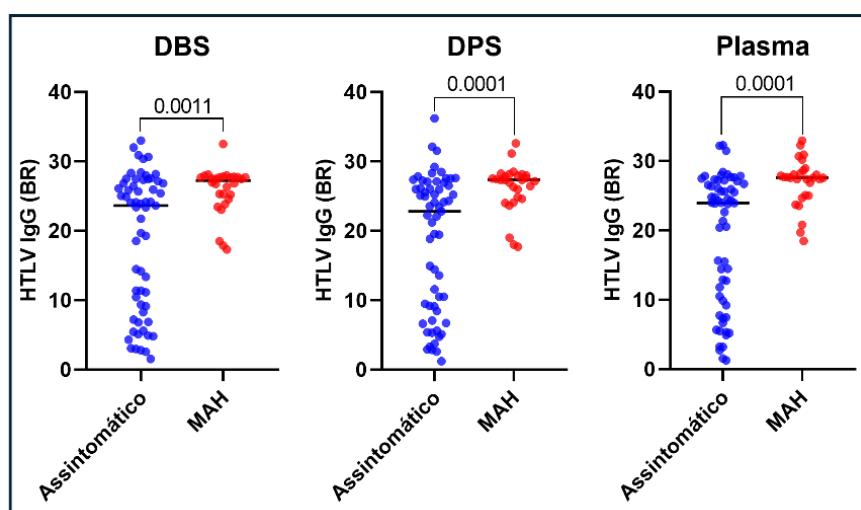


Figura 18. Níveis de IgG anti-HTLV-1/2 de acordo com as manifestações clínicas de pacientes infectados pelo HTLV. Teste de Mann-Whitney

Os dados apresentados a seguir (Tabela 17) demonstram que indivíduos com MAH apresenta níveis médios de IgG consistentemente mais elevados em todas as amostras biológicas avaliadas (DBS, DPS e plasma), quando

comparados a pacientes assintomáticos.

Tabela 17. Comparação entre médias e desvio padrão dos níveis de IgG entre indivíduos assintomáticos e MAH.

Amostra	Assintomático	MAH
	Média (DP)	Média (DP)
DBS	18.7 (9.83)	25.8 (3.36)
DPS	18.5 (9.80)	26.2 (3.40)
Plasma	18.9 (9.49)	26.9 (3.42)

Ao analisar o DBS, observa-se que a diferença nos níveis de IgG entre os grupos é evidente, com pacientes com MAH apresentando uma média de 25,8 (DP 3,36) versus 18,7 (DP 9,83) nos pacientes assintomáticos. A mesma tendência se repete no DPS e plasma, com níveis de IgG mais elevados no grupo MAH em comparação aos assintomáticos.

Amostras pareadas de DBS, DPS e plasma de 53 indivíduos soropositivos para HTLV e 7 não infectados testados no teste de captura in-house também foram analisadas no kit Murex HTLV I+II EIA para comparação, seguindo as instruções do fabricante para amostras de soro. No kit Murex, todas as amostras de DBS, DPS e plasma de indivíduos com HTLV apresentaram resultados reativos, como esperado, visto que esses indivíduos já tinham confirmação prévia de infecção (Figura 19A).

Na comparação entre os métodos, os resultados obtidos com o kit comercial foram semelhantes aos observados nos testes in house. A análise entre plasma, DPS e DBS demonstrou, mais uma vez, altíssima concordância, com valores de CCC próximos de 1, evidenciando elevada precisão e exatidão na quantificação de IgG em DPS e DBS em relação ao plasma. A aderência dos dados à linha de identidade ($x = y$) reforça a ausência de viés sistemático, confirmando mais uma vez que os métodos alternativos (DPS e DBS) produzem resultados praticamente equivalentes aos do plasma (Figura 19 B).

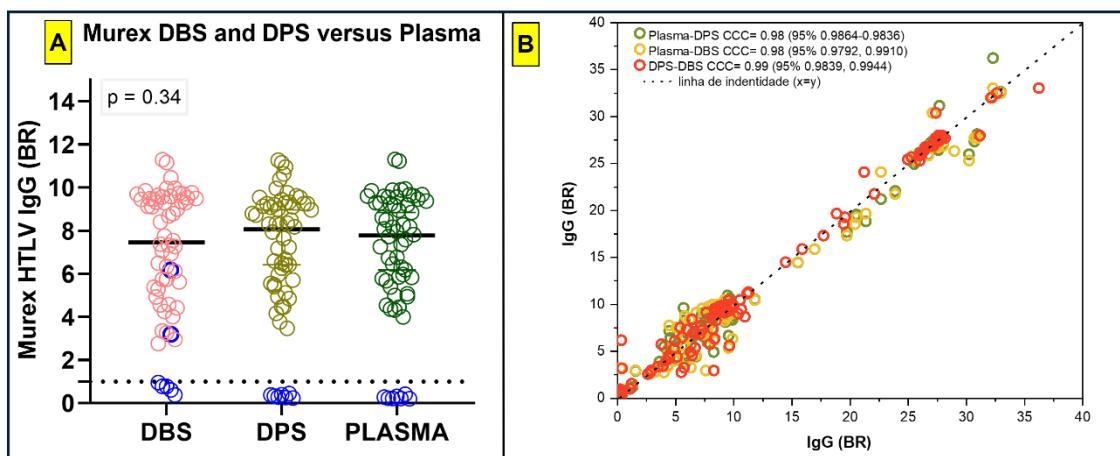


Figura 19. Níveis de IgG anti-HTLV-1/2 no ensaio Murex em DBS, DPS e plasma e correlação entre as amostras. (A) Níveis de IgG anti-HTLV-1/2 detectados em DBS, DPS e plasma utilizando o ensaio comercial Murex; Círculos azuis: amostras de indivíduos soronegativos. As barras horizontais pretas mostram a mediana. A linha pontilhada horizontal indica a relação S/CO em 1.00, acima da qual as amostras são consideradas reativas (B) Gráfico de dispersão comparando as concentrações de IgG (unidades BR) entre plasma, DPS e DBS. Cada ponto representa uma amostra analisada por dois métodos. A linha tracejada indica a linha de identidade ($x = y$). Os coeficientes de correlação de concordância (CCC) de Lin e seus ICs 95% evidenciam excelente concordância entre os métodos.

Porém, entre os 7 controles negativos, 2 deles apresentaram um resultado falso-positivo no DBS (Figura 19A e Tabela 18). As amostras de DPS e plasma desses controles negativos apresentaram corretamente um resultado não reativo, e uma forte correlação positiva foi observada entre DBS e DPS versus plasma (Figura 19B).

A Tabela 18 mostra com mais detalhes os resultados obtidos no ensaio Murex para os 7 controles negativos. Os dois últimos indivíduos (amostras 6 e 7) na tabela apresentaram positividade no DBS (ou seja, Binding Ratio [BR] ou S/CO ≥ 1.00), apesar de não apresentarem infecção por HTLV.

Tabela 18. Comparação entre os níveis de IgG (BR) detectados no ensaio de captura in-house e ensaio Murex em amostras de indivíduos não infectados.

	IgG (BR) Ensaio de captura in-house				IgG (BR) Ensaio comercial Murex			
	DBS	DPS	Plasma	Resultado	DBS	DPS	Plasma	Resultado
Amostra 1	0.15	0.13	0.13	Negativo	0.78	0.45	0.41	Negativo
Amostra 2	0.12	0.15	0.13	Negativo	0.96	0.24	0.23	Negativo
Amostra 3	0.31	0.13	0.11	Negativo	0.38	0.26	0.20	Negativo
Amostra 4	0.21	0.12	0.13	Negativo	0.61	0.38	0.28	Negativo
Amostra 5	0.25	0.20	0.10	Negativo	0.78	0.28	0.22	Negativo
Amostra 6	0.14	0.17	0.33	Negativo	6.18	0.33	0.31	Somente o DBS positivo
Amostra 7	0.17	0.14	0.13	Negativo	3.19	0.39	0.22	Somente o DBS positivo

Como pode ser observado na Tabela 18, as amostras pareadas dos 7 indivíduos não infectados pelo HTLV (DBS, DPS e plasma) apresentaram resultado negativo no ensaio de captura in house, uma vez que o BR (também chamado de S/CO) apresentou valor abaixo de 1.

As amostras 6 e 7 apresentaram resultados falso-positivos no ensaio Murex apenas no DBS, com resultados de BR 6.18 e 3.19 (valores em negrito na tabela), respectivamente. Posteriormente, a amostra 6 foi retestada no ensaio Murex, apresentando novamente um resultado positivo apenas em DBS (dados não mostrados). A amostra 7 não foi retestada. Portanto, a especificidade do ensaio Murex usando DBS foi de 71,43% (IC 95%, 29,04% a 96,33%).

Em relação ao teste de estabilidade de IgG em cartões de papel filtro, foi possível detectar IgG anti-HTLV-1/2 três meses após a preparação dos cartões. Assim, concluiu-se que a IgG permanece estável no cartão por pelo menos até 3 meses após a coleta, independentemente se os cartões foram armazenados a -20°C ou à temperatura ambiente (Quadro 3).

Quadro 3. Teste de estabilidade de IgG anti-HTLV-1/2 nos cartões 3 meses após a coleta

N	ELISA de captura IgG (BR)			ELISA de captura IgG (BR após 3 meses)				Controles negativos
	DBS	DPS	PLASMA	DBS (RT)	DBS (-20°C)	DPS (RT)	DPS (-20°C)	
1	0.15	0.13	0.13	0.26	0.72	0.5	0.37	
2	0.14	0.17	0.33	0.28	0.22	0.17	0.26	
3	27.46	25.56	25.6	21.38	21.68	23.4	21.45	
4	23.38	22.24	23.82	20.07	20.61	19.41	20.8	Indivíduos HTLV positivos
5	4.83	4.76	5.21	3.62	5.75	4.21	5.55	
6	25.06	25.20	24.82	20.96	20.93	20.28	20.62	
7	25.23	24.84	25.07	21.55	20.78	23.95	20.91	
8	25.30	27.95	25.01	20.62	20.58	21.05	21.03	
9	24.90	25.09	24.78	20.75	21.16	23.99	20.84	
10	23.40	22.81	23.97	19.84	20.32	18.5	20.06	

Como pode ser observado no quadro 3, dez amostras foram utilizadas no teste de estabilidade (2 controles negativos, 6 pacientes assintomáticos e 2 pacientes com MAH). Os spots foram armazenados nessas diferentes condições durante 3 meses e somente então foram destacados dos cartões e eluídos para detecção de IgG. Observa-se que os níveis de IgG detectados após 3 meses foram muito semelhantes aos encontrados quando os spots foram eluídos no dia seguinte à preparação do DBS e DPS.

Em resumo, verificou-se que o IgG anti-HTLV-1/2 permaneceu estável no DBS e DPS por até 3 meses após a coleta, e os cartões puderam ser armazenados em temperatura ambiente ou -20°C durante esse período sem comprometer a detecção desse anticorpo.

2.3.3. Discussão

Dried Blood Spots (DBS) e Dried Plasma Spots (DPS) são metodologias que oferecem diversas vantagens, entre elas menores custos logísticos e possibilidade de utilização em áreas remotas(Lim, 2018). Essa metodologia tem demonstrado grande potencial, sendo utilizada principalmente no monitoramento de medicamentos terapêuticos e diagnóstico de doenças(Boa-Sorte et al., 2014; Parker et al., 1995; Zailani e Ho, 2023).

A infecção por HTLV tem sido negligenciada por muitas décadas, apesar do vírus ter sido identificado antes do HIV (Futsch, Mahieux e Dutartre, 2018). Grande parte dessa realidade está relacionada à dificuldade de acesso ao diagnóstico e ao alto custo dos testes, fatores que limitam a detecção precoce e o acompanhamento adequado da infecção, especialmente em áreas de recursos limitados. O presente estudo verificou a viabilidade de detecção de anticorpos IgG anti-HTLV-1/2 em amostras de DBS e DPS.

Os resultados demonstraram que foi possível detectar IgG anti-HTLV-1/2 em amostras de DPS e DBS, utilizando um ensaio de captura in-house. O ELISA desenvolvido e validado apresentou 100% de sensibilidade e especificidade, uma vez que detectou corretamente todos os casos positivos (indivíduos com HTLV) e negativos (indivíduos sem infecção por HTLV). Além disso, foi observada alta correlação de concordância entre DBS, DPS e plasma. Esses resultados indicam que o uso de DBS e DPS pode ser uma alternativa viável ao plasma para a detecção de anticorpos anti-HTLV-1/2, refletindo com alta precisão os valores encontrados no plasma. Isso reforça a confiabilidade dessas amostras na triagem e no monitoramento sorológico. Além disso, essa metodologia tem a vantagem de ser menos invasiva, mais simples e com custos logísticos reduzidos em comparação à coleta de sangue convencional, tornando-se especialmente vantajosa em estudos epidemiológicos, em regiões de difícil

acesso e em estratégias de rastreamento populacional.

A estratégia metodológica apresentada neste estudo mostra-se especialmente útil em países em desenvolvimento e em regiões com populações vulneráveis, como comunidades indígenas na região amazônica. Durante a recente pandemia causada pelo vírus SARS-CoV-2, um estudo realizado em Manaus (Amazonas, Brasil) evidenciou a extrema vulnerabilidade das populações indígenas, atribuída às precárias condições sanitárias e ao limitado acesso aos serviços de saúde. O estudo destacou ainda a ausência de políticas públicas direcionadas a essas comunidades, frequentemente invisíveis para as autoridades brasileiras (Pontes et al., 2021).

Nesse contexto, a adoção da metodologia com amostras de DBS e DPS pode facilitar de forma significativa a vigilância epidemiológica e o diagnóstico precoce da infecção por HTLV, promovendo a inclusão de populações vulneráveis em estratégias de prevenção, rastreamento e cuidado. Trata-se de uma abordagem com grande potencial para ampliar o acesso à saúde em contextos historicamente negligenciados, como regiões remotas e comunidades indígenas.

A técnica de extração de sangue total e plasma a partir de cartões de papel filtro, apresentada neste estudo, é simples, padronizada e não requer equipamentos caros, o que a torna especialmente adequada para locais com infraestrutura limitada. Além disso, essa metodologia pode ser aplicada a diversas outras infecções, não se restringindo à detecção de anticorpos contra o HTLV. Estudos anteriores já demonstraram sua eficácia na identificação de anticorpos contra o vírus da hepatite C (HCV), HIV e SARS-CoV-2 (Morley et al., 2020; Vázquez-Morón et al., 2018).

Ao comparar dois grupos de indivíduos com HTLV, um assintomático e outro com MAH, observou-se que o grupo com MAH apresentou níveis mais elevados de IgG anti-HTLV. Isso era esperado, uma vez que está bem estabelecido que indivíduos com MAH apresentam uma resposta imune exacerbada, caracterizada pela ativação persistente de células T e aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α , levando à hiperativação do sistema imunológico e, consequentemente, à maior produção de anticorpos (Burbelo et al., 2008; Enose-Akahata et al., 2012; Luna et al., 2011).

O kit comercial Murex HTLV I+II EIA foi utilizado para testar 60 amostras (sendo 53 de indivíduos soropositivos para HTLV e 7 de indivíduos não infectados) com o objetivo de comparar os resultados ao ensaio de captura *in-house*. O teste *in-house* demonstrou 100% de sensibilidade ao detectar anticorpos anti-HTLV em amostras de DPS e DBS dos indivíduos infectados. No entanto, entre os 7 indivíduos não infectados, foram observados dois resultados falso-positivos nas amostras de DBS, indicando a necessidade de cautela na interpretação de resultados negativos e positivos em populações de baixa prevalência.

Após a repetição de uma dessas amostras, o ensaio Murex continuou fornecendo um resultado falso positivo apenas no DBS e um resultado negativo em DPS e plasma. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que o ensaio Murex foi validado e é usado para testar apenas amostras de soro ou plasma, e não outros tipos de amostras, como DBS e DPS. O resultado falso positivo provavelmente ocorreu apenas em DBS devido à maior presença de proteínas e componentes celulares nesse tipo de amostra, o que pode interferir na reação do ensaio, gerando alguma ligação inespecífica de proteínas da amostra aos componentes do teste.

Um resultado similar, falso-positivo no DBS também foi observado em um estudo que utilizou esse tipo de amostra para detectar anticorpos contra o HIV-1/2(Castro et al., 2008). Um dos indivíduos não infectados (negativo para infecção por HIV pela sorologia) testou positivo no DBS. Os autores do estudo consideraram esse resultado um problema de contaminação.

Apesar dos 2 resultados falso-positivos no ensaio Murex usando DBS, uma forte correlação de concordância foi observada entre as amostras de DBS, DPS e plasma usando esse ensaio comercial, indicando que essas amostras menos invasivas fornecem resultados consistentes com aqueles encontrados no plasma, em relação ao nível de anticorpos. No entanto, devido ao falso-positivo observado no DBS, nota-se que essa amostra é a menos ideal para uso nesse ensaio, uma vez que não houve falsos negativos ou falsos positivos usando DPS no ensaio Murex. Estudos futuros incluirão mais amostras de indivíduos não infectados por HTLV para validar os resultados, já que o número reduzido de controles negativos foi uma limitação deste estudo. Além disso, serão testadas mais amostras de indivíduos com HTLV-2, pois apenas duas foram analisadas

até o momento.

Em relação ao teste de estabilidade de IgG, observou-se apenas uma pequena variação entre os níveis de anticorpos quando se analisou os cartões armazenados por 3 meses em temperatura ambiente ou -20°C, indicando que, em locais onde não há possibilidade de refrigeração, os cartões podem ser armazenados em temperatura ambiente. Esse achado é muito importante, pois favorece a realização de estudos epidemiológicos em locais de difícil acesso ou áreas onde há populações sem acesso à energia elétrica, impossibilitando a refrigeração dos cartões de DBS e DPS.

Há estudos relatando que os anticorpos em DBS (contra vários patógenos) permanecem estáveis por aproximadamente 28 a 30 dias em temperatura ambiente (22 a 25°C), 90 dias a 4°C e até 200 dias a -20°C(Amini et al., 2021; Kaduskar et al., 2021). Entretanto, deve-se levar em consideração que a temperatura ambiente pode variar muito dependendo da região onde o estudo for realizado e, portanto, faz-se necessário que o teste de estabilidade seja realizado novamente quando esta metodologia for testada em outra região, uma vez que no Reino Unido, onde este estudo foi realizado, a TA variou entre 18°C e 21°C no momento do teste.

2.3.4. Conclusões

1 - Este estudo demonstrou que o DBS e DPS podem ser usados para a detecção de IgG anti-HTLV-1/2 por meio de um ensaio de captura in-house utilizando um antígeno comercialmente disponível, marcado com peroxidase. O ensaio foi altamente sensível (100%) e específico (100%) usando DBS, DPS e plasma.

2 - Esses resultados demonstram que a metodologia aqui descrita tem potencial para ser validada como uma estratégia confiável, o que poderia aumentar significativamente a capacidade de triagem e diagnóstico da infecção pelo HTLV, especialmente em populações de difícil acesso e em estudos epidemiológicos. No entanto, mais estudos são necessários para aplicar essa metodologia em regiões onde o HTLV-1/2 é endêmico, permitindo assim uma melhor validação do ensaio.

2.3.5. Resultados do teste de quantificação da neopterina

A neopterina foi detectada em todas as amostras de DBS e DPS, como mostrado na Figura 20A. A concentração de neopterina foi maior no DBS do que no plasma e no DPS. Contudo, quando se realizou a análise comparativa da dosagem de neopterina em plasma, Amostras de Plasma Seco (DPS) e Amostras de Sangue Seco (DBS) verificou-se uma concordância moderada entre os métodos. O Coeficiente de Correlação de Concordância (CCC) foi de 0.45 (IC 95%: 0.43–0.63) para plasma vs. DPS e 0.55 (IC 95%: 0.28–0.59) para plasma vs. DBS, indicando correlação limitada, com dispersão significativa em torno da linha de identidade ($x=y$). Já a comparação entre DPS e DBS apresentou CCC de 0.30, sugerindo concordância apenas razoável, com ampla variabilidade entre DPS e DBS (Figura 20 B).

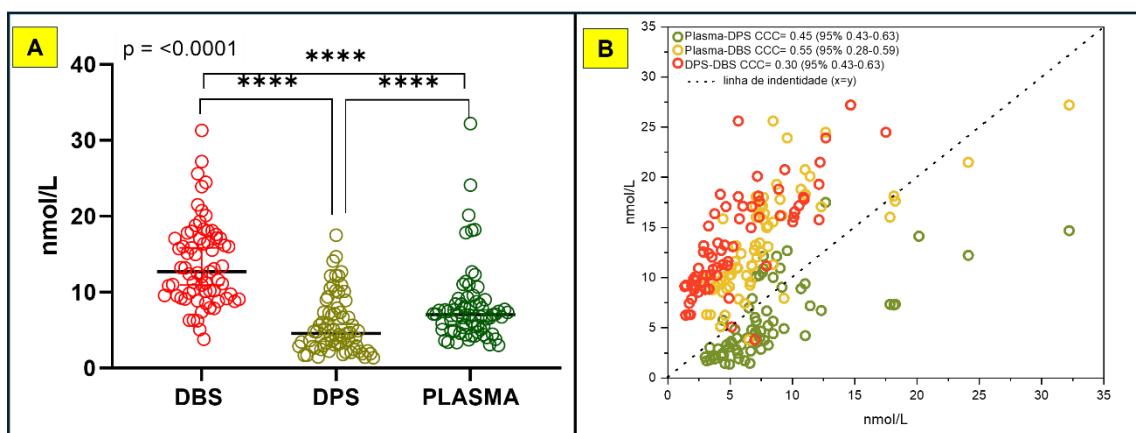


Figura 20. Quantificação da neopterina em DBS, DPS e plasma e correlação entre as amostras. (A) Níveis de neopterina detectados no DBS, DPS e plasma dos participantes do estudo. (B) Gráfico de dispersão comparando a concentração de neopterina entre plasma, DPS e DBS. Cada ponto representa uma amostra analisada por dois métodos. A linha tracejada indica a linha de identidade ($x = y$). Os coeficientes de correlação de concordância (CCC) de Lin e seus ICs 95% evidenciam moderada concordância entre os métodos.

Indivíduos com MAH apresentaram níveis mais altos de neopterina no DBS, DPS e plasma, em comparação com aqueles com infecção assintomática (Figura 21).

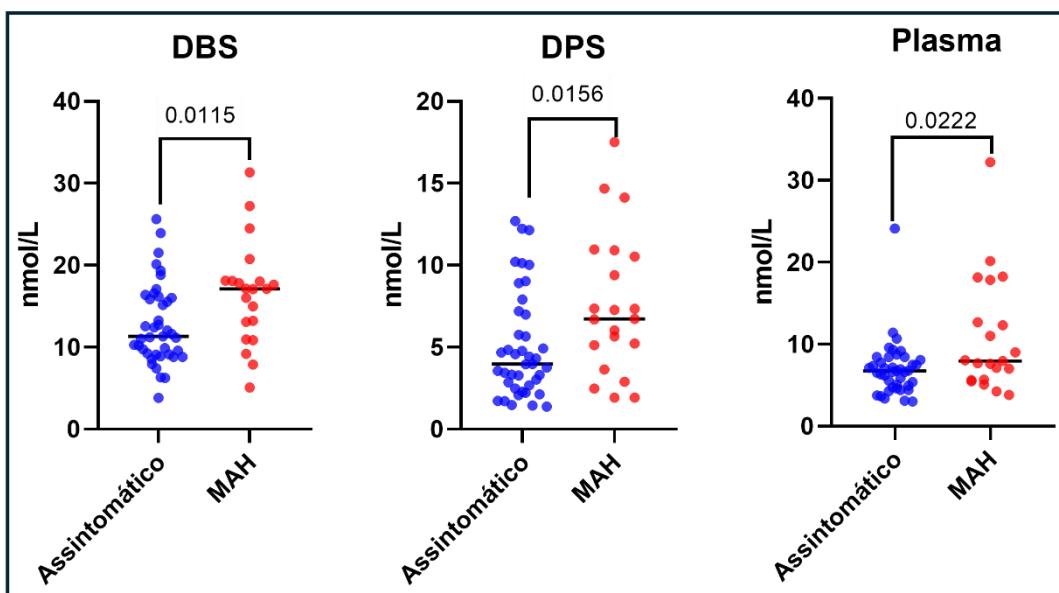


Figura 21. Níveis de neopterina de acordo com as manifestações clínicas de pacientes infectados pelo HTLV. (B) Gráfico de dispersão comparando as concentrações de IgG (unidades BR) entre plasma, DPS e DBS. Cada ponto representa uma amostra analisada por dois métodos. A linha tracejada indica a linha de identidade ($x = y$). Os coeficientes de correlação de concordância (CCC) de Lin e seus ICs 95% evidenciam concordância moderada.

Os dados apresentados a seguir (Tabela 19) demonstram que indivíduos com MAH apresentaram níveis médios de neopterina consistentemente mais elevados em todas as amostras biológicas avaliadas (DBS, DPS e plasma), quando comparados a pacientes assintomáticos. Isso era esperado, visto que a MAH está associada a uma maior ativação do sistema imunológico, refletindo-se, assim, em níveis mais elevados de neopterina.

Tabela 19. Comparação entre médias e desvio padrão de neopterina entre indivíduos assintomáticos e MAH.

Amostra	Assintomático		MAH	
	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)
DBS	12.7 (4.90)		16.4 (6.22)	
DPS	5.0 (3.24)		7.5 (4.31)	
Plasma	6.9 (3.42)		10.8 (7.01)	

Ao analisar o DBS, observa-se que a diferença nos níveis de neopterina entre os grupos é evidente, com os pacientes com MAH apresentando uma média de 16.4 (DP 6.22) versus 12.7 (DP 4.90) entre os indivíduos assintomáticos. A mesma tendência se repete no DPS, com médias de 7.5 (DP 4.31) no grupo MAH e 5.0 (DP 3.24) no grupo assintomático. Resultado semelhante foi observado no plasma, com os níveis de neopterina sendo

maiores no grupo MAH (média 10.8, DP 7.01) em comparação ao grupo assintomático (média 6.9, DP 3.42).

Em relação ao teste de estabilidade da neopterina, foi possível quantificá-la três meses após a preparação dos cartões (Quadro 4).

Quadro 4. Teste de estabilidade da neopterina 3 meses após o prepraro dos cartões

Neopterina nmol/L				Neopterina nmol/L (após 3 meses)					Controles negativos
N	DBS	DPS	PLASMA	DBS (RT)	DBS (-20°C)	DPS (RT)	DPS (-20°C)		
1	13.46	4.02	7.38	16.49	15.13	5.73	3.79		
2	9.19	1.92	3.81	7.93	10.12	3.88	2.43		
3	7.95	4.92	9.33	9.92	7.71	4.04	1.98		
4	9.25	1.47	6.6	13.88	9.44	3.48	1.91	Pacientes com HTLV	
5	16.18	9.03	9.17	18.25	21.03	7.97	5.43		
6	11.30	4.42	8.45	14.53	11.63	6.59	3.48		
7	17.07	6.73	12.32	27.68	24.73	14.27	6.71		
8	16.03	7.34	17.84	15.65	14.44	10.24	6.06		
9	15.55	10.03	8.46	20.53	11.4	6.29	3.33		
10	21.50	12.22	24.12	19.56	16.9	7.13	4.96		

Como mostrado no quadro 4, dez amostras foram usadas no teste de estabilidade (2 controles negativos, 6 pacientes assintomáticos e 2 pacientes com MAH). Os spots que foram armazenados sob essas diferentes condições foram destacados dos cartões e eluídos para a quantificação da neopterina após 3 meses. Observou-se que os níveis de neopterina após 3 meses foram similares aos níveis encontrados quando os spots foram eluídos no dia seguinte à preparação do DBS e DPS. Assim, conclui-se que a neopterina permanece estável no cartão por até 3 meses após a coleta, independentemente se os cartões forem armazenados a -20°C ou à temperatura ambiente, demonstrando que os cartões podem ser armazenados durante esse tempo sem comprometer a quantificação dessa molécula.

2.3.6. Discussão

A neopterina é uma molécula produzida por diversas células, como macrófagos, monócitos, fibroblastos, células endoteliais e dendríticas, e tem sido alvo de diversos estudos devido ao seu potencial uso no diagnóstico e monitoramento de doenças infecciosas (Eisenhut, 2013). Sua dosagem tem se

mostrado importante em doenças como o câncer(Volgger et al., 2016) e infecções virais(Chauvin et al., 2021). Apesar destes dados, sua dosagem ainda não foi amplamente verificada em diversas infecções e, por isso, destacou-se neste estudo seu potencial como biomarcador útil em diversas situações clínicas, podendo ser utilizada para monitorar a evolução de doenças(Bellmann-Weiler et al., 2021; Drugan et al., 2016).

A neopterina pode ser quantificada em fluidos biológicos, incluindo o LCR(Molero-Luis et al., 2020), plasma(Blankson et al., 2023), soro(Zheng et al., 2005) e urina(Shepheard et al., 2022). Dentre essas amostras, o procedimento de obtenção do LCR é o mais invasivo, pois envolve a inserção de uma agulha entre as vértebras lombares (punção lombar), requer cuidados específicos e é realizado em condições controladas e em ambiente hospitalar(Oliveira et al., 2020). Neste estudo, demonstrou-se que o uso de amostras de sangue coletadas em cartões de papel filtro (DBS e DPS) é uma abordagem confiável e menos invasiva para quantificar neopterina. Os resultados indicam que DBS e DPS podem servir como tipos alternativos de amostra eficazes para a detecção dessa molécula.

Um estudo anterior demonstrou que é possível usar DBS para detectar diferentes pterinas (neopterina, biopterina e pterina) em sangue coletado em papel filtro como uma triagem alternativa para deficiências de tetrahidrobiopterina(Zurflüh et al., 2005). Os autores deste estudo extraíram pterinas de cartões de DBS utilizando 250µL de HCL 20mmol/L e um banho ultrassônico, com subsequente quantificação de pterinas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Na metodologia apresentada no presente estudo, detectou-se neopterina não apenas em DBS, mas também em DPS e, além disso, apresentou-se um método mais simples que não requer reagentes e equipamentos com custo elevado, facilitando assim sua aplicação em locais com poucos recursos laboratoriais. Os resultados também comprovaram que a dosagem de neopterina em amostras secas (DBS e DPS) pode ser realizada com kits comerciais de ELISA, método mais acessível e econômico quando comparado à CLAE, que exige equipamentos de alto custo e manutenção especializada. Essa vantagem operacional é uma alternativa mais viável para laboratórios com recursos limitados.

A metodologia aqui apresentada é de grande valia para ser implementada principalmente em países subdesenvolvidos, como o Brasil, onde a falta de recursos financeiros limita o acesso da população a serviços de saúde de qualidade, medicamentos, alimentação adequada e saneamento básico, além da desigualdade na distribuição de renda que acentua as disparidades em saúde, sendo os mais pobres os mais afetados(Valencio, Valencio e Baptista, 2023).

Foram observadas concentrações mais elevadas de neopterina nas amostras de DBS em comparação às de DPS e plasma. Esse achado pode ser explicado pelo fato de o sangue total utilizado na preparação do DBS conter células imunológicas, como macrófagos e células dendríticas, que são naturalmente produtoras de neopterina (Heneberk, Wurfelova, Radochova, 2023). Durante os processos de secagem e armazenamento, essas células podem ter sofrido alterações metabólicas residuais ou lise celular durante a eluição, liberando neopterina previamente armazenada. Além disso, o volume analisado no DBS, embora pequeno, contém todos os componentes do sangue total (incluindo células e plasma), o que pode contribuir para uma concentração relativa mais alta de neopterina quando comparado ao plasma isolado.

Considerando que houve correlação moderada entre nos níveis de neopterina entre DBS, DPS e plasma, e observando que os níveis de neopterina foram maiores no DBS em comparação com DPS, sugerimos ajustar um valor de corte específico para DBS e DPS . Esse ajuste permitirá uma comparação mais precisa dos resultados e evitará interpretações errôneas, permitindo assim uma interpretação consistente e mantendo a compatibilidade com o plasma.

Como mencionado anteriormente, a neopterina no LCR pode servir como um biomarcador importante para monitorar a progressão da MAH em indivíduos infectados pelo HTLV(Nomoto et al., 1991; Takao et al., 2024; Zargari et al., 2020). Neste estudo, constatamos que pacientes com MAH apresentaram níveis séricos mais elevados de neopterina em comparação com indivíduos assintomáticos. Essa observação está alinhada aos achados de um estudo realizado em Manaus, que também investigou esse biomarcador nesses grupos de pacientes(Takatani et al., 2017). Os níveis elevados de neopterina fazem sentido, visto que a neopterina é um biomarcador inflamatório e a MAH é uma doença inflamatória crônica. Isso reforça ainda mais o uso da neopterina como

marcador para monitorar a progressão da doença em indivíduos infectados pelo HTLV.

Neste estudo, alguns indivíduos assintomáticos apresentaram níveis de neopterina semelhantes aos de pacientes com MAH. Resultado semelhante foi observado em outro estudo(Santos et al., 2004), no qual foi relatado que 40% dos indivíduos assintomáticos analisados apresentaram uma resposta imune celular inflamatória exacerbada (linfoproliferação espontânea e produção de IFN- γ) semelhante à de pacientes com MAH. Esses resultados mostram que, embora não apresentem sintomas, indivíduos assintomáticos podem apresentar inflamação subclínica, e essa inflamação crônica pode causar danos na medula espinhal ou outras regiões do corpo, causando uveítes e artropatias, por exemplo(Quaresma et al., 2015).

A quantificação da neopterina em DBS e DPS poderia não apenas auxiliar na prevenção da MAH em indivíduos assintomáticos infectados pelo HTLV-1, mas também facilitar a identificação de subgrupos de pacientes. Uma melhor estratificação desses subgrupos poderia ser feita verificando-se não apenas os níveis de neopterina, mas também a carga proviral desses indivíduos. Afinal, existe o fenótipo “HAM-like”, que se refere a portadores assintomáticos com risco aumentado de desenvolver MAH(Harding et al., 2022).

Embora este estudo tenha avaliado o potencial da dosagem de neopterina em DPS e DBS em pacientes com HTLV, acredita-se que o protocolo adotado pode ser aplicável também a outras infecções, ampliando seu uso para diferentes contextos clínicos e epidemiológicos além do HTLV. Por exemplo, em pacientes com HIV, níveis séricos elevados dessa molécula estão associados a um maior risco subsequente de progressão clínica da doença (AIDS)(Mildvan et al., 2005) e pacientes com dengue apresentam concentrações séricas de neopterina mais elevadas em comparação com indivíduos saudáveis. Observa-se também que o aumento dos níveis de neopterina está associado a uma maior duração da febre, o que indica seu potencial como marcador inflamatório para acompanhar a evolução clínica da doença e estimar sua gravidade (Chan et al., 2006).

Em um estudo que investigou os níveis séricos de neopterina em pacientes com hepatite B, foram observados níveis mais elevados dessa molécula quando comparados ao grupo controle, embora não tenha sido

observada associação entre os níveis de neopterina e danos aos hepatócitos ou estado de replicação viral(Kalkan, Ozden e Akbulut, 2005). Em pacientes infectados pelo vírus influenza, é encontrada uma concentração maior de neopterina em comparação aos controles saudáveis e, assim como ocorre em outras infecções virais, essa elevação pode estar associada a um maior risco de piora do quadro clínico do paciente(Pizzini et al., 2019). Diversos estudos já investigaram infecções causadas por vírus, protozoários e bactérias, demonstrando que os níveis de neopterina podem ser utilizados como um biomarcador útil para monitorar a progressão da doença e até mesmo para estimar o risco de mortalidade em pacientes. (Blankson et al., 2023; Hailemichael et al., 2021; Kamińska et al., 2016; Leng et al., 2011; Onguru et al., 2008; Tahar et al., 2016).

A metodologia proposta neste estudo apresenta grande potencial para auxiliar no combate a doenças endêmicas, como a malária, cuja maior incidência ocorre em regiões de difícil acesso, especialmente zonas rurais com carência de infraestrutura médica (Ngwa et al., 2022). Nessas localidades, a falta de diagnóstico preciso e tratamento oportuno agrava o quadro epidemiológico. Nesse contexto, a neopterina surge como um biomarcador promissor: estudos recentes demonstraram sua utilidade na predição da letalidade em casos graves de malária por *Plasmodium falciparum*(Blankson et al., 2023). Além disso, sua análise combinada com outros marcadores inflamatórios (como CX3CL1 e CXCL9) pode aprimorar o monitoramento da progressão da doença (Tahar et al., 2016), reforçando a relevância clínica da abordagem aqui descrita.

Em relação ao teste de estabilidade da neopterina, observou-se apenas uma pequena variação entre os cartões armazenados por 3 meses em temperatura ambiente ou -20°C, indicando que em locais onde não há possibilidade de refrigeração dos cartões, eles podem ser armazenados em temperatura ambiente. Esse achado é muito importante, pois favorece a realização de estudos epidemiológicos em locais de difícil acesso ou áreas onde há populações sem acesso à energia elétrica, impossibilitando a refrigeração dos cartões de DBS e DPS. Em países em desenvolvimento como o Brasil, que é afetado por diversas infecções e tem enfrentado diversos desafios para controlá-las ou eliminá-las nos últimos 50 anos(Waldman e Sato, 2016), essa metodologia é menos invasiva e pode ser particularmente útil para facilitar estudos

epidemiológicos em áreas remotas ou com recursos limitados.

Uma das principais limitações deste estudo foi o baixo número de amostras de controle negativo. Essa limitação pode ter impactado a confiabilidade na generalização dos resultados, comprometendo a avaliação da real diferença entre os grupos estudados. Estudos futuros priorizarão a inclusão de um número maior de controles negativos para garantir uma análise mais abrangente e representativa das características dos indivíduos não infectados.

Como perspectivas futuras, pretende-se avaliar essa metodologia em populações diversas, incluindo regiões de alta endemicidade para o HTLV. O objetivo é validar essas amostras como alternativas menos invasivas à coleta convencional de plasma, especialmente em contextos com limitações de infraestrutura.

2.3.7. Conclusões

1 - As amostras de DBS e DPS mostraram-se uma estratégia viável, econômica e minimamente invasiva para quantificar a neopterina. Este método acessível poderia facilitar o monitoramento da inflamação em PVHTLV, inclusive permitindo a identificação precoce de processos inflamatórios subclínicos em indivíduos assintomáticos;

2 - O presente estudo fornece dados que podem impactar positivamente o contexto epidemiológico da pesquisa científica, pois demonstra que é possível utilizar uma metodologia mais acessível e de baixo custo para a detecção de um marcador inflamatório que se encontra elevado em diversas infecções e possui valor prognóstico. Além disso, existe a possibilidade de testar essa metodologia em diversas outras infecções e investigar outros marcadores. Portanto, estudos futuros são necessários, utilizando um número maior de amostras e testando amostras de DBS e DPS em outras infecções além do HTLV.

3. REFERÊNCIAS

- ABAD, M. et al. HTLV-2b among HIV type 1-coinfected injecting drug users in Spain. **AIDS Res Hum Retrovir**, v. 27, n. 5, p. 579-83, 2011.
- ABRAMS, A.; AKAHATA, Y.; JACOBSON, S. The prevalence and significance of HTLV-I/II seroindeterminate Western blot patterns. **Viruses**, v. 3, n. 8, p. 1320-31, 2011.
- ABREU, I. N. et al. HTLV-1/2 in indigenous peoples of the Brazilian Amazon: seroprevalence, molecular characterization and sociobehavioral factors related to risk of infection. **Viruses**, v. 15, n. 1, p. 22, 2022.
- ABREU, I. N. et al. HTLV-1 and HTLV-2 infection among Warao indigenous refugees in the Brazilian Amazon: challenges for public health in times of increasing migration. **Front Public Health**, v. 10, 2022.
- ABREU, I. N. et al. HTLV-1/2 in Indigenous Peoples of the Brazilian Amazon: Seroprevalence, Molecular Characterization and Sociobehavioral Factors Related to Risk of Infection. **Viruses**, v. 15, 2023.
- AFONSO, P. V.; CASSAR, O.; GESSAIN, A. Molecular epidemiology, genetic variability and evolution of HTLV-1 with special emphasis on African genotypes. **Retrovirology**, v. 16, p. 39, 2019.
- AMIANTI, C. et al. HTLV infection in Brazil's second-largest indigenous reserve. **Sci Rep**, v. 12, p. 16701, 2022.
- AMINI, F. et al. Reliability of dried blood spot (DBS) cards in antibody measurement: A systematic review. **PLoS One**, 2021.
- AMOUSSA, A. E. R. et al. HTLV-1aA introduction into Brazil and its association with the trans-Atlantic slave trade. **Infect Gen Evol**, v. 48, p. 45-51, 2017.
- ANYANWU, N. C. J. et al. Re-emergence of human T-lymphotropic viruses in West Africa. **Braz J Infect Dis**, v. 22, n. 3, p. 224-34, 2018.
- ARRUDA, B. C. et al. Evaluation of real time PCR technique to diagnosis of human T-lymphotropic virus type i (HTLV-I) in patients in the Hematologia da Fundação Hemope Hospital, in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 5, p. 384–389, 2008.
- BAIETTO, L., SIMIELE, M., D'AVOLIO, A. How effective are the use of DBS and DPS as tools to encourage widespread therapeutic drug monitoring? **Bioanalysis**, v. 6, p. 425–7, 2014.
- BARALLE, F. E.; GIUDICE, J. Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity. **Nature Rev Mol Cell Biol**, v. 18, p. 437-51, 2017.
- BARBEAU, B.; PELOPONESE, J.; MESNARD, J. Functional comparison of

antisense proteins of HTLV-1 and HTLV-2 in viral pathogenesis. **Front Microbiol**, v. 4, 2013.

BARTMAN, M. T. et al. Long-term increases in lymphocytes and platelets in human T-lymphotropic virus type II infection. **Blood**, v. 112, n. 10, p. 3995–4002, 2008.

BELLMANN-WEILER, R. et al. Neopterin predicts disease severity in hospitalized patients with COVID-19. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 8, 2021.

BERNARD-VALNET, R. et al. Is type I interferon response effective to control HTLV-1 infection? **Virol**, v. 16, n. 6, p. 356-70, 2012.

BERTOLA, F. et al. N-terminal domain of HTLV-1 integrase. Complexation and conformational studies of the zinc finger. **J Peptide Sci**, v. 7, p. 588-97, 2001.

BITTENCOURT, AL.; PRIMO, J.R.L.; OLIVEIRA, M.F.P. Manifestations of the human T-cell lymphotropic virus type I infection in childhood and adolescence. **J ped**, v. 82, p. 411-20, 2006.

BITTENCOURT, A. L.; FARRE, L. Infective dermatitis associated with human T-cell lymphotropic virus type-1, an underdiagnosed diseaseInternational Journal of Infectious Diseases. **Elsevier**, 2024.

BLANKSON, S. O. et al. High Plasma Levels of Neopterin Are Associated with Increased Mortality among Children with Severe Malaria in Benin. **Diagnostics**, v. 13, n. 3, 1 fev. 2023.

BOA-SORTE, N. et al. Dried blood spot testing for the antenatal screening of HTLV, HIV, syphilis, toxoplasmosis and hepatitis B and C: Prevalence, accuracy and operational aspects. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 18, n. 6, p. 618–624, 2014.

BOOSTANI, R.; ARDAKANI, A. M.; ASHRAFI, H. Khorasan Disease: Prevalence of HTLV-I Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP) In West Azarbaijan from 2004 to 2007. **Iran Red Cres Med J**, v. 13, n. 6, p. 428-30, 2011.

BOTELHO, B.J.S. et al. Molecular and Phylogenetic Evidence of Interfamilial Transmission of HTLV-1 in the Afro-Descendant Community of São José de Icatú in the Brazilian Amazon. **Viruses**, v. 16, n. 8, p. 1290, 2024.

BOULOS, R. et al. Herpes Simplex Virus Type 2 Infection, Syphilis, and Hepatitis B Virus Infection in Haitian Women with Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Human T Lymphotropic Virus Type I Infections. **J Infect Dis**, v. 166, p. 418-20, 1992.

BRAÇO, I. L. J. et al. High prevalence of human T-lymphotropic virus 2 (HTLV-2) infection in villages of the Xikrin tribe (Kayapo), Brazilian Amazon region. **BMC Infect Dis**, v. 19, n. 1, p. 459, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº1.376, de 19 de novembro de 1993. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, 2 dez. 1993. Seção 2, p. 4. Disponível em<PORTMSGM1376-93.PDF (ial.sp.gov.br)>. Acesso em: 25 ago. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de manejo clínico do paciente com HTLV. Brasília: 2004. Disponível em:<ALGORITMO PARA O DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INFECÇÃO PELO HTLV (saude.gov.br)>. Acesso em: 25 dez. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Prevalência da infecção pelo HTLV-1/2 no Brasil. Brasília: 2020. Disponível em:<(PDF) Prevalência da infecção por HTLV-1/2 no Brasil (researchgate.net)>. Acesso em: 28 dez. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de manejo clínico da infecção pelo HTLV. Brasília: 2021. Disponível em:<guia_htlv.indd (www.gov.br)>. Acesso em: 25 dez. 2022.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria da ciência, tecnologia e insumos estratégicos. Portaria SECTICS/MS Nº13, de 3 de abril de 2024. Torna pública a decisão de incorporar, no âmbito do Sistema Único de Saúde – SUS, o exame para detecção pré-natal de infecção pelo vírus T-linfotrópico humano (HTLV) em gestantes. Brasília, 2024. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2024/prt3148_15_02_2024.html. Acesso em 13 dezembro 2024.

BRITO, W. R. S. et al. Prevalence and risk factors for HTLV-1/2 infection in Quilombo remnant communities living in the Brazilian Amazon. **Front Public Health**, v. 10, 2022.

BRODER, S.; GALLO, R. C. A pathogenic retrovirus (HTLV-III) linked to AIDS. **N Eng J Med**, v. 311, n. 20, p. 1292–1297, 1984.

BURBELO, P. D. et al. Anti-HTLV antibody profiling reveals an antibody signature for HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). **Retrovirology**, v. 5, 20 out. 2008.

CALATTINI, S. et al. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in central Africa. **Retrovirology**, v. 2, p. 30, 2005.

CARNEIRO, M.A.S. et al. First report on human T-lymphotropic virus 1 infection in a group of transgender women. **Front Public Health**, v. 12, 2024.

CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F. et al. Infection and disease caused by the human T cell lymphotropic viruses type I and II in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 35, n. 5, p. 499-508, 2002.

CASOLI, C.; PILOTTI, E.; BERTAZZONI, U. Molecular and cellular interactions of HIV-1/HTLV coinfection and impact on AIDS progression. **AIDS Rev**, v. 9, n. 3, p. 104-9, 2007.

CASSEB, J. et al. Prevalence of HTLV-I and HTLV-II infections among HIV-1-infected asymptomatic individuals in São Paulo, Brazil. **Rev Inst Med Trop**, v. 39, n. 4, p. 213-15, 1997.

CASSEB, J. et al. Lack of tax diversity for tropical spastic paraparesis/human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) associated myelopathy development in HTLV-I-infected subjects in São Paulo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 3, p. 273-76, 2006.

CASTILLO-MANCILLA, J. R. et al. Tenofovir diphosphate in dried blood spots is strongly associated with viral suppression in individuals with human immunodeficiency virus infections. **Clinical Infectious Diseases**, 2019

CASTRO, N. M. et al. HTLV-I Infection and Urodynamic Findings Neurourology. **International Braz J Urol**, v. 33, n. 2, p. 238–245, 2007.

CASTRO, A. et al. Evaluation of the human immunodeficiency virus type 1 and 2 antibodies detection in dried whole blood spots (dbs) samples. **Rev Inst Med Trop S Paulo**, v. 50, n. 8, p.151–6, 2008.

CATALAN-SOARES, B. et al. Human T-cell lymphotropic virus in family members of seropositive blood donors: silent dissemination. **Pan Amer J Pub Health**, v. 16, n. 6, p. 387-394, 2004.

CATALAN-SOARES, B. et al. 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 Saude Publica**, v. 21, n. 3, p. 926-31, 2005.

CATERINO-DE-ARAUJO, A. et al. 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 Human Retro**, v.31, n. 5, p.543-9, 2015.

CHAMPS, A. P. S. et al. HTLV-1 associated myelopathy: clinical and epidemiological profile in a 10-year case series study. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, n. 6, p. 668-72, 2010.

CHAN, C.P.Y., et al. Detection of serum neopterin for early assessment of dengue virus infection. **Journal of Infection**, v. 53, p. 152–8, 2006.

CHANG, Y. B. et al. Seroprevalence and demographic determinants of human T-lymphotropic virus type 1 and 2 infections among first-time blood donors – United States, 2000-2009. **Infect Dis**, v. 209, n. 4, p. 523-31, 2014.

CHAUVIN, M. et al. Elevated Neopterin Levels Predict Fatal Outcome in SARS-CoV-2-Infected Patients. **Front Cell Infect Microbiol**, 2021.

CIMINALE, V. et al. HTLV-1 and HTLV-2: Highly similar viruses with distinct oncogenic properties. **Front Micro**, 2014.

CLAUSEN, H. et al. Newborn Screening for High-Risk Congenital Heart Disease by Dried Blood Spot Biomarker Analysis. **JAMA Network Open**, p. e2418097, 2024.

DE MORAIS, M. P. E. et al. Prevalence of human T-lymphotropic virus type 1 and 2 among blood donors in Manaus, Amazonas State, Brazil. **Rev Inst Med Tropical de São Paulo**, v. 59, 2017.

DELAMARRE, L. et al. The HTLV-I envelope glycoproteins: structure and functions. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v.13, p. 85-91, 1996.

DIAS, A. R. N. et al. Human T lymphotropic virus and pulmonary diseases. **Frontiers in Microbiology**. **Frontiers**, 2018.

DIAS, A. T. et al. Gingival recession treatment with enamel matrix derivative associated with coronally advanced flap and subepithelial connective tissue graft: a split-mouth randomized controlled clinical trial with molecular evaluation. **Clin Oral Investig**, 2022.

DIOP, S. et al. Seroprevalence and molecular epidemiology of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 in blood donors from Dakar, Senegal. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 4, p. 1550-4, 2006.

DOURADO, I. et al. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v.34, n. 5, p. 527-31, 2003.

DRUGAN, C. et al. Evaluation of neopterin as a biomarker for the monitoring of Gaucher disease patients. **Hematology**. v. 21, p. 379–86, 2016.

DUTHALER, U., et al. Using dried blood spots to facilitate therapeutic drug monitoring of antiretroviral drugs in resource-poor regions. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, p. 2729–37, 2018.

EGUCHI, KATSUMI et al. Primary Sjogren's syndrome with antibodies to HTLV-I: clinical and laboratory features. **Annals of the Rheumatic Diseases**, 1992.

EINSIEDEL, L. et al. Human T-cell leukaemia virus type 1 associated pulmonary disease: clinical and pathological features of an under-recognised complication of HTLV-1 infection. **Retrovirology**, 2021.

EIRIN, M. et al. Human T-Lymphotropic virus type 1 (HTLV-1): a new subgroup within the cosmopolitan subtype. **Retrovirology**, v.8, n.1, p. 75, 2011.

EISENHUT, M. Neopterin in Diagnosis and Monitoring of Infectious Diseases. **J Biomark**, 2013.

ENOSE-AKAHATA, Y. et al. Quantitative differences in HTLV-I antibody responses: classification and relative risk assessment for asymptomatic carriers and ATL and HAM/TSP patients from Jamaica. **blood**, v. 119, n. 12, p. 2829–

2836, 2012.

EREZ, Z. et al. Communication between viruses guides lysis-lysogeny decisions. **Nature**, v. 541, p. 488-493, 2017.

EUSEBIO-PONCE, E. et al. HTLV-1 infection: An emerging risk. Pathogenesis, epidemiology, diagnosis and associated diseases. **Rev Esp Quimioter**, v. 32, n. 6, p. 485–496, 2019.

FIRMINO, A. A. et al. HTLV-1 Proviral Load in Vaginal Fluid Correlates with Levels in Peripheral Blood Mononuclear Cells. **Pathogens**, 2023.

FRUTOS, M. C. et al. Seronegative human T-cell lymphotropic virus 1 carriers in blood banks: A potential viral source for silent transmission? **Vox Sang**, v. 117, n. 9, p. 1090-97, 2022.

FURTADO, K. C. Y. O. et al. Occurrence of strongyloidiasis among patients with HTLV-1/2 seen at the outpatient clinic of the Núcleo de medicina Tropical, Belém, state of Pará, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. 2, p. 241–243, mar. 2013.

FURUKAWA, Y. et al. Phylogenetic Subgroups of Human T Cell Lymphotropic Virus (HTLV) Type I in the *tax* Gene and Their Association with Different Risks for HTLV-I-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis. **J Infect Dis**, v. 182, p. 1343-9, 2000.

FUTSCH, N.; MAHIEUX, R.; DUTARTRE, H. HTLV-1, the other pathogenic yet neglected human retrovirus: from transmission to therapeutic treatment. **Viruses**, v. 10, n. 1, 2018.

GALLO, R. C.; MONTAGNIER, L. The Discovery of HIV as the Cause of AIDS. **N Engl J Med**, v. 349, n. 24, p. 2283-5, 2003.

GALLO, R. C. History of the discoveries of the first human retroviruses: HTLV-1 and HTLV-2. **Oncogene**, v. 24, n. 39, p. 5926–5930, 2005.

GALPERIN, C. Virus, provirus and cancer. **Rev Hist Sci Paris**, v. 47, n. 1, p. 7-56, 1994.

GARIBYAN, L.; AVASHIA, N. Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). **J Invest Dermatol**, v. 133, n. 3, p. e6, 2013.

GASMI, M. et al. Long terminal repeat sequence analysis of HTLV-I molecular variants identified in fourth north African patients. **AIDS Res Human Retrov**, v. 10, n. 10, p. 1313-15, 1994.

GESSION, A.; MAHIEUX, R. New human retroviruses: HTLV-3 and HTLV-4. **Med Trop**, v. 65, n. 6, p. 525-8, 2005.

GESSION, A. Human retrovirus HTLV-1: descriptive and molecular epidemiology,

origin, evolution, diagnosis and associated diseases. **Bull Soc Pathol Exot**, v. 104, n. 3, p. 167-80, 2011.

GESSION, A.; CASSAR, O. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. **Front Microbiol**, v. 3, p. 388, 2012.

GESSION, A. et al. HTLV-3/4 and simian foamy retroviruses in humans: discovery, epidemiology, cross-species transmission and molecular virology. **Virology**, v. 435, n. 1, p. 187-99, 2013.

GHALLAB, N.A. Diagnostic potential and future directions of biomarkers in gingival crevicular fluid and saliva of periodontal diseases: review of the current evidence. **Arch Oral Biol**, v. 87, p. 115-24, 2018.

GHEZ, D. et al. Neuropilin-1 is involved in human T-cell lymphotropic virus type 1 entry. **J Virol**, v. 80, n. 14, p. 6844-54, 2006.

GIAM, C.; SEMMES, O. J. HTLV-1 infection and adult T-cell leukemia/lymphoma-a tale of two proteins: tax and HBZ. **Viruses**, v. 8, n. 6, p. 161, 2016.

GIAM, C. HTLV-1 replication and adult T cell leukemia development. **Rec Res Cancer Res**, v. 217, p. 209-43, 2021.

GOMES, R.; NASCIMENTO, E.F.; ARAÚJO, F.C. Por que os homens buscam menos os serviços de saúde do que as mulheres? As explicações de homens com baixa escolaridade e homens com ensino superior. **Cad Saud Pub**, v.23, n.3, p.565-74, 2007.

GOTUZZO, E. et al. Human T Cell Lymphotropic Virus Type I Infection among Female Sex Workers in Peru. **J Infect Dis**, v. 169, n. 4, p. 754-59, 1994.

HAILEMICHAEL, W. et al. Neopterin: A promising candidate biomarker for severe covid-19Journal of Inflammation ResearchDove Medical Press Ltd, , 2021.

HALIN, M. et al. Human T-cell leukemia virus type 2 produces a spliced antisense transcript encoding a protein that lacks a classic bZIP domain but still inhibits Tax2-mediated transcription. **Blood**, v. 114, n. 12, p. 2427-38, 2009.

HARDING, D. et al. Refining the risk of HTLV-1-associated myelopathy in people living with HTLV-1: identification of a HAM-like phenotype in a proportion of asymptomatic carriers. **J Neurovirol**, v. 28, p. 473–82, 2022.

HASELTINE, W. A.; SODROSKI, J. G.; PATARCA, R. Structure and function of the genome of HTLV. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 115, p. 177-209, 1985.

HENEBERK, O.; WURFELOVA, E; RADOCHOVA, V. Neopterin, the Cell-Mediated Immune Response Biomarker, in Inflammatory Periodontal Diseases: A Narrative Review of a More than Fifty Years Old Biomarker. **Biomedicines**, v. 11, n. 5, p. 1294, 2023.

HISADA, M. et al. Virus markers associated with vertical transmission of human T lymphotropic virus type 1 in Jamaica. **Clin Infect Dis**, v.34, n.12, p.1551-57, 2002.

HOOGENHOF, M. M. G.; PINTO, Y. M.; CREEMERS, E. E. RNA splicing. **Circul Res**, v. 118, n. 3, p. 454-68, 2016.

HOSHINO, H. Cellular factors involved in HTLV-1 entry and pathogenicity. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. JUN, 2012.

ICTV—International Committee on Taxonomy of Viruses. Taxonomy history: primate T-lymphotropic virus 1. https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=201904999. Acesso em 16 Jun 2023.

IMPLURB. **Plano diretor urbano e ambiental de Manaus e suas leis complementares**, versão 1, Julho 2021. Disponível em: [Legislação Urbanística Municipal - Plano Diretor de Manaus e Suas Leis Complementares](#).

ISACHE, C. et al. HTLV-1 and HIV-1 co-infection: a case report and review of the literature. **IDCases**, v. 4, p. 53-55, 2016.

ISHAK, R. et al. Identification of human T cell lymphotropic virus type IIa infection in the Kayapo, an indigenous population of Brazil. **AIDS**, v. 11, n. 7, p. 813-21, 1995.

ISHAK, R. et al. Molecular evidence for infection by HTLV-2 among individuals with negative serological screening tests for HTLV antibodies. **Epidemiol Infect**, v. 135, n. 4, p. 604-9, 2007.

ISHAK, R.; ISHAK, M.O.G.; VALLINOTO, A.C.R. The challenge of describing the epidemiology of HTLV in the Amazon region of Brazil. **Retrovirol**, v. 17, p. 4, 2020.

ISHAK, R. et al. Long-term prevalence follow-up (1967–2022) of HTLV-2 among vulnerable indigenous populations in the Amazon region of Brazil. **Front Microbiol**, v. 14, e1217134, 2023.

ISHIHARA, K. et al. Relevance of molecular tests for HTLV-1 infection as confirmatory tests after the first sero-screening. **J Immuno Immuno**, v. 35, n. 1, p. 74-82, 2014.

IWANAGA, M. Epidemiology of HTLV-1 infection and ATL in Japan: An update. **Front Microbiol**, v. 11, p. 1024, 2020.

IZUMO, S.; UMEHARA, F.; OSAME, M. HTLV associated myelopathy. **Neurophatol**, v. 65, p. 8, 2000.

JONES, K. S. et al. Heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of human T-cell leukemia virus type 1 virions into CD4+ T cells. **J Virol**, v. 79, n. 20, p. 12692-702, 2005.

KADUSKAR, O. et al. Optimization and Stability Testing of Four Commercially Available Dried Blood Spot Devices for Estimating Measles and Rubella IgG Antibodies. **MSphere**, 2021.

KALINICHENKO, S.; KOMKOV, D.; MAZUROV, D. HIV-1 and HTLV-1 Transmission Modes: Mechanisms and Importance for Virus Spread Viruses. **MDPI**, 1 jan. 2022.

KALKAN, A.; OZDEN, M.; AKBULUT, H. Serum neopterin levels in patients with chronic hepatitis. **BJpn J Infect Dis**, 2005.

KALYANARAMAN, V. S. et al. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. **Science**, v. 218, n. 4572, p. 571-3, 1982.

KANNIAN, P. et al. Distinct transformation tropism exhibited by human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 is the result of post infection T cell clonal expansion. **J Virol**, v. 86, n. 7, p. 3757-66, 2012.

KAMIŃSKA, A. et al. Highly efficient SERS-based detection of cerebrospinal fluid neopterin as a diagnostic marker of bacterial infection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 16, p. 4319–4327, 1 jun. 2016.

KAMOI, K. et al. Updates on HTLV-1 Uveitis. **Viruses**, 2022.

KOMURIAN-PRADEL, F et al. Geographical subtypes demonstrated by RFLP following PCR in the LTR region of HTLV-I. **AIDS Res Hum Retro**, v. 8, n. 4, p. 429-34, 1992.

LE BLANC, I. et al. HTLV-1 structural proteins. **Virus Res**, v. 78, p. 5-16, 2001.

LENG, S. X. et al. Association of detectable cytomegalovirus (CMV) DNA in monocytes rather than positive CMV IgG serology with elevated neopterin levels in community-dwelling older adults. **Experimental Gerontology**, v. 46, n. 8, p. 679–684, ago. 2011.

LIM, M.D. Dried blood spots for global health diagnostics and surveillance: Opportunities and challenges. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, p. 256–65, 2018.

LIMA, G. M. et al. Declínio da prevalência do HTLV-1/2 em doadores de sangue do Hemocentro Regional da Cidade de Uberaba, Estado de Minas Gerais, 1995 a 2008. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, p. 421-24, 2010.

LIMA, C. M. et al. Association of sicca syndrome with proviral load and proinflammatory cytokines in HTLV-1 infection. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, 2016.

LIMA, A. C. R. et al. Prevalence and risk factors for HTLV-1/2 infection in riverside and rural populations of the state of Pará. **Viruses**, v. 14, n. 10, p. 2262, 2022.

LOPES, M. S. S. N.; PROIETTI, A. B. F. C. Transfusion-transmitted HTLV-1 /2 and hemovigilance: the contribution of look-back studies. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 30, n. 3, p. 229-40, 2008.

Luna, T. et al. Effect of TNF- α production inhibitors on the production of pro-inflammatory cytokines by peripheral blood mononuclear cells from HTLV-1-infected individuals. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. V. 44, p. 1134-40, 2011.

MACÊDO, O. et al. Human T-cell lymphotropic virus types I and II infections in a cohort of patients with neurological disorders in Belém, Pará, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 46, n. 1, p. 13-20, 2004.

MAHIEUX, R.; GESSAIN, A. HTLV-3/STLV-3 and HTLV-4 viruses: discovery, epidemiology, serology and molecular aspects. **Viruses**, v. 3, n. 7, p. 1074-90, 2011.

MALDONADO, J.O. et al. Distinct morphology of Human T-cell Leukemia Virus type 1-like particles. **Viruses**, v. 8, n. 5, p. 132, 2016.

MALONEY, E. M. et al. Endemic human T cell lymphotropic virus type II infection among isolated Brazilian Amerindians. **J Infect Dis**, v. 166, n. 1, p. 100-7, 1992.

MALPICA, L. et al. Epidemiology, clinical features, and outcome of HTLV-1-related ATLL in an area of prevalence in the United States. **Blood Adv**, v. 2, n. 6, p. 607-20, 2018.

MANEL, N. et al. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. **Cell**, v. 115, n. 4, p. 449-59, 2003.

MANEL, N. et al. GLUT-1 est le récepteur des rétrovirus humains HTLV. **Med Sci**, v. 20, n. 3, p. 277-79, 2004.

MANESCHY, C. et al. Seroprevalence of the Human T lymphotropic Virus (HTLV1 and HTLV 2) in Blood Donor Candidates in the State of Pará, Northern Brazil. **Research, Society and Development**, n. 4, p. 1-9, 2022.

MARTIN-LATIL, S. et al. Mother-to-child transmission of HTLV-1: in vitro study of HTLV-1 passage across a tight human epithelial barrier. **Retrovirology**, v. 8, p. 194, 2011.

MARTIN, J. L. et al. Molecular studies of HTLV-1 replication: an update. **Viruses**, v. 8, n. 2, p. 31, 2016.

MARTINEZ, M. P.; AL-SALEEM, J.; GREEN, P. L. Comparative virology of HTLV-1 and HTLV-2. **Retrovirology**, v. 16, n. 1, p. 21, 2019.

MARTINS, M. L. et al. 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**, v. 82, n. 10, p. 1746-53, 2010.

MATSUOKA, M.; JEANG, K. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 4, p. 270-80, 2007.

MEHARWADE, V. V. et al. Effects of scaling and root planning with or without a local drug delivery system on the gingival crevicular fluid leptin level in chronic periodontitis patients: a clinic-biochemical study. **JPIS**, v. 44, p. 118-25, 2014.

MELAMED, A. et al. Clonality of HTLV-2 in natural infection. **PLOS pathol**, v. 10, n. 3, e1004006, 2014.

MELLO, M. A. G. et al. HTLV-1 in pregnant women from the Southern Bahia, Brazil: A neglected condition despite the high prevalence. **Virol J**, v. 11, n. 1, 2014.

MILDVAN, D. et al. Serum Neopterin, an Immune Activation Marker, Independently Predicts Disease Progression in Advanced HIV-1 Infection. **Clin Infect Dis**, v. 40, n. 6, p. 853-8, 2005.

MILLEN, S.; THOMA-KRESS, A. K. Milk transmission of HTLV-1 and the need for innovative prevention strategies. **Front Med**, v. 9, e867147, 2022.

MIURA, T. et al. Phylogenetic subtypes of human T-lymphotropic virus type I and their relations to the anthropological background. **Proc Natl Acad Sci U S A**, n. 91, p. 1124–1127, 1994.

MOAT, S.J., GEORGE, R.S., CARLING, R.S. Use of Dried Blood Spot Specimens to Monitor Patients with Inherited Metabolic Disorders. **Int J Neonatal Screen**, 2020.

MOLERO-LUIS, M. et al. Cerebrospinal fluid neopterin as a biomarker of neuroinflammatory diseases. **Sci Rep**, 2020.

MONTAGNIER, L. Historical essay: A history of HIV discovery. **Science**, v. 298, n. 5599, p. 1727-8, 2002.

MONTEIRO, D. L. M. et al. Prevalence of HTLV-1/2 in pregnant women living in the metropolitan area of Rio de Janeiro. **Plos Negl Trop Dis**, v. 8, n. 9, e3146, 2014.

MORAIS, M. P. E. et al. Prevalence of human T-lymphotropic virus type 1 and 2 among blood donors in Manaus, Amazonas State, Brazil. **Rev Inst Med Trop**, v. 59: e80, 2017.

MORLEY, G. et al. Sensitive Detection of SARS-CoV-2-Specific Antibodies in Dried Blood Spot Samples. **Emerg Infect Dis.**, v. 26, n. 12, p. 2970–73, 2020.

MOTA, A. C. A. et al. The close relationship between South African and Latin American HTLV type 1 strains corroborated in a molecular epidemiological study of the HTLV type 1 isolates from a blood donor cohort. **AIDS**, v. 23, n. 4, p. 503-

7, 2007.

MOTA-MIRANDA, A. C. A. et al. Molecular characterization of HTLV-1 gp46 glycoprotein from health carriers and HAM/TSP infected individuals. *Virol J*, v. 10, p. 75, 2013.

MOTOKAWA, S. et al. High prevalence of arthropathy in HTLV-I carriers on a Japanese island. **Annals of the Rheumatic Diseases**, 1996.

MURPHY, E. L.; CASSAR, O.; GESSAIN, A. Estimating the number of HTLV-2 infected persons in the world. **Retrovirology**, v. 12, p. 5, 2015.

NAITO, T. et al. Distinct gene expression signatures induced by viral transactivators of different HTLV-1 subgroups that confer a different risk of HAM/TSP. *Retrovirology*, v. 15, p. 72, 2018.

NAKANO, K; WATANABE, T. HTLV-1 Rex: the courier of viral messages making use of the host vehicle. **Front Microbiol**, v. 3, p. 330, 2012.

NAKAMURA, H. et al. High prevalence of Sjogren's syndrome in patients with HTLV-I associated myelopathy. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 56, n. 3, p. 167–172, 1997.

NAKAO, K.; ABEMATSU, N.; SAKAMOTO, T. Systemic diseases in patients with HTLV-1-associated uveitis. **British Journal of Ophthalmology**, v. 102, n. 3, p. 373–376, 1 mar. 2018.

NGWA, S. F. et al. Malaria; risk factors within urban and rural settings in the Sahelian region of Cameroon and the role of insecticide resistance in mosquitoes, 15 set. 2022.

NOMOTO, M. et al. Neopterin in cerebrospinal fluid: A useful marker for diagnosis of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Neurology**, 1991.

NUNES, D. et al. HTLV-1 is predominantly sexually transmitted in Salvador, the city with the highest HTLV-1 prevalence in Brazil. **Plos One**, v. 12, n. 2, e0171303, 2017.

OLIVEIRA, E.H. et al. Human T-cell lymphotropic virus in patients infected with HIV-1: molecular epidemiology and risk factors for transmission in Piaui, Northeastern Brazil. **Curr HIV Res**, v. 10, n. 8, p. 700-7, 2012.

OLIVEIRA-FILHO, A.B. et al. Human T-lymphotropic virus 1 and 2 among people who used illicit drugs in the state of Pará, northern Brazil. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019.

OLIVEIRA, J. P. S. et al. Cerebrospinal fluid: history, collection techniques, indications, contraindications and complications. **J Bras Patol Med Lab**, 2020.

ONGURU, P. et al. High serum levels of neopterin in patients with Crimean-

Congo hemorrhagic fever and its relation with mortality. *Journal of Infection*, v. 56, n. 5, p. 366–370, maio 2008.

ORLETTI, M. P. S. et al. Prevalence of infection by human T Cell lymphotropic viruses (HTLV-1/2) in adult population in Vitória-ES. *Braz J Infect Dis*, v. 25, n. 5, 2021.

PAIVA, A.; CASSEB, J. Sexual transmission of Human T-cell lymphotropic virus type 1. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 47, n. 3, p. 265-74, 2014.

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*, v. 57, n. 1, p. 1-14, 2015.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **The Response to HTLV in the Framework of Maternal and Child Health**, 2020.

PANFIL, A. R. et al. Functional comparison of HBZ and the related APH-2 protein provides insight into human T-cell leukemia virus type 1 pathogenesis. *J Virol*, v. 90, p. 3760-72, 2016.

PARKER, S.P. et al. Use of dried blood spots for the detection and confirmation of HTLV-I specific antibodies for epidemiological purposes. *J Clin Pathol*, v. 48, 1995.

PASHABAYG, C. R. et al. Phylogenetic and phylodynamic study of Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) in Iran. *Infect Genet Evol*, v. 85:104426, 2020.

PINTO, M. T. et al. Evaluation of human T-lymphotropic virus prevalence/co-infection rates for a four-year period in a non-metropolitan blood center in Southeast Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 49, n. 2, p. 232–236, 1 mar. 2016.

PIQUE, C.; JONES, K. S. Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1. *Front Microbiol*, v. 3, p. 378, 2012.

POIESZ, B. J. et al. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Nat Acad Sci U S A*, v. 77, n. 12, p. 7415–9, 1980.

PONTES, G. S. et al. HTLV-2 infection in Manaus, Brazil: first description of HTLV-2c subtype in an urban area of the Western Amazon region. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 54, 2020.

PONTES, G. S. et al. Increased vulnerability to SARS-CoV-2 infection among indigenous people living in the urban area of Manaus. *Sci Reports*, v. 11, e17534, 2021.

PIZZINI, A. et al. Assessment of neopterin and indoleamine 2,3-dioxygenase activity in patients with seasonal influenza: A pilot study. **Influ Resp Viruses**, v. 13, n. 6, p. 603–609, 1 nov. 2019.

QUARESMA, J. A. S. et al. HTLV-1, immune response and autoimmunity. **Viruses**, 2015.

RATNER, L.; PHILPOTT, T.; TROWBRIDGE, D. B. Nucleotide Sequence Analysis of Isolates of Human T-Lymphotropic Virus Type 1 of Diverse Geographical Origins. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 7, n. 11, p. 923–941, 1991.

RATNER, P. et al. Distinct transformation tropism exhibited by human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 is the result of post infection T cell clonal expansion. **J Virol**, v. 86, n. 7, p. 3757-66, 2012.

RIBEIRO, L. M. et al. HTLV 1/2 prevalence and risk factors in individuals with HIV/AIDS in Pernambuco, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 52: e20180244, 2019.

ROSADAS, C. et al. Blocking HTLV-1/2 silent transmission in Brazil: Current public health policies and proposal for additional strategies. **PLOS**, v. 15, n. 9, e0009717, 2021.

ROSADAS, C. et al. Impact and economic analysis of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-targeted antenatal screening, England and Wales, 2021. **Euro Surveill**, v. 29, n. 22, e2300537, 2024.

ROSADAS, C. et al. Brazil takes a leap towards the elimination of HTLV-1 vertical transmission. **Lancet**, v. 39, e10888, 2024b.

ROUCOUX, D. F. et al. A Prospective Study of Sexual Transmission of Human T Lymphotropic Virus (HTLV)-I and HTLV-II, **J Infect Dis**, v. 191, p. 1490-7, 2005.

SAMPAIO, G. C. L. et al. Human T Cell Lymphotropic Virus Type 1 Global Prevalence Associated with the Human Development Index: Systematic Review with Meta-Analysis. **AIDS**, 2023.

SANTOS, S.B. et al. Exacerbated inflammatory cellular immune response characteristics of HAM/TSP is observed in a large proportion of HTLV-I asymptomatic carriers. **BMC Infect Dis**, 2004.

SANTOS, A. C. C.; SOARES, D. J.; RIVEMALES, M. C. C. (Un)Familiarity, illness and limitations imposed by HTLV: experiences of positive women. **Cad Saúde Colet**, v. 25, n. 1, p. 45-50, 2017.

SARKODIE, F. et al. Screening for viral markers in volunteer and replacement blood donors in West Africa. **Vox sang**, v. 80, n. 3, p. 142-7, 2001.

SATO, T. et al. Proposal of classification criteria for HTLV-1-associated

myelopathy/tropical spastic paraparesis disease activity. **Front Microbiol**, 2018.

SEQUEIRA, C. G. et al. Descriptive study of HTLV infection in a population of pregnant women from the state of Pará, Northern Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 45, n. 4, p. 453-6, 2012.

SHEPHEARD, S. R. et al. Urinary neopterin: A novel biomarker of disease progression in amyotrophic lateral sclerosis. **Eur J Neurol**. v. 29, p. 990–9, 2022.

SHOJI, T. et al. Identification of a novel motif responsible for the distinctive transforming activity of human T-cell leukemia virus (HTLV) type 1 Tax1 protein from HTLV-2 Tax2. **Retrovirology**, v. 6, p. 83, 2009.

SILVA, M.; et al. Neurological manifestations of coinfection with HIV and human T-lymphotropic virus type 1. **AIDS**, v. 26, n. 4, p. 521–23, 2012.

SILVA, P.H.G. et al. A avaliação da resistência masculina na busca aos serviços de saúde. **Res Soc Develop**, v. 12, n. 3, e19912340356, 2023.

SMADJA, D. et al. Clinical characteristics of HTLV-1 associated dermatopolymyositis. **Acta Neurol Scand**, v. 92, p. 206–212, 1995.

SOUZA, V. G. et al. High prevalence of HTLV-1 and 2 viruses in pregnant women in São Luis, State of Maranhão, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 45, n. 2, p. 159-62, 2012.

Souza, F.S. et al. Following the Clues: Usefulness of Biomarkers of Neuroinflammation and Neurodegeneration in the Investigation of HTLV-1-Associated Myelopathy Progression. **Front Immunol**, 2021.

SUBBARAO, K. et al. Gingival crevicular fluid: An overview. **J Pharm Bioallied Sci**, v.11, p.135–9, 2019.

TAHAR, R. et al. Plasma levels of eight different mediators and their potential as biomarkers of various clinical malaria conditions in African children. **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, 29 jun. 2016.

TAKAO, N. et al. Large-Scale Whole-Genome Analysis of HTLV-1–Associated Myelopathy Identified Hereditary Spastic Paraplegias. **Neurology Genetics**, v. 10, n. 1, fev. 2024.

TAKATANI, M. et al. Clinical and laboratory features of HTLV-I asymptomatic carriers and patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis from the Brazilian Amazon. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 2017.

THE, G. D. E.; BOMFORD, R. An HTLV-I Vaccine: Why, How, for Whom? **AIDS res human retro**, v. 9, n. 5, p. 381–86, 1993.

TIENEN, C. V. et al. Molecular Epidemiology of Endemic Human T-Lymphotropic Virus Type 1 in a Rural Community in Guinea-Bissau. **Plos**, v. 6, n.6, e1690,

2012.

TREVINO, A. et al. Trends in the prevalence and distribution of HTLV-1 and HTLV-2 infections in Spain. **Virol J**, v. 9, p. 71, 2012.

TSUKASAKI, K.; TOBINAI, K. Clinical trials and treatment of ATL. **Leuk Res Treat**, v. 2012, p. 101754, 2012.

VALENCIO, N.; VALENCIO, A.; BAPTISTA, M. S. The interface of disasters, sanitation, and poverty in Brazil: a sociological perspectiveFrontiers in Sustainable Cities. **Frontiers**, 2023.

VALLINOTO, A. C. R. et al. Molecular epidemiology of Human T-Lymphotropic Virus type II infection in Amerindian and urban populations of the amazon region of Brazil. **Human Biol**, v. 74, n. 5, p. 633-44, 2002.

VALLINOTO, A. C. R.; ISHAK, R. HTLV-2: an ancient infection among Indian people of Brazilian Amazon Region. **Rev Pan Amazon Saude**, v. 8, n. 2, 2017.

VAN DOOREN, S. et al. Evidence for a post-Columbian introduction of human T-cell lymphotropic virus (type I) in Latin America. **J Gen Virol**, v. 79, p. 2695-708, 1998.

VARMA, 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**, v. 33, n. 12, p. 3239-44, 1995.

VÁSQUEZ-MORÓN, S. et al. Evaluation of dried blood spot samples for screening of hepatitis C and human immunodeficiency virus in a real-world setting. **Sci Rep**, 2018.

VAUGHT, J. B. **Blood collection, shipment, processing, and storage**Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention. **Anais...set**. 2006.

VIANA, G. M. C. et al. Seroprevalence of HTLV-1/2 among blood donors in the state of Maranhão, Brazil. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 36, n. 1, p. 50-3, 2014.

VITALE.E et al. Annals of Nursing and Practice Anxiety Comparison among Patients Who Received Acupressure: Syringe versus Butterfly Needle. **Annals of Nursing and Practice**, v. 7, n. 1, p. 1110, 2020.

Volgger, B. M. et al. Long-term significance of urinary neopterin in ovarian cancer: A study by the Austrian Association for Gynecologic Oncology (AGO). **Annals of Oncology**. v. 27, p. 1740-6, 2016.

WATANABE, T. HTLV-1 associated diseases. **Int J Hematol**, v. 66, n. 3, p. 257-78, 1997.

WATTEL, E. et al. Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type I-

infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. **J virol**, v. 69, n. 5, p. 2863-68, 1995.

WIKTOR, S. Z. et al. Human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) among female prostitutes in Kinshasa, Zaire. **J Infect Dis**, v. 161, n. 6, p. 1073-7, 1990.

WILLEMS, L. et al. Reducing the global burden of HTLV-1 infection: an agenda for research and action. **Antiviral Res**, v. 137, p. 41-8, 2017.

WOLFE, N. D. et al. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 102, n. 22, p. 7994-9, 2005.

WOO, T. et al. Noninvasive detection of antibodies to human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2 by use of oral fluid. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 12, 2019.

WU, W. et al. HTLV-1 bZIP factor (HBZ): roles in HTLV-1 oncogenesis. **Bing Du Xue Bao**, v. 32, n. 2, p. 235-42, 2016.

YAMAZATO, Y. et al. High Expression of p40tax and Proinflammatory Cytokines and Chemokines in the Lungs of Human T-Lymphotropic Virus Type 1-Related Bronchopulmonary Disorders. **Chest**, v. 124, n. 6, p. 2283-2292, 2003.

YE, J.; XIE, L.; GREEN, P. L. Tax and overlapping rex sequences do not confer the distinct transformation tropisms of human T-cell leukemia virus types 1 and 2. **J virol**, v. 77, n. 14, p. 7728-35, 2003.

YOKOYAMA, S.; GOJOBORI, T. Molecular Evolution and Phylogeny of the Human AIDS Viruses LAV, HTLV-III, and ARV. **J Mol Evol**, v. 24, n. 330-36, 1987.

YOUNIS, I. et al. Repression of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 and Type 2 Replication by a Viral mRNA-Encoded Posttranscriptional Regulator. **J Virol**, v. 78, n. 20, p. 11077-83, 2004.

YOUSEFI, M. et al. Prevalence and associated risk factors of htlv-1 and co-infections of blood-borne viruses in birjand, iran's eastern border. **Archives of Iranian Medicine**, v. 23, n. 10, p. 672-677, 1 out. 2020.

ZAILANI, N. N. B.; HO, P. C. L. Dried Blood Spots—A Platform for Therapeutic Drug Monitoring (TDM) and Drug/Disease Response Monitoring (DRM). **European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, 2023.

ZARGARI, R. et al. The Role of Chemokines in the Pathogenesis of HTLV-1. **Front Microbiol**, v. 11, p. 421, 2020.

ZHENG, B. et al. Serum neopterin for early assessment of severity of severe acute respiratory syndrome. **Clinical Immunology**, v. 116, n. 1, p. 18-26, jul. 2005.

ZIHLMANN, K.F.; ALVARENGA, A.T.; CASSEB, J. Living invisible: HTLV-1-infected persons and the lack of care in public health. **Plos Negl Trop Dis**, v. 6, n. 6, e1705, 2012.

ZUNT, J. R. et al. Risk factors for HTLV-II infection in Peruvian men who have sex with men. **Amer J Trop med hygien**, v. 74, n. 5, p. 922, 2006a.

ZUNT, J. R. et al. HTLV-2 infection in infection drug users in King County, Washington. **Scand J Infect Dis**, v. 38, n. 8, p. 654-663, 2006b.

Zurflüh, M. R. et al. Screening for tetrahydrobiopterin deficiencies using dried blood spots on filter paper. **Mol Genet Metab**. v. 86, p. 96–103, 2005.

ZUO, X. et al. HTLV-1 persistent infection and ATLL oncogenesis. **J Med Virol**, 2022.

ANEXOS

QUESTIONÁRIO HTLV

Data: ____/____/____ Nº (ID): _____ População: () Urbana () Indígena () Ribeirinha () Quilombola () Rural

Se Indígena, qual a comunidade? _____ Se Ribeirinha, qual localidade? _____

Se Rural, qual localidade? _____ Se Quilombola, qual localidade? _____

Nome: _____ Sexo: ____ Data de nascimento: ____/____/____ Idade ____

Tipo sanguíneo: () A+ () A- () AB+ () AB - () B+ () B- () O+ () O- () não sabe

1) Onde você nasceu (cidade/estado)? _____

2) Em que município você reside? () Belém () Manaus () Rio Branco () Macapá () Goiânia () Campo Grande () Palmas () Outros : _____

3) Há quanto tempo você reside nessa localidade? () < 1 ano () 1 a 3 anos () 4 a 7 anos () > 7 anos

4) Em relação a sua cor, como você se classifica? () Branca () Negra () Parda () Amarela

5) Qual é o seu estado civil? () Casada ou “vive junto” () Solteiro/a () Separado/a () Viúvo/a

6) Nível de escolaridade: () Ensino fundamental incompleto () ensino fundamental completo () ensino médio incompleto () ensino médio completo () ensino superior incompleto () ensino superior completo () pós-graduação incompleta () pós-graduação completa () Analfabeto

7) Renda familiar (salários mínimos): () < 1 () 1 () 2 () 3 () 4 () 5 () > 5

8) Você ou sua família recebe auxílio governamental (B. Família, BPC, Aux. Emergencial, etc)? () Sim () Não. Qual?

9) Você faz algum acompanhamento de saúde? () Não () Sim

10) Se sim, qual foi a última vez? () Há um mês () Há 6 meses () > 6 meses

11) Se sim, onde? () SUS () Privado

12) Você fuma cigarros? () Sim () Não

13) Se sim, quantos cigarros por dia na última semana? () Menos 10 () Entre 10-20 ()+20

14) Você consome bebida alcoólica? () Sim () Não () às vezes

15) Se sim, quantas vezes por semana? () 1 a 3 () 4 a 6 () Todos os dias

16) Você tem alguma tatuagem? () Sim () Não

17) Se sim, quantas tatuagens? _____ Em que local do corpo? _____

18) Você tem algum piercing no corpo? () Sim () Não

19) Você já recebeu transfusão de sangue? () Sim () Não

20) Se sim, quantas? _____ Em que ano recebeu transfusão? _____

21) Você já usou alguma droga ilícita (fumada, inalada ou injetável) na sua vida? () Sim () Não

22) Quando criança, você foi amamentado? () Sim () Não () Não sei

23) Você é sexualmente ativo? () Sim () Não

24) Você já ficou gestante durante sua vida? () Sim () Não

25) Se sim, quantas vezes ficou gestante? _____

26) Já amamentou () Sim () Não

27) Se sim, por quanto tempo? () menos de 6 meses () 6 ou mais meses

28) Com que idade você teve a sua primeira relação sexual? _____

29) Já praticou sexo em troca de dinheiro? () Sim () Não

30) Usa preservativo nas relações sexuais? () Sim () Não () às vezes

31) Quantos parceiros por semana? () 1 () 2 () 3 ou mais

32) Já teve diagnóstico de alguma IST? () Sim () Não () Não sabe dizer

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I- DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

NOME: _____

ENDEREÇO COMPLETO: _____

BAIRRO: _____ CEP: _____ CIDADE: _____

ESTADO: _____ FONE1: _____ FONE 2: _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: _____

PROCEDÊNCIA: _____

II – DADOS SOBRE O ESTUDO

Você está sendo convidado a participar da pesquisa intitulada “Marcadores epidemiológicos de frequência (Prevalência) dos HTLV-1/2, seus subtipos moleculares e aspectos sócio-comportamentais de risco para a infecção em populações humanas das Regiões Norte e Centro-Oeste do Brasil”

A equipe responsável por esta pesquisa é formada pelos seguintes componentes: Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto (Coordenador. Tel. 91 98115-8578 / E-mail: vallinoto@ufpa.br), Ricardo Ishak, Izaura Vallinoto, Greice Costa, João Guerreiro, Rosimar Feitosa, Vânia Azevedo, Jacqueline Monteiro, Andréa Rangel, Maria Alice Queiroz, Ednelza Amoras, Fernanda Figueiredo, Sandra Souza, David Bichara, Julius Monteiro, Cintia Aben-Athar, Felipe Bonfim, Igor Brasil, Deborah Crespo, Gamilson Soares Pontes, Felipe Naveca, Ivina Lopes, Elaine Soares Leal, Simone Schneider Weber, Renata Trentin Perdomo, Hivana Dall'Agnol, Leonardo Dall'Agnol, Silvio Monteiro, Conceição Pedroso, Megmar Carneiro, Sheila Teles, Karlla Caetano, Márcia Matos, Regina Martins e Sandra do Valle.

III. EXPLICAÇÕES SOBRE O PROJETO DE PESQUISA AO PARTICIPANTE

a) O objetivo da pesquisa é descrever a ocorrência de infecção pelo HTLV em diferentes estratos populacionais (indígenas, ribeirinhos, rurais, urbanos e quilombolas) localizados nas regiões Norte e Centro-Oeste do Brasil;

b) A ocorrência desta infecção pode resultar em complicações clínicas que devem ser rapidamente tratadas;

c) Visando esclarecer alguns desses aspectos, o(a) convidamos a participar desta pesquisa. Para conduzir os estudos, precisaremos realizar uma coleta de sangue (10mL) da veia do braço para realizar os estudos sorológicos. As coletas de sangue serão realizadas com materiais descartáveis e estéreis. Geralmente, não há dor no local da coleta, mas pode ocorrer de intensidade limitada e por pouco tempo, em casos de coletas de sangue da veia. Algumas complicações decorrentes da coleta de sangue podem ocorrer como manchas roxas no local da coleta devido à retirada da agulha pelo profissional antes do garrote ou por perfuração da veia; alergia ao álcool a 70% usado para limpeza local ou contaminações devido à má limpeza feita ou uso de material não-descartável (estéril) contaminado;

e) É assegurado o encaminhamento de todos os casos de infecção para o acompanhamento com a equipe médica de cada estado participante do estudo;

f) Este estudo poderá auxiliar nas tomadas de decisão por parte dos gestores da saúde, bem como na realização de ações mais efetivas de prevenção da transmissão do HTLV;

g) A participação neste estudo é voluntária e você poderá retirar o seu consentimento e desistir de participar a qualquer momento sem prejuízo do seu tratamento regular;

- h) As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;
- i) Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exame e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à participação;
- j) Para obtenção de quaisquer informações e esclarecimentos, o paciente poderá entrar em contato com os pesquisadores responsáveis no Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Pará, situado na Rua Augusto Corrêa 1, Guamá, CEP: 66075-110. Telefone para contato: (0xx91) 3201-7587. Poderá, também, contactar o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (CEP-ICS/UFPA); Complexo de Sala de Aula/ICS, Sala 14, Campus Universitário, nº 01, Guamá, CEP: 66075-110. Belém - Pará. Tel: 3201-7735 E-mail: cepccs@ufpa.br.
- j) Todas as informações coletadas serão mantidas em sigilo.

III. AFIRMAÇÕES DO PACIENTE OU DE SEU RESPONSÁVEL LEGAL

1. Fui esclarecido sobre os objetivos da pesquisa, os procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos? ()SIM ()NÃO
2. Fui esclarecido sobre a liberdade de retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo quanto à continuidade do meu tratamento? ()SIM ()NÃO
3. Fui esclarecido de que não haverá remuneração financeira além do previsto para as despesas do estudo? ()SIM ()NÃO
4. Fui esclarecido de que não haverá indenização além das previstas pela lei, em reparação a dano imediato ou tardio, causado pela pesquisa em questão? ()SIM ()NÃO
5. Fui esclarecido de que a segurança da minha identidade será preservada, mantendo-se as informações em caráter confidencial? ()SIM ()NÃO

IV. CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido dos riscos e dos benefícios deste estudo, conforme acima definido, autorizo a minha participação na qualidade de paciente no Projeto de Pesquisa referido no inciso II.

MANAUS, _____ de _____ de 20____

Assinatura Paciente

Assinatura e carimbo do Pesquisador

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO RESPONSÁVEL LEGAL DO MENOR

I- DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

NOME: _____

ENDEREÇO COMPLETO: _____

BAIRRO: _____ CEP: _____ CIDADE: _____

ESTADO: _____ FONE1: _____ FONE 2: _____

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: _____

PROCEDÊNCIA: _____

Seu filho está sendo convidado a participar da pesquisa intitulada **“Marcadores epidemiológicos de frequência (Prevalência) dos HTLV-1/2, seus subtipos moleculares e aspectos sociocomportamentais de risco para a infecção em populações humanas das Regiões Norte e Centro-Oeste do Brasil”**

A equipe responsável por esta pesquisa é formada pelos seguintes componentes: Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto (Coordenador. Tel. 91 98115-8578 / E-mail: vallinoto@ufpa.br), Ricardo Ishak, Izaura Vallinoto, Greice Costa, João Guerreiro, Rosimar Feitosa, Vânia Azevedo, Jacqueline Monteiro, Andréa Rangel, Maria Alice Queiroz, Ednelza Amoras, Fernanda Figueiredo, Sandra Souza, David Bichara, Julius Monteiro, Cintia Aben-Athar, Felipe Bonfim, Igor Brasil, Deborah Crespo, Gemilson Soares Pontes, Felipe Naveca, Ivina Lopes, Elaine Soares Leal, Simone Schneider Weber, Renata Trentin Perdomo, Hivana Dall'Agnol, Leonardo Dall'Agnol, Silvio Monteiro, Conceição Pedroso, Megmar Carneiro, Sheila Teles, Karlla Caetano, Márcia Matos, Regina Martins e Sandra do Valle.

I. EXPLICAÇÕES SOBRE O PROJETO DE PESQUISA AO PARTICIPANTE

a) O objetivo da pesquisa é descrever a ocorrência de infecção pelo HTLV em diferentes estratos populacionais (indígenas, ribeirinhos, rurais, urbanos e quilombolas) localizados nas regiões Norte e CentroOeste do Brasil;

b) A ocorrência desta infecção pode resultar em complicações clínicas que devem ser rapidamente tratadas;

c) Visando esclarecer alguns desses aspectos, convidamos seu filho a participar desta pesquisa. Para conduzir os estudos, precisaremos realizar uma coleta de sangue (10mL) da veia do braço para realizar os estudos sorológicos. A coleta de sangue será realizada com materiais descartáveis e estéreis. Geralmente, não há dor no local da coleta, mas pode ocorrer de intensidade limitada e por pouco tempo, em casos de coletas de sangue da veia. Algumas complicações decorrentes da coleta de sangue podem ocorrer como manchas roxas no local da coleta devido à retirada da agulha pelo profissional antes do garrote ou por perfuração da veia; alergia ao álcool a 70% usado para limpeza local ou contaminações devido à má limpeza feita ou uso de material não-descartável (estéril) contaminado;

d) É assegurado o encaminhamento de todos os casos de infecção para o tratamento com a equipe médica de cada estado participante do estudo;

e) Este estudo poderá auxiliar nas tomadas de decisão por parte dos gestores da saúde, bem como na realização de ações mais efetivas de prevenção da infecção pelo HTLV;

f) A participação neste estudo é voluntária e você poderá retirar o seu consentimento e seu filho desistir de participar a qualquer momento sem prejuízo do seu tratamento regular;

- g) As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;
- h) Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exame e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à participação;
- i) Para obtenção de quaisquer informações e esclarecimentos, o paciente poderá entrar em contato com os pesquisadores responsáveis no Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Pará, situado na Rua Augusto Corrêa 1, Guamá, CEP: 66075-110. Telefone para contato: (0xx91) 3201-7587. Poderá, também, contactar o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará (CEP-ICS/UFPA); Complexo de Sala de Aula/ICS, Sala 14, Campus Universitário, nº 01, Guamá, CEP: 66075-110. Belém - Pará. Tel: 3201-7735 E-mail: cepccs@ufpa.br.
- j) Todas as informações coletadas serão mantidas em sigilo.

II. AFIRMAÇÕES DO PACIENTE OU DE SEU RESPONSÁVEL LEGAL

1. Fui esclarecido sobre os objetivos da pesquisa, os procedimentos, os riscos, os benefícios e outros assuntos? ()SIM ()NÃO
2. Fui esclarecido sobre a liberdade de retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo quanto à continuidade do meu tratamento? ()SIM ()NÃO
3. Fui esclarecido de que não haverá remuneração financeira além do previsto para as despesas do estudo? ()SIM ()NÃO
4. Fui esclarecido de que não haverá indenização além das previstas pela lei, em reparação à dano imediato ou tardio, causado pela pesquisa em questão? ()SIM ()NÃO
5. Fui esclarecido de que a segurança da minha identidade será preservada, mantendo-se as informações em caráter confidencial? ()SIM ()NÃO

III. CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido dos riscos e dos benefícios deste estudo, conforme acima definido, autorizo a minha participação na qualidade de paciente no Projeto de Pesquisa referido no inciso II.

MANAUS, _____ de _____ de 20____

Assinatura Paciente

Assinatura e carimbo do Pesquisador

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa denominada **“Marcadores epidemiológicos de frequência (Prevalência) dos HTLV-1/2, seus subtipos moleculares e aspectos sociocomportamentais de risco para a infecção em populações humanas das Regiões Norte e Centro-Oeste do Brasil”**

A equipe responsável por esta pesquisa é formada pelos seguintes componentes: Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto (Coordenador. Tel. 91 98115-8578 / E-mail: vallinoto@ufpa.br), Ricardo Ishak, Izaura Vallinoto, Greice Costa, João Guerreiro, Rosimar Feitosa, Vânia Azevedo, Jacqueline Monteiro, Andréa Rangel, Maria Alice Queiroz, Ednelza Amoras, Fernanda Figueiredo, Sandra Souza, David Bichara, Julius Monteiro, Cintia Aben-Athar, Felipe Bonfim, Igor Brasil, Deborah Crespo, Gemilson Soares Pontes, Felipe Naveca, Ivina Lopes, Elaine Soares Leal, Simone Schneider Weber, Renata Trentin Perdomo, Hivana Dall'Agnol, Leonardo Dall'Agnol, Silvio Monteiro, Conceição Pedroso, Megmar Carneiro, Sheila Teles, Karlla Caetano, Márcia Matos, Regina Martins e Sandra do Valle.

O motivo que nos leva a estudar esse assunto é que a ocorrência desta infecção pode resultar em complicações de saúde muito sérias que devem ser rapidamente acompanhadas por um médico.

Para que você participe da nossa pesquisa deverá ser submetido a uma coleta de sangue (10mL) da veia do braço. A coleta de sangue será realizada com materiais descartáveis e estéreis. Geralmente, há um pouco de dor no local da coleta, mas por pouco tempo. Algumas complicações decorrentes da coleta de sangue podem ocorrer como manchas roxas no local da coleta devido à retirada da agulha pelo profissional antes do garrote ou por perfuração da veia; alergia ao álcool a 70% usado para limpeza local ou contaminações.

Para participar desta pesquisa, o responsável por você deverá autorizar e assinar um termo de consentimento. Você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Tiraremos todas as dúvidas que você tiver sobre a pesquisa e você estará livre para participar ou recusar-se. O seu responsável ou você mesmo podem retirar o consentimento ou interromper a sua participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e se você não aceitar participar, ninguém se chateará com você, lhe penalizará nem modificará a forma em que é atendido (a). O pesquisador guardará segredo sobre a sua identidade. Você não será identificado em nenhuma publicação. Os riscos envolvidos na pesquisa consistem em **“RISCOS MÍNIMOS”** (ex.: a possibilidade de exposição da identidade dos participantes, seja por imagem, seja por identificação sonora, etc.).

Os resultados estarão disponíveis e poderão ser vistos por você quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a permissão do seu responsável. Os dados e os instrumentos utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 anos, e após esse tempo serão destruídos. Este termo de assentimento será impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no **“LOCAL DA PESQUISA”** e a outra será entregue a você.

Caso você tenha dúvidas e queira conversar sobre a pesquisa poderá entrar em contato com os pesquisadores no Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Pará, situado na Rua Augusto Corrêa 1, Guamá, CEP: 66075-110. Telefone para contato: (0xx91) 3201-7587. Poderá, também, contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde da

Universidade Federal do Pará (CEP-ICS/UFPA); Complexo de Sala de Aula/ICS, Sala 14, Campus Universitário, nº 01, Guamá, CEP: 66075-110. Belém - Pará. Tel: 3201-7735 E-mail: cepccs@ufpa.br.

Eu, _____, portador (a) do documento de Identidade _____ (se já tiver documento), fui informado (a) dos objetivos da presente pesquisa, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações, e o meu responsável poderá modificar a decisão de participar se assim o desejar. Tendo o consentimento do meu responsável já assinado, declaro que concordo em participar dessa pesquisa. Recebi o termo de assentimento e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

DADOS DO VOLUNTÁRIO DA PESQUISA:

Nome Completo: _____

Endereço: _____

RG: _____ Fone: () _____

Email: _____

NOME DO ADOLESCENTE

ASSINATURA

DATA

NOME DO INVESTIGADOR

ASSINATURA

DATA