

# PARTÍCULAS VIRAIS IDÊNTICAS AO HTLV-I EM CULTURAS DE LINFOCITOS DE UMA MULHER ASSINTOMÁTICA CUJO SORO APRESENTA ANTICORPOS CONTRA O HTLV-I E HTLV-III/LAV-I E LAV-II

E. A. CARDOSO, A. M. TERRINHA E J. F. MOURA NUNES

Laboratório de Virulogia, Instituto Português de Oncologia de Francisco Gentil, Lisboa.

## RESUMO

Os autores descrevem o aparecimento de partículas virais idênticas ao HTLV-I em linfócitos cultivados a partir do sangue de uma mulher de etnia negra, natural da Guiné-Bissau, residente em Portugal e que não apresenta qualquer sintomatologia clínica referenciável. O estudo do soro desta paciente revelou a presença simultânea de anticorpos contra os vírus HTLV-I e HTLV-III/LAV-I e LAV-II.

## SUMMARY

**Viral particles identical to HTLV-I in lymphocyte cultures of a symptomless female whose serum contained antibodies against HTLV-I and HTLV-III**

Viral particles identical to HTLV-I were found in cultured lymphocytes obtained from a healthy black female born in Guinea-Bissau. Antibodies to HTLV-I and HTLV-III/LAV-I and LAV-II were detected in the serum.

## INTRODUÇÃO

A detecção e isolamento de um retrovírus associado a leucemias humanas, culminou um grande esforço de pesquisas e estudos de vários anos<sup>1,4</sup>. Este vírus foi designado por HTLV-I (Human T-Cell Leukemia Virus) e foi isolado a partir de células leucémicas de um doente com linfoma cutâneo de células T. Outros retrovírus linfotrópicos foram posteriormente caracterizados, nomeadamente o HTLV-II (isolado de um paciente com cloroleucemia)<sup>8</sup>, o HTLV-III/LAV-I e LAV-II e o HTLV-IV relacionados com o Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA)<sup>1,3,15</sup>.

O HTLV-I aparece associado a uma forma rara de leucemia, descrita como leucemia/linfoma T do adulto (ATL), em que se encontram sobretudo envolvidos os linfócitos T "helper"<sup>4</sup>. No decurso da doença verifica-se acção imunodepressiva do vírus<sup>11</sup>. Parece existir um longo período de latência entre o início da infecção viral e as primeiras manifestações clínicas da doença<sup>2</sup>.

O vírus induz no hospedeiro humano uma resposta humoral com consequente produção de anticorpos que foram detectados quer em doentes quer em indivíduos sem patologia clínica<sup>11,16</sup>. A infecção é do tipo horizontal pois só existem sequências provirais nas células leucémicas<sup>4</sup>, devendo a sua transmissão processar-se por contactos íntimos ou transfusões de sangue<sup>13</sup>.

Aparentemente este vírus poderá ter origem no continente africano, podendo os portugueses na época dos descobrimentos estarem implicados na sua disseminação a partir de África<sup>5,7</sup>. Atendendo a estes factos, levámos a efeito um estudo seroepidemiológico na população portuguesa, com especial incidência nos indivíduos retornados das nossas ex-colónias. Este estudo foi depois tornado extensivo aos vírus envolvidos no SIDA (resultados a publicar posteriormente).

Neste trabalho descreve-se um caso de um soro positivo para o HTLV-I, LAV-I e LAV-II, sendo a dadora assintomática portadora de um vírus idêntico, nas suas características ultra-estruturais, ao HTLV-I.

## MATERIAL E MÉTODOS

Paciente: mulher de etnia negra, 45 anos de idade, natural da Guiné-Bissau, casada e residente em Portugal desde 1974. Não apresenta sintomatologia clínica referenciável. Colheita de sangue efectuada em 1985 (N.º de ref. 1711).

O soro obtido estudado foi para pesquisa de anticorpos de HTLV-III/LAV-I e LAV-II utilizando-se o teste imunoenzimático (ELISA), a imunofluorescência (IMF) e o teste de radioimunoprecipitação (RIPA), seguido de autoradiografia<sup>9</sup>. Este estudo foi feito em colaboração com o Institut Pasteur de Paris (L. Montagnier e col.).

A pesquisa de anticorpos anti HTLV-I (ELISA) foi realizada pela Dr.<sup>a</sup> M. Robert-Guroff do National Cancer Institute, Bethesda, USA.

Aproximadamente um ano após a obtenção do soro e verificada já a sua positividade para os vírus referidos, colheram-se 30 ml de sangue heparinizado que foi centrifugado em almofada de Ficoll-Hypaque, a 900 g durante 15'. Os linfócitos foram, após esta separação, co-cultivados na proporção de  $5 \times 10^5$  do indivíduo em estudo e  $5 \times 10^5$  de um dador normal; o meio de cultura usado foi o RPMI suplementado com 10% de soro fetal de vitela (Gibco) inativado, 10  $\mu$ g/ml de polybren (Euróbio), 25  $\mu$ g/ml de fitohemaglutinina (PHA) (Gibco) e ainda soro anti-interferon alfa (Institut Pasteur de Paris). As células foram incubadas a 37° C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após 72 h de cultura adicionou-se Interleuquina 2 (IL-2) (Boehringer Mannheim) na concentração final de 10%.

Tendo-se verificado um rápido declínio de células viáveis, centrifugaram-se de novo em almofada de Ficoll-Hypaque ao fim de oito semanas de cultura, com a finalidade de eliminar os detritos celulares; as escassas células recuperadas foram cultivadas em meio RPMI contendo 20% de soro fetal de vitela e 10% de IL-2. Quando a cultura mostrou sinais inequívocos de multiplicação celular baixou-se a concentração de IL-2 para 2%.

Para microscopia electrónica as células em suspensão foram centrifugadas a 900 g durante 5', sendo o sedimento fixado em glutaraldeído a 3% em tampão de cacodilato de sódio — HCL, 0.1M, pH=7.3. O material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão e em acetato de urânio a 1% em água e incluído em Epon-Araldite. Foram observados cortes espessos corados com azul de toluidina alcalino e seleccionadas para os cortes ultrafinos as áreas contendo células grandes e multinucleadas. Os cortes foram contrastados sequencialmente em acetato de urânio e água e com citrato de chumbo e observados num microscópio electrónico JEOL 100C.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O soro 1711 inicialmente analisado para o estudo da presença de anticorpos contra os vírus linfotrópicos HTLV-I e HTLV-III/LAV-I mostrou alta reactividade para os dois vírus. Posteriormente verificou-se ser também positivo para o LAV-II. A reactividade aos três vírus (tanto quanto nos é dado a conhecer, não descrita na literatura científica), levou-nos a um estudo mais aprofundado deste caso numa tentativa de detecção e isolamento de retrovírus.

Uma reacção imunológica cruzada entre os vírus do grupo leucemia e os vírus do grupo SIDA está excluída, dado não haver qualquer semelhança entre a sua constituição proteica<sup>9</sup>. Não se pode pôr de parte a hipótese de reacção cruzada entre os vírus LAV-I e LAV-II, o que só será passível de clarificação após um melhor conhecimento da constituição proteica dos dois vírus e da sua descodificação genética, o que está longe das nossas possibilidades técnicas actuais.

A reactividade contra o HTLV-I não exclui, no entanto, uma reacção cruzada com o HTLV-II, pois sabe-se que estes dois vírus compartilham determinantes antigénicas<sup>8,10</sup>.

Os linfócitos foram mantidos em cultura segundo o método utilizado no Institut Pasteur de Paris com a finalidade de isolar o LAV-II. Durante esse período o número de células viáveis diminuiu drasticamente na ausência de qualquer efeito citopatógeno característico das células infectadas com vírus do grupo SIDA. As poucas células recuperadas foram cultivadas de acordo com o protocolo seguido neste Laboratório para o isolamento de HTLV-I descrito em material e métodos.

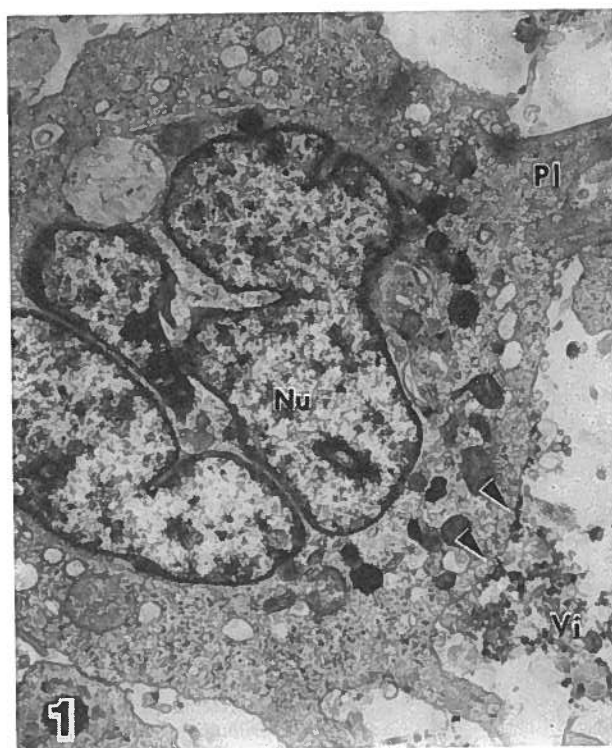


Figura 1 Célula portadora de vírus. Notar a existência de núcleos polilobulados (Nu), de prolongamentos celulares (Pl) e de um grupo de partículas virais (Vi). São visíveis espessamentos da membrana celular (setas) que correspondem a áreas de formação viral ("budding"). Ampliação  $\times 6500$ .



Figura 2 "Budding" viral na membrana citoplasmática (setas) de célula produtora de vírus. Partículas virais extracelulares (Vi). Os nucleóides são densos e o envólucro não apresenta espículas. Ampliação  $\times 11500$ .

Assim, estando a linha celular bem estabilizada observou-se a presença de uma pequena percentagem de células de maiores dimensões com prolongamentos citoplasmáticos, a par de muitas células pequenas isoladas e de grandes aglomerados celulares. A presença de células de maiores dimensões, confirmadas em microscopia electrónica como apresentando núcleos multilobulados, está de acordo com o aparecimento deste tipo de células em culturas produtoras de vírus do grupo HTLV-I e HTLV-II<sup>11</sup> (fig. 1). Também característico das células infectadas com este tipo de vírus, é a diminuição das necessidades em IL-2 nas culturas, o que pressupõe a existência de células transformadas capazes de produzir esta interleuquina<sup>16</sup>; (M. Robert-Guroff, com. pessoal).

Em microscopia electrónica observaram-se espessamentos com alta densidade aos electrões, em algumas zonas da membrana citoplasmática. Estas zonas com dimensões da ordem dos 150 nm (mas atingindo por vezes mais de 300 nm) fazem procidência para o espaço extracelular (fig. 2). Na vizinhança da membrana citoplasmática destas células e muitas vezes próximo das referidas áreas de espessamento, encontraram-se partículas de perfil aproximadamente circular, com o diâmetro médio de 135 nm, constituídas por uma membrana trilaminar sem expansões periféricas e um nucleóide central denso e heterogéneo com diâmetro médio de 87 nm; membrana e nucleóide estão separados por um espaço claro (fig. 2).

A presença destas partículas assim como as alterações morfológicas da membrana citoplasmática das células sugerem estar-se na presença da formação de partículas virais por um processo de "budding" característico dos vírus da família retroviridae do tipo C. Morfologicamente as partículas presentes são claramente distintas dos vírus do grupo responsável pelo SIDA<sup>12</sup>, assemelhando-se aos vírus HTLV-I/II<sup>6</sup>.

Prosseguimos o estudo imunológico do vírus isolado e destas células, para uma tentativa de melhor identificação do agente em causa.

A positividade do soro da paciente para o HTLV-I bem como as características morfológicas das partículas virais, sugerem estar-se na presença da expressão morfológica do vírus HTLV-I. No entanto será necessária a utilização de métodos imunocitoquímicos para a sua completa caracterização.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a colaboração de: **Dr. Alcino Maciel** (Centro Regional de Saúde de Ponte de Lima, Portugal), **Dr.º M. Robert-Guroff** (National Cancer Institute, Bethesda, USA), **Dr. Luc Montaignier** (Institut Pasteur de Paris, France).

As observações ultraestruturais foram efectuadas no Instituto de Investigação Veterinária.

Este trabalho foi financiado, em parte, pela Liga Portuguesa contra o Cancro e Fundação Calouste Gulbenkian.

## BIBLIOGRAFIA

- BARRÉ-SINOUSI, F.; CHERMANN, J.C.; REY, F.; NUGEYRE, M.T.; CHAMARET, S.; DAUGUET, C.; AXLER-BLIN, C.; VEZINET-BRUN, F.; ROUZIQUX, C.; ROZENBAUM, W. and MONTAGNIER, L.: Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient of risk for acquired immunodeficiency syndrome. *Science*, 1983; 220: 868.
- BLATTNER, W.A. and GALLO, R.C. Human T-cell leukemia/lymphoma viruses: clinical and epidemiologic features in Current topics on Microbiology and Immunology, vol. 115, Human T-cell leukemia virus, pág. 67. Ed. Vogt, P.K., Springer Verlag, 1985.
- CLAVEL, F.; BRUN-VÉZINET, F.; GUÉTARD, D.; CHAMARET, A.; ROUZIQUX, C.; REY, F.; CHAMPALIMAUD, J.L.; NINA, J.S.; MANSINHO, K.; SANTOS-FERREIRA, M.O.; KLATZMANN, D.; MONTAGNIER, L.; LAV type II: un second retrovirus associé au SIDA en Afrique de l'Ouest. C.R. Acad. Sci. (Paris), 1986; 302:485.
- GALLO, R.C.; MANN, D.; BRODER, S.; RUSCETTI, F.W.; MAEDA, M.; KALYANARAMAN, V.S.; ROBERT-GUROFF, M. and REITZ, M.S.; Human T-cell Leukemia-Lymphoma virus (HTLV) is in T but not B-lymphocytes from a patient with cutaneous T-cell lymphoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982; 79:5680.
- GALLO, R.C.; SLISKI, A.; and WONG-STAAAL, F.; Origin of human T-cell leukemia lymphoma virus. *Lancet*, 1983; 2:962.
- GALLO, R.C.; The human T-cell leukemia/lymphotropic retroviruses (HTLV) family: past, present and future. *Cancer Res. suppl.*, 1985; 45:4524.
- HINO, S.; KINOSHITA, K.; and KITAMINA, T.; HTLV and the propagation of christianity in Nagasaki. *Lancet*, 1983; 2:572.
- KALYANARAMAN, V.S.; SARNGADHARAN, M.G.; ROBERT-GUROFF, M.; MYOSHI, I.; BLAYNEY, D.; GOLDE, D.; and GALLO, R.C.; A new sub-type of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science*, 1982; 218:571.
- KLATZMANN, D.; BARRÉ-SINOUSI, F.; NUGEYRE, M.T.; DAUGUET, C.; VILMER, E.; GRISCELLI, C.; VEZINET-BRUN, F.; ROUZIQUX, C.; GLUCKMAN, J.C.; CHERMANN, J.C.; and MONTAGNIER, L. Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper-inducer T lymphocytes. *Science*, 1984; 225:59.
- LEE, T.H.; COLIGAN, J.E.; McLANE, M.F.; SODROSKI, J.G.; POPOVIC, M.; WOON-STAAAL, F.; GALLO, R.C.; HASELTINE, W.; and ESSEX, M.; Serological cross-reactivity between envelope gene products of type I and II human T-cell leukemia virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1984; 81:7579.
- MITSUYA, H.; and BRODER, S.; Human T-cell leukemia/lymphoma viruses (HTLV): a unique family of pathogenic retroviruses. in Current Topics on Microbiology, vol. 115. Human T-cell leukemia virus, pág. 33. Ed. Vogt, P.K. Springer Verlag, 1985.
- MUNN, R.J.; PRESTON, A.M.; YAMAMOTO, J.K.; and GARDNER, M.B.; Ultrastructural comparison of retroviruses associated with human and simian acquired immunodeficiency syndromes. *Lab. Invest.* 1985; 53:194.
- OSAME, M.; IZUMO, S.; IGATA, A.; MATSUMOTO, M.; and MATSUMOTO, T.; Blood transfusion and HTLV-I associated myelopathy. *Lancet*, 1986; 2:104.
- POIESZ, B.J.; RUSCETTI, F.W.; GAZDAR, A.F.; BUNN, P.A.; MINNA, J.D.; and GALLO, R.C.; 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, 1980; 77:7415.
- POPOVIC, M.; SARNGADHARAN, M.G.; READ, E.; and GALLO, R.C.; Detection, isolation and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science*, 1984; 224:497.
- YOSHIKI, M.; FURUKAWA, M.; TAKEHARA, Y.; YOSHIMURA, K.; MIYAMOTO, K.; MATSUNRA, T.; MORISHIMA, Y.; TAJIMA, K.; OKOCHI, K.; and HINUMA, Y.; Prevalence of possible adult T-cell leukemia virus-carriers among volunteer blood donors in Japan. *Int. J. Cancer*, 1984; 33:717.

Pedido de separatas:  
Ermelinda A. Cardoso  
Laboratório de Virulogia  
Instituto Português de Oncologia de Francisco Gentil  
1093 Lisboa Codex