

## Prevalência de Anticorpos para o Vírus da Leucemia Humana de Células T (HTLV-I) em Pacientes Cancerosos na Região Amazônica (Nota Prévia)

CÉLIA MARIA NAKAUCHI<sup>1</sup>, ALEXANDRE DA COSTA LINHARES<sup>1</sup>, JOÃO EMÍLIO MACEDO<sup>2</sup>, KOSHI MARUYAMA<sup>3</sup>, LUIS ISAMU KANZAKI<sup>1</sup>, VÂNIA NAKAUCHI AZEVEDO<sup>1</sup>

### Resumo

*Amostras de soro colhidas de 43 pacientes apresentando câncer, procedentes de Belém e de outros municípios do Estado do Pará foram testados, através do ensaio imuno-enzimático (ELISA), quanto à presença de anticorpos para o HTLV-I. Obtiveram-se resultados positivos em 10 (23,2%) dos espécimes, a par de confirmar-se a sua especificidade pela técnica de "Western blot" (WB) e a imunomicroscopia eletrônica indireta utilizando-se o ouro como recurso de marcação do complexo antígeno-anticorpo (IIG-EM).*

*Entre os indivíduos que exibiram anticorpos para o HTLV-I, cinco (50,0%) foram representados por mulheres com tumor de cérvix uterino.*

**Unitermos:** Leucemias de células T e vírus HTLV-I, anticorpos

### Introdução

Desde os achados pioneiros correlacionando o HTLV-I e a leucemia humana<sup>8</sup>, que se acumulam evidências no tocante ao caráter patogênico desse agente virótico. Além de ser amplamente reconhecido como relacionado à leucemia de células T do adulto (ATL), o HTLV-I tem sido implicado a outros processos mórbidos que acometem o homem<sup>1,5,6,7</sup>.

Investigações de natureza soro-epidemiológica levadas a efeito em várias regiões do mundo têm, sistematicamente, demonstrado significativos percentuais de pessoas infectadas pelo vírus em questão, particularmente no Japão e Caribe. Nos Estados Unidos e Europa, a infecção por HTLV-I tem sido detectada com mais freqüência entre viciados em drogas injetáveis<sup>3,4,10</sup>. Em recente estudo conduzido na área metropolitana do Panamá<sup>9</sup> anticorpos para o citado retrovírus foram registrados em 5% da população examinada.

Investigações acerca da ocorrência de anticorpos para o HTLV-I em comunidades urbanas no Brasil não têm sido levadas a efeito até o presente. O nosso estudo preliminar visa, portanto, a determinação da prevalência de anticorpos para o referido vírus, em pacientes portadores de processos neoplásicos atendidos em um hospital público em Belém, Pará.

### Material e métodos

#### *Amostras de soro*

Obtiveram-se esses espécimes a partir da punção venosa efetuada em 43 pacientes cancerosos sob tratamento no Instituto Offir Loyola. Os processos neoplásicos acometiam órgãos diversos (Tabela I) e o acompanhamento clínico era efetuado por um dos autores.

#### *Técnicas laboratoriais*

Todos os procedimentos laboratoriais foram desenvolvidos no "Department of Pathology, Chiba Cancer Center Research Institute", Chiba, Japão. O método de ELISA foi executado consoante prévia descrição de Burrells e Dawson<sup>2</sup>. Resumidamente, microplacas contendo 96 orifícios foram sensibilizadas com suspensão de vírus HTLV-I em diluição ótima, previamente estabelecida, utilizando-se como diluente solução-tampão 0,05 M de carbonato/bicarbonato, pH 9,6, procedendo-se à subsequente "fixação" com glutaraldeído a 3%, por 15 minutos a 4°C. As placas foram então lavadas vigorosamente com solução salina tamponada de fosfatos (PBS), contendo 0,05% de Tween 20 e com pH 7,2 (PT), sucedendo-se reação de bloqueio com albumina bovina (BSA) a 1% em PBS. A seguir fez-se outro procedimento de lavagem com PT, adicionando-se,

<sup>1</sup>Seção de Vírus do Instituto Evandro Chagas, Fundação Serviços de Saúde Pública, Belém, Pará, Brasil. <sup>2</sup>Instituto Offir Loyola, Belém, Pará, Brasil. <sup>3</sup>Department of Pathology, Chiba Cancer Center Research Institute, Chiba, Japan.

Endereço para correspondência: Dr. A. C. Linhares, Instituto Evandro Chagas, FSESP, Av. Almirante Barroso 494, CP 1128, 66.050, Belém, Pará, Brasil.

**Tabela 1** — Frequência de anticorpos para HTLV-I, pelo método de ELISA, em pacientes de Belém e de outras cidades do Estado do Pará, de acordo com o tipo de câncer.

Local / natureza do câncer	Positivos	/ testados	(%)
Carcinoma epidermóide de pulmão esquerdo (lobo superior)	1	2	50.0
Blastoma maligno da coluna vertebral e região lombar.	0	1	0.0
Doença de Hodgkin (nodular esclerosante)	0	1	0.0
Tumor de Wilms — Rim esquerdo	0	1	0.0
Carcinoma epidermóide de cérvix uterino	5	16	31.2
Osteossarcoma de fêmur esquerdo	1	3	33.3
Adenocarcinoma gástrico-pequena curvatura	1	4	25.0
Blastoma maligno de esôfago 1/3 inferior (epidermóide)	0	2	0.0
Blastoma de mama esquerda-Adenocarcinoma	0	1	0.0
Leucemia linfóide aguda	0	5	0.0
Fibrossarcoma da face (região geniana esquerda)	1	1	100.0
Blastoma da parótida esquerda (epidermóide)	0	2	0.0
Doença de Hodgkin celularidade mista	0	2	0.0
Carcinoma epidermóide da região dorsal da língua	0	1	0.0
Osteossarcoma da costela (6ª costela esquerda)	1	1	100.0
<b>Total</b>	<b>10</b>	<b>43</b>	<b>23.2</b>

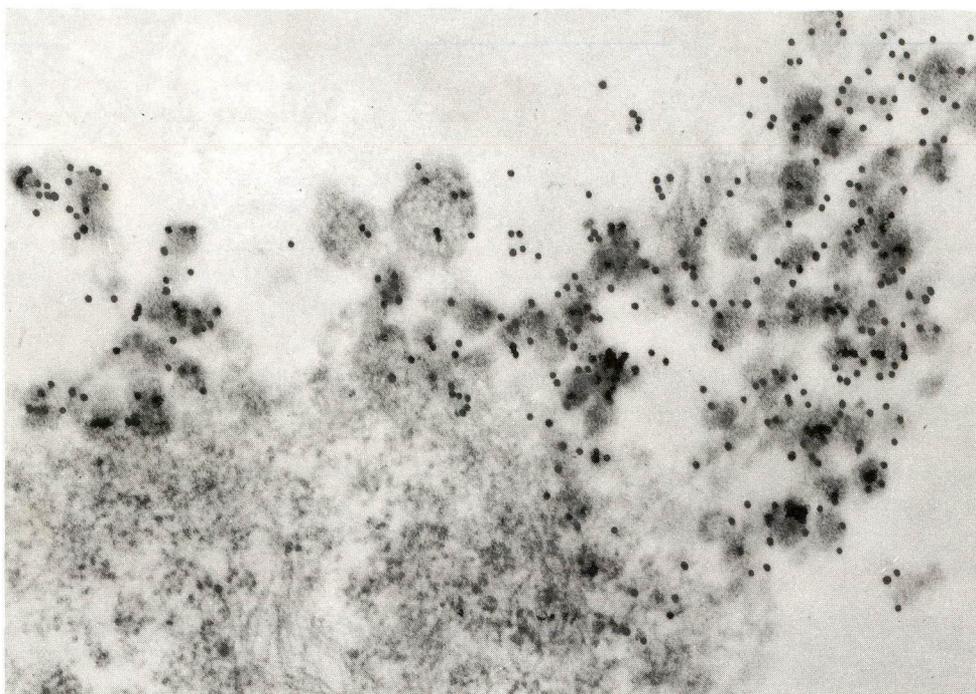
subseqüentemente, as amostras de soro sob teste diluídas a 1 : 100 em PT contendo 0,1% de BSA (PTB); sucedeu-se período de incubação (60 minutos) a temperatura ambiente (TA). Depois de se proceder a outra lavagem depositou-se nos orifícios das microplacas diluição apropriada de conjugado enzimático, produzido em coelhos, envolvendo imunoglobulina anti-IgG humana quimicamente acoplada à peroxidase (Miles Scientific, Naperville, IL); observou-se, então, incubação por uma hora a TA. Seguiu-se a adição do substrato enzimático "[2-2' -Azino-di(3-ethylbenzathiazoline sulfonic acid) diammonium salt]" que reagiu durante 10 min a TA, antes de bloquear-se a sua reação com ácido fluorídrico 0,1 M, pH 3,3. Os valores de absorção foram determinados utilizando-se filtro de 405 nm. Todos os espécimes com valores de densidade óptica igual ou

superior a 0,3 foram considerados positivos. Sistemáticamente foram utilizadas amostras-padrão positivas e negativas, a título de controlar o sistema.

Em geral, os soros que se revelavam positivos por ELISA, eram confirmados a partir de testes subseqüentes de WB<sup>5</sup> e/ou IIG-EM<sup>6</sup>.

### Resultados

Dos 43 espécimes testados ressaltaram-se como os mais freqüentes aqueles oriundos de mulheres apresentando câncer de cérvix uterino, constituindo-se em 16 (37,2%) das amostras. A freqüência de anticorpos para HTLV-I foi de 23,2% e, entre os indivíduos positivos, destacaram-se 5 (50,0%) com tumor maligno de colo de útero.



**Figura 1** — Microfotografia eletrônica de partículas tipo C (HTLV-I) em células Lma-66 testadas com soro de uma paciente com câncer de cervix uterino (97, M.P.R., Belém, Pará), diluído 1: 1000, através da técnica de IIG-EM. As partículas tipo C são observadas sob aumento de 63,000 X

A reação de um dos soros positivos — obtido de mulher portadora de tumor de cervix — com partículas de HTLV-I tipo C é apresentada em microfotografia eletrônica exibida sob aumento de 63,000 X (fig. 1).

### Discussão

Não obstante o caráter preliminar de que se reveste este estudo, os resultados obtidos sugerem claramente que a infecção pelo HTLV-I em nossa região (particularmente entre doentes portadores de neoplasias malignas) é freqüente. A investigação restringiu-se ao exame de pacientes cancerosos, sem registrar-se, entretanto, casos de ATL. Os tumores neoplásicos foram detectados em sítios diversos, ressaltando-se o de cervix uterino como o mais freqüente. Nesse contexto cabe assinalar observações de Maruyama e col.<sup>6</sup> que sugerem ser a taxa de positivos para HTLV-I entre indivíduos cancerosos pelo menos 5 vezes superior àquela que via de regra tem sido assinalada na população normal. O fato de registrar-se um percentual expressivo de positividade entre mulheres com câncer uterino não significa, necessariamente, que tal condição mórbida predispõe à infecção pelo retrovírus em exame. Embora tais achados possam refletir apenas o fato de ter-se partido de um universo em que tal localização do tumor era a mais freqüente, são imperativos estudos mais amplos com vistas a melhor elucidar-se esse particular que emergiu de nossa avaliação-piloto.

As observações preliminares também suscitaram a possibilidade de que cepas locais do HTLV-I não são homólogas àquelas prevalentes no Japão. O WB levado

a efeito com algumas das amostras de soro revelou reação desses espécimes com o peptídeo viral "p 15", diferentemente do que registra naquele país. Tal particularidade pode indicar que a composição antigênica de cepas viróticas locais difere, em pequena escala, daquelas circulantes no Japão.

Investigações ulteriores de caráter mais amplo são absolutamente necessárias, com o propósito de melhor caracterizar-se a magnitude do HTLV-I em nossa região como um patógeno humano.

### Summary

*Serum samples were collected from 43 cancer patients living in Belém and other cities of Pará, and tested for the presence of antibody to HTLV-I by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Positive results occurred in 10 (23,2%) out of the 43 specimens, being further confirmed by both Western-blot analysis (WB) and indirect immunogold electron microscopy (IIG-EM).*

*Five (50,0%) out of the 10 seropositive patients were females suffering from cervix cancer.*

**Key words:** T-cell Leukemia and HTLV-I virus, antibodies

### Agradecimentos

Formulamos nossos agradecimentos aos Srs. Francisco Teles Pantaleão e Airton J. da Graça Teixeira pelo apoio proporcionado em relação à colheita de soro. Também somos extremamente gratos aos membros do "Department of Pathology, Chiba Cancer Center

Research Institute", Chiba, Japão, pela excelente assistência técnica proporcionada.

#### Referências Bibliográficas

1. Brew, BJ & Price, RH. Another retroviral disease of the nervous system: chronic progressive myelopathy due to HTLV-I. *N. Engl. J. Med.* 318, 1988; 1195-1197.
2. Burrells C & Dawson Mc L. Elisa methodology. Variations in technical procedures. In: Wardley, R. C. and Crowther, J. R. ed. *The ELISA. Ezyme-linked immunosorbent assay in veterinary research and diagnosis.* The Hague/Boston/London. Martinus Nighoff Publ, 1982; 1-9.
3. Gallo, RC. The first human retrovirus. *Scientific American* 255, 1986; 88-98.
4. Hinuma Y, Nagata K, Anaoka M, Nakai M, Matsumoto T, Kinoshita K, Shirakawa S & Miyoshi I. Adult T-cell leukemia, antigen in an ATL cell line and detection of antibody to the antigen in human sera. *Proc. natl. Acad. Sci. USA* 78, 1981; 6476-6560.
5. Katayama I, Maruyama K, Fukushima T, Nishibe Y & Kayano H. Cross-reacting antibodies to human T cell leukemia virus — I and II in Japanese patients with hairy cell leukemia. *Leukemia* 1, 1987; 401-404.
6. Maruyama K, Miyauchi M, Fukushima T, Mochizuki S, Koshikawa N, Kawamura, K, Tamayama C, Nakano M, Odo A & Iha S. Antigenic variations of retrovirus in Japanese cancer patients. *Leukemia*. In press.
7. Mattock C & Parker NE. HTLV-I infection and Schizophrenia. *Lancet* ii: 945.
8. Poiesz BJ, Ruscetti FN, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD & Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T — cell lymphoma. *Proc. natl. Acad. Sci. USA* 77, 1980; 7415-7419.
9. Reeves, WC, Saxinger C, Brenes MM, Quiroz E, Clark JW, HOH M-W & Blattner WA. Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) seroepidemiology and risk factors in Metropolitan Panama. *Am. J. Epidemiol.* 127, 1988; 532-539.
10. Tedder RS, Shanson DC, Jeffries DJ, Cheingsong-Popov R, Dalgleish A, Clapham P, Nagy K & Weiss RA. Low prevalence in the UK of HTLV-I and HTLV-II infection in subjects with AIDS, with extended lymphadenopathy, and at risk of AIDS. *Lancet* ii, 1984; 125-128.