



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOLOGIA DE AGENTES INFECCIOSOS E PARASITÁRIOS

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E IMUNOLÓGICA DA
INFECÇÃO PELO VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T
HUMANAS**

LUCINDA ASSUNÇÃO GUSTAVO SOUZA

Belém-Pará
2009

LUCINDA ASSUNÇÃO GUSTAVO SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E IMUNOLÓGICA DA
INFECÇÃO PELO VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T
HUMANAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto.

Belém-Pará
2009

LUCINDA ASSUNÇÃO GUSTAVO SOUZA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E IMUNOLÓGICA DA INFECÇÃO PELO
VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Banca Examinadora: Prof. Dr. Ricardo Ishak
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Prof. Dr. José Alexandre Rodrigues Lemos
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Prof. Dr. Marcio Roberto Teixeira Nunes
Instituto Evandro Chagas, IEC

Prof. Dr. Luiz Fernando Almeida Machado (suplente)
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Belém, 08 de maio de 2009.

Ainda que eu tenha o dom de profetizar e conheça todos os mistérios e toda a ciência; ainda que eu tenha tamanha fé ao ponto de transportar montes, se não tiver amor, nada serei.

(1Cor 13, 2).

**À minha amada mãe Rosa Maria; ao meu
querido e amado irmão Lisandro Fídias;
ao nosso anjinho Gabriel; à minha
irmãzinha Ingrid.**

**Aos meus avôs Pedro e Lucinda;
à minha tia Antonia das Graças.**

**Ao meu grande e único amor,
Allan Sousa.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, minha fonte de coragem, de inspiração, de amor e quem me carregou nos braços nos momentos mais difíceis desta caminhada e sempre esteve ao meu lado mostrando-me o melhor caminho a ser seguido.

Aos Professores Dr. Ricardo Ishak e Dra. Marluísa Ishak pelo apoio e por permitirem o desenvolvimento deste e de outros trabalhos no Laboratório de Virologia da Universidade Federal do Pará.

À equipe de professores do Laboratório de Virologia: Dr. Luiz Fernando, Msc. Vânia Nakauth e Msc. Rosimar Neris pela amizade e valiosos conselhos.

Ao Prof. Dr. Antonio Vallinoto, meu orientador neste e em todos os trabalhos que já realizei, pelas críticas, conselhos, conversas, amizade e pela dedicação que me foi dada em todos estes anos que estive no Laboratório de Virologia e que, de fato, foi um mestre pra mim.

À Dra. Rita Catarina Medeiros Sousa e sua equipe pelo apoio direto ao desenvolvimento deste trabalho e aos grupos de pacientes estudados por terem aceitado participar deste projeto.

Aos amigos do Laboratório de Virologia por toda a ajuda e amizade: Núbia Caroline, Jacqueline, Lúcio, Stéphanie, Isabella, Jamilla, Iran, Felipe, Leonardo, Juliana e Yuri. Em especial à Rafaela, Ethienne, Larissa, Carolina Miranda e Bárbara pela amizade e que contribuíram diretamente para a realização deste trabalho.

Aos amigos Ruy Parijós e Paulo dos Santos que me ajudaram a concluir este trabalho por meio de compreensão e de conselhos que levarei para a vida toda.

Às minhas amigas Renata Hermes e Elizabete Pires pela grande amizade que construímos ao longo desses anos, superando obstáculos, conversando muito, rindo e chorando juntas. À minha amiga Giselle Pena de Oliveira, com quem, apesar da distância, mantenho a grande amizade de sempre, e de quem sempre recebo forças e pensamentos positivos.

Às minhas amigas Marly Rose e Marcelle pela amizade que vem desde a infância, com força, uma torcendo pela outra, sempre juntas.

À minha amada mãe Rosa Maria Gustavo pelo eterno amor, carinho, amizade, muita força... Por ter me ensinado a sempre buscar o caminho do bem, digno, honesto e da justiça... Por ser incansável na busca da felicidade e ser meu exemplo de mulher.

Ao meu querido e amado irmão Lisandro, que mesmo distante, sinto seu amor, carinho, paciência, amizade, atenção e uma torcida inigualável. E ao nosso amado Gabriel que nos trouxe e traz muita luz e a quem desejo bênçãos de Deus sempre. Saudades de vocês.

À minha avó Lucinda por sempre nos passar sua sabedoria e cuidar de todos com muito amor.

Agradeço ao meu avô e pai Pedro, que me criou como filha e apesar de não estar mais entre nós, deixou a sua força e determinação como exemplo.

A toda minha família: meus tios Antônia das Graças, Pedro Luiz, Manoel, Idevone; meus primos e irmãos Kelly, Fábio, Fernando e Ingrid; Gilmar e Jamyle com toda sua família que sempre me acolheram com muito carinho. A todos, que participaram direta ou indiretamente deste trabalho, obrigada pelo apoio e incentivo.

Aos senhores José Maria, Marlito Portugal, Angela Sousa e Joana Pantoja, e à amiga e cunhada de coração Alanna Sousa pela torcida, força, ajudas, conselhos e pelos quais tenho grande amizade e carinho.

E de maneira muito especial, agradeço ao meu amor, Allan Sousa, por todo o amor, carinho, amizade e companheirismo que me foram dedicados. Pela força, sempre me incentivando a continuar nos momentos mais difíceis... Pelos conselhos, pelas críticas construtivas, por me fazer rir, pelos momentos maravilhosos, e também por aqueles em que tivemos dificuldades, com os quais aprendi a crescer... Onde eu estiver você estará comigo... No meu coração... Estarei sempre ao seu lado, torcendo por sua felicidade... Amo você.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS	12
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE FIGURAS	14
RESUMO	15
ABSTRACT	16
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 O VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS (HTLV)	17
1.1.1 Histórico.....	17
1.2 BIOLOGIA DO HTLV.....	19
1.2.1 Morfologia do HTLV.....	19
1.2.2 Genoma do HTLV	21
1.2.3 Variabilidade genética do HTLV	25
1.2.4 Replicação do HTLV	28
1.3 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	30
1.3.1 Distribuição do HTLV no mundo.....	30
1.3.2 Distribuição do HTLV no Brasil	34
1.3.3 Distribuição do HTLV na Amazônia	37
1.3.4 Transmissão do HTLV	39
1.4 PATOLOGIAS ASSOCIADAS À INFECÇÃO PELO HTLV-1	42
1.4.1 Leucemia/linfoma de células T do adulto (LLcTA)	42
1.4.2 Paraparesia espástica tropical/Mielopatia associada ao HTLV (PET/MAH) ...	44
1.4.2.1 Carga proviral e níveis de linfócitos T CD4+ e CD8+ associados à PET/MAH....	47
1.5 PATOLOGIAS ASSOCIADAS À INFECÇÃO PELO HTLV-2	49

1.6 OBJETIVOS	50
1.6.1 Objetivo Geral	50
1.6.2 Objetivos Específicos	50
2 MATERIAL E MÉTODOS	51
2.1 DESENHO DE ESTUDO.....	51
2.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS INVESTIGADAS	52
2.2.1 Indivíduos sintomáticos soropositivos para HTLV	52
2.2.2 Indivíduos assintomáticos soropositivos para HTLV	54
2.2.3 Indivíduos controles soronegativos para HTLV	55
2.3 ASPECTOS ÉTICOS	55
2.4 SOROLOGIA	56
2.5 EXTRAÇÃO DO DNA	56
2.6 REAÇÃO EM CADEIA MEDIADA PELA POLIMERASE (PCR).....	56
2.6.1 Amplificação da região <i>pX</i>	57
2.6.2 Amplificação da região 5'<i>LTR</i> do HTLV-1	58
2.6.3 Amplificação da região 5'<i>LTR</i> do HTLV-2	59
2.7 ELETROFORESE	60
2.8 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DA PCR.....	60
2.9 SEQUENCIAMENTO.....	61
2.9.1 Precipitação do DNA sequenciado	62
2.9.2 Eletroforese do DNA sequenciado	62
2.10 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS	62
2.10.1 Edição e alinhamento das sequências	62
2.10.2 Análise nucleotídica	63

2.10.3 Análise filogenética	63
2.10.3.1 Método de agrupamento de vizinhos (<i>Neighbor-Joining</i>).....	63
2.11 CARACTERIZAÇÃO DA CARGA PROVIRAL	64
2.12 QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD4 ⁺ E LINFÓCITOS T CD8 ⁺	64
2.13 MÉTODOS ESTATÍSTICOS.....	64
3 RESULTADOS	66
3.1 REAÇÃO EM CADEIA MEDIADA PELA POLIMERASE.....	66
3.1.1 Amplificação da região <i>pX</i> pela PCR	66
3.1.2 Análise de Polimorfismo com Enzimas de Restrição (RFLP) da região <i>pX</i>	66
3.1.3 Amplificação da região 5'<i>LTR</i> do HTLV-1 pela PCR	70
3.1.4 Amplificação da região 5'<i>LTR</i> do HTLV-2 pela PCR	71
3.2 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS	72
3.2.1 Análise nucleotídica da região 5'<i>LTR</i> do HTLV-1 e do HTLV-2	72
3.2.2 Análise filogenética	73
3.3 CARACTERIZAÇÃO DA CARGA PROVIRAL	77
3.4 QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD4 ⁺ E T CD8 ⁺	78
4 DISCUSSÃO	82
5 CONCLUSÕES	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
ANEXOS	

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Critérios de diagnóstico de PET/MAH, segundo a OMS (1989)	45
Quadro 2 – Níveis de definição diagnóstica de PET/MAH.....	47
Quadro 3 – Indivíduos sintomáticos, segundo suas manifestações neurológicas.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Iniciadores utilizados nas reações de <i>Nested PCR</i> da região <i>pX</i>	57
Tabela 2 - Iniciadores utilizados nas reações de <i>Nested PCR</i> da região <i>5'LTR</i> do HTLV-1	59
Tabela 3 - Iniciadores utilizados nas reações de <i>Nested PCR</i> da região <i>5'LTR</i> do HTLV-2	60
Tabela 4 – Distribuição da infecção, por tipo de HTLV, entre os grupos analisados	69
Tabela 5 – Estatística descritiva dos valores de carga proviral	77
Tabela 6 – Estatística descritiva dos níveis de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da estrutura morfológica do HTLV	20
Figura 2 - Organização genômica dos HTLV-1 e HTLV-2.....	22
Figura 3 - Representação esquemática dos genes que constituem o DNA proviral do HTLV e seus respectivos produtos protéicos	25
Figura 4 - Classificação dos subtipos de HTLV-1.....	27
Figura 5 - Esquema do ciclo de replicação do HTLV	30
Figura 6 - Mapa indicando países endêmicos para o HTLV-1	32
Figura 7 - Prevalência da infecção por HTLV-1/2 (por 1000 indivíduos)	37
Figura 8 – Algoritmo da metodologia utilizada.....	65
Figura 9 – Perfil eletroforético da região <i>pX</i>	66
Figura 10 – Distribuição dos tipos de HTLV entre os portadores da infecção em geral....	67
Figura 11 – Perfil de RFLP, com a enzima <i>TaqI</i> , a partir da região <i>pX</i>	68
Figura 12 – Distribuição dos tipos de HTLV entre assintomáticos e sintomáticos.....	70
Figura 13 – Perfil eletroforético da região 5' <i>LTR</i> do HTLV-1.....	71
Figura 14 – Perfil eletroforético da região 5' <i>LTR</i> do HTLV-1.....	72
Figura 15 – Árvore enraizada das cepas de HTLV-1	75
Figura 16 – Árvore enraizada das cepas de HTLV-2	76
Figura 17 – Distribuição das médias de carga proviral	78
Figura 18 - Distribuição das médias de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺	80
Figura 19 – Análise das diferenças entre as médias de linfócitos T CD4 ⁺	81
Figura 20 – Análise das diferenças entre as médias de linfócitos T CD8 ⁺	81

RESUMO

O presente estudo teve como objetivos efetuar a caracterização molecular e imunológica da infecção pelo HTLV em 42 portadores assintomáticos da infecção pelo HTLV; e 19 portadores com sintomas neurológicos associados à infecção (16 com PET/MAH e outros três com neuropatia periférica). Outro grupo de 100 indivíduos soronegativos para HTLV procedentes de Belém-PA também foi analisado. As amostras de sangue foram processadas para realização da sorologia para HTLV, para contagem de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (incluindo os soronegativos), para as técnicas de quantificação da carga proviral do HTLV e caracterização dos tipos e subtipos de HTLV circulantes nos infectados. Entre os 42 assintomáticos, foi positiva para o HTLV-1 35 amostras (83.3%), e para o HTLV-2 07 amostras (16.7%) ($p < 0.0001$). Entre os 19 sintomáticos, foi positiva para o HTLV-1 18 amostras (94.7%), e para o HTLV-2 01 amostra (5.3%) ($p = 0.0002$), onde as 16 amostras que tiveram diagnóstico de PET/MAH foram positivas HTLV-1. As análises filogenéticas das regiões 5'*LTR* agruparam 34 amostras (60%) de HTLV-1 no Subgrupo Transcontinental do Subtipo Cosmopolita; e 05 amostras (72.2%) de HTLV-2, no subtipo HTLV-2c. As médias de distribuição dos níveis de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ foi maior entre os sintomáticos, porém não havendo diferenças significantes quando comparados com os assintomáticos e controles soronegativos. Foi observada uma maior média de carga proviral entre os portadores sintomáticos quando comparados aos assintomáticos ($p = 0.0123$). Os resultados obtidos confirmam a ocorrência de PET/MAH associada à infecção pelo HTLV-1 na região de Belém-PA. A predominância do subtipo A de HTLV-1 corrobora outros resultados que demonstram a presença deste subtipo como o mais prevalente em áreas urbanas do Brasil, assim como a predominância de HTLV-2c entre as infectadas pelo HTLV-2 confirma a maior frequência deste subtipo na Amazônia brasileira, ressaltando que dentre as amostras de HTLV-2 está a de um paciente sintomático (neuropatia periférica). A maior média de carga proviral entre sintomáticos corrobora resultados de achados que associam esta variável ao desenvolvimento de PET/MAH entre os infectados pelo HTLV. Sendo assim, estes resultados indicam ainda a necessidade do monitoramento da descrição de casos de infecção pelo HTLV com diagnóstico clínico-laboratorial adequado.

ABSTRACT

This study aimed to perform the immunological and molecular characterization of HTLV in 42 asymptomatic carriers of HTLV, and 19 patients with neurological symptoms associated with infection (16 with HAM / TSP and three with peripheral neuropathy). Another group of 100 subjects seronegative for HTLV from Belém-PA was also analyzed. The blood samples were processed to perform HTLV serologic analysis, for cytometric analysis of CD4+ and CD8+ T lymphocytes (including seronegative), for quantification of HTLV proviral load and characterization of HTLV types and subtypes that infected symptomatic and asymptomatic carriers. Among the 42 asymptomatic carriers were positive 35 samples for HTLV-1 (83.3%), and 07 samples were for HTLV-2 (16.7%) ($p < 0.0001$). Among the 19 symptomatic carrier, 18 samples were positive for HTLV-1 (94.7%), and 01 sample was for HTLV-2 (5.3%) ($p = 0.0002$), where 16 samples had a diagnosis of HAM / TSP were HTLV-1 positive. The phylogenetic analysis of 5'LTR regions grouped 34 samples (60%) of HTLV-1 in the Subgroup Transcontinental of Subtype Cosmopolita, and 05 samples (72.2%) of HTLV-2 in subtype HTLV-2c. The mean distribution of the levels CD4+ and CD8+ T lymphocytes was higher among symptomatic, but no significant differences when compared with the asymptomatic and seronegative controls. There was a higher mean proviral load among symptomatic individuals when compared to asymptomatic ($p = 0.0123$). The results show the molecular confirmation of tropical spastic paraparesis occurrence associated to HTLV-1 infection in Belém, Pará. Furthermore, the molecular characterization of the viral subtype corroborates the results of previous studies which demonstrated the presence of the HTLV-1 subtype A in the most of symptomatic infected patients, as well as urban population of Brazil. As the prevalence of HTLV-2c between infected by HTLV-2 confirmed the highest frequency of this subtype in Brazilian Amazon, emphasizing among the samples of HTLV-2 is a symptomatic patient (peripheral neuropathy). The highest mean proviral load between symptomatic corroborates findings involving this variable to the development of HAM / TSP among HTLV infected. Thus, these results emphasize the need to monitor the description of cases of HTLV infection with appropriate laboratory diagnosis.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS (HTLV)

1.1.1 Histórico

O Vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV) pertence à família *Retroviridae* que compreende vírus que infectam primariamente vertebrados, particularmente aves e mamíferos, determinando-lhes uma variedade de doenças como imunodeficiências, neoplasias e desordens neurodegenerativas, embora já tenham sido encontrados retrovírus infectando outros seres, além dos humanos, tais como insetos, moluscos e outros mamíferos (Andrada-Serpa *et al.*, 1994; Coffin, 1996). Entre os membros desta família, o HTLV e o *Vírus da imunodeficiência humana* (HIV) são os que possuem maior notoriedade entre os estudos científicos.

Os relatos pioneiros sobre o primeiro retrovírus humano identificado, o HTLV, deram-se em situações independentes, nos Estados Unidos (EUA) e no Japão, na década de 1980, que associaram a infecção por este vírus com diferentes neoplasias (Poiesz *et al.*, 1980; Yoshida *et al.*, 1982).

Inicialmente, foram isoladas e identificadas partículas de retrovírus a partir de uma linhagem linfoblastóide obtida de um paciente com Linfoma Cutâneo de Células T, nos EUA, sendo o agente, nesta ocasião, denominado de Vírus linfotrópico de células T humanas - HTLV (Poiesz *et al.*, 1980).

Posteriormente, pesquisadores japoneses isolaram partículas virais de células obtidas de pacientes advindos do sudoeste do Japão com quadros de Leucemia de Células T de Adultos (ATL, atualmente também chamado de Leucemia/linfoma de células T do Adulto - LLcTA), nomeando o agente viral encontrado de Vírus associado à leucemia de células T de adulto (ATLV) (Yoshida *et al.*, 1982).

Entretanto, estes dois estudos não estavam tratando de agentes virais diferentes, o que foi mostrado por meio da análise molecular comparativa das seqüências dos vírus isolados, tanto nos EUA por Poiesz *et al.* (1980), como no Japão por Yoshida *et al.* (1982), confirmando que ambos eram da mesma espécie de retrovírus, sendo, desta forma, padronizada a nomenclatura para Vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 - HTLV-1 (Watanabe *et al.*, 1984).

Foi possível associar, também, a infecção pelo HTLV-1 com uma doença neurológica degenerativa a partir de estudos soropidemiológicos que encontraram indivíduos soropositivos para o HTLV-1 com quadro de paraparesia espástica tropical no Caribe (Gessain *et al.*, 1985) e com mielopatia no sul do Japão (Osame *et al.*, 1986). Posteriormente, estas doenças tiveram suas nomenclaturas unificadas por apresentarem as mesmas características clínicas e laboratoriais, passando a se chamar de Paraparesia espástica tropical / Mielopatia associada ao HTLV-1 (PET/MAH ou TSP/HAM, em inglês) (Román & Osame, 1988).

O Vírus linfotrópico de células T humanas tipo 2 (HTLV-2) foi isolado pela primeira vez, no ano de 1982, a partir de células de um paciente com tricoleucemia (ou leucemia de células pilosas), sendo denominado desta forma porque, apesar do isolado estar relacionado com o HTLV-1, os testes imunológicos realizados mostraram que se estava a frente de um agente distinto, permitindo assim a determinação da existência de dois tipos virais (HTLV-1 e HTLV-2) (Kalyanaraman *et al.*, 1982).

Atualmente, descreve-se que o HTLV-2 está associado a raros casos de uma mielopatia semelhante à PET/MAH (Hjelle *et al.*, 1992; Murphy *et al.*, 1997; Araujo & Hall, 2004), além de não ter clara associação com o desenvolvimento de neoplasias (Feuer & Green, 2005).

Recentemente, dois novos tipos de HTLV foram descritos, o HTLV-3 e o HTLV-4, por meio da análise sorológica e molecular de amostras de habitantes do sul do Camarões (Calattini *et al.*, 2005; Wolfe *et al.*, 2005).

As amostras de HTLV-3, perante a análise filogenética, apresentaram elevada proximidade ao equivalente símio STLV-3 (Calattini *et al.*, 2005; Wolfe *et al.*, 2005). Enquanto que o HTLV-4 identificado é um membro de uma linhagem filogenética que é diferente de todos os tipos conhecidos de HTLV e STLV (Wolfe *et al.*, 2005).

Em adição, sugere-se que a transmissão dessas novas variantes se deu por transmissão cruzada entre espécies de STLV, uma vez que os indivíduos que apresentaram infecção por estes tipos virais relataram manter contato direto com primatas não-humanos através da caça, permitindo assim a emergência de novas cepas virais humanas (Wolfe *et al.*, 2005).

1.2 BIOLOGIA DO HTLV

1.2.1 Morfologia do HTLV

O HTLV-1 e o HTLV-2 pertencem à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae*, gênero *Deltaretrovirus* (ICTVdb, 2006). São vírus que apresentam propriedades biológicas e moleculares semelhantes, incluindo o tropismo preferencial por linfócitos T maduros com fenótipo CD4⁺ e CD8⁺ (Richardson *et al.*, 1990; Ijichi *et al.*, 1992; Lal *et al.*, 1995; Hall *et al.*, 1996; Nagai *et al.*, 2001).

Suas características morfológicas compreendem uma partícula viral na forma esférica que mede, aproximadamente, 100nm de diâmetro, a qual é envolvida externamente por um envelope glicolipoprotéico derivado da matriz lipídica da

membrana plasmática do hospedeiro associada às glicoproteínas virais de superfície gp46 e glicoproteínas transmembranas gp21. Juntamente à membrana do envelope, na parte interna do vírus, encontra-se a matriz formada pelas proteínas p19, a qual envolve o capsídeo icosaédrico composto pelas proteínas p15 e p24, assim formando o nucleocapsídeo. Esta estrutura abriga o genoma viral composto por duas fitas simples de RNA com polaridade positiva que estão associadas às enzimas: protease, transcriptase reversa, integrase e RNase H (Coffin,1996; Tangy, 1996; Kroon & Proietti, 2006; Figura 1).

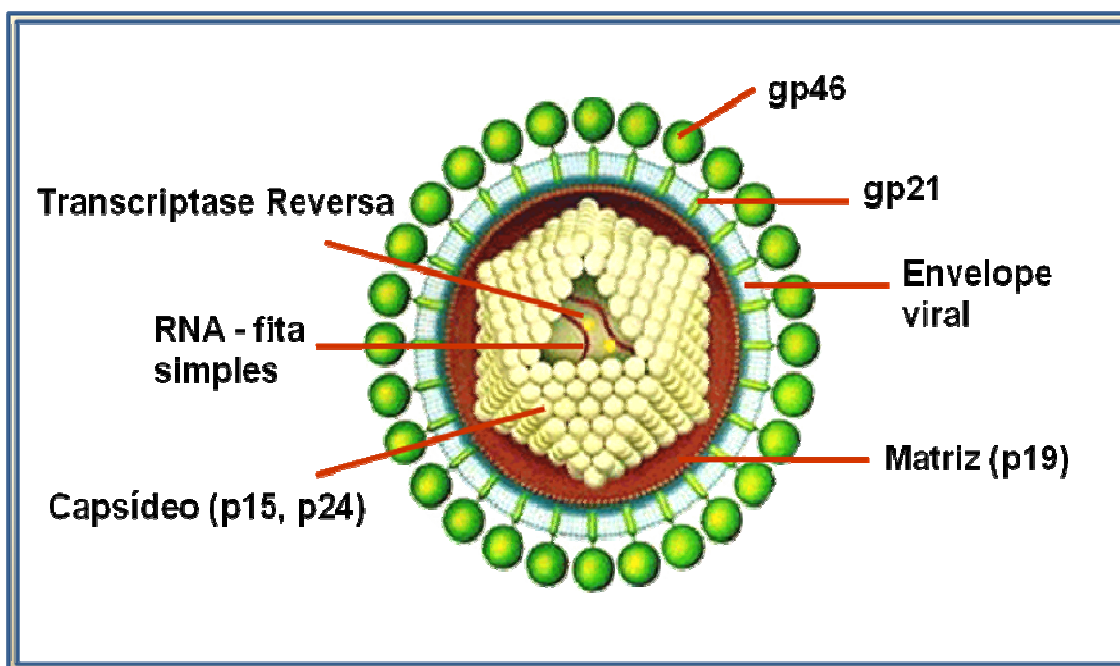


Figura 1: Esquema da estrutura morfológica do HTLV (adaptado de <http://www3.kmu.ac.jp/microbiol>).

1.2.2 Genoma do HTLV

Os HTLV-1 e o HTLV-2 apresentam estruturas genômicas semelhantes possuindo, aproximadamente, 70% de homologia em suas seqüências nucleotídicas (Feuer & Green, 2005). Demonstram, também, similaridades no tamanho do provírus inserido no ácido desoxirribonucléico (DNA) da célula hospedeira, onde o HTLV-1 tem uma extensão proviral de 9032pb (Seiki *et al.*, 1983) e o HTLV-2 de 8952pb (Shimotohno *et al.*, 1985).

O genoma do HTLV consiste de duas moléculas simples de ácido ribonucléico (RNA) com uma organização similar aos outros retrovírus, possuindo os genes essenciais *gag*, *pol* e *env*, uma região *pro* (sobreposta aos genes *gag* e *pol*) e outra região exclusiva do HTLV denominada *pX* que contém quatro fases de leitura aberta (*Open Reading Frames* – ORF): ORF I, ORF II, ORF III (*rex*), ORF IV (*tax*) e, para o HTLV-2 há, também, a ORF V. Flanqueando as extremidades do genoma viral, encontram-se as regiões longas repetidas denominadas *LTR* (*Long Terminal Repeats*) (Seiki *et al.*, 1983; Shimotohno *et al.*, 1985; Feuer & Green, 2005; Kroon & Proietti, 2006; Figura 2).

Três espécies de Ácidos Ribonucléicos mensageiros (mRNAs) são transcritos a partir do DNA proviral do HTLV: uma fita de RNA de seqüência completa (*unsplicing*) é utilizada para a síntese dos produtos dos genes *gag*, *pro* e *pol* e, também, para o RNA genômico que é reservado no interior dos vírus; um mRNA subgenômico que é sintetizado a partir de uma única etapa de processamento (*single-splicing*) e codifica o produto do gene *env*; e outro mRNA subgenômico que é produzido pela remoção de dois introns (*double-splicing*) e codifica as proteínas regulatórias da região *pX* (Coffin, 1996; Feuer & Green, 2005; Kroon & Proietti, 2006; Figura 2).

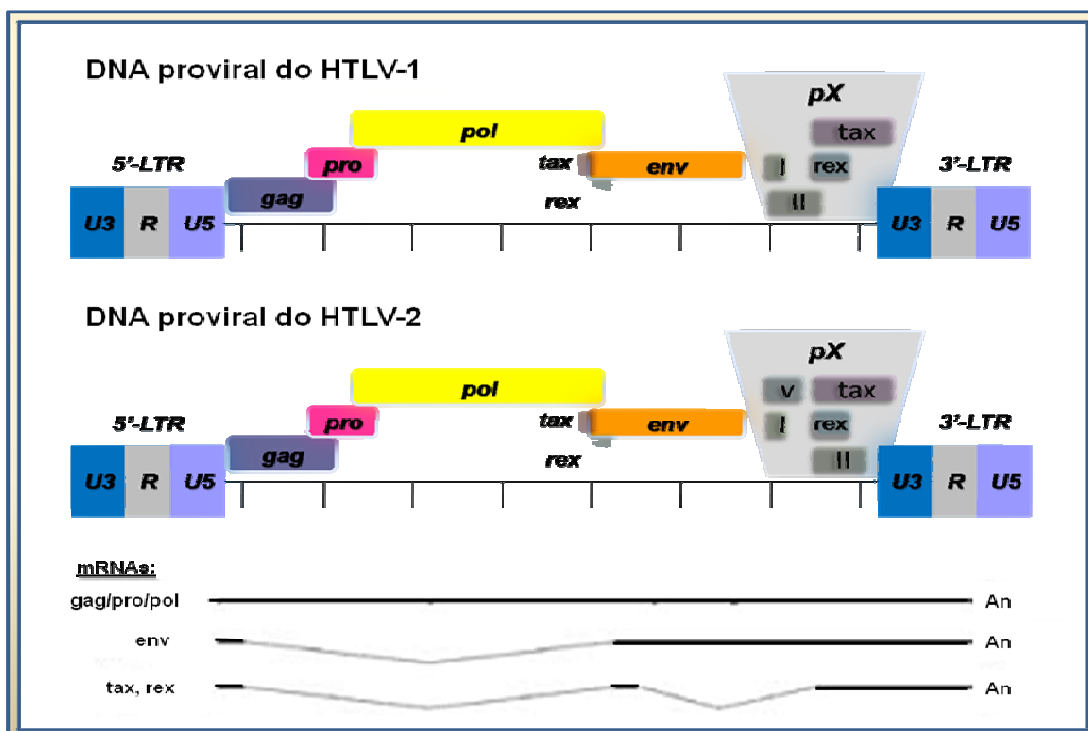


Figura 2: Organização genômica dos HTLV-1 e HTLV-2, demonstrando também os mRNAs transcritos do DNA proviral do HTLV (adaptado de Feuer & Green, 2005).

As regiões *LTR* são formadas pelos três domínios: U3, R e U5, em ambas as extremidades 5' e 3'. São fundamentais na integração do DNA proviral ao DNA da célula hospedeira e, também, na regulação da transcrição do genoma do HTLV, pois possuem sítios de ligação para a RNA polimerase celular, assim como, seqüências reguladoras de transcrição viral (*TATA box*, *enhancers* e sinal poli-A), desta forma apresentando a função de iniciador e de finalizador da transcrição (Gelmann *et al.*, 1984; Shimotohno *et al.*, 1985).

O gene *gag* inicia no códon ATG na posição nucleotídica 802 e termina com o códon TAA na posição 2089 no genoma do HTLV-1 (Seiki *et al.*, 1983). Este gene é inicialmente traduzido em um precursor polipeptídico, que posteriormente sofre clivagem em três proteínas finais: a proteína da matriz de 19kDa (p19) e as proteínas do

capsídeo p24 e p15, cada uma com 24kDa e 15kDa, respectivamente (Oroszlan *et al.*, 1982; Seiki *et al.*, 1983).

O gene *pro* é codificado em uma fase de leitura entre os genes *gag* e *pol*, localizado entre os nucleotídeos 2078 e 2611 do HTLV-2 (Shimotohno *et al.*, 1985), assim resultando em uma enzima denominada protease, a qual atua sobre as cadeias polipeptídicas virais, clivando-as para a formação das proteínas estruturais finais, sendo esta clivagem específica para as proteínas codificadas pelos genes *gag* e *pol* (Shimotohno *et al.*, 1985; Kroon & Proietti, 2006).

O gene *pol* localiza-se entre os nucleotídeos 2498 e 5185 do HTLV-1 (Seiki *et al.*, 1983). Este gene codifica as enzimas integrase, transcriptase reversa e RNAase H (a mesma transcriptase reversa, porém com um novo nome ao desempenhar função diferenciada), todas envolvidas na síntese e na integração do genoma viral, na forma de provírus, ao genoma da célula hospedeira (Seiki *et al.*, 1983; Shimotohno *et al.*, 1985; Hall *et al.*, 1994).

Entre a sequência de nucleotídeos 5180 a 6644 do HTLV-1, localiza-se o gene *env* que codifica as proteínas do envelope viral (Seiki *et al.*, 1983). Este gene codifica uma proteína precursora, que após clivagem proteolítica e glicosilação, dá origem à glicoproteína de superfície gp46 (SU) e à glicoproteína transmembrana gp21 (TM), sendo que a glicoproteína TM ancora a glicoproteína SU na superfície viral por meio de ligação não-covalente (Delamarre *et al.*, 1996).

A função das glicoproteínas do envelope é viabilizar a entrada do HTLV na célula hospedeira, uma vez que a infecção depende da interação entre a superfície do vírus com a superfície celular, onde a gp46 atua na adsorção viral ao receptor celular e a gp21 atua na fusão de membrana em que o cerne será introduzido no citoplasma da

célula hospedeira (Jinno *et al.*, 1999; Rosenberg *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 2005; Manel *et al.*, 2003, 2005).

Tratando-se da região *pX*, as ORFs I e II do HTLV-1 codificam as proteínas p12/p27 e p13/p30, respectivamente, enquanto que no HTLV-2 as ORFs I, II e V codificam p10, p28 e p11, respectivamente (Feuer & Green, 2005). A função destas proteínas na biologia do HTLV ainda não está muito bem esclarecida, entretanto há alguns estudos indicando que elas não têm um papel essencial na transformação de células T ativadas *in vitro* (Green *et al.*, 1995; Derse *et al.*, 1997), mas são importantes na habilidade dos vírus de infectarem, propagarem-se e persistirem *in vivo* (Cockerell *et al.*, 1996; Collins *et al.*, 1998; Bartoe *et al.*, 2000; Silverman *et al.*, 2004).

As ORFs principais da região *pX*, também melhor caracterizadas, são as ORFs III e IV que codificam as proteínas regulatórias Tax e Rex, respectivamente (Feuer & Green, 2005).

A proteína Tax atua no aumento da transcrição de genes virais a partir do domínio U3 da região 5'LTR (Cann *et al.*, 1985; Chen *et al.*, 1985; Felber *et al.*, 1985; Fujisawa *et al.*, 1985; Seiki *et al.*, 1986; Ross *et al.*, 1997), assim como um transativador de uma variedade de fatores da regulação celular que controlam a expressão gênica, a multiplicação e diferenciação da célula, o ciclo celular e a estabilidade genômica (Wang *et al.*, 2008). A Tax também tem efeito repressor na transcrição da proteína celular supressora de tumor p53, assim como influencia na transcrição de outras proteínas celulares como c-myc, c-myb, ciclina D e MAD-1 que estão envolvidas na regulação do controle mitótico (Kibler & Jeang, 2001).

A proteína Rex regula, de maneira pós-transcricional, a expressão de genes virais, facilitando principalmente a expressão citoplasmática de mRNAs virais que

têm um processamento incompleto (*incompletely splicing*) (Younis & Green, 2005). A Figura 3 apresenta um desenho esquemático de todos os genes que constituem o genoma do HTLV e seus respectivos produtos protéicos.

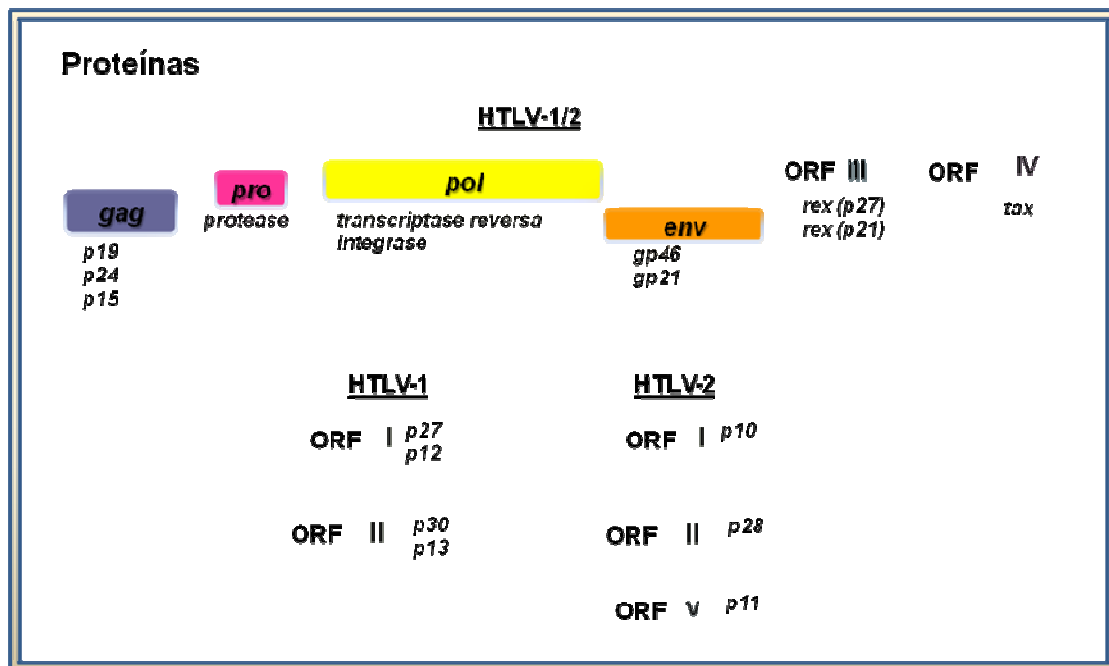


Figura 3: Representação esquemática dos genes que constituem o DNA proviral do HTLV e seus respectivos produtos protéicos (adaptado de Feuer & Green, 2005).

1.2.3 Variabilidade genética do HTLV

A importância da organização genômica do HTLV não somente se caracteriza pela descrição de seus produtos codificados, mas também pela descrição da variabilidade na seqüência de nucleotídeos do genoma viral que dá origem a quatro tipos descritos: HTLV-1, HTLV-2, HTLV-3 e HTLV-4, onde os dois últimos foram recentemente identificados, entretanto ainda necessitam de estudos posteriores para um maior esclarecimento sobre sua transmissão entre seres humanos, sua distribuição geográfica e sua capacidade de desencadear doenças em seus portadores (Wolfe *et al.*, 2005).

O HTLV-1 apresenta sete diferentes subtipos que foram identificados ao longo dos últimos anos por meio da análise filogenética da região *LTR* com isolados de todo o mundo (Vicente *et al.*, 2006; Figura 4). O HTLV-1a, também denominado subtipo Cosmopolita, apresenta isolados de diversas regiões geográficas (Miura *et al.*, 1994, 1997; Van Dooren *et al.*, 2001). O subtipo HTLV-1b, conhecido também como subtipo Centro-Africano, é denominado assim uma vez que contém isolado de populações da África Central (Hahn *et al.*, 1984; Vandamme *et al.*, 1994; Van Dooren *et al.*, 2001).

O HTLV-1c ou subtipo da Melanésia apresenta isolados diferentes da Papua Nova Guiné e de aborígenes da Austrália (Gessain *et al.*, 1991; Bastian *et al.*, 1993; Van Dooren *et al.*, 2001). O HTLV-1d foi descrito como um novo e distinto subtipo molecular isolado de pigmeus da República Democrática de Camarões e de um indivíduo infectado no Gabão (Chen *et al.*, 1995; Mahieux *et al.*, 1997; Van Dooren *et al.*, 2001).

Há também os subtipos HTLV-1e, que foi isolado de um pigmeu do Congo, e HTLV-1f oriundo de um indivíduo do Gabão (Salemi *et al.*, 1998; Van Dooren *et al.*, 2001); e, mais recentemente, o HTLV-1g que foi descrito como um novo subtipo da África Central (Wolfe *et al.*, 2005).

O subtipo Cosmopolita é dividido em cinco subgrupos, baseado em suas distribuições geográficas que são: A ou Transcontinental (presente em todo o mundo exceto na Melanésia, norte e oeste da África), B ou Japonês (inicialmente descrito no Japão, mas depois no Peru, Brasil, Chile e Colômbia), C ou Oeste-africano (presente no oeste da África, Caribe e Guiana Francesa), D ou Norte-africano (presente no norte da

África) (Gasmi *et al.*, 1994; Vidal *et al.*, 1994; Miura *et al.*, 1994), além do subgrupo E isolado em negros do Peru (Van Dooren *et al.*, 1998) (Figura 4).

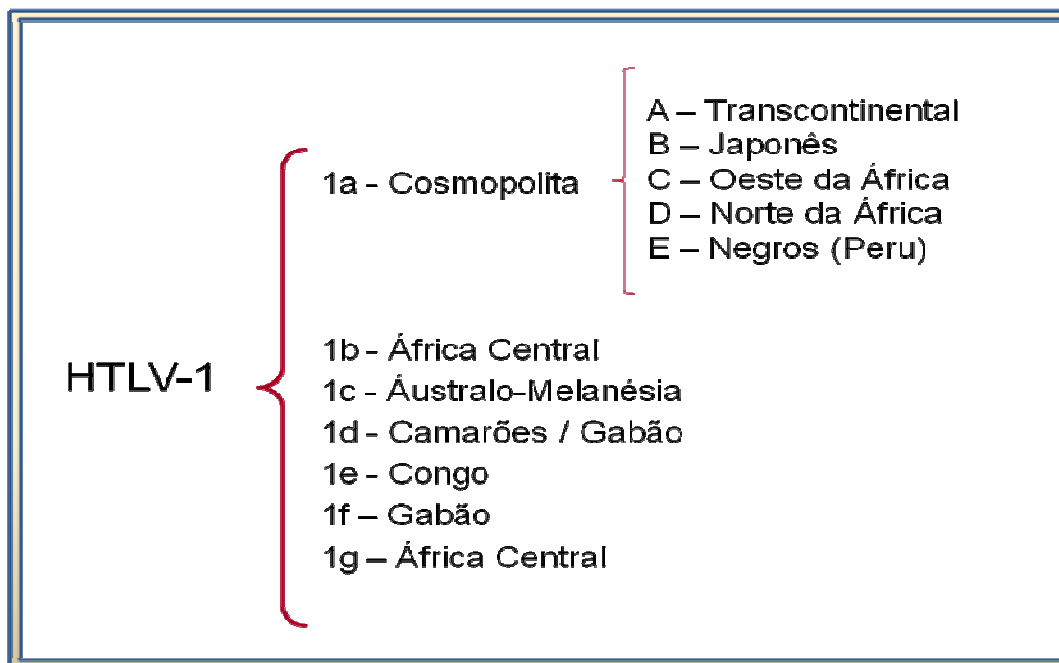


Figura 4: Classificação dos subtipos de HTLV-1 (adaptado de Vicente *et al.*, 2006).

Tratando do HTLV-2, existem quatro subtipos completamente caracterizados em termos moleculares: HTLV-2a, HTLV-2b, HTLV-2c e HTLV-2d. A primeira descrição da existência de dois subtipos moleculares distintos (HTLV-2a e HTLV-2b) foi baseada no polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (RFLP) da região *env* e na sequência nucleotídica da região *LTR* (Hall *et al.*, 1992; Dube *et al.*, 1993). Sendo, posteriormente, identificada uma diferença fenotípica entre estes dois subtipos, baseada na mutação que ocorre no gene da proteína Tax do subtipo 2b que aboliu um códon de parada, assim obtendo uma proteína com 25 aminoácidos a mais do que o subtipo 2a (Salemi *et al.*, 1995; Eiraku *et al.*, 1996).

O subtipo HTLV-2c foi encontrado em populações indígenas da Amazônia brasileira em um estudo que investigou a prevalência da infecção pelo

HTLV-2 nestas populações e em outro estudo que avaliou a transmissão vertical entre indígenas da tribo Kayapó (Ishak *et al.*, 1995, 2003), além de ser encontrado também em populações urbanas e em pacientes infectados pelo HIV (Vallinoto *et al.*, 2002; Laurentino *et al.*, 2005). Este subtipo, de maneira molecular, apresenta sequências nucleotídicas das regiões 5'*LTR* e *env* relacionadas às do HTLV-2a. Entretanto, de maneira fenotípica, está relacionado ao subtipo HTLV-2b, pois suas regiões *tax* e suas proteínas Tax são semelhantes (Eiraku *et al.*, 1996).

O HTLV-2d foi isolado uma única vez de uma amostra de um pigmeu que vive no Congo, sendo esta cepa a mais divergente de todos os subtipos já encontrados (Vandamme *et al.*, 1998).

1.2.4 Replicação do HTLV

O HTLV apresenta um ciclo de replicação típico dos retrovírus que se inicia com a adsorção do vírus por meio da ligação da glicoproteína de superfície gp46 ao receptor da membrana celular, o transportador de glicose GLUT1 (Manel *et al.*, 2003, 2005). A subunidade glicoprotéica transmembrana (gp21) atua na próxima etapa que é a fusão de membrana em que o cerne será introduzido no citoplasma da célula hospedeira (Kroon & Proietti, 2006).

Em seguida, no cerne viral introduzido no citoplasma, ocorre a transcrição do RNA viral em DNA de fita dupla pela ação da enzima Transcriptase Reversa, ocorrendo após este processo, o desnudamento do DNA formado por meio da dissociação do cerne viral, assim liberando o material genético para o citoplasma. Este DNA é transportado ao núcleo da célula hospedeira, onde será integrado ao genoma celular pela ação da Integrase, assim formando o provírus. Este processo de integração

marca o fim da fase precoce do ciclo, iniciando então a fase tardia que é caracterizada pela ação das enzimas do hospedeiro (Nisole & Saïb, 2004; Kroon & Proietti, 2006).

Logo, o provírus formado é transcrito, sintetizando um longo RNA viral que é processado para formar os mRNAs virais e o RNA genômico viral que serão, em seguida, transportados para o citoplasma celular, utilizando a maquinaria bioquímica celular. As proteínas virais são sintetizadas nos ribossomos a partir dos mRNAs, sendo algumas processadas pós-traducionalmente (Nisole & Saïb, 2004; Kroon & Proietti, 2006).

Então a montagem da partícula viral se inicia, onde as proteínas virais são processadas pela protease viral e, posteriormente, o RNA genômico é empacotado e as proteínas formadas darão origem à estrutura externa que forma as partículas virais. Estas são liberadas para o meio extracelular por brotamento, onde o envelope glicoprotéico é adicionado à partícula viral. Já no meio extracelular, o processamento de outras proteínas estruturais ocorre no interior do vírus, formando o capsídeo viral e originando a partícula madura. Estes vírus podem permanecer no fluido celular ou infectar novas células (Nisole & Saïb, 2004; Kroon & Proietti, 2006; Figura 5).

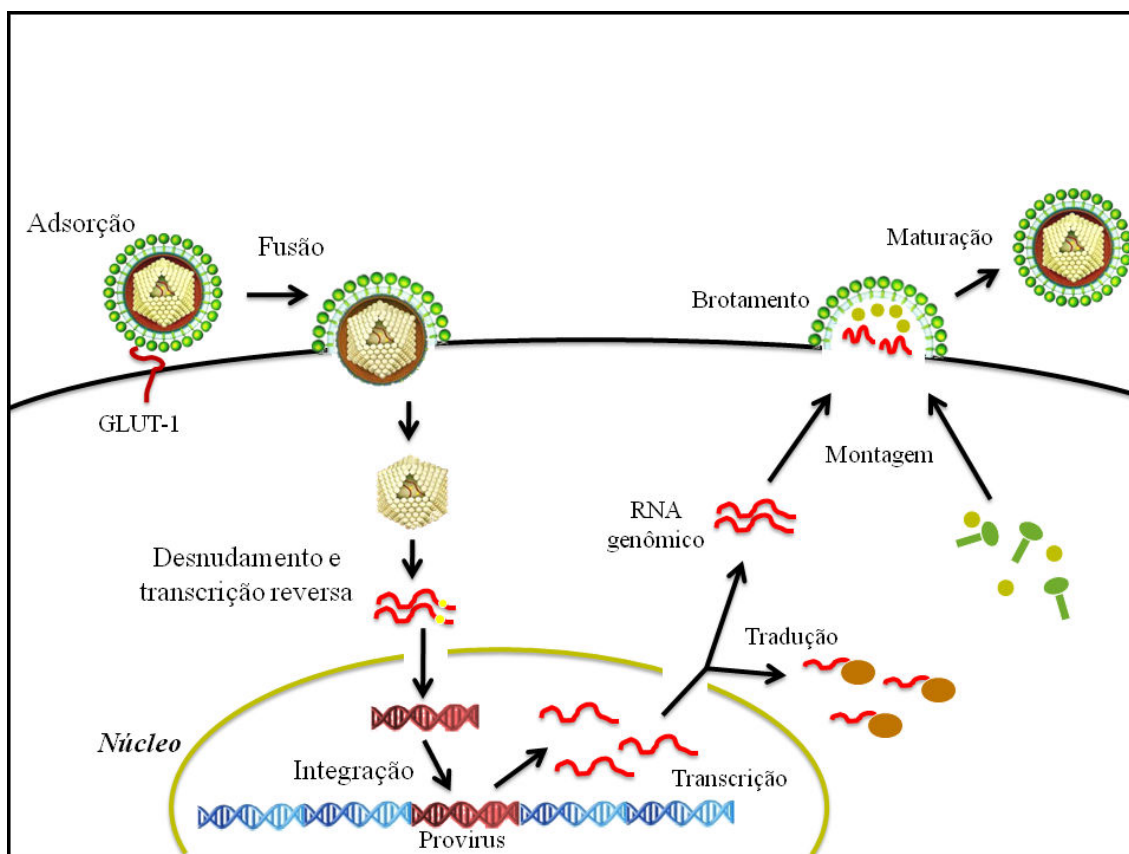


Figura 5: Esquema do ciclo de replicação do HTLV (adaptado de Nisole & Saib, 2004).

1.3 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

1.3.1 Distribuição do HTLV no mundo

Atualmente, estima-se que cerca de 20 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HTLV no mundo, mas as taxas de soroprevalência variam de acordo com a área geográfica, a composição sócio-demográfica da população estudada e os comportamentos de risco de grupos individuais (Proietti *et al.*, 2005; Catalan-Soares & Proietti, 2006). Como por exemplo, relata-se uma elevada taxa de prevalência (37%) no sudoeste do Japão (Yamaguchi, 1994; Mueller *et al.*, 1996), em contraste com taxas muito baixas de prevalência (0.0039%) em doadores de sangue franceses (Couroucé *et al.*, 1993).

Entretanto, as informações sobre taxas de prevalência da infecção pelo HTLV-1, em amostras representativas da população em geral, não são comuns. Muitos dados sobre essas taxas provêm de estudos em doadores de sangue ou em grupos populacionais selecionados como grávidas, pacientes com doença neurológica ou hematológica, descendentes de pessoas infectadas, nativos, usuários de drogas injetáveis (UDI) e prostitutas (Mueller, 1991; Ferreira Júnior *et al.*, 1997; Manns *et al.*, 1999).

O Japão foi a primeira região a ser identificada como endêmica para o HTLV, com taxas de prevalência que variam de 0 a 37%, principalmente em áreas localizadas no sudoeste do país (Shikoku, Kyushu e Okinawa) (Goto *et al.*, 1997). Em adição, de um modo geral, taxas relativamente elevadas da soroprevalência de HTLV-1 ou HTLV-1/2 na população geral ou em grupos de indivíduos específicos, como gestantes e doadores de sangue, são encontradas no Japão com taxas acima de 10% (Yamaguchi, 1994; Mueller *et al.*, 1996), em vários países do Caribe, como a Jamaica (aproximadamente 6%) (Murphy *et al.*, 1991), em países da África Sub-Saariana como Benin, Camarões e Guiné-Bissau (acima de 5%) (Dumas *et al.*, 1991; Gessain & de The, 1996; Andersson *et al.*, 1997; Sarkodie *et al.*, 2001) e em áreas do Irã e Melanésia (menos de 5%) (Mueller, 1991; Manns *et al.*, 1999).

Em alguns países da América do Sul, taxas de soroprevalência um pouco mais baixas são encontradas (Castillo *et al.*, 2000; Carneiro-Proietti *et al.*, 2002; Kazanji & Gessain, 2003; Pouliquen *et al.*, 2004). Dados da Guiana Francesa, Venezuela, Peru e Argentina revelam uma taxa de soropositividade acima de 2% para HTLV-1/2 geralmente com dados de doadores de sangue (Kazanji & Gessain, 2003; León *et al.*, 2003; Sanchez-Palacios *et al.*, 2003; Gastaldello *et al.*, 2004).

Em relação a áreas geográficas não endêmicas como a Europa e América do Norte, a infecção é geralmente encontrada entre imigrantes de áreas endêmicas, seus filhos e contatos sexuais, entre usuários de drogas injetáveis e prostitutas (Proietti *et al.*, 2005). Entre doadores de sangue da Europa e América do Norte, encontra-se taxas de soroprevalência muito baixas como 0.01–0.03% nos EUA e Canadá (Murphy *et al.*, 1991; Chiavetta *et al.*, 2003), taxa de 0.002% na Noruega (Stigum *et al.*, 2000) e taxa de 0.0056% na Grécia (Tseliou *et al.*, 2003) (Figura 6).

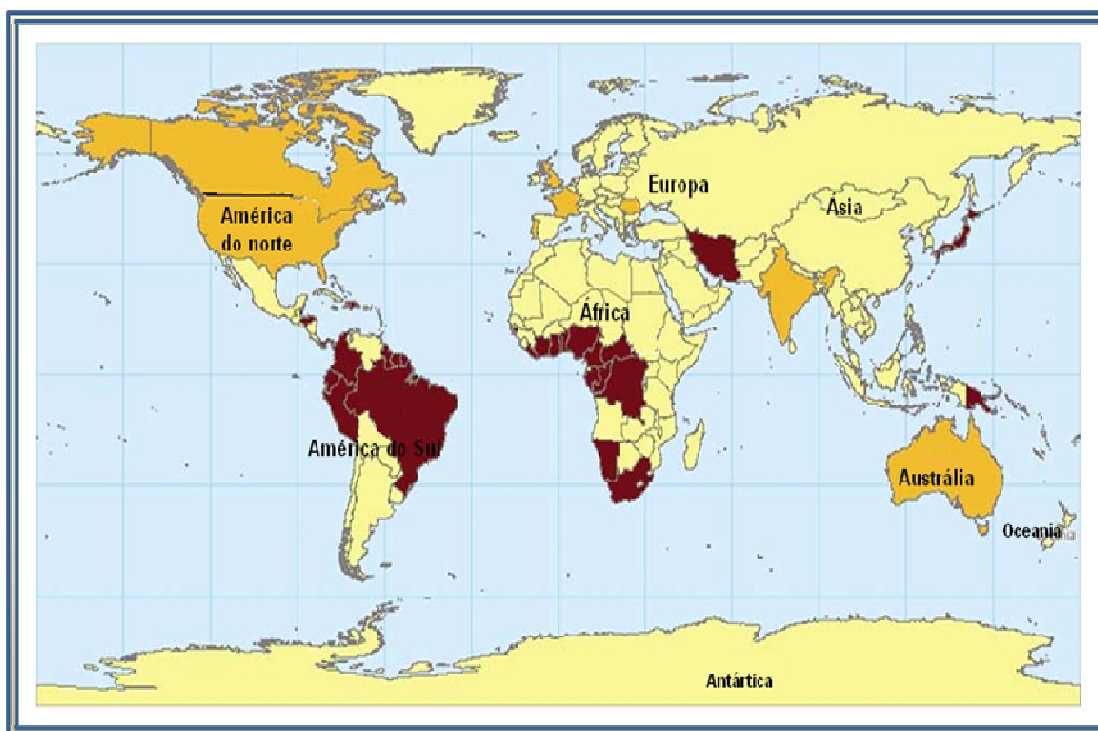


Figura 6: Mapa indicando países endêmicos para o HTLV-1. Na cor marrom escuro são encontrados países que possuem áreas com prevalência que varia de 1 a 5%. Na cor laranja, destacam-se os países com baixa prevalência (menor que 1% em alguns grupos) devido ao processo de imigração das áreas endêmicas (adaptado de Proietti *et al.*, 2005).

A distribuição geográfica do HTLV-2, por sua vez apresenta um perfil diferenciado daquele descrito para o HTLV-1, ocorrendo mais frequentemente entre grupos populacionais distintos e aparentemente não relacionados entre si, habitando diversas áreas geográficas (Ministério da Saúde, 2004).

Na América do Sul, o HTLV-2 está presente em distintas populações da Colômbia, Argentina e Brasil, onde três subtipos moleculares, o HTLV-2a e HTLV-2b foram identificados em indígenas e UDI (Dube *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1993; Ishak *et al.*, 1995; Eiraku *et al.*, 1996; Switzer *et al.*, 1996), e HTLV-2c encontrado em indígenas (Ishak *et al.*, 1995, 2001).

O HTLV-2 também está presente na América do Norte (Hjelle *et al.*, 1993) e na América Central (Heneine *et al.* 1991). E além das populações indígenas ameríndias, o HTLV-2, também, foi encontrado em áreas urbanas, entre usuários de drogas injetáveis da Europa e da América do Norte (Ehrlich *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1989; Egan *et al.*; 1999). No continente asiático, a soroprevalência deste subtipo restringiu-se aos nativos da Mongólia (Hall *et al.*, 1994).

No continente africano, a infecção pelo HTLV-2 foi evidente em diferentes comunidades de pigmeus (Goubau *et al.*, 1993) e, particularmente, em pigmeus do Camarões (Mauclère *et al.*, 1997). Na região do Congo, foi encontrado o novo subtipo HTLV-2d em pigmeus de Efe Bambuti com as seqüências mais divergentes entre os HTLV-2 até então conhecidos (Vandame *et al.*, 1998). Estudos realizados na cidade de Dakar, Senegal, encontraram uma soroprevalência de HTLV-1 e de HTLV-2 de 0,16% em doadores de sangue, sendo sete identificados como HTLV-1a, subtipo Cosmopolita e um como HTLV-2 (Diop *et al.*, 2006).

1.3.2 Distribuição do HTLV no Brasil

Estudos de prevalência em grupos específicos confirmam a presença do HTLV-1 e HTLV-2 em todo o Brasil. Sendo possível que o HTLV-1 tenha chegado ao país principalmente pelo tráfico de escravos vindos da África, assim como pela imigração japonesa, enquanto que o HTLV-2, de maneira mais remota, pode ter origem associada à imigração de asiáticos e ancestrais dos povos indígenas em tempos pré-colombianos (Catalan-Soares & Proietti, 2006).

No Brasil, desde 1989, há estudos relatando a ocorrência de HTLV-1 e HTLV-2, assim como a ocorrência da infecção por estes agentes associados com doenças (Cortes *et al.*, 1989; de Oliveira *et al.*, 1990; Proietti *et al.*, 1994; Galvão-Castro *et al.*, 1997). A infecção pelo HTLV-1 e pelo HTLV-2 encontra-se presente em todas as regiões brasileiras, mas as prevalências variam de um estado para o outro, sendo mais elevadas na Bahia, Pernambuco, Maranhão e no Pará (Dourado *et al.*, 2003; Catalan-Soares *et al.*, 2005). Sendo que, baseado nos diversos estudos sorológicos conduzidos no país, estima-se que haja cerca de 750.000 portadores do HTLV no Brasil (Ministério da Saúde, 2004).

A infecção pelo HTLV-1 é, no Brasil, considerada endêmica, mas quando comparada com os índices de prevalência do Japão, apresentam valores inferiores na população geral (Farias de Carvalho *et al.*, 1997; Galvão-Castro *et al.*, 1997).

Um estudo realizado na Bahia avaliou a soroprevalência de HTLV-1 e HTLV-2 em cidades do interior do Estado (Catolândia, Ipujiara, Jacobina e Prado), onde se observou uma prevalência geral de HTLV-1 de 0,3%, sendo que nenhum indivíduo apresentou anticorpos anti-HTLV-2 (Brito *et al.*, 1998). Em outro estudo

desenvolvido no mesmo Estado, mas com mulheres grávidas, foi encontrada uma prevalência de 0,84% para o HTLV-1 (Bittencourt *et al.* 2001).

Em 2003, na cidade de Salvador, Bahia, foi conduzida uma pesquisa em uma amostra representativa da população geral desta cidade constituída de 1385 indivíduos, sendo observada uma prevalência para HTLV-1 de 1,76% (Dourado *et al.*, 2003). Na Bahia, relata-se, também, de maneira importante, a soroprevalência de 35,2% para HTLV-1/2 entre UDIs (Ministério da Saúde, 2004).

No Estado do Ceará, um estudo realizado em 191 amostras sororreativas para HTLV-1/2 por ELISA de indivíduos atendidos no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Estado do Ceará (HEMOCE), demonstrou a confirmação dos resultados por Western-Blot para HTLV-1 e HTLV-2 em 73 amostras (38%) e resultado indeterminado em 118 (62%) (Santos *et al.*, 2003). Notam-se também neste estado, os primeiros casos comprovados de associação de PET/MAH ao HTLV-1 na capital Fortaleza (Castro-Costa *et al.*, 1991)

No Rio de Janeiro, foi encontrada uma soroprevalência para HTLV de 4% em homossexuais, 9% entre profissionais do sexo (no Rio de Janeiro e Minas Gerais) (Ministério da Saúde, 2004), além de uma prevalência de 16,5% entre UDIs (Guimarães *et al.*, 2001). Outro estudo realizado no Rio de Janeiro, observou uma taxa de prevalência de 18,2% entre pacientes com doença hematológica (Ministério da Saúde, 2004).

No Estado de São Paulo, em um estudo realizado com amostra representativa de doadores do banco de sangue do estado, foi identificada uma prevalência de 0,15% para o HTLV-1 e 0,03% para o HTLV-2 (Ferreira Júnior *et al.*, 1995). Encontra-se, também neste Estado, taxas de soroprevalência para HTLV de 10%

entre pacientes com Aids e 1% entre portadores assintomáticos do HIV (Ministério da Saúde, 2004).

Na região Sul do Brasil, foi realizado um estudo soroepidemiológico demonstrando a infecção pelo HTLV-2 entre os índios Guarani com uma taxa de soropositividade de 5,76% (3/52) (Menna-Barreto *et al.*, 2005). No Paraná, foi relatada uma taxa de infecção de 6,5% entre indivíduos co-infectados por HIV/HTLV (Morimoto *et al.*, 2005).

Foi realizada uma importante pesquisa conduzida para determinar e quantificar a distribuição geográfica das taxas de prevalência para HTLV-1 e HTLV-2 em candidatos a doadores de sangue, de 27 áreas urbanas correspondendo às capitais de cada um dos Estados brasileiros e do Distrito Federal, no período de 1995 a 2000 (Catalan-Soares *et al.*, 2005). As taxas de prevalência médias obtidas apresentaram grande heterogeneidade na distribuição geográfica, variando de 0,4/1.000 em Florianópolis, na Região Sul, até uma taxa 25 vezes maior, 10/1.000 em São Luís, na Região Nordeste. Sendo observado que, em média, as taxas de soropositividade são menores nas capitais do sul do país, tendendo a aumentar em direção ao Nordeste e Norte (Figura 7).

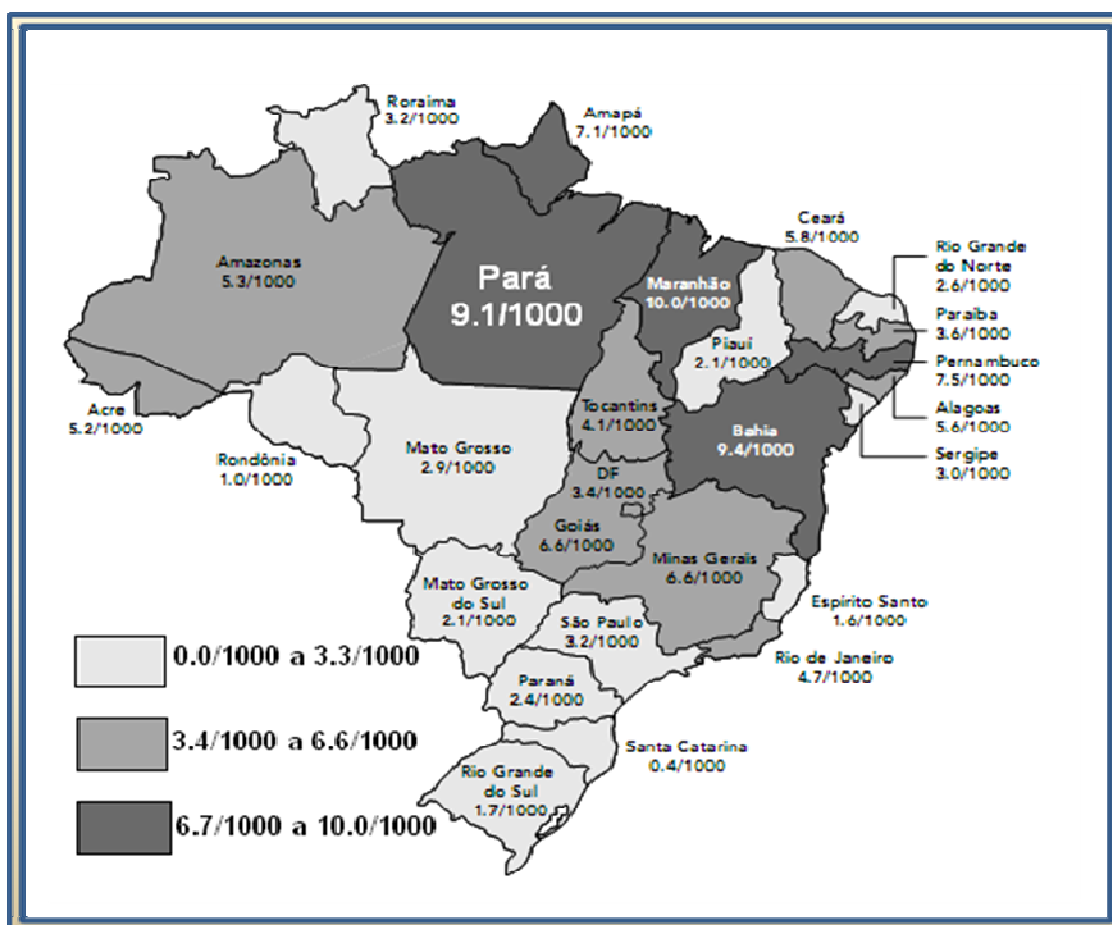


Figura 7 – Prevalência da infecção por HTLV-1/2 (por 1000 indivíduos). Dados obtidos a partir da triagem sorológica em candidatos a doadores de sangue dos 26 estados e o Distrito Federal do Brasil (adaptado de Catalan-Soares *et al.*, 2005).

1.3.3 Distribuição do HTLV na Amazônia

Na Região Norte, em uma pesquisa conduzida entre 11121 candidatos à doação de sangue do banco de sangue do Estado do Acre, no período de 1998 a 2001, observou-se soroprevalência de 0,07% para HTLV-1 e 0,03% para HTLV-2 (com confirmação por Western-Blot) (Colin *et al.*, 2003).

No Estado do Pará e na região amazônica próxima ao estado, estudos conduzidos em diferentes grupos populacionais (indígenas, doadores de sangue, imigrantes de área endêmica e pacientes com doença associada ao HTLV), demonstram a ocorrência da infecção pelos HTLV-1/2 na região (Ishak *et al.*, 1995; 1998; 2001;

2002; Vallinoto *et al.*, 2002; 2004; 2006). Ishak *et al.* (1995) avaliaram a prevalência da infecção pelo HTLV-2 em 1342 índios de 25 comunidades indígenas da Amazônia, sendo observada sororreatividade de 7,8% para HTLV-2, sendo 67 amostras provenientes da comunidade Kayapó, o que corresponde a uma taxa de soroprevalência acima de 30% para esta tribo. A infecção foi encontrada, também, nas comunidades Munduruku, Tiryó e Arara do Laranjal. Em 2001, outro estudo foi realizado entre indígenas da aldeia Kararao (Kayapó), onde se observou a infecção por HTLV-2c em dois indivíduos (mãe e filho) de 26 estudados, tendo, às análises moleculares, comprovada a transmissão vertical (Ishak *et al.*, 2001).

A presença de HTLV-2 também foi observada na área urbana do Estado do Pará em candidatos à doação de sangue do Centro de Hemoterapia e Hematologia do estado do Pará (HEMOPA) (Ishak *et al.*, 1998), assim como entre indivíduos infectados pelo HIV-1, onde se observou uma taxa de co-infecção de 4,7% para o HTLV-2 e 2,7% para o HTLV-1 (Vallinoto *et al.*, 1998). Estudos de Vallinoto *et al.* (2002) também encontraram a infecção por HTLV-2c em populações urbanas e ameríndios.

Analisando um grupo de indivíduos infectados pelo HIV-1 oriundos de Belém (Pará) e Macapá (Amapá), Laurentino *et al.* (2005) encontraram a co-infecção em seis pacientes de Belém, dos quais dois foram caracterizados como HTLV-1a (subgrupo Transcontinental) e quatro foram caracterizados como HTLV-2c.

Um grupo de 168 imigrantes japoneses residentes na cidade de Tomé-Açú, Pará foi analisado quanto à prevalência da infecção pelo HTLV, sendo verificada uma taxa de infecção de 1,78% (Vallinoto *et al.*, 2004). No mesmo estudo, as três amostras positivas foram caracterizadas filogeneticamente como HTLV-1a (Cosmopolita), sendo duas do subgrupo Japonês e uma do subgrupo Transcontinental. A

presença do HTLV-1a, subgrupo Transcontinental, também foi evidenciada em dois habitantes de comunidades remanescentes de quilombos localizados na Ilha de Marajó (Vallinoto *et al.*, 2006).

Estudos de Ishak *et al.* (2002), encontraram os primeiros casos comprovados de uma provável associação entre o HTLV-1 e PET/MAH, em Belém-Pará, baseando-se na análise de pacientes com paraparesia progressiva de origem indeterminada, atendidos em uma clínica universitária da cidade. Posteriormente, Souza *et al.* (2006) avaliaram a ocorrência da infecção por HTLV em cinco pacientes de um hospital universitário de Belém-Pará, que tiveram diagnóstico clínico de distúrbio neurodegenerativo típico de PET/MAH, de acordo com critérios clínicos estabelecidos pelo Programa Nacional de DST e AIDS do Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, 2004), sendo todas as amostras caracterizadas como pertencentes ao HTLV-1a, Subgrupo Transcontinental.

1.3.4 Transmissão do HTLV

O HTLV-1 e o HTLV-2 compartilham as mesmas formas de transmissão dos outros retrovírus humanos. Entretanto, admite-se que, de maneira diferente do HIV, a transmissão do HTLV entre humanos é dependente da veiculação de linfócitos infectados (Ministério da Saúde, 2004).

As principais vias de transmissão são: a vertical (de mãe para filho), principalmente através da amamentação prolongada, a sexual e a parenteral, por meio da transfusão de hemocomponentes celulares infectados ou compartilhamento de agulhas e seringas contaminadas (Manns *et al.*, 1999; Ministério da Saúde 2004; Catalan-Soares & Proietti, 2006).

A transmissão da mãe infectada para seu filho ocorre em aproximadamente 20% dos casos e tal transmissão tem sido relacionada com a carga proviral da mãe, aos elevados títulos de anticorpos e à amamentação prolongada (Kinoshita *et al.*, 1984; Ureta-Vidal *et al.*, 1999). A transmissão vertical, no momento do parto, parece ser menos importante (Fujino & Nagata, 2000) e pode ser dificultada pela apoptose das células de placenta induzida pelo HTLV-1 (Fujino *et al.*, 1999). Em uma comunidade indígena da região amazônica brasileira, evidenciou-se a transmissão de mãe para filho do HTLV-2c, que é um provável mecanismo responsável pela endemicidade do HTLV-2 nestas populações relativamente fechadas (Ishak *et al.*, 2001).

Tal como acontece com outras infecções sexualmente transmissíveis, a infecção pelo HTLV-1 está associada a relações sexuais desprotegidas, a presença de úlceras genitais e promiscuidade sexual (Catalan-Soares *et al.*, 2003; Belza, 2004). Estudos transversais, que avaliam a direção na transmissão sexual, sugerem que haja uma transmissão mais eficiente de homens para mulheres (Kajiyama *et al.*, 1986; Murphy *et al.*, 1989a, 1996; Larsen *et al.*, 2000). Entretanto, estudos prospectivos apresentam resultados divergentes em relação à direção da transmissão. Um deles mostra elevada transmissão na direção homem/mulher (Stuver *et al.*, 1993); enquanto que outros dois mostram que não há diferença significativa entre a transmissão homem/mulher ou mulher/homem (Figuerola *et al.*, 1997; Roucoux *et al.*, 2005).

A exposição intravenosa a sangue contaminado parece ser uma eficiente forma de transmissão do HTLV-1, uma vez que prévios relatos demonstram que isso ocorria principalmente pela transfusão de hemocomponentes que não eram testados para HTLV-1 (Okochi *et al.*, 1984; Manns *et al.*, 1992). A maioria dos estudos

epidemiológicos para HTLV-1 relatava a transfusão, no passado, como um importante fator de risco para a infecção pelo HTLV-1 (Murphy *et al.*, 1996; Schreiber *et al.*, 1997). Entretanto, nos últimos 20 anos, a pesquisa de anticorpos contra HTLV-1/2 em candidatos a doação de sangue foi implementada em vários países (Japão, EUA, Canadá, Brasil, entre outros países europeus) e esta medida pública se reflete atualmente na diminuição de infecções pelo HTLV por meio de transfusão de sangue (Taylor, 1996; Catalan-Soares *et al.*, 2001).

A transmissão por compartilhamento de agulhas e seringas contaminadas pelo HTLV-1 e HTLV-2 também são formas importantes de transmissão (Feigal *et al.*, 1991; Khabbaz *et al.*, 1992). O HTLV-2 mostra-se com maior prevalência entre UDIs norte-americanos e europeus do que o HTLV-1 (Lee *et al.*, 1989, 1990; Murphy *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2001), enquanto que o HTLV-1 tem maior prevalência entre usuários de drogas injetáveis no Brasil (Etzel *et al.*, 2001) e em Nova Iorque (Ehrlich & Poiesz, 1988; Lee *et al.*, 1990).

1.4 PATOLOGIAS ASSOCIADAS À INFECÇÃO PELO HTLV-1

Apesar de mais de 90% dos indivíduos infectados por HTLV-1 permanecer assintomático ao longo da vida, sabe-se que este agente é etiológicamente responsável por algumas síndromes clínicas de natureza neoplásica, inflamatória ou degenerativa (Bangham, 2000; Ministério da Saúde, 2004).

O HTLV-1 foi o primeiro retrovírus associado à doença humana, sendo claramente associado à Leucemia/linfoma de células T do adulto (LLcTA ou ATL) (Poiesz *et al.*, 1980; Yoshida *et al.*, 1982); à Paraparesia espástica tropical/Mielopatia associada ao HTLV (Gessain *et al.*, 1985; Osame *et al.*, 1986; Román & Osame, 1988); à Uveíte (Pinheiro 1995; Mochizuki *et al.*, 1992); e à dermatite infecciosa (LaGrenade *et al.*, 1990), sendo também associado a casos de Polimiosite (Beilke *et al.*, 1996).

1.4.1 Leucemia/linfoma de células T do adulto (LLcTA)

A Leucemia/linfoma de células T do adulto (LLcTA) foi inicialmente descrita no Japão por Uchiyama *et al.* (1977), que observaram que um tipo particular de leucemia de células T associava-se com a presença de linfócitos multilobulados, com freqüentes lesões ósseas, com hipercalcemia, com rápida progressão para morte, e que os casos se agrupavam em uma região geográfica do sul do Japão. A partir de então, passou a ser relatada em outras partes do mundo e logo associada à infecção pelo HTLV-1 em pacientes no Sudoeste do Japão (Poiesz *et al.*, 1980; Yoshida *et al.*, 1982).

O tempo compreendido entre a infecção e o desenvolvimento da doença tem sido estimado entre 30 e 50 anos de idade, sendo atribuído ao fato de que na maioria, se não em todos os casos de LLcTA, a infecção com o vírus foi adquirida na

infância e a manifestação clínica se dá na fase adulta, usualmente após 40 anos de idade (Tajima *et al.*, 1985; Murphy *et al.*, 1989b).

Na LLcTA, as células leucêmicas, preferencialmente a subpopulação de linfócitos T auxiliares (CD4⁺), foram denominadas *flower cell* e são caracterizadas por um acentuado pleomorfismo celular, com núcleo polilobulado, cromatina condensada e citoplasma escasso (Silva *et al.*, 2002a; Matsuoka, 2005).

A LLcTA é classificada em quatro categorias clínicas: aguda, crônica, *smoldering* e linfomatosa. A forma aguda compreende de 55% a 75% de todos os casos da doença e, na ausência de tratamento específico, leva rapidamente ao óbito, com sobrevida inferior a 12 meses. As formas clínicas crônica e *smoldering*, por outro lado, apresentam um curso prolongado da doença, sendo freqüentemente assintomáticos (Proietti *et al.*, 2005).

Nas formas clínicas mais agressivas da LLcTA (aguda e linfomatosa), o paciente pode apresentar complicações adicionais a exemplo de linfadenomegalias, hepatoesplenomegalia, infiltração pulmonar, lesões de pele, lesões ósseas, além de hipercalcemia causada pelo aumento da reabsorção óssea pelos osteoclastos. A imunodeficiência é relatada freqüentemente, predispondo o paciente a constantes infecções oportunistas, sejam por bactérias, vírus, fungos ou parasitas, com destaque para *Pneumocystis carinii* e *Strongiloides stercoralis* (Silva *et al.*, 2002a; Yamaguchi, 2000; Manns *et al.*, 1999).

1.4.2 Paraparesia espástica tropical/Mielopatia associada ao HTLV (PET/MAH)

A Paraparesia espástica tropical/Mielopatia associada ao HTLV (PET/MAH) é uma doença desmielinizante crônica e progressiva associada à infecção pelo HTLV-1, que afeta predominantemente a coluna vertebral. Relata-se que esta doença afeta entre 0,2 e 5% dos indivíduos infectados na quarta década de vida (Vernant *et al.*, 1987; Kaplan *et al.*, 1990).

Os sintomas iniciais mais prevalentes de PET/MAH são fraqueza e rigidez dos membros inferiores (Osame *et al.*, 1987; Vernan *et al.*, 1987). Outros sintomas comumente presentes são dor lombar, um grau variável de perda sensorial e distúrbios da bexiga tal como urgência urinária e incontinência. Com o progresso da doença, constipação, megacólon, impotência sexual, dor durante a ereção peniana e decréscimo da libido podem se tornar aparentes. Hiperreflexia dos membros inferiores e sinal de Babinski são geralmente vistos inicialmente no curso de PET/MAH (Ferreira Júnior *et al.*, 1997). A doença frequentemente progride mais rapidamente após um período de 5-10 anos e então tende a se estabilizar com níveis severos de desabilidade crônica (Kira *et al.*, 1991).

Um grupo de pesquisadores de HTLV, no ano de 1989, formou um comitê específico junto à Organização Mundial da Saúde (OMS), para a elaboração de critérios diagnósticos a serem utilizados na definição de PET/MAH (Quadro 1). Sendo importante ressaltar que um sintoma ou sinal isolado pode ser a única evidência de PET/MAH na sua fase inicial (Takayanagui & Castro-Costa, 2006).

Quadro 1 – Critérios de diagnóstico de PET/MAH, segundo a OMS (1989).

Critérios

Idade e Sexo:

- Frequentemente esporádica e em adultos, mas às vezes familiar, ocasionalmente visto em crianças; predomínio nas mulheres.

Instalação:

- Geralmente insidiosa, mas pode ser súbita.

Principais Manifestações Neurológicas:

- Paraparesia espástica crônica que progride geralmente de forma lenta, às vezes permanece inalterada após progressão inicial.

- Fraqueza dos membros inferiores, de predomínio proximal.

- Distúrbio vesical é uma característica precoce; constipação intestinal ocorre mais tardiamente; impotência e diminuição da libido são frequentes.

- Sintomas sensitivos como formigamento, agulhadas e queimação, são mais proeminentes do que sinais físicos objetivos.

- Dor lombar baixa com irradiação para os membros inferiores é comum.

- Sensibilidade vibratória é mais frequentemente comprometida que a proprioceptiva.

- Hiperreflexia dos membros inferiores, frequentemente com clônus e sinal de Babinski.

- Hiperreflexia dos membros superiores e os sinais de Hoffmann e de Trömner são frequentes; a fraqueza pode estar ausente.

- Reflexo mandibular exaltado em alguns pacientes.

Achados Neurológicos menos frequentes:

- Sinais cerebelares; atrofia óptica; surdez; nistagmo; déficit de outros nervos cranianos; tremor de mãos; ausência ou diminuição do reflexo aquiliano.

- Crises convulsivas; déficit cognitivo; demência ou comprometimento da consciência são raros.

Outras Manifestações Neurológicas:

- Atrofia muscular; fasciculação (rara); polimiosite; neuropatia periférica; polirradiculopatia; neuropatia de nervos cranianos; meningite; encefalopatia.

Manifestações Sistêmicas Não Neurológicas que Podem Estar Associadas com PET/MAH:

- Alveolite pulmonar; uveíte; síndrome de Sjögren; artropatia; vasculite; ictiose; crioglobulinemia; gamopatia monoclonal; leucemia / linfoma de células T do adulto.

Diagnóstico Laboratorial:

- Presença de anticorpos anti-HTLV-1 ou de antígenos no sangue e no LCR.

- LCR pode apresentar pleocitose linfocitária moderada.

- Linfócitos lobulados podem estar presentes no sangue e/ou no LCR.

- Pode ocorrer hiperproteinorraquia leve e moderada.

- Isolamento viral quando possível no sangue e/ou no LCR.

Fonte: adaptado de Takayanagui & Castro-Costa, 2006.

Entretanto, ao longo desses anos, neurologistas brasileiros reuniram-se com profissionais de outros países da América do Sul, Europa e Estados Unidos da América (EUA), com o objetivo de propor um modelo de diagnóstico de PET/MAH que considere níveis de definição diagnóstica como Possível, Provável e Definida, de acordo com os sintomas mielopáticos, achados sorológicos e moleculares. Este novo modelo proposto considera os principais tópicos salientados pela OMS, constituindo-se em uma ferramenta complementar aos critérios da OMS, sendo útil para o segmento clínico-terapêutico (Quadro 2) (Castro-Costa *et al.*, 2006).

Neste novo modelo também foi dada importância à exclusão de outras condições clínicas semelhantes que são: meningite carcinomatosa; paraparesia espástica familiar; mielite transversa; esclerose lateral primária; síndromes paraneoplásicas; siringomielia; doença de Lyme; deficiência de folato e vitamina B 12; doença de Behçet; neurosífilis; neurotuberculose; sarcoidose; mielopatia vacuolar do HIV; doença vascular do colágeno; mielopatia autoimune; síndrome de Sjögren; mielopatia tóxica; esclerose lateral amiotrófica; mielopatia fungal; fistula arteriovenosa espinhal; mielopatia hepática; mielopatia parasítica (larva migra visceral de *Toxocara canis* e *Ascaris suum*); compressão da medula espinhal (tumor espinhal, espondilose cervical, tumor cerebral parasagital, entre outros); mielopatias regionais endêmicas com similar manifestações clínicas (incluindo esquistossomose e neurocisticercose).

Quadro 2 – Níveis de definição diagnóstica de PET/MAH (Castro-Costa *et al.*, 2006).

Níveis de Definição Diagnóstica

Definido

1. Paraparesia espástica progressiva, não remissiva, associada à marcha suficientemente comprometida para ser percebida pelo próprio paciente; Sintomas ou sinais sensitivos podem ou não estar presentes. Quando presentes permanecem sutis e sem nível sensitivo. Sinais ou sintomas esfinterianos anais e urinários podem ou não estar presentes;
2. Presença de anticorpos anti-HTLV-1 no soro e LCR, confirmados por Western Blot e/ou detecção do DNA proviral no sangue e/ou LCR;
3. Exclusão de outras condições que se assemelham à PET/MAH.

Provável

1. Apresentação monossintomática: espasticidade ou hiperreflexia dos membros inferiores ou sinal de Babinski com ou sem sinais sensitivos sutis ou bexiga neurogênica isolada confirmada por testes urodinâmicos;
2. Presença de anticorpos anti-HTLV-1 no soro e/ou LCR, confirmados por Western Blot e/ou detecção do DNA no sangue e/ou LCR;
3. Exclusão de outras condições que se assemelham à PET/MAH.

Possível

1. Apresentação clínica completa ou incompleta;
 2. Presença de anticorpos anti-HTLV-1 no soro e/ou LCR, confirmados por Western Blot e/ou detecção do DNA no sangue e/ou LCR;
 3. Não exclusão de outras condições que se assemelham à PET/MAH.
-

Fonte: adaptado de Castro-Costa *et al.*, 2006.

1.4.2.1 Carga proviral e níveis de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ associados com a PET/MAH

A baixa incidência da PET/MAH (0,2 a 5%) nos portadores do HTLV-1 sugere que interações vírus-hospedeiro influenciam na patogênese dessa doença inflamatória (Martins & Stancioli, 2006). Uma carga proviral elevada e uma resposta imune aumentada para HTLV-1 são características de pacientes com PET/MAH, quando comparadas com o observado em portadores assintomáticos (Nagai *et al.*, 1998; Montanheiro *et al.*, 2005; Olindo *et al.*, 2005).

No fluido cérebro-espinhal (FCE) de pacientes com PET/MAH, linfócitos T CD4⁺ infiltrantes parecem ser o principal reservatório para o vírus. Desta maneira, o HTLV-1 parece atravessar a barreira hemato-encefálica por migração dos

linfócitos infectados e, como no sangue periférico, a proliferação das células infectadas dentro do CSF é confrontada por uma intensa imunidade celular anti-HTLV-1 nos pacientes com PET/MAH (Cavrois *et al.*, 2000).

Há pesquisas que avaliam os níveis de linfócitos T CD4⁺ também por secretarem citocinas neurotóxicas e pró-inflamatórias, por serem o grupo de células infectadas pelo HTLV que mais se concentra no LCR no início da PET/MAH, por ajudarem na ativação da resposta imune celular (T CD8⁺) em animais e humanos e por serem os principais alvos do HTLV-1, o qual está mais associado a doenças (Goon *et al.*, 2004).

Assim como, há muitos estudos que avaliam os níveis de linfócitos T CD8⁺ específicos para HTLV entre pacientes doentes com PET/MAH e assintomáticos, visto que a principal resposta imune desenvolvida no hospedeiro contra os antígenos do HTLV (proteínas Tax, Env, Rex e Gag) se dá pela ativação de linfócitos T citotóxicos (CD8⁺), e estes produzem mediadores inflamatórios como Interferon-gama (INF- γ) que são encontrados em altos níveis no LCR e nas lesões da medula espinhal de pacientes com PET/MAH (Kubota *et al.*, 2000; Goon *et al.*, 2004).

Estudos prévios demonstram, também, uma correlação entre a carga de DNA proviral e a frequência de linfócitos T CD8⁺ Tax específicos em pacientes com PET/MAH, sugerindo que a resposta celular mediada pelos linfócitos CD8⁺ Tax específico estaria ligada diretamente aos níveis de carga de DNA proviral (Nagai *et al.*, 2001). Estes linfócitos T CD8⁺ específicos para Tax produzem mediadores inflamatórios como Interferon-gama (INF- γ), e esta atividade pode estar diretamente ligada à carga proviral e ao desenvolvimento de PET/MAH (Kubota *et al.*, 2000; Nagai *et al.*, 2001).

1.5 PATOLOGIAS ASSOCIADAS À INFECÇÃO PELO HTLV-2

HTLV-2 foi isolado inicialmente de uma linhagem de células T (Mo-T) derivada de um paciente com uma forma variante rara de leucemia de célula pilosa (Kalyanaraman *et al.*, 1982). Num segundo paciente com uma leucemia de célula T CD8⁺ e coexistente leucemia de célula B pilosa foi detectada infecção por HTLV-2 (Rosenblatt *et al.*, 1986). Contudo, uma associação entre leucemia de célula pilosa e HTLV-2 ainda não foi confirmada. Aparentemente o HTLV-2 parece desempenhar um papel em desordens linfoproliferativas de células T. O HTLV-2 tem, também, sido detectado em um pequeno número de pacientes com mielopatia espástica e graus variáveis de ataxia (Hjelle *et al.*, 1992; Harrington Jr. *et al.*, 1993).

Além disso, uma síndrome neurológica similar a PET/MAH tem sido descrita em raros pacientes co-infectados com HIV-1 e HTLV-2 (Rosenblatt *et al.*, 1992), e pelo menos um paciente infectado com HTLV-2 tem sido identificado com uma doença neurológica progressiva crônica clinicamente indistinguível de PET/MAH (Jacobson *et al.*, 1993; Silva *et al.*, 2002b), neste paciente, nenhum outro retrovírus humano pôde ser detectado, sugerindo que ambos HTLV-1 e HTLV-2 podem estar diretamente relacionados a PET/MAH.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo Geral:

Efetuar a caracterização molecular e imunológica da infecção pelo Vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV) em portadores assintomáticos e com sintomatologia neurológica característica de PET/MAH.

1.6.2 Objetivos Específicos:

- i) Comparar a frequência dos tipos e subtipos de HTLV circulantes nos portadores assintomáticos e nos pacientes com sintomas de PET/MAH;
- ii) Correlacionar os valores de carga proviral, observados nos portadores assintomáticos e nos pacientes com PET/MAH, com a presença ou ausência de sinais e sintomas de PET/MAH;
- iii) Comparar níveis de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ entre o grupo controle, de indivíduos soronegativos para HTLV, o de portadores assintomáticos do HTLV-1 e com PET/MAH.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 DESENHO DE ESTUDO

Os pacientes portadores de HTLV diagnosticados na cidade de Belém, são encaminhados ao ambulatório do Núcleo de Medicina Tropical (NMT) da Universidade Federal do Pará (UFPA), para avaliação de médico infectologista, além de outros especialistas (hematologista, dermatologista, neurologista) dependendo da apresentação clínica da doença, quando esta estiver presente.

A partir de então foi desenvolvido este estudo observacional, transversal, onde foram estudados, entre os anos de 2007 e 2008, os casos de infecção por HTLV detectados em indivíduos referenciados ao serviço ambulatorial do Núcleo de Medicina Tropical (NMT), com doença neurológica associada ao HTLV ou assintomáticos.

Estes indivíduos foram esclarecidos sobre os procedimentos e objetivos da pesquisa, sendo solicitado aos que quiseram participar, a assinatura no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1). Os procedimentos incluíram: a) informações sobre infecções sexualmente transmissíveis (IST) por meio de uma abordagem educativa que minimizasse o estigma das IST; b) preenchimento de questionário contendo variáveis demográficas, epidemiológicas e clínicas (Anexo 2); c) coleta de 10 ml de sangue periférico.

O sangue colhido dos indivíduos participantes foi transportado, no mesmo dia, ao Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará (UFPA), onde foi processado para realização de confirmação sorológica da infecção, de contagem de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, bem como para a realização de técnicas de biologia molecular para pesquisa do DNA proviral do HTLV-1/2 e, conseqüentemente, sua caracterização molecular. Outra

alíquota da amostra foi enviada à fundação Hemopa para a realização da quantificação de carga proviral do HTLV.

2.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS INVESTIGADAS

2.2.1 Indivíduos sintomáticos soropositivos para HTLV

Este grupo foi composto por 19 indivíduos procedentes do Núcleo de Medicina Tropical (NMT), que foram submetidos a exames neurológicos, à análise sorológica para o HTLV com resultado posterior positivo e que inicialmente tiveram diagnóstico clínico de distúrbio neurodegenerativo típico de Paraparesia espástica tropical/Mielopatia associada ao HTLV (PET/MAH), sendo 11 mulheres (57.9%) e oito homens (42.1%), com idade variando entre 28 e 78 anos e média de 54.4 anos (Desvio Padrão - DP \pm 14.4). Entretanto, apenas 16 destes indivíduos tiveram confirmado, posteriormente, o diagnóstico de PET/MAH, sendo outros dois diagnosticados com Polineuropatia Periférica (PP) e outro diagnosticado com Mononeuropatia Periférica de membro inferior esquerdo (MP). E como estas sintomatologias estão dentro dos critérios de diagnóstico de PET/MAH, estes indivíduos permaneceram no estudo (Quadro 3).

Quadro 3 – Indivíduos sintomáticos, segundo suas manifestações neurológicas.

Paciente	Idade	Sexo	Manifestações Neurológicas
RSM	74	F	Dor lombar, força muscular diminuída, paraparesia espática, parestesia e dor nos mmii, alteração esfínteriana (PP).
ESCN	57	M	Dor lombar, força muscular diminuída, paraparesia seguida de tetraparesia espática, alteração esfínteriana, impotência (PET/MAH).
EMM	33	M	Dor lombar, força muscular diminuída, paraparesia espática, parestesia e dor nos mmii, alteração esfínteriana, impotência (PET/MAH).
AAMC	50	F	Força muscular diminuída, parestesia e dor nos mmii, alteração esfínteriana (MP).
MCAS	52	F	Dor lombar, força muscular diminuída, paraparesia espática, parestesia e dor nos mmii, alteração esfínteriana, constipação intestinal (PET/MAH).
WNO	39	M	Dor lombar, força muscular diminuída, parestesia e dor nos mmii, alteração esfínteriana, impotência (PET/MAH).
SSRS	28	F	Dor lombar, força muscular diminuída, parestesia e dor nos mmii, alteração esfínteriana (PET/MAH).
TSQ	43	F	Dor lombar, força muscular diminuída, parestesia e dor nos mmii e mmss, alteração esfínteriana (PET/MAH).
GOS	52	F	Dor lombar, força muscular diminuída, parestesia e dor nos mmii, constipação intestinal (PET/MAH).
CAOD	33	M	Força muscular diminuída, dor nos mmi, impotência (PET/MAH).
MSRL	47	F	Dor lombar, força muscular diminuída, parestesia e dor nos mmii e mmss, alteração esfínteriana (PET/MAH).
ACAP	64	M	Força muscular diminuída, dor nos mmii, constipação intestinal e impotência (PET/MAH).
JGR	69	M	Dor lombar, parestesia em mmii, alteração esfínteriana (PET/MAH).
JMPC	68	M	Dor lombar, força muscular diminuída, parestesia e dor nos mmii, constipação intestinal e impotência (PET/MAH).
MAC	59	F	Dor lombar, força muscular diminuída, parestesia e dor nos mmii, alteração esfínteriana, constipação intestinal (PET/MAH).
ASP	63	F	Dor lombar, força muscular diminuída, parestesia e dor nos mmii, constipação intestinal e alteração esfínteriana (PET/MAH).
NACS	78	F	Dor lombar, força muscular diminuída, parestesia e dor nos mmii, constipação intestinal (PET/MAH).
TTCL	66	F	Dor lombar, força muscular diminuída, parestesia e dor nos mmii, alteração esfínteriana (PET/MAH).
NRC	58	M	Dor lombar, força muscular diminuída, parestesia e dor nos mmii, marcha normal (PP).

Mmii: membros inferiores; mmss: membros superiores.

Após o diagnóstico clínico, as amostras de sangue, coletadas em tubos contendo EDTA, foram encaminhadas ao Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFPA para avaliação dos níveis de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, confirmação sorológica da infecção pelo HTLV-1/2 e posterior caracterização molecular do vírus circulante, sendo as alíquotas de plasma e de leucócitos (PBMC) congeladas à -20°C até o momento do uso. Outra alíquota destas amostras de sangue foi enviada à Fundação Hemopa para quantificação da carga proviral.

2.2.2 Indivíduos assintomáticos soropositivos para HTLV

Este grupo foi composto por 42 indivíduos procedentes do Núcleo de Medicina Tropical da UFPA, que foram submetidos a exames neurológicos, à análise sorológica para o HTLV com resultado posterior positivo e que foram caracterizados como assintomáticos para a infecção pelo HTLV, sendo 31 indivíduos do sexo feminino (73.8%) e 11 do sexo masculino (26.2%), com idade variando de 20 a 79 anos e uma média de 40.7 anos (Desvio Padrão - DP ±14.8). As amostras de sangue destes indivíduos foram encaminhadas ao Laboratório de Virologia, do Instituto de Ciências Biológicas da UFPA para avaliação dos níveis de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, confirmação sorológica da infecção pelo HTLV-1/2 e posterior caracterização molecular do vírus circulante, sendo as alíquotas de plasma e de leucócitos (PBMC) congeladas à -20°C até o momento do uso. Outra alíquota destas amostras de sangue foi enviada à Fundação Hemopa para quantificação da carga proviral.

2.2.3 Indivíduos controles soronegativos para HTLV

Pertencem a este grupo, amostras de sangue de 100 indivíduos funcionários de Laboratórios de Análises Clínicas de Belém-PA, soronegativos para a infecção pelo HTLV, sendo 70 indivíduos do sexo feminino (70%) e 30 do sexo masculino (30%), com idade variando de 20 a 53 anos e uma média de 31.2 anos (Desvio Padrão - DP ± 8.1). As amostras de sangue destes indivíduos foram encaminhadas ao Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFPA para avaliação dos níveis de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ e análise sorológica da infecção pelo HTLV-1/2, sendo as alíquotas de plasma congeladas à -20°C até o momento do uso. Vale ressaltar a especificidade destas amostras, uma vez que elas foram coletadas segundo critérios de idade e gênero para que se pudesse ser feito um pareamento mais confiável com a população de indivíduos com diagnóstico clínico de PET/MAH e assintomáticos.

Estes indivíduos também foram esclarecidos sobre os procedimentos e objetivos da pesquisa, sendo solicitado aos que quiseram participar, a assinatura no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1).

2.3 ASPECTOS ÉTICOS

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário João de Barros Barreto (processo nº 2061/2005), em obediência à resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, a qual trata das diretrizes e Normas Regulamentares da Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (Anexo 3).

2.4 SOROLOGIA

Os soros ou plasmas foram testados para a presença de anticorpos para HTLV-1 e para HTLV-2, usando-se um ensaio imunoenzimático, ELISA (*HTLV-1/2 Ab-Capture ELISA Test System, Ortho Diagnostic Systems Inc., USA*). Esse teste incluiu o uso combinado de quatro antígenos recombinantes: antígeno do envelope do HTLV-1, antígeno do envelope do HTLV-2, e dois antígenos do capsídeo viral do HTLV-1 e do HTLV-2. As amostras reativas foram submetidas à confirmação por *Nested-PCR* da região genômica *pX*, que permite a diferenciação da infecção por HTLV-1 ou por HTLV-2.

2.5 EXTRAÇÃO DO DNA

Foi utilizado o método de extração de DNA total a partir de células mononucleadas do sangue periférico, de acordo com o protocolo do kit EZ-DNA de isolamento de ácido nucléico da Biosystems, *Biological Industries Ltd*. O procedimento ocorreu seguindo-se as etapas de lise celular, de precipitação de proteínas, de precipitação do DNA e de hidratação do DNA.

2.6 REAÇÃO EM CADEIA MEDIADA PELA POLIMERASE (PCR)

A PCR foi efetuada em duas etapas (*Nested PCR*), para a amplificação de duas regiões genômicas (*pX* e *5'LTR* para HTLV-1 e HTLV-2) do DNA proviral do HTLV, a partir do DNA dos indivíduos soropositivos. As amplificações de cada segmento gênico foram realizadas no equipamento termo-ciclador da *Perkin-Elmer Cetus Corp., USA*.

2.6.1 Amplificação da região *pX*

Um fragmento de 159 pb da região *pX* foi amplificada com o objetivo de investigar a presença de um sítio de restrição (T/CGA) para a enzima *TaqI*, o qual está presente apenas no HTLV-2, servindo portanto como critério de discriminação da infecção pelo HTLV-1 e pelo HTLV-2, confirmando assim a infecção por esse retrovírus.

As reações de amplificação foram realizadas em um volume de 50µL contendo 500ng de DNA extraído, 200µM de cada dNTP, 20 pmol de cada iniciador, KCl 50mM, MgCl₂ 2,0 mM, Tris-HCl pH 8,3 10 mM e 0,5 U de *Taq* DNA polimerase. Em cada reação de amplificação, após a desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, foram efetuados 35 ciclos de 40 segundos a 94°C, 30 segundos a 51,6°C e 1 minuto a 72°C. Os ciclos foram seguidos por extensão final de 10 minutos a 72°C. Posteriormente foi realizada uma segunda etapa da reação (*Nested* PCR) utilizando 3µL do produto da amplificação anterior, considerando as mesmas condições de reação. Nessas reações foram utilizados pares de iniciadores internos e externos à região gênica, cujas seqüências são descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Iniciadores utilizados nas reações de *Nested* PCR da região *pX*.

INICIADORES	GENE	SEQUÊNCIA 5' – 3'	ETAPAS
TR101	<i>pX</i>	5'– TTCCCAGGATTTGGACAGAG–3'	1º
TR102	<i>pX</i>	5'– GGGTAAGGACCTTGAGGGTC–3'	1º
TR103L	<i>pX</i>	5'– CGGATACCCAGTCTACGTGTT– 3'	2º
TR104	<i>pX</i>	5'– GAGCCGATAACGCGTCCATCG–3'	2º

A análise de RFLP do produto do gene *pX* (159 pb) foi realizada misturando-se 6,0µL do produto amplificado, 7,0µL de H₂O, 1,5µL de tampão E (Promega, Madison WI, USA) e 0,5µL da enzima de restrição *TaqI* (10U/µL, Promega, Madison WI, USA), com posterior incubação à 65°C por 5 horas. A presença do sítio de restrição (T/CGA), gera dois fragmentos (85 pb e 53 pb), presente no HTLV-2 e ausente no HTLV-1.

2.6.2 Amplificação da região 5'*LTR* do HTLV-1

As reações para amplificação da região 5'*LTR* foram executadas em um volume final de 50µL, contendo 500ng de DNA extraído, 125 µM de cada dNTP, 20 pmol/µL de cada iniciador, MgCl₂ 3,0 µM, KCl 50 mM, Tris-HCl pH 8,3 10mM e 0,5 U de *Taq* DNA polimerase. Em cada reação de amplificação, após a desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, foram efetivados 35 ciclos de 40 segundos a 94°C, 30 segundos a 57°C e 1 minuto a 72°C. Os 35 ciclos foram seguidos por uma extensão final de 10 minutos a 72°C. No passo seguinte da amplificação (*Nested PCR*) foram utilizados 3,0µL do produto da primeira amplificação nas mesmas condições de reação. Os iniciadores internos e externos que foram utilizados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Iniciadores utilizados nas reações de *Nested PCR* da região 5'*LTR* do HTLV-1.

INICIADORES	GENE	SEQUÊNCIA 5' – 3'	ETAPAS
LTR-I.01	5' <i>LTR</i> -1	5'-TGAAATGACCATGAGCCCCAA-3'	1º
LTR-I.02	5' <i>LTR</i> -1	5'-CGCGGAATAGGGCTACGCCT-3'	1º
LTR-I.03	5' <i>LTR</i> -1	5'-GGCTTAGAGCCTCCCAGTGA – 3'	2º
LTR-I.04	5' <i>LTR</i> -1	5'-GCCTAGGGAATAAAGGGGCG-3'	2º

O produto resultante da amplificação da região 5'*LTR* (800 pb) foi utilizado na análise de sequenciamento de bases nucleotídicas e na construção de árvores filogenéticas.

2.6.3 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 500 ng de DNA extraído, 125µM de cada dNTP, 20 pmol/µL de cada iniciador, MgCl₂ 3,0 µM, KCl 50mM, Tris-HCl pH 8,3 10 mM e 0,5 U de *Taq* DNA polimerase. Em cada reação de amplificação, após a desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, foram efetivados 35 ciclos de 40 segundos a 94°C, 30 segundos a 57°C e 1 minuto a 72°C. Os 35 ciclos foram seguidos por uma extensão final de 10 minutos a 72°C. No passo seguinte da amplificação (*Nested PCR*) foram utilizados 3,0µL do produto da amplificação nas mesmas condições de reação. Os iniciadores internos e externos utilizados estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Iniciadores utilizados nas reações de *Nested* PCR da região 5'*LTR* do HTLV-2.

INICIADORES	GENE	SEQUÊNCIA 5' – 3'	ETAPAS
F-IILTR	5' <i>LTR</i> -2	5'-TCGCGATGACAATGGCGACTAGCCTC-3'	1º
<i>Long Gag</i>	5' <i>LTR</i> -2	5'-GGGGGCTTTGGGTATTGGAGTTGGG-3'	1º
Mo16	5' <i>LTR</i> -2	5'-GCCTCCCAAGCCAGCCAC-3'	2º
MSW-Gag	5' <i>LTR</i> -2	5'-GGGAAAGCCCGTGGATTTGCCCAT-3'	2º

O produto da amplificação da região 5'*LTR* (788 pb) foi utilizado na análise de sequenciamento de nucleotídeos e posterior construção de árvores filogenéticas.

2.7 ELETROFORESE

Os produtos das amplificações e das digestões enzimáticas foram visualizados após eletroforese (100 V/45 minutos) em gel de agarose a 3% para o produto *pX* e em gel de agarose a 2% para os produtos 5'*LTR* do HTLV-1 e do HTLV-2, em tampão TAE 1x (TAE 50x estoque – TrisBase 1,6 M, Acetato de Na 0,8 M e EDTA-Na₂ 40 mM/1000 mL água deionizada), contendo 5 µL de brometo de etídio (10mg/mL), mediante a utilização de transiluminador com fonte de luz ultra-violeta.

2.8 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DA PCR

Foi realizada a reação de purificação dos produtos amplificados da região 5'*LTR* a partir da PCR, com o objetivo de ter melhorado o processo de sequenciamento de bases nucleotídicas. O processo de purificação seguiu o protocolo da *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen, INC., USA).

2.9 SEQUENCIAMENTO

Após a purificação do produto da PCR (região 5'*LTR*), o DNA amplificado foi submetido ao sequenciamento automático. A metodologia utilizada baseou-se na síntese bioquímica da cadeia de DNA através do método de Sanger *et al.* (1977) pelo *kit* da *ABI PRISM™ 310 BigDye Terminator v3.1 Matrix Standards* (*Applied Biosystems*). As fitas de DNA foram sequenciadas em ambas as direções, usando-se o equipamento de sequenciamento automático *ABI PRISM 310 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*). A técnica foi realizada de acordo com o protocolo que se segue:

i) Para cada reação, misturar os seguintes reagentes em um tubo marcado:

- <i>Terminator Ready Reaction Mix</i>	0,5 µL
- Tampão	1,0 µL
- DNA 10-30 ng (produto da PCR purificado)	0,5 µL
- Iniciadores (5,0 pmol/µL)	1,0 µL
- H ₂ O deionizada	<u>7,0 µL</u>
- TOTAL	10,0 µL

O *Terminator Ready Reaction Mix* é composto de *A-Dye Terminator*, *G-Dye Terminator*, *C-Dye Terminator*, *T-Dye Terminator*, dGTP, dATP, dCTP, dTTP, Tris-HCl pH 9,0, MgCl₂, Pirofosfato Termo-estável e *AmpliTaq* DNA Polimerase, Fs.

ii) Colocar os tubos contendo a mistura no termociclador (*GeneAmp PCR System 2400*) e realizar 35 ciclos de 10 segundos a 94°C, 5 segundos a 57°C e 4 minutos a 60°C. Ao final do processo, resfriar a mistura para 4°C.

2.9.1 Precipitação do DNA sequenciado

- i) Adicionar 40 μ L de isopropanol a 65% aos 10 μ L da solução anteriormente seqüenciada;
- ii) Homogeneizar em agitado mecânico (vórtex);
- iii) Deixar a temperatura ambiente, não expondo à luz, por 15 minutos;
- iv) Centrifugar por 25 minutos a 14000 rpm;
- v) Desprezar o sobrenadante;
- vi) Adicionar 300 μ L de etanol a 60%;
- vii) Centrifugar a 14.000 rpm por 5 minutos;
- viii) Desprezar o sobrenadante;
- ix) Secar na estufa a 37°C.

2.9.2 Eletroforese do DNA sequenciado

O sistema de eletroforese utilizou o sequenciador *ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*. A corrida foi realizada seguindo o protocolo do fabricante em um capilar de 61 cm, nas seguintes condições: voltagem de corrida 12,2 kV, corrente 3-5 μ A, temperatura 50°C e tempo de corrida de 2 horas e 45 minutos.

2.10 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS

2.10.1 Edição e alinhamento das seqüências

A análise comparativa entre as seqüências nucleotídicas exigiu um perfeito alinhamento das mesmas, considerando-se o pareamento de bases homólogas. O alinhamento foi realizado por meio do programa *Clustal X* (Thompson *et al.*, 1997) operado em Windows.

2.10.2 Análise nucleotídica

As análises referentes à frequência das bases nucleotídicas, à determinação das taxas de transversão/transição e o grau de divergência genética, entre as seqüências nucleotídicas e o perfil filogenético das cepas foram realizadas com o auxílio do programa MEGA-4 – *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* versão 4.0 (Tamura *et al.*, 2007).

2.10.3 Análise filogenética

As relações filogenéticas entre os HTLV-1 e os HTLV-2 que foram isolados neste estudo, com outras seqüências previamente descritas na literatura e que estão disponíveis no *Genebank*, foram estabelecidas a partir das seqüências nucleotídicas da região 5'*LTR*, as quais foram avaliadas a título de comparação e discussão, com o auxílio do método de Agrupamento de Vizinhos (*Neighbor-Joining*) para reconstrução das análises filogenéticas.

2.10.3.1 Método de agrupamento de vizinhos (*Neighbor-Joining*)

O método de Agrupamento de Vizinhos (*Neighbor-Joining*) refere-se à distância genética entre as amostras, agrupando-as de acordo com a maior similaridade (Saitou & Nei, 1987). De acordo com esse método, primeiramente estabelece-se os cálculos para o percentual de divergências entre todos os pares de seqüência, corrigindo estes valores para múltiplas substituições ao usar o modelo de Kimura 2-parâmetros e as distâncias corrigidas são usadas para construir as árvores filogenéticas. Para a realização do mesmo, foi utilizado ainda o programa MEGA-4 – *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* versão 4.0 (Tamura *et al.*, 2007). A sustentação estatística da árvore

filogenética foi efetuada por meio da análise de *bootstrap* que gerou 1000 réplicas aleatórias do banco de dados.

2.11 CARACTERIZAÇÃO DA CARGA PROVIRAL

Naqueles pacientes que apresentaram infecção pelo HTLV, a quantificação da carga proviral para esse agente viral foi realizada por meio da PCR em Tempo Real utilizando o sistema *TaqMan* de três seqüências alvo desenvolvido pela Applied Biosystems (PE Applied Biosystems, Foster City, USA), seguindo protocolo previamente descrito (Tamegão-Lopes *et al.*, 2006).

2.12 QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD4⁺ E LINFÓCITOS T CD8⁺

As amostras de sangue dos pacientes com diagnóstico clínico de PET/MAH ou outros sintomas neurológicos soropositivos para o HTLV, dos portadores da infecção assintomáticos e dos indivíduos controles soronegativos foram processadas dentro de 4 horas após a coleta. A contagem de células T foi determinada por Citometria de Fluxo (FacsCount, Becton & Dickinson, USA) usando o kit de imunomonitoramento da FacsCountTM Reagents de acordo com o protocolo padrão recomendado pelo fabricante (Becton Dickinson, USA).

2.13 MÉTODOS ESTATÍSTICOS

As análises comparativas dos valores dos níveis de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ entre os grupos de portadores de PET/MAH, de assintomáticos e de soronegativos foram efetuadas por meio do método de Kruskal-Wallis. Enquanto que os valores de carga proviral entre assintomáticos e sintomáticos infectados pelo HTLV,

foram analisados por meio do teste t-Student. A distribuição das frequências dos tipos de HTLV circulantes entre os grupos portadores da infecção foi analisada pelo teste Qui-quadrado. Sendo que ambos os testes utilizados foram executados usando-se o programa BioEstat 5.0v (Ayres et al., 2008).

A metodologia completa utilizada neste trabalho pode ser observada de maneira resumida na Figura 8.

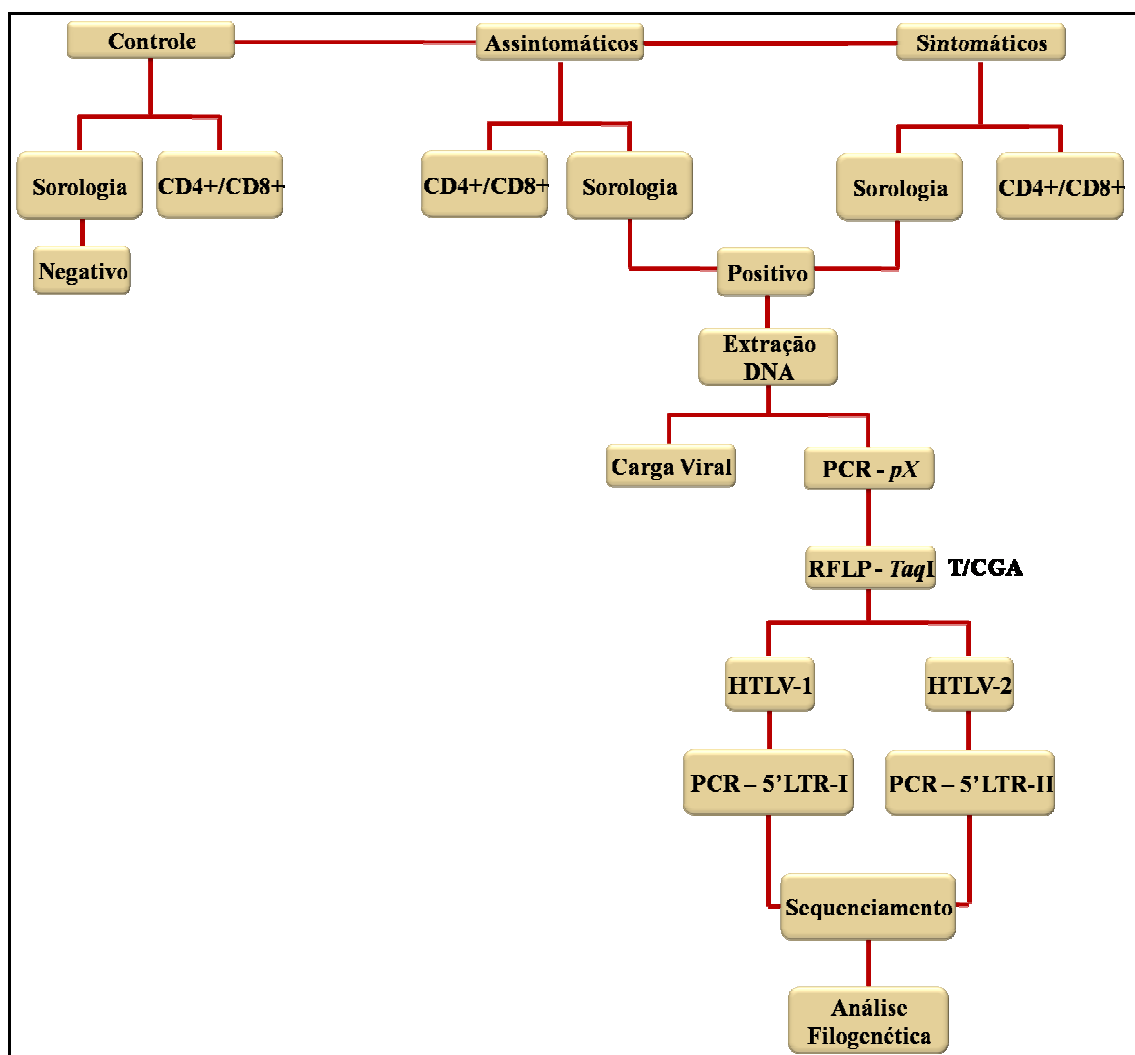


Figura 8 – Algoritmo da metodologia utilizada.

3 RESULTADOS

3.1 REAÇÃO EM CADEIA MEDIADA PELA POLIMERASE (PCR)

3.1.1 Amplificação da região *pX* pela PCR

Entre as 42 amostras do grupo de assintomáticos e as 19 amostras do grupo com doença neurológica, todas confirmaram a infecção por meio da amplificação e detecção de 159pb da região *pX* do HTLV, utilizando o método da *Nested* PCR (Figura 9).

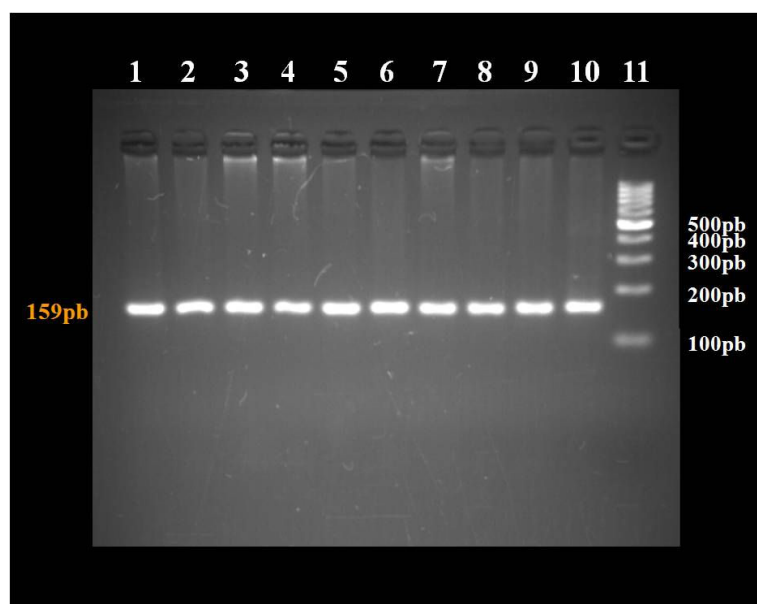


Figura 9 - Perfil eletroforético do fragmento de 159pb amplificado da região *pX* do genoma proviral do HTLV. 1-10: amostras positivas; 11: DNA ladder 100pb.

3.1.2 Análise de Polimorfismo com Enzimas de Restrição (RFLP) da Região *pX*

Após a amplificação da região *pX*, as amostras dos grupos de portadores da infecção foram submetidas à análise por RFLP, para a diferenciação dos tipos virais, utilizando-se a endonuclease de restrição *TaqI*.

Foi observada na amostra geral, considerando todos os indivíduos portadores da infecção independentemente do quadro clínico, uma predominância da

infecção pelo HTLV-1 (86.9%) em detrimento da infecção pelo HTLV-2 (13.1%). Esta diferença entre o número de infectados, de acordo com o tipo viral, foi estatisticamente significativa ($p < 0.0001$, $X^2 = 31.738$) (Figura 10).

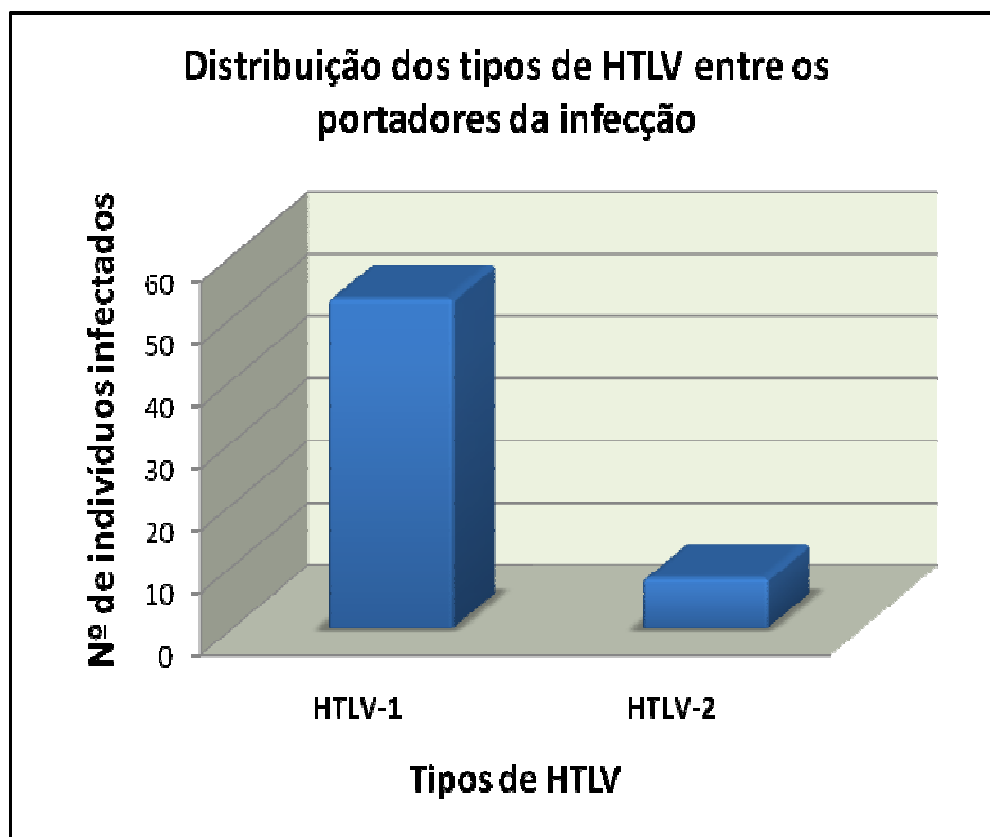


Figura 10 - Distribuição dos tipos de HTLV entre os portadores da infecção em geral.

Entre as amostras de assintomáticos, a presença do sítio de restrição para a enzima *TaqI* (T/CGA) foi observada em sete amostras (16,7%), o que caracteriza infecção pelo HTLV-2. Sendo então observada a ausência do sítio de restrição em 35 amostras (83,3%), caracterizando-as como infectadas pelo HTLV-1 (Figura 11).

As amostras do grupo de sintomáticos apresentaram, perante esta análise, a infecção pelo HTLV-1 em 18 amostras (94,7%), das quais 16 pertencem a indivíduos com diagnóstico de PET/MAH, uma pertence a indivíduo com diagnóstico de Neuropatia periférica de membro inferior esquerdo e outra a indivíduo com Neuropatia periférica. Enquanto que a infecção pelo HTLV-2 foi determinada em apenas uma amostra (5,3%) de um paciente com diagnóstico de Neuropatia periférica (Tabela 4).

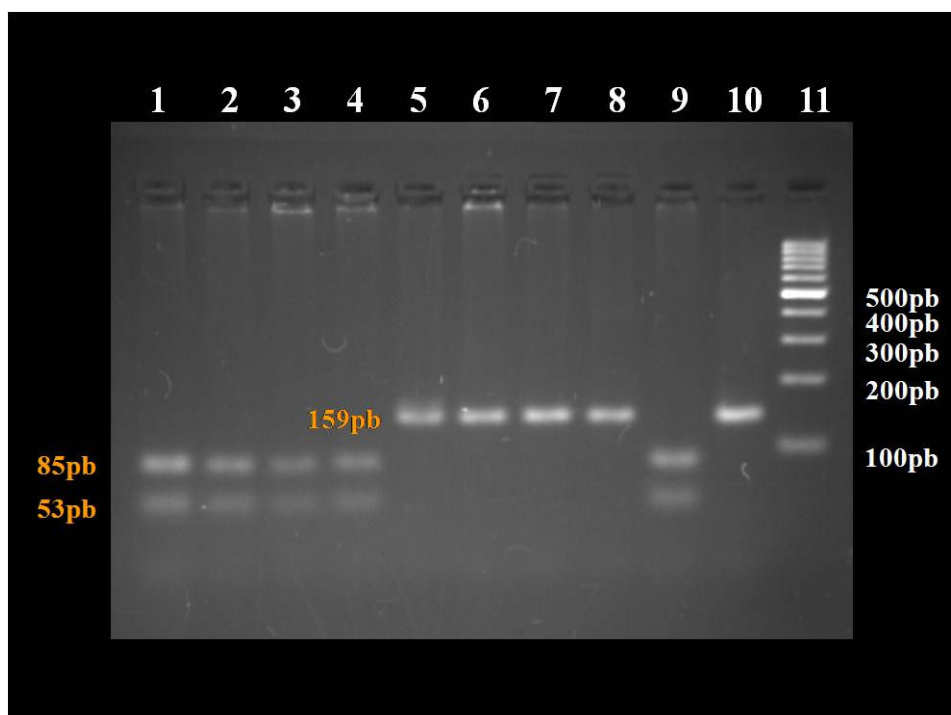


Figura 11 - Perfil de RFLP, com a enzima *TaqI*, a partir do fragmento de 159pb da região *pX* do genoma proviral do HTLV. 1-4: amostras positivas para HTLV-2; 5-8: amostras positivas para HTLV-1; 9: controle positivo de HTLV-2; 10: controle positivo de HTLV-1; 11: DNA ladder 100pb.

Tabela 4 – Distribuição da infecção, por tipo de HTLV, entre os grupos analisados.

	Sintomáticos		Assintomáticos		Total	
	N	Frequência (%)	N	Frequência (%)	N	Frequência (%)
HTLV-1	18	94.7	35	83.3	53	86.9
HTLV-2	1	5.3	7	16.7	8	13.1
Total	19	100	42	100	61	100

Fazendo uma análise comparativa das distribuições dos tipos virais circulantes entre o grupo de indivíduos assintomáticos e o grupo de pacientes sintomáticos, não foi verificada diferença significativa, uma vez que há distribuição mais elevada de HTLV-1 e mais baixa de HTLV-2 em ambos os grupos ($p = 0.4166$, $X^2 = 1.493$). Entretanto, avaliando estas distribuições dentro de cada grupo foi evidenciada significância estatística tanto entre os sintomáticos ($p = 0.0002$, $X^2 = 13.474$) quanto entre os assintomáticos ($p < 0.0001$, $X^2 = 17.357$), demonstrando assim que há tendência significativa de se ter um maior número de indivíduos infectados pelo HTLV-1 em relação à infecção pelo HTLV-2 em ambos os grupos (Figura 12).

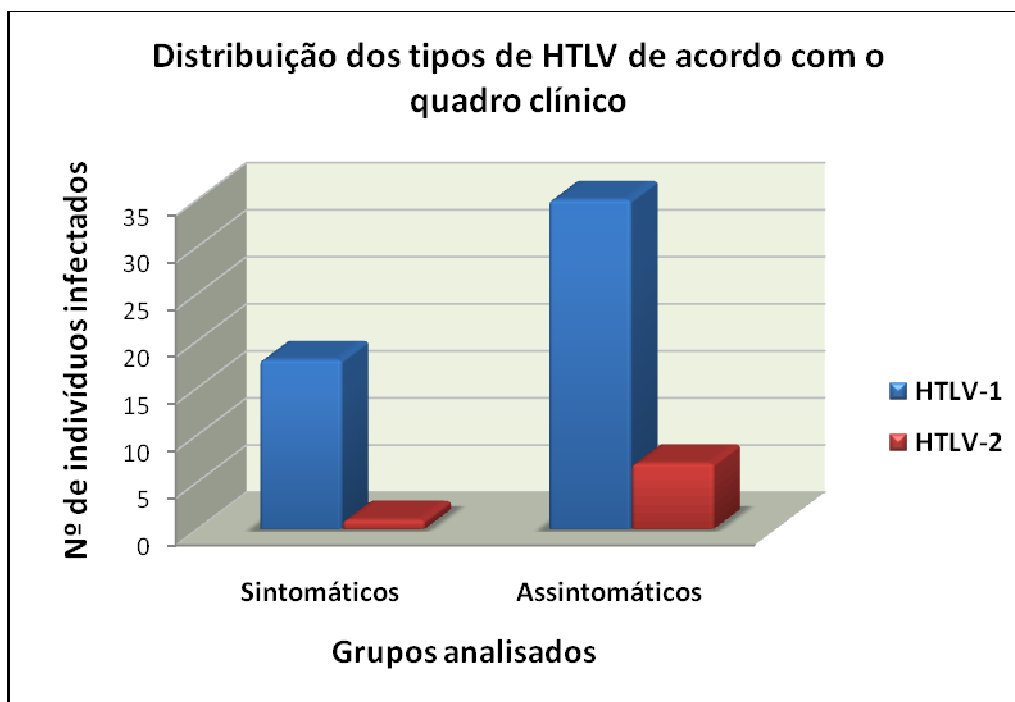


Figura 12 - Distribuição dos tipos de HTLV entre indivíduos assintomáticos e sintomáticos.

3.1.3 Amplificação da Região 5'*LTR* do HTLV-1 pela PCR

Entre as 35 amostras de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e assintomáticos, 21 (60%) tiveram o segmento de 800pb da região 5'*LTR* amplificado (Figura 13), e posteriormente sequenciado e submetido à análise filogenética. À medida que entre as 18 amostras de pacientes infectados pelo HTLV-1 e sintomáticos, 13 (72.2%) obtiveram o mesmo fragmento da região 5'*LTR* amplificado e, também, subsequentemente sequenciado e submetido a uma análise filogenética.

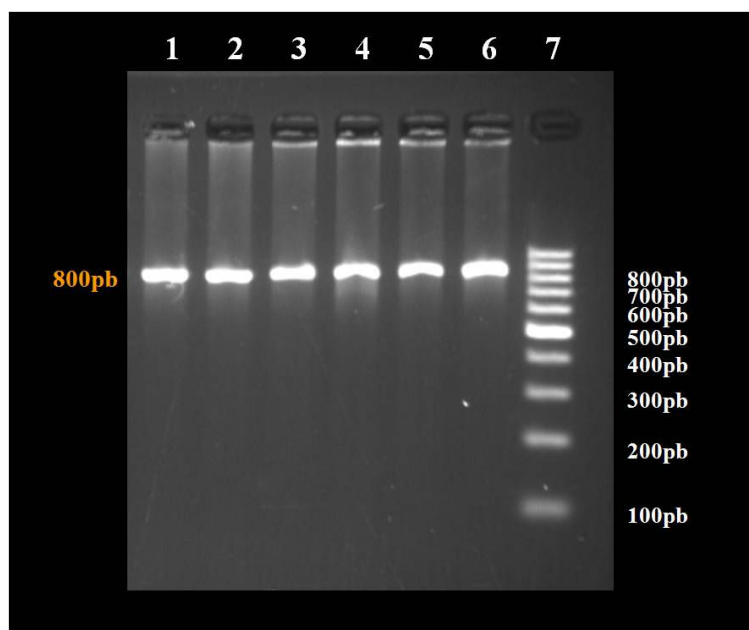


Figura 13 – Perfil eletroforético do fragmento de 800pb amplificado da região 5'*LTR* do genoma proviral do HTLV-1. 1-6: amostras positivas; 7: DNA ladder 100pb.

3.1.4 Amplificação da Região 5'*LTR* do HTLV-2 pela PCR

Das sete amostras infectadas pelo HTLV-2 e que pertencem ao grupo de assintomáticos, quatro (57.1%) tiveram o segmento de 788pb da região 5'*LTR* amplificado (Figura 14), sequenciado e submetido à análise filogenética. Assim como a única amostra caracterizada como infectada pelo HTLV-2, dentre os pacientes sintomáticos, também teve tal fragmento amplificado e posteriormente sequenciado para uma análise filogenética.

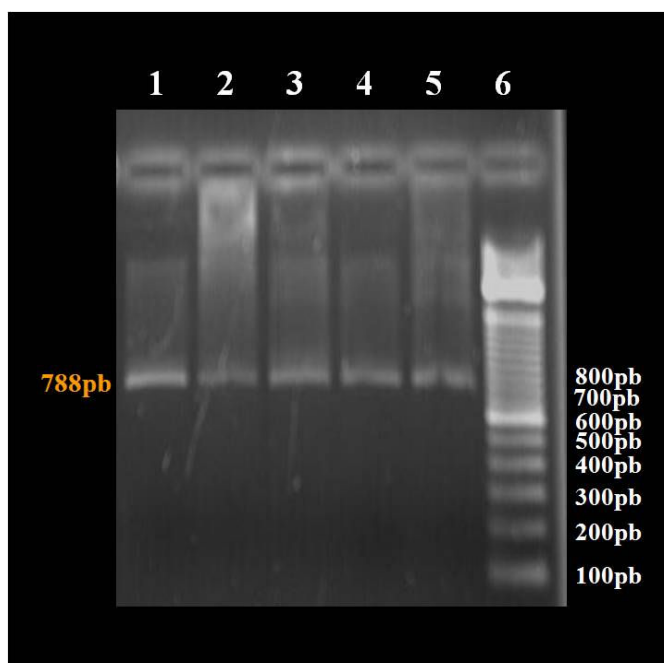


Figura 14 – Perfil eletroforético do fragmento de 788pb amplificado da região *LTR* do genoma proviral do HTLV-2. 1-5: amostras positivas; 6: DNA ladder 100pb.

3.2 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS NUCLEOTÍDICAS

3.2.1 Análise nucleotídica da região 5'*LTR* do HTLV-1 e do HTLV-2

Por meio do sequenciamento de bases nucleotídicas, no sentido *forward*, foi possível obter um fragmento de 733pb da região 5'*LTR* do HTLV-1 e 760pb da região *LTR* do HTLV-2, ambos os fragmentos sequenciados correspondentes as 34 amostras caracterizadas como infectadas pelo HTLV-1 que tiveram sucesso na amplificação da região 5'*LTR* (21 de assintomáticos e 13 de sintomáticos), bem como correspondentes as cinco amostras infectadas pelo HTLV-2 que também tiveram a região 5'*LTR* amplificada anteriormente (quatro de assintomáticos e uma de sintomático).

As regiões de HTLV-1 sequenciadas foram comparadas entre si, com cepas do protótipo HTLV-1_{ATK} (Seike *et al.*, 1983), e com outras sequências disponíveis

no *GenBank*. O mesmo foi feito para as regiões de HTLV-2 sequenciadas, as quais foram comparadas entre si, com cepas do protótipo do HTLV-2a (HTLV-2_{MOT}, Shimotohno *et al.*, 1985) e HTLV-2b (HTLV-2_{NRA}, Lee *et al.*, 1993) respectivamente, e com outras sequências disponíveis no *GenBank*.

Após a comparação das sequências da região 5'*LTR* de HTLV-1 do presente estudo entre si, observou-se uma similaridade média de 99,986%. À medida que na comparação das mesmas com o protótipo HTLV-1_{ATK} e posteriormente com as outras sequências do *GenBank* verificou-se uma similaridade média de 99,983% e 99,969% respectivamente.

A análise comparativa entre as sequências *LTR* de HTLV-2 do presente estudo, mostrou uma similaridade média de 99,993%. A comparação destas amostras isoladas com os protótipos HTLV-2a_{MOT} e HTLV-2b_{NRA} mostrou uma similaridade média de 99,99% e 99,983% respectivamente.

3.2.2 Análise Filogenética

A análise filogenética foi realizada por meio do método de Agrupamento de Vizinhos (*Neighbor-Joining*) executado no programa MEGA 3.1.

Entre as 35 amostras de indivíduos infectados pelo HTLV-1 e assintomáticos, 21 (60%) tiveram a região 5'*LTR* amplificada, sequenciada e analisada filogeneticamente, ocorrendo o mesmo com a região 5'*LTR* amplificada das 13 amostras (72.2%) de sintomáticos, dentre as 18 infectadas pelo HTLV-1.

A comparação das sequências nucleotídicas da região 5'*LTR* de HTLV-1 das amostras analisadas no presente estudo (assintomáticos: LTR1 18736, LTR1 18548, LTR1 18737, LTR1 17222, LTR1 16624, LTR1 17203, LTR1 19940, LTR1 18741,

LTR1 17205, LTR1 18500, LTR1 18378, LTR1 18856, LTR1 17206, LTR1 18857, LTR1 17416, LTR1 17417, LTR1 18745, LTR1 17202, LTR1 18793, LTR1 16621, LTR1 18795; sintomáticos: LTR1 18740, LTR1 15416, LTR1 18744, LTR1 18739, LTR1 18747, LTR1 18746, LTR1 15289, LTR1 16847, LTR1 12705, LTR1 15586, LTR1 15376, LTR1 18743, LTR1 18794) com outras 40 cepas disponíveis no *GenBank*, possibilitou a construção de uma árvore filogenética que demonstra o agrupamento de todas as amostras deste estudo no clado composto por isolados do subtipo Cosmopolita (ou HTLV-1a), subgrupo Transcontinental, com *bootstrap* de 66% (Figura 15).

Ao se comparar a frequência do Subtipo Cosmopolita, Subgrupo Transcontinental em 72.2% das amostras de HTLV-1 de sintomáticos com a frequência do mesmo subtipo em 60% das amostras de HTLV-1 dos assintomáticos, não se observou diferença com significância estatística ($p = 0.2299$, $X^2 = 1.441$).

Em relação à árvore filogenética obtida a partir da comparação das sequências nucleotídicas da região 5'*LTR* de HTLV-2 das cinco amostras isoladas (62.5%) entre as oito de HTLV-2 descritas no presente trabalho (assintomáticos: LTR2 18748, LTR2 16846, LTR2 17224, LTR2 15373; sintomático: LTR2 15371) com outras 40 cepas descritas no *GenBank*, foi possível verificar o agrupamento dos isolados deste trabalho no clado do subtipo HTLV-2c, que está filogeneticamente associado ao agrupamento do HTLV-2a, com valor de *bootstrap* de 63% (Figura 16).

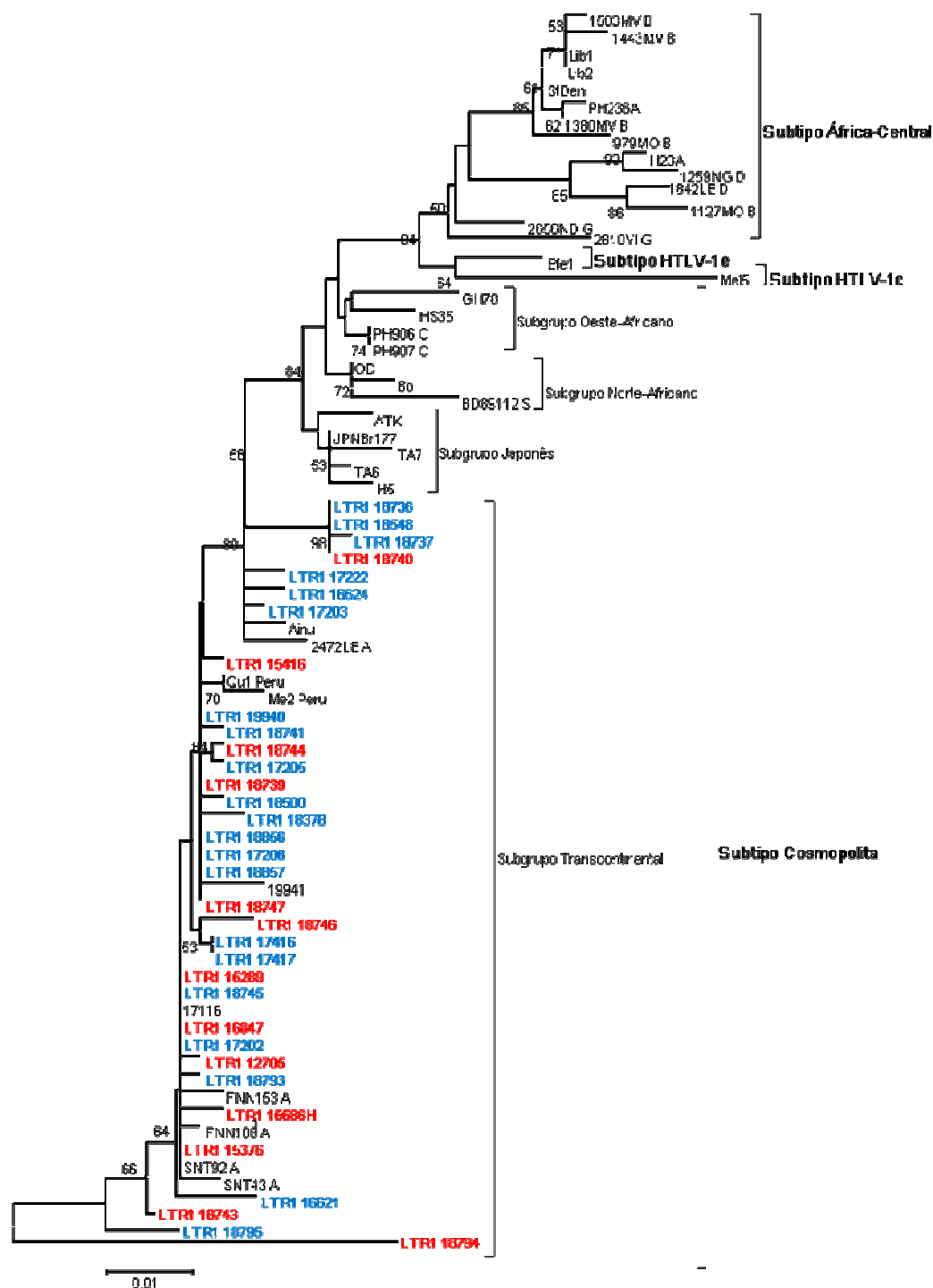


Figura 15 – Árvore filogenética enraizada mostrando as relações filogenéticas entre cepas do HTLV-1 descritas no presente trabalho (sintomáticos destacados em vermelho e assintomáticos destacados em azul) com aquelas disponíveis no *GenBank*. A árvore foi construída por meio do método de Agrupamento de Vizinhos (*Neighbor-Joining*) após o alinhamento de 427 nucleotídeos da região 5'LTR. A amostra Mel5 foi usada como grupo externo (*outgroup*). O suporte estatístico foi efetuado por meio do uso de 1000 réplicas do banco de dados (*bootstrap*).

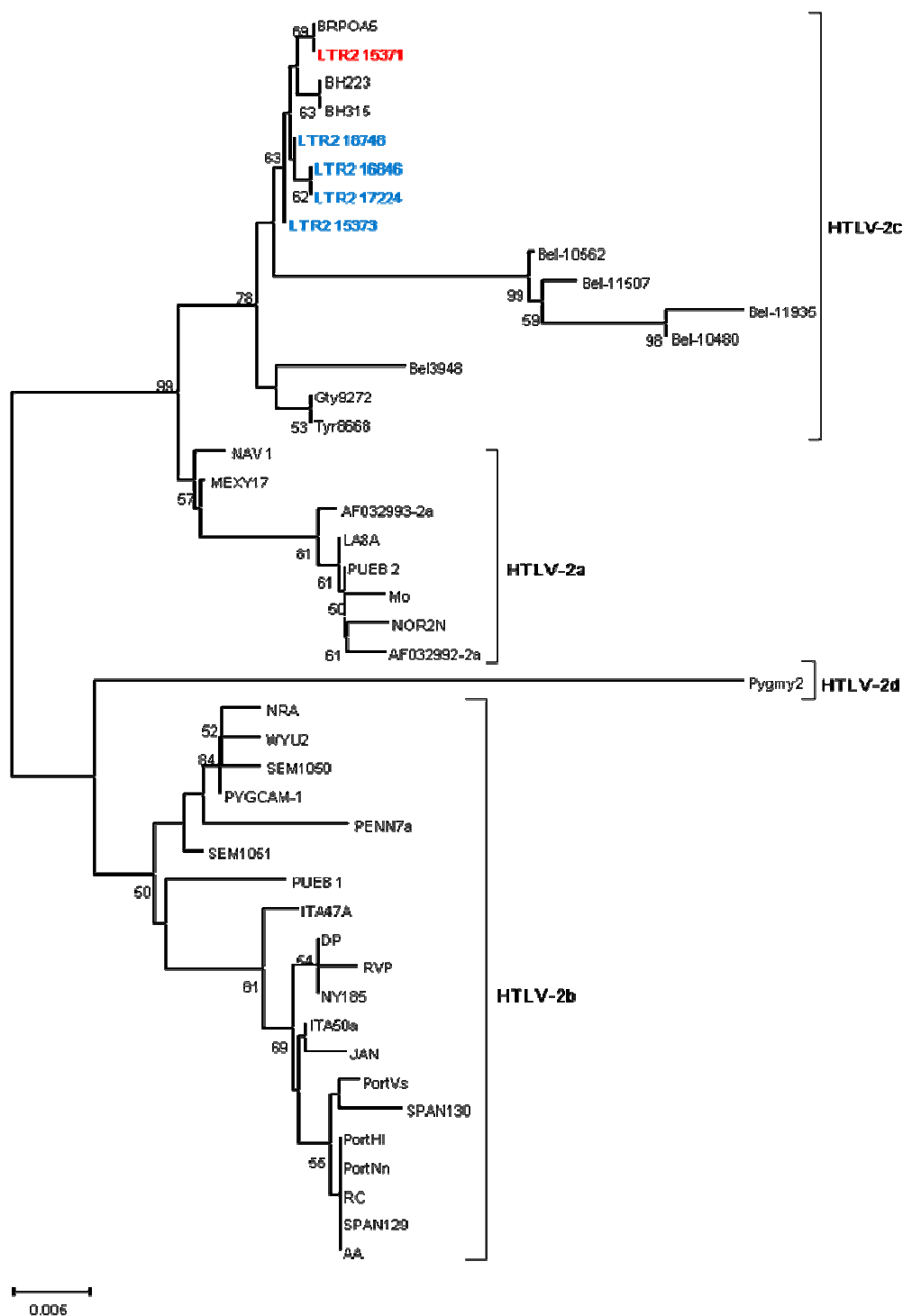


Figura 16 – Árvore filogenética enraizada mostrando as relações filogenéticas entre cepas do HTLV-2 descritas no presente trabalho (sintomático destacado em vermelho e assintomáticos destacados em azul) com aquelas disponíveis no *GenBank*. A árvore foi construída por meio do método de Agrupamento de Vizinhos (*Neighbor-Joining*) após o alinhamento de 435 nucleotídeos da região 5’*LTR*. O suporte estatístico foi efetuado por meio do uso de 1000 réplicas do banco de dados (*bootstrap*).

3.3 CARACTERIZAÇÃO DA CARGA PROVIRAL

Foi realizada, nos dois grupos portadores da infecção, a quantificação da carga proviral de HTLV por meio de PCR em Tempo Real. Entre os 42 indivíduos assintomáticos, todas as amostras tiveram êxito na quantificação da carga proviral que variou de zero (indetectável) a 3080 DNA/mm³, com média de 252 DNA/mm³ (DP = 566.9). Entre os 19 indivíduos sintomáticos, todos também tiveram êxito nesta quantificação que variou de zero (indetectável) a 6297 DNA/mm³, com média de 1342 DNA/mm³ (DP = 1675.2) (Tabela 5). É importante ressaltar que entre os pacientes sintomáticos, apenas um apresentou carga proviral indetectável, o qual tem o diagnóstico de Polineuropatia periférica.

Tabela 5 – Estatística descritiva dos valores de carga proviral obtidos dos grupos estudados.

	Carga Proviral (cópias DNA/mm³)		
	Mínimo	Máximo	Média / DP
Sintomáticos	0	6297	1342 / ±1675.2
Assintomáticos	0	3080	252 / ±566.9

A análise das diferenças entre os valores de carga proviral dos grupos estudados, por meio do teste t-Student, executado no programa BioEstat 5.0v, demonstrou que existe diferença estatisticamente significativa entre as médias de carga proviral dos dois grupos, apresentando um valor de *t* significativo (2,7641), com probabilidade igual a 0,0123. Este resultado sugere a hipótese de que existe diferença nos níveis de carga proviral entre indivíduos infectados pelo HTLV com doença

nerológica associada a esta infecção e indivíduos infectados assintomáticos, sendo em média mais altos aqueles níveis de carga proviral pertencentes ao grupo de indivíduos doentes (Figura 17).

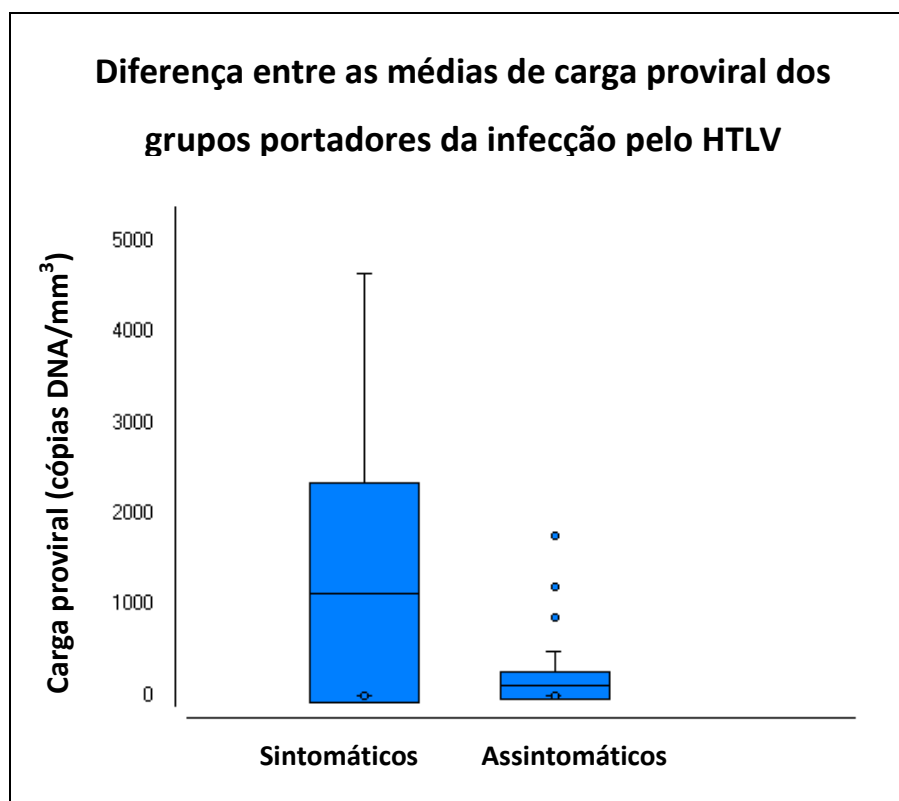


Figura 17 – Distribuição das médias de carga proviral entre indivíduos infectados pelo HTLV assintomáticos e sintomáticos por meio do teste *t-Student*.

3.4 QUANTIFICAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD4⁺ E T CD8⁺

Todos os indivíduos portadores do HTLV assintomáticos tiveram os níveis de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ quantificados, tendo os níveis de linfócitos T CD4⁺ uma variação de 342 a >2000 células/microlitro, com média de 1075 células/microlitro (DP ±344.7). Os níveis de linfócitos T CD8⁺ variaram de 297 a 1049 células/microlitro, com média de 589 células/microlitro (DP ±190.8).

Em relação aos pacientes infectados pelo HTLV-1 e pelo HTLV-2 sintomáticos, todos também tiveram quantificados seus níveis de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, sendo que os níveis de linfócitos T CD4⁺ variaram de 388 a 1883 células/microlitro, com média de 1188 células/microlitro (DP \pm 452.6), enquanto que os níveis de linfócitos T CD8⁺ variaram de 188 a 1673 células/microlitro, com média de 668 células/microlitro (DP \pm 395.2).

Um grupo controle, constituído de 100 indivíduos soronegativos para o HTLV-1/2, também teve os níveis de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ quantificados, onde a quantidade de células T CD4⁺, neste grupo, variou de 422 a 2231 células/microlitro, com média de 1047 células/microlitro (DP \pm 327.6), à medida que a quantidade de células T CD8⁺ variou de 232 a 1749 células/microlitro, com média de 647 células/microlitro (DP \pm 258.8) (Tabela 6).

Tabela 6 – Estatística descritiva dos níveis de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ obtidos dos grupos estudados.

	T CD4 ⁺ (células/ μ l)			T CD8 ⁺ (células/ μ l)		
	Mínimo	Máximo	Média / DP	Mínimo	Máximo	Média / DP
Sintomáticos	388	1883	1188 / \pm 452.6	188	1673	668 / \pm 395.2
Assintomáticos	342	2000	1075 / \pm 344.7	297	1049	589 / \pm 190.8
Controle	428	2231	1047 / \pm 327.6	232	1749	648 / \pm 258.8

A distribuição das médias dos níveis de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, entre os grupos de indivíduos analisados para estas variáveis, demonstrou proximidade entre os valores, podendo-se observar que em média os níveis para as duas células são maiores no grupo de indivíduos sintomáticos, como se pode visualizar na Figura 18.

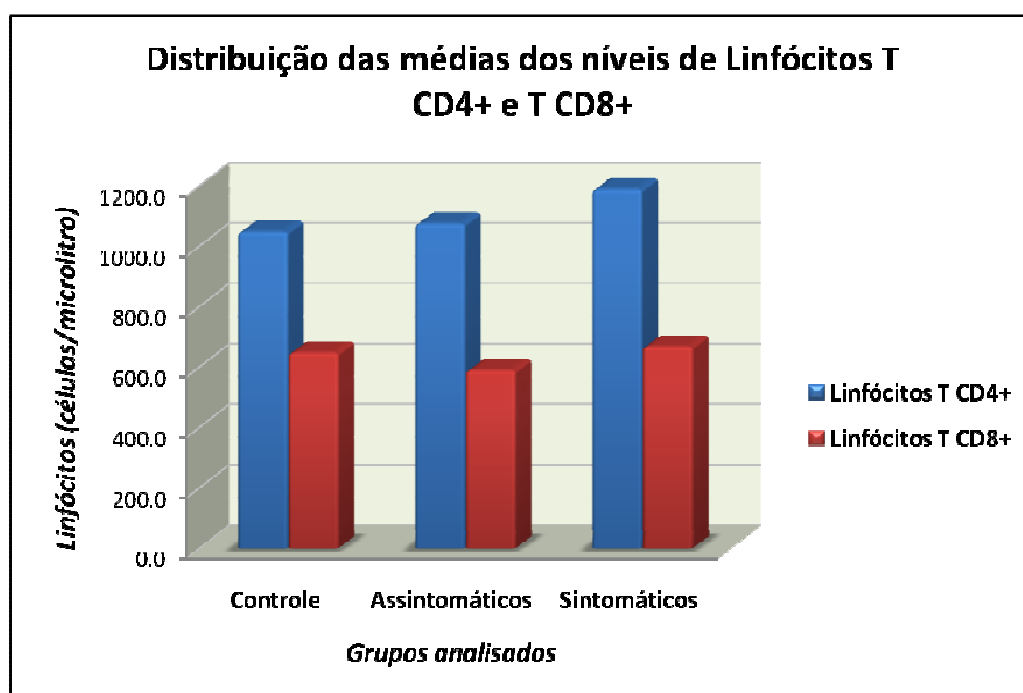


Figura 18 - Distribuição das médias dos níveis de Linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ entre os grupos de indivíduos infectados pelo HTLV (assintomáticos e sintomáticos) e controles sadios.

Entretanto, quando se avaliou a diferença estatística entre as médias de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ dos grupos estudados no presente trabalho, respectivamente, por meio do teste de Kruskal-Wallis, executado no programa BioEstat 5.0v, verificou-se que não há significância entre estas diferenças (linfócitos T CD4⁺: $H=1.6292$ e $p=0.4428$; linfócitos T CD8⁺: $H=1.1535$ e $p=0.5617$), assim revelando que, no presente estudo, estes níveis apresentam-se, em média, de maneira normal e semelhantes entre os indivíduos portadores da infecção pelo HTLV (Figuras 19 e 20).

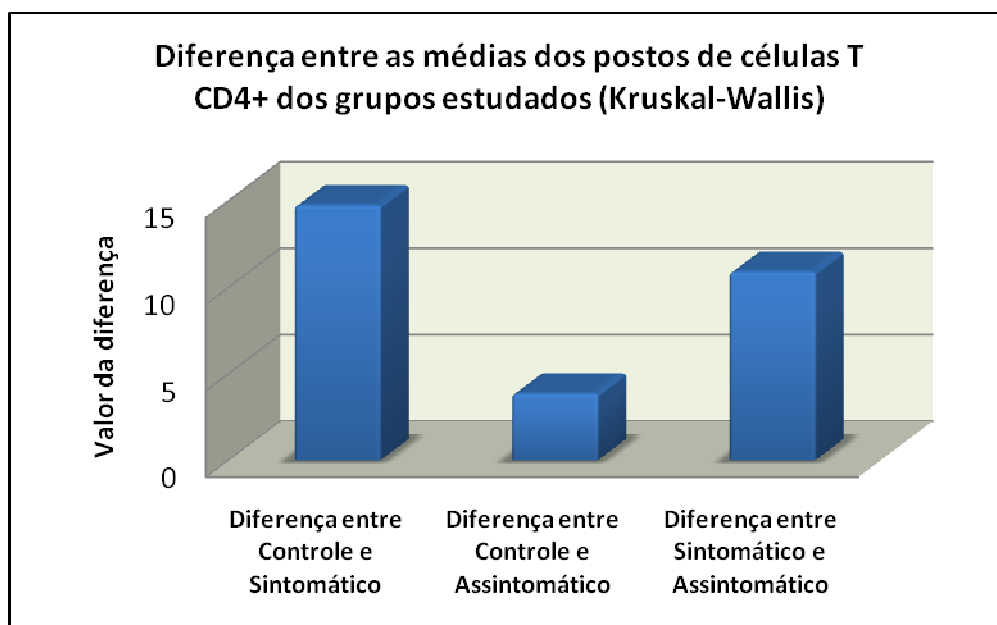


Figura 19 – Análise das diferenças entre as médias dos postos de linfócitos T CD4⁺ dos grupos estudados no presente trabalho, por meio do teste de Kruskal-Wallis.

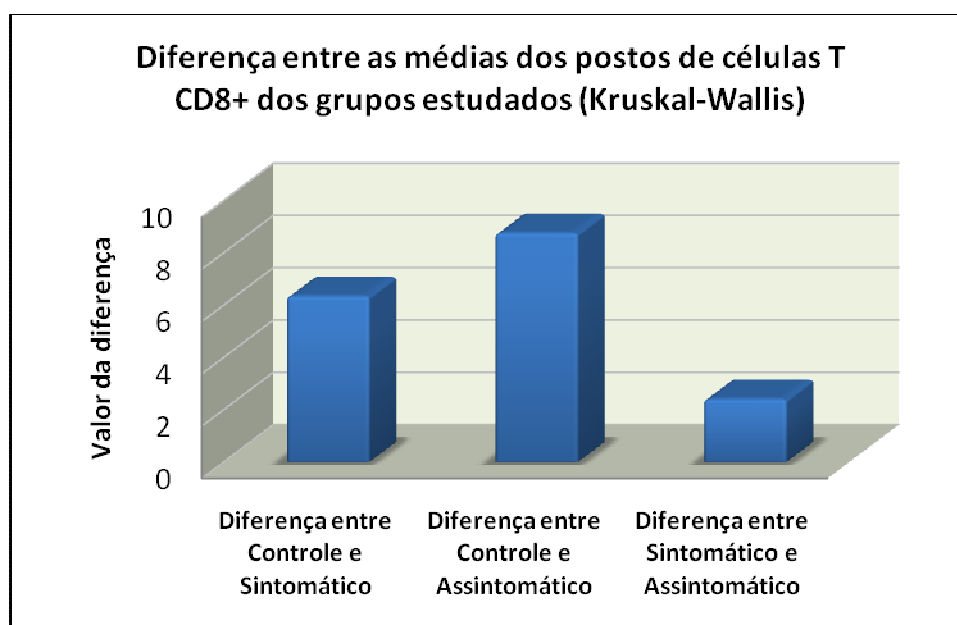


Figura 20 – Análise das diferenças entre as médias dos postos de linfócitos T CD8⁺ dos grupos estudados no presente trabalho, por meio do teste de Kruskal-Wallis.

4 DISCUSSÃO

Atualmente, estima-se que cerca de 20 milhões de pessoas estejam infectadas pelo HTLV no mundo, mas as taxas de soroprevalência variam de acordo com a área geográfica, a composição sócio-demográfica da população estudada e os comportamentos de risco de grupos individuais (Proietti *et al.*, 2005; Catalan-Soares & Proietti, 2006). Sendo que no Brasil, desde 1989, há estudos relatando a ocorrência de HTLV-1 e HTLV-2, assim como a ocorrência e caracterização da infecção por estes agentes associados ou não com doenças (Castro *et al.*, 1989; Cortes *et al.*, 1989; de Oliveira *et al.*, 1990; Castro-Costa *et al.*, 1991; Proietti *et al.*, 1994; Galvão-Castro *et al.*, 1997; Ishak *et al.*, 2002, Souza *et al.*, 2006).

O presente trabalho relata características moleculares e imunológicas da infecção pelo HTLV-1/2 em uma população constituída por um grupo de indivíduos portadores assintomáticos e outro de indivíduos com diagnóstico clínico de PET/ MAH e de Neuropatia periférica. Foi também utilizada uma amostragem de indivíduos controles sadios soronegativos para o HTLV-1/2 para a comparação dos níveis de linfócitos T CD4+ e TCD8+ com os grupos de infectados pelo HTLV.

Segundo Carneiro-Proietti *et al.* (2002), a infecção pelo HTLV-1 é mais prevalente no mundo, quando comparada à infecção pelo HTLV-2. A caracterização molecular da infecção pelo HTLV no presente estudo, em todos os portadores da infecção, independentemente de quadro clínico, mostrou uma predominância estatisticamente significativa da infecção pelo HTLV-1 entre 53 indivíduos (86.9%) em relação à infecção pelo HTLV-2 que ocorreu em 08 portadores (13.1%). Estes resultados estão de acordo com prévios relatos de Kazanji & Gessain (2003), na Guiana Francesa, e Diop *et al.* (2006), no Senegal; bem como em vários outros estudos

realizados no Brasil (Ferreira Júnior *et al.*, 1995; Brito *et al.*, 1998; Colin *et al.*, 2003; Vallinoto *et al.*, 2004, 2006). Entretanto, relatos de Vallinoto *et al.* (1998) e Laurentino *et al.* (2005) demonstraram maior prevalência de HTLV-2 em relação ao HTLV-1 entre indivíduos coinfectados pelo HIV, no norte do Brasil, assim como na região sul por Morimoto *et al.* (2005).

A distribuição dos tipos virais circulantes, no presente trabalho, entre os grupos de indivíduos assintomáticos, mostrou uma maior prevalência estatisticamente significativa do HTLV-1 (83.3%) em relação ao HTLV-2 (16.7%), corroborando achados de Kashima *et al.* (2006), no Brasil, que envolveram indivíduos portadores sadios que mostraram infecção apenas pelo HTLV-1; entre outros estudos em doadores de sangue no Brasil (Ferreira Júnior *et al.*, 1995; Colin *et al.*, 2003; Mota-Miranda *et al.*, 2008), em Moçambique (Gudo *et al.*, 2009) e Peru (Quispe *et al.*, 2009) que também relataram a prevalência de HTLV-1 nos respectivos trabalhos.

Entre os 19 indivíduos com doença neurológica associada ao HTLV, 18 (94.7%) tiveram confirmado a infecção pelo HTLV-1 (16 com PET/MAH, um com Mononeuropatia periférica e outro com Polineuropatia periférica), e apenas um (5.3%) confirmou a infecção pelo HTLV-2 (com Polineuropatia periférica). Estes resultados, que demonstram predominância de HTLV-1 com significância estatística entre os sintomáticos, estão de acordo com estudos de Ishak *et al.* (2002) e Souza *et al.* (2006) realizados em indivíduos com diagnóstico de PET/MAH, em Belém-Pará, que apresentaram infecção predominante pelo HTLV-1 associada ao desenvolvimento de doença neurológica como a PET/MAH, entre outras pesquisas também realizadas em portadores com esta doença neurológica no Brasil que mostraram a predominância do mesmo tipo viral (Araújo *et al.*, 1996; Castro-Costa *et al.* 1991; Segurado *et al.*, 2002).

Apesar do potencial patogênico do HTLV-2 ainda não estar completamente esclarecido na literatura, a presença de manifestações clínicas neurológicas neste único paciente com HTLV-2 do grupo de sintomáticos, assim como os poucos casos relatados na literatura de pacientes infectados por este tipo viral que apresentam sintomatologia de doença neurológica similar à PET/HAM (Zehender *et al.*, 1998; Orland *et al.*, 2003; Posada-Vergara *et al.*, 2006), torna possível a relação deste tipo de vírus com doença.

Ademais, Orland *et al.* (2003) sugere que a mielopatia associada ao HTLV-2 geralmente se apresenta com sinais e sintomas mais fracos com progressão mais lenta e, em associação a isto, vale ressaltar que o indivíduo sintomático infectado pelo HTLV-2 na presente pesquisa, teve o diagnóstico de Polineuropatia periférica. Enquanto que Posada-Vergara *et al.*, (2006) sugere que as manifestações neurológicas podem ser mais frequentes entre coinfectados HTLV-2/HIV-1 do que em monoinfectados pelo HTLV-2.

Deve-se considerar também que a região Amazônica é endêmica para o HTLV-2, tanto entre indígenas quanto entre residentes da área urbana (Ishak *et al.* 1995, 2001; Vallinoto *et al.*, 1998, 2002; Laurentino *et al.*, 2005), podendo tornar o presente achado (infecção pelo HTLV-2 em 5.3% dos sintomáticos e 16.7% dos assintomáticos) em um reflexo desta característica epidemiológica peculiar à região, o que justifica a busca ativa da identificação de sintomas associados à infecção pelo HTLV-2.

A identificação de todas as amostras de HTLV-1, que tiveram sucesso na amplificação e sequenciamento da região *LTR* (60% dos assintomáticos e 72.2% dos sintomáticos), ao Subtipo Cosmopolita, Subgrupo Transcontinental, está de acordo com estudos anteriores que demonstraram a maior frequência deste subtipo viral na América

do Sul (Kazanji & Gessain, 2003; Pouliquen *et al.*, 2004), e em pacientes com PET/MAH no Brasil, o qual é predominante, também, em casos assintomáticos (Segurado *et al.*, 2002; Kashima *et al.* 2006; Souza *et al.*, 2006), assim como é predominante em indivíduos da população geral e de grupos específicos como UDIs e grávidas (Alcântara Júnior *et al.*, 2003). É importante ressaltar ainda que este subtipo tenha sido o único encontrado, até então, infectando indivíduos da área urbana e rural do estado do Pará (Laurentino *et al.*, 2005; Vallinoto *et al.*, 2006), a exceção de imigrantes japoneses residentes em Tomé-Açú, onde o Subgrupo Japonês também foi encontrado (Vallinoto *et al.*, 2004).

Contudo, apesar de se observar uma elevada prevalência, estatisticamente significante, do Subtipo Cosmopolita de HTLV-1 nos sintomáticos (72.2%), no presente trabalho, este subtipo viral não está estatisticamente associado com o quadro clínico destes indivíduos, uma vez que quando comparados com o grupo de assintomáticos (60%), ambos demonstraram predominância do subtipo Cosmopolita, subgrupo Transcontinental, sem a presença de diferenças significantes. Este achado corrobora prévios estudos que indicam que a ocorrência de PET/MAH ou outra doença associada ao HTLV não está relacionada a um ou mais subtipos específicos (Segurado *et al.*, 2002; Catalan-Soares & Proietti, 2006).

No presente trabalho, a análise filogenética das amostras infectadas pelo HTLV-2 e que tiveram a região *LTR* sequenciada (quatro entre sete assintomáticos e o único sintomático), possibilitou a confirmação da ocorrência do subtipo 2c em todas estas. Este subtipo tem sido o mais frequentemente descrito em populações indígenas, rurais e urbanas da Amazônia brasileira (Ishak *et al.*, 1995, 2001; Vallinoto *et al.* 2002; Laurentino *et al.*, 2005), a exceção da recente identificação do subtipo 2b em doadores

de sangue de Belém (Santos *et al.*, 2008), apesar da descrição da maior prevalência dos subtipos 2a e 2b em outras regiões brasileiras como foi relatado por Alcântara *et al.* (2003) em Salvador, por Novoa *et al.* (2007) em São Paulo e por Renner *et al.* (2006) em Porto Alegre. Frente a isto, vale ressaltar que o subtipo HTLV-2c, encontrado na Amazônia, representa um subtipo molecular único, filogeneticamente associado ao HTLV-2a (Ishak *et al.*, 1995; Vallinoto *et al.*, 2002; Laurentino *et al.*, 2005).

Os achados deste trabalho também mostram que o HTLV-2c continua se expandindo para áreas urbanas, não mais se restringindo a áreas indígenas da região Amazônica como relatado anteriormente (Ishak *et al.*, 1995, 2001) já que todas as amostras de HTLV-2c deste estudo correspondem a indivíduos residentes na área urbana de Belém-Pará. Estes resultados contribuem com a teoria de que o HTLV-2c entrou na região amazônica por meio de um efeito fundador que ocorreu por fluxos migratórios de ancestrais ameríndios portadores e logo após se expandindo para a área urbana por meio de processos de miscigenação durante a colonização do país (Vallinoto *et al.*, 2002).

Ademais, considerando a rara descrição do HTLV-2a e do HTLV-2b em indivíduos portadores de sintomas associados à infecção e os achados clínicos descritos no presente trabalho identificando a infecção pelo HTLV-2c em um indivíduo portador de sintomas neurológicos associados a esta infecção (Polineuropatia periférica), ressalta-se a necessidade de estudos contínuos que possam avaliar se esse subtipo molecular possa ter um papel patogênico diferenciado.

A baixa incidência da PET/MAH (0,2 a 5%) nos portadores do HTLV sugere que interações vírus-hospedeiro influenciam na patogênese dessa doença inflamatória, justificando o porquê de algumas pessoas infectadas desenvolverem

doença, enquanto outras permanecem assintomáticas (Martins & Stancioli, 2006). Alguns parâmetros como carga proviral elevada (Nagai *et al.*, 1998; Yamano *et al.*, 2002; Montanheiro *et al.*, 2005; Olindo *et al.*, 2005; Best *et al.*, 2006), parecem ser fatores preditivos positivos para o desenvolvimento de doença neurológica, uma vez que são características de pacientes com PET/MAH, quando comparadas com o observado em portadores assintomáticos.

Os achados do presente trabalho mostram que, em média, no sangue periférico, a carga proviral é significativamente maior entre os indivíduos com sintomas neurológicos associados ao HTLV (média = 1342 cópias de DNA/mm³, DP ±1675.2), quando comparada com os indivíduos assintomáticos (média = 252 cópias de DNA/mm³, DP ±566.9). A partir deste resultado, é possível sugerir que a carga proviral está relacionada com o desenvolvimento de doença neurológica entre os indivíduos portadores da infecção deste estudo, assim podendo ser utilizada como uma ferramenta de monitoramento de indivíduos infectados pelo HTLV.

Este resultado está de acordo com diversos trabalhos que mostraram a mesma relação entre pessoas portadoras com PET/MAH e assintomáticos. No estudo de Montanheiro *et al.* (2005), também se observou carga proviral, no sangue periférico, significativamente maior entre pacientes portadores de HTLV com PET/MAH (mediana = 679 cópias em 10⁴ PBMC) do que em portadores assintomáticos (mediana = 271 cópias em 10⁴ PBMC). Já em um estudo prospectivo, que avaliou uma coorte de 20 indivíduos portadores da infecção pelo HTLV e inicialmente assintomáticos, foi observado um persistente aumento da carga proviral nos indivíduos que, ao longo da pesquisa, desenvolveram sintomas inflamatórios de PET/MAH ou Uveíte, não sendo o mesmo observado naqueles que permaneceram assintomáticos (Taylor *et al.*, 1999)

Em uma pesquisa japonesa desenvolvida por Nagai *et al.* (1998), foi observada uma diferença maior entre os níveis de carga proviral dos portadores com PET/MAH (7.98% das PBMCs) e portadores assintomáticos sem familiares com a mielopatia (1.2% das PBMCs), quando comparada com a diferença entre a carga proviral dos portadores doentes e portadores assintomáticos que eram familiares de pacientes com PET/MAH (4.96%), mostrando assim, que os maiores níveis encontravam-se entre os doentes e os assintomáticos familiares de indivíduos com a mesma patologia. Assim, o aumento da carga proviral em assintomáticos familiares de doentes com PET/MAH sugere a existência de fatores genéticos que contribuem para a replicação do HTLV *in vivo*, segundo esta pesquisa.

Yamano *et al.* (2002) encontrou uma maior carga de mRNA que contém o gene *tax* (mRNA-*tax*) no sangue de portadores de HTLV com PET/MAH do que em portadores assintomáticos da infecção. Este achado está diretamente associado à carga proviral e à gravidade da doença, as quais no mesmo estudo foram positivamente correlacionadas com a carga de mRNA-*tax*. Assim sugerindo que o aumento da expressão de HTLV tem um importante papel na patogênese da PET/MAH, assim como o nível de mRNA-*tax* (e consequentemente a carga proviral) pode ser usado como um preditor da progressão da doença em pacientes com PET/MAH.

Outra pesquisa relevante sobre a relação da carga proviral com presença ou ausência de sintomas em infectados pelo HTLV foi desenvolvida por Olindo *et al.* (2005), que avaliaram a carga proviral no sangue periférico de indivíduos portadores com PET/MAH que tinham rápida progressão da doença, de portadores também doentes que tinham uma progressão lenta da doença e de portadores assintomáticos da infecção pelo HTLV. Seus resultados mostraram que a média de carga proviral foi seis vezes

menor nos portadores assintomáticos (média = 18.224 cópias em 10^6 PBMCs) quando comparados com aqueles que apresentavam PET/MAH (média = 107.905 cópias em 10^6 PBMCs); e significativamente maior nos sintomáticos com rápida progressão da doença (média = 146.469 cópias em 10^6 PBMCs) do que nos pacientes com progressão lenta da doença (média = 87.912 cópias em 10^6 PBMCs). Assim, segundo estes pesquisadores, estes resultados sugerem que a carga proviral modifica de forma paralela com o curso natural da infecção pelo HTLV, sendo menor em portadores assintomáticos, e alto e muito alto em indivíduos doentes com progressão lenta e rápida da doença, respectivamente.

Entretanto há estudos que associam não só a carga proviral com a mudança do curso da infecção pelo HTLV em indivíduos com doença neurológica e assintomáticos, mas também outros marcadores imunológicos, como Best *et al.* (2006) avaliando pacientes infectados com PET/MAH e assintomáticos, sugeriu que a PET/MAH está primariamente associada à carga proviral, e de forma secundária com alguns marcadores imunológicos (proliferação de células T e produção da citocina IF- γ *in vitro*, e níveis séricos de marcadores de ativação de células Th1, proteína IP-10, e Th2, sCD30), os quais quando avaliados mostraram-se significativamente diferentes entre assintomáticos e sintomáticos.

Esta definição de que a carga proviral não está isoladamente associada à presença ou ausência de doença como a PET/MAH ou outras síndromes neurológicas semelhantes, mas sim associada em conjunto com outros marcadores do hospedeiro e/ou do vírus, pode justificar o fato de se ter verificado ainda, no presente trabalho, alguns pacientes com doença neurológica que apresentaram uma baixa carga proviral (cp) (um paciente com PET/MAH e cp = 1.86 cópias DNA/mm³; um com

Polineuropatia periférica e cp = 0.34 cópias; e outro com Polineuropatia periférica, mas com cp indetectável), assim como alguns portadores assintomáticos apresentaram alta carga proviral (três portadores com cp variando entre 1196 e 3080.39 cópias DNA/mm³).

Outro parâmetro do hospedeiro que vem sendo também estudado e associado ao desenvolvimento de doença neurológica, quando comparado entre pacientes com PET/MAH e portadores assintomáticos, é a resposta imune aumentada contra o HTLV, considerando os níveis de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (Kubota *et al.*, 2000; Brito-Melo *et al.*, 2002; Goon *et al.*, 2004).

Kubota *et al.* (2000) observaram frequência significativamente maior de linfócitos T CD8⁺ específicos para HTLV-1 em pacientes infectados pelo HTLV e com PET/MAH, quando comparados com portadores assintomáticos. Estas células secretam o mediador inflamatório IF- γ quando reconhecem antígenos de HTLV-1 ligados ao Antígeno Leucocitário Humano (HLA) de células T CD4⁺ infectadas, e, por esta razão, no mesmo estudo, avaliaram os níveis de linfócitos T CD8⁺ de memória, específicos para a Tax, e verificaram que estes níveis estavam aumentados nos pacientes com PET/MAH. Assim, sugerindo que estas células T CD8⁺ específicas para HTLV-1 podem desempenhar importante função no desenvolvimento de PET/MAH.

Outra pesquisa relatou uma média significativamente maior de células T CD4⁺ específicas para HTLV-1, secretando IF- γ , em indivíduos portadores da infecção com PET/MAH, em comparação com portadores assintomáticos, estando ambos com elevada carga proviral. Desta forma sugerindo que a alta frequência de células T CD4⁺ específicas está associada com a doença PET/MAH, e não simplesmente refletem a

maior carga proviral que normalmente é encontrado em pacientes com PET/MAH (Goon *et al.*, 2004).

Brito-Melo *et al.* (2002) avaliaram tanto os níveis de linfócitos T CD4⁺ quanto os de T CD8⁺ em portadores de HTLV com PET/MAH hospitalizados, em portadores oligossintomáticos, em portadores assintomáticos e em controles não infectados, observando maior média percentual, significativa, de linfócitos T CD4⁺ nos oligossintomáticos e doentes hospitalizados quando comparados com os controles sadios, onde os hospitalizados tiveram maior média significativa em relação aos assintomáticos. Assim como encontraram maior média percentual de linfócitos T CD8⁺ nos hospitalizados quando comparados com todos os outros grupos. Assim, mostrando relação dos dois tipos de células com o desenvolvimento de doença.

No presente estudo, foram feitas análises de contagem de células T CD4⁺ e T CD8⁺ no sangue periférico de portadores assintomáticos da infecção, de portadores com sintomatologia neurológica associada ao HTLV e de controles sadios soronegativos para HTLV. Inicialmente, foi observado que as maiores médias de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ estiveram no grupo de indivíduos com sintomas neurológicos típicos de PET/MAH. Entretanto, quando estes níveis foram analisados estatisticamente nos três grupos estudados, não mostraram qualquer diferença significativa entre cada grupo.

Assim, no presente trabalho, não se pode afirmar ainda qualquer associação dos níveis de células T CD4⁺ e T CD8⁺ com o desenvolvimento de PET/MAH ou outros sintomas neurológicos, necessitando de estudos contínuos que investiguem melhor a associação destas variáveis com o desenvolvimento ou não de doença neurológica, como a PET/MAH, em portadores da infecção pelo HTLV.

5 CONCLUSÕES

- i) O HTLV-1 foi significativamente mais prevalente que o HTLV-2 tanto na amostra geral estudada quanto nos grupos específicos (assintomáticos e sintomáticos);
- ii) O Subtipo Cosmopolita, Subgrupo Transcontinental, foi o único circulante entre as amostras de HTLV-1 submetidas à análise filogenética, de ambos os grupos estudados, não sendo observada relação estatisticamente significativa entre a elevada presença deste subtipo com o desenvolvimento de doença neurológica;
- iii) O subtipo molecular HTLV-2c foi o único encontrado entre as amostras de HTLV-2 analisadas filogeneticamente, de ambos os grupos estudados;
- iv) A média de carga proviral foi significativamente maior entre os portadores sintomáticos podendo estar associada ao desenvolvimento de PET/MAH ou sintomas semelhantes;
- v) Não houve diferenças significantes que possam associar a média elevada de linfócitos TCD4+, encontrada nos portadores de HTLV sintomáticos, com o desenvolvimento de PET/MAH ou das outras síndromes descritas neste trabalho;
- vi) Os resultados deste trabalho indicam a necessidade do monitoramento da descrição de casos de infecção pelo HTLV com diagnóstico clínico-laboratorial adequado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCANTARA JR, L.C., VAN DOOREN, S., GONÇALVES, M.S., KASHIMA, S., COSIA, M.C., SANTOS, F.L., BITTENCOURT, A.L., DOURADO, I., FILHO, A.A., COVAS, D.T., VANDAMME, A.M., GALVÃO-CASTRO, B. Globin haplotypes of human T-cell lymphotropic virus type I infected individuals in Salvador, Bahia, Brazil, suggest a Post-Columbian African origin of this virus. **Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology**, **33**: 536-542, 2003.
- ALCANTARA, L.C., SHINDO, N., VAN DOOREN, S., SALEMI, M., COSTA, M.C., KASHIMA, S., COVAS, D.T., VANDAMME, A.M., GALVÃO-CASTRO, B. Brazilian HTLV type 2a strains from intravenous drug users (IDUs) appear to have originated from two sources: Brazilian Amerindians and European/North American IDUs. **Aids Research and Human Retroviruses**, **19**: 519-523, 2003.
- ANDERSSON, S., DIAS, F., MENDEZ, P.J., RODRIGUES, A., BIBERFELD, G. HTLV-I and -II infections in a nationwide survey of pregnant women in Guinea-Bissau, West Africa. **Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology**, **15(4)**: 320-2, 1997.
- ANDRADA-SERPA, M.J. Retroviridae. In: **Virologia Humana**. Editora Cultura Médica. Rio de Janeiro, 1994. p.315-338.
- ARAUJO A., HALL W.W. Human T-lymphotropic virus type II and neurological disease. **Annals of neurology**, **56(1)**: 10-9, 2004.
- ARAÚJO Ade Q, de ANDRADA-SERPA M.J. Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-I Associated Myelopathy in Brazil. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, **13 (supl)**: S33-S37, 1996.

- AYRES, M., AYRES JR, M., AYRES, D.L., SANTOS, A.S. BioEstat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. **Belém, Sociedade Civil Mamirauá, Brasília CNPq**, 2008.
- BANGHAM, C. R. M., The immune response to HTLV-I. **Current Opinion in Immunology**, **12**: 397 – 402, 2000.
- BARTOE, J.T., ALBRECHT, B., COLLINS, N.D., ROBEK, M.D., RATNER, L., GREEN, P.L., LAIRMORE, M.D. Functional role of pX open reading frame II of human T-lymphotropic virus type 1 in maintenance of viral loads in vivo. **Journal of virology**, **74(3)**: 1094-100, 2000.
- BASTIAN, I., DENT, J., MCFARLANE, R., KAROPOULOS, A., WAY, B. HTLV-I among Northern Territory blood donors. **The Medical journal of Australia**, **159(1)**: 7-12, 1993.
- BEILKE, M.A., TRAINA-DORGE, V., ENGLAND, J.D., BLANCHARD, J.L. Polymyositis, arthritis, and uveitis in a macaque experimentally infected with human T lymphotropic virus type I. **Arthritis Rheum**, **39(4)**:610-5, 1996.
- BELZA, M.J.; SPANISH GROUP FOR THE UNLINKED ANONYMOUS SURVEY OF HIV SEROPREVALENCE IN STD PATIENTS. Prevalence of HIV, HTLV-I and HTLV-II among female sex workers in Spain, 2000-2001. **Eur J Epidemiol**, **19(3)**:279-82, 2004.
- BEST, I., ADAUI, V., VERDONCK, K., GONZÁLEZ, E., TIPISMANA, K., CLARK, D., GOTUZZO, E., VANHAM, G. Proviral load and immune markers associated with human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in Peru. **Clinical and Experimental Immunology**, **146**: 226-233, 2006.

- BITTENCOURT, A.L., DOURADO, I., FILHO, P.B., SANTOS, M., VALADÃO, E., ALCANTARA, L.C., GALVÃO-CASTRO, B. Human T-cell lymphotropic virus type I infection among pregnant women in Northeastern Brazil. **Journal Acquired Immune Deficiency Syndromes & Human Retrovirology**, **26**: 490 – 494, 2001.
- BRITO-MELO, G.E., MARTINS-FILHO, O.A., CARNEIRO-PROIETTI, A.B., CATALAN-SOARES, B., RIBAS, J.G., THORUM, G.W., BARBOSA-STANCIOLI, E.F., Grupo Interdisciplinar de Pesquisas em HTLV. Phenotypic study of peripheral blood leucocytes in HTLV-I-infected individuals from Minas Gerais, Brazil. **Scandinavian Journal of Immunology**, **55(6)**: 621-628, 2002.
- BRITTO, A.P.C.R., GALVÃO-CASTRO, B., STRAATMANN, A., SANTOS-TORRES, S., TAVARES-NETO, J. Infecção pelo HTLV-I/II no Estado da Bahia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **31(1)**: 34 – 41, 1998.
- CALLATINI, S.; CHEVALIER, A.; DUPREZ, R.; BASSOT, S.; FROMENT, A.; MAHIEUX, R.; GESSAIN, A. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. **Retrovirology**, **2 (30)**, 2005.
- CANN, A. J., ROSENBLATT, J. D., WACHSMAN, W., SHAH, N. P., CHEN, I. S.Y. Identification of the gene responsible for human T-cell leukaemia virus transcriptional regulation. **Nature**, **318**: 571-574, 1985.
- CARNEIRO-PROIETTI, A.B., RIBAS, J.G., CATALAN-SOARES, B.C., MARTINS, M.L., BRITO-MELO, G.E., MARTINS-FILHO, O.A., PINHEIRO, S.R., ARAÚJO ADE, Q., GALVÃO-CASTRO, B., DE OLIVEIRA, M.S., GUEDES, A.C., PROIETTI, F.A. Infecção e doença pelos vírus linfotrópicos humanos de células T (HTLV-I/II) no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **35(5)**: 499 - 508, 2002.

- CASTILLO, L.C., GRACIA, F., ROMÁN, G.C., LEVINE, P., REEVES, W.C., KAPLAN, J. Spinocerebellar syndrome in patients infected with human T-lymphotropic virus types I and II (HTLV-I/HTLV-II): report of 3 cases from Panama. **Acta neurologica Scandinavica**, **101(6)**: 405-12, 2000.
- CASTRO, L.H., CHAVES C.J., CALLEGARO D., NÓBREGA J.P.S., SCAFF M. HTLV-I associated myelopathy in Brazil, a preliminary report. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, **47**: 501-502, 1989.
- CASTRO-COSTA, C. M., VALE, O. C., GOUBAU, P., DESMYTER, J., CARTON, H. HTLV-1 and tropical spastic paraparesis in Fortaleza (northeastern Brazil). **Journal of Tropical and Geographical Neurology**, **1**: 45-48, 1991.
- CASTRO-COSTA, C.M., ARAÚJO, A.Q.C., MENNA-BARRETO, M., TAKAYANAGUI, O.M., SOHLER, M., SILVA, E.L., DE PAULA, S., ISHAK, R., RIBAS, J., ROVIROSA, L., CARTON, H., GOTUZZO, E., HALL, W.W., MONTANO, S., MURPHY, E. L., OGER, J., REMONDEGUI, C., TAYLOR, G.P. Proposal for diagnostic criteria of Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-1- Associated Myelopathy (TSP/HAM). **Aids Research and Human Retroviruses**, **22(10)**: 931-935, 2006.
- CATALAN-SOARES, B.C., PROIETTI, F.A., CARNEIRO-PROIETTI, A.B.F. Os vírus linfotrópicos de células T humanos (HTLV) na última década (1990-2000). Aspectos epidemiológicos. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, **4(2)**: 81-95, 2001.
- CATALAN-SOARES, B.C., PROIETTI, A.B., PROIETTI, F.A.; INTERDISCIPLINARY HTLV-I/II RESEARCH GROUP. HTLV-I/II and blood

- donors: determinants associated with seropositivity in a low risk population. **Revista de Saúde Pública**, **37(4)**: 470 – 476, 2003.
- CATALAN-SOARES, B., CARNEIRO-PROIETTI, A.B., PROIETTI, F.A.; INTERDISCIPLINARY HTLV RESEARCH GROUP. 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. **Cadernos de Saúde Pública**, **21(3)**: 926 – 931, 2005.
- CATALAN-SOARES, B.C., PROIETTI, F.A. HTLV-1 e 2: Aspectos epidemiológicos. In: **Cadernos Hemominas HTLV**. Proietti, A.B.F.C *et al.* (eds.) Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006. p.69 – 85.
- CAVROIS, M., GESSAIN, A., GOUT, O., WAIN-HOBSON, S., WATTEL, E. Common human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) integration sites in cerebrospinal fluid and blood lymphocytes of patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis indicate that HTLV-1 crosses the blood-brain barrier via clonal HTLV-1-infected cells. **The Journal of infectious diseases**, **182(4)**: 1044-50, 2000.
- CHEN, I.S., CANN, A.J., SHAH, N.P., GAYNOR, R.B. Functional relation between HTLV-II x and adenovirus E1A proteins in transcriptional activation. **Science**, **230**: 570 - 573, 1985.
- CHEN, J., ZEKENG, L., YAMASHITA, M., TAKEHISA, J., MIURA, T., IDO, E., MBOUDJEKA, I., TSAGUE, J.M., HAYAMI, M., KAPTUE, L. HTLV type I isolated from a Pygmy in Cameroon is related to but distinct from the known central African type. **AIDS research and human retroviruses**, **11(12)**: 1529-31, 1995.

- CHIAVETTA, J.A., ESCOBAR, M., NEWMAN, A., HE, Y., DRIEZEN, P., DEEKS, S., HONE, D.E., O'BRIEN, S.F., SHER, G. Incidence and estimated rates of residual risk for HIV, hepatitis C, hepatitis B and human T-cell lymphotropic viruses in blood donors in Canada, 1990-2000. **CMAJ : Canadian Medical Association journal**, **169(8)**: 767-73, 2003.
- COCKERELL, G.L., ROVNAK, J., GREEN, P.L., CHEN, I.S. A deletion in the proximal untranslated pX region of human T-cell leukemia virus type II decreases viral replication but not infectivity in vivo. **Blood**, **87(3)**: 1030-5, 1996.
- COFFIN, J. M. Retroviridae. In: **Fundamental Retrovirology**. Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M., Chanock, R. M., Melnick, J. L. Monath, T. P., Roizman, B., Straus, S. E. (eds.) Lippincott Raven, Philadelphia, 1996. p.763 – 843.
- COLIN, D.D., ALCÂNTARA, L.C.J., SANTOS, F.L.N., UCHÔA, R., TAVARES-NETO, J. Prevalência da infecção pelo vírus linfotrópico humano de células T e fatores de risco associados à soropositividade em doadores de sangue da cidade de Rio Branco, AC, Brasil (1998-2001). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **36**: 677 – 683, 2003.
- COLLINS, N.D., NEWBOUND, G.C., ALBRECHT, B., BEARD, J.L., RATNER, L., LAIRMORE, M.D. Selective ablation of human T-cell lymphotropic virus type 1 p12I reduces viral infectivity in vivo. **Blood**, **91(12)**: 4701-7, 1998.
- CORTES, E., DETELS, R., ABOULAFIA, D., LI, X.L., MOUDGIL, T., ALAM, M., BONECKER, C., GONZAGA, A., OYAFUSO, L., TONDO, M. HIV-1, HIV-2, and HTLV-I infection in high-risk groups in Brazil. **The New England journal of medicine**, **320(15)**: 953-8, 1989.

- COUROUCÉ, A.M., PILLONEL, J., LEMAIRE, J.M., MANIEZ, M., BRUNET, J.B.
Seroepidemiology of HTLV-I/II in universal screening of blood donations in France.
AIDS, **7(6)**: 841-7, 1993.
- DELAMARE, L., A. R. ROSENBERG, C. PIQUE, D. PHAM, I. CALLEBAUT, AND
M.-C. DOKHELAR. The HTLV-1 envelope glycoproteins: structure and functions.
Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology,
13: 85-91, 1996.
- DE OLIVEIRA, M.S., MATUTES, E., FAMADAS, L.C., SCHULZ, T.F., CALABRO,
M.L., NUCCI, M., *et al.* Adult T-cell leukaemia/lymphoma in Brazil and its relation
to HTLV-I. **Lancet**, **336**: 987-90, 1990.
- Department of Microbiology Kansai Medical University.** Disponível em:
<<http://www3.kmu.ac.jp/microbiol>> Acesso em 25/03/2008.
- DERSE, D., MIKOVITS, J., RUSCETTI, F. X-I and X-II open reading frames of
HTLV-I are not required for virus replication or for immortalization of primary T-
cells in vitro. **Virology**, **237(1)**: 123-8, 1997.
- DIOP, S., CALATTINI, S., ABAH-DAKOU, J., THIAM, D., DIAKHATÉ, L.,
GESSAIN, A. Seroprevalence and molecular epidemiology of human T-cell
leukemia virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 in blood donors from Dakar, Senegal.
Journal of Clinical Microbiology: 1550-1554, 2006.
- DOURADO, I., ALCANTARA, L.C., BARRETO, M.L., TEIXEIRA, M.G.,
GALVÃO-CASTRO, B. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a
city with African ethnic and sociodemographic characteristics. **Journal of Acquired
Immune Deficiency Syndromes**, **34**: 527-531, 2003.

- DOURADO, I., ANDRADE, T., GALVÃO-CASTRO, B. HTLV-I in Northeast Brazil: differences for male and female injecting drug users. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, **19(4)**: 426-429, 1998.
- DUBE, D.K., SHERMAN, M.P., SAKSENA, N.K., BRYZ-GORNIA, V., MENDELSON, J., LOVE, J., ARNOLD, C.B., SPICER, T., DUBE, S., GLASER, J.B. *et al.* Genetic heterogeneity in human T-cell leukemia/lymphoma virus type II. **Journal of Virology**, **67**: 1175 – 1184, 1993.
- DUMAS, M., HOUINATO, D., VERDIER, M., ZOHOUN, T., JOSSE, R., BONIS, J., ZOHOUN, I., MASSOUGBODJI, A., DENIS, F. Seroepidemiology of human T-cell lymphotropic virus type I/II in Benin (West Africa). **AIDS research and human retroviruses**, **7(5)**: 447-51, 1991.
- EGAN, J. F., O'LEARY, B., LEWIS, M., MULCAHY, F., SHEEHY, N., HASEGAWA, H., FITZPATRICK, F., O'RIONDAN, J., HAÇÇ, W. W. High rate of human T- lymphotropic virus type IIa infection in HIV type 1- infected intravenous drug abusers in Ireland. **AIDS research and human retroviruses**, **15**: 699 - 705, 1999.
- EHRlich, G.D., POIESZ, B.J. Clinical and molecular parameters of HTLV-I infection. **Clin Lab Med**, **8(1)**:65-84, 1988.
- EHRlich, G. D., GLASER, J. B., LAVIGNE, K., QUAN, D., MILDVAN, D., SNINSKY, J. J., KWOK, S., PAPSIDERO, L., POIESZ, B. J. Prevalence of human T-cell leukemia/lymphoma virus (HTLV) type II infection among high-risk individuals: type-specific identification of HTLVs by polymerase chain reaction. **Blood**, **74**: 1658-1664, 1989.

EIRAKU, N., NOVOA, P., FERREIRA, M.C., MONKEN, C., ISHAK, R., FERREIRA, O.C., ZHU, S.W., LORENÇO, R., ISHAK, M., AZEVEDO, V., GUERREIRO, J.F., POMBO DE OLIVEIRA, M., HAMMERSCHLAK, N., IJICHI, S., HALL, W.W. Identification and characterization of new and distinct molecular subtype of human T-cell lymphotropic type 2. **Journal of Virology**, **70**: 1481-1492, 1996.

ETZEL, A., SHIBATA, G.Y., ROZMAN, M., JORGE, M.L., DAMAS, C.D., SEGURADO, A.A. HTLV-1 and HTLV-2 infections in HIV-infected individuals from Santos, Brazil: seroprevalence and risk factors, **J Acquir Immune Defic Syndr**, **26(2)**:185-90, 2001.

FARIAS DE CARVALHO, S.M.F., POMBO DE OLIVEIRA, M.S., THULER, L.C., RIOS, M., COELHO, R.C., RUBIM, L.C. HTLV-I and HTLV-II infections in hematological disorder patients, cancer patients, and healthy individuals from Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology**, **15(3)**: 238-2, 1997.

FEIGAL, E.; MURPHY, E.; VRANIZAN, K.; BACCHETTI, P.; CHAISSON, R.; DRUMMOND, J. E.; BLATTNER, W.; McGRATH, M.; GREENSPAN, J. & MOSS, A. Human T-cell lymphotropic virus types I and II in intravenous drug users in San Francisco: Risk factors associated with seropositivity. **Journal of Infectious Diseases**, **164**:36-42, 1991.

FELBER, B.K., PASKALIS, H., KLEINMAN-EWING, C., WONG-STAAAL, F.PAVLAKIS, G.N. The pX protein of HTLV-I is a transcriptional activator of its long terminal repeats. **Science**, **229**:675-679, 1985.

FERREIRA JÚNIOR, O.C., VAZ, R.S., CARVALHO, M.B., GUERRA, C., FABRON, A.L., ROSEMBLIT, J., HAMERSCHLAK, N. Human T- lymphotropic virus type I

- and type II infections and correlation with risk factors in blood donors from São Paulo, Brazil. **Transfusion**, **35**: 258 – 263, 1995.
- FERREIRA JÚNIOR, O.C., PLANELLES, V., ROSENBLATT, J.D. Human T-cell leukemia viruses: epidemiology, biology, and pathogenesis. **Blood Reviews**, **11**: 91 – 104, 1997.
- FEUER, G., GREEN, P. L. Comparative biology of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. **Oncogene**, **24**: 5996 – 6004, 2005.
- FIGUEROA JP, WARD E, MORRIS J, BRATHWAITE AR, PERUGA A, BLATTNER W, VERMUND SH, HAYES R. Incidence of HIV and HTLV-1 infection among sexually transmitted disease clinic attenders in Jamaica. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol**, **15(3)**:232-7, 1997.
- FUJINO, T., IWAMOTO, I., OTSUKA, H., IKEDA, T., TAKESAKO, S., NAGATA, Y. Apoptosis in placentas from human T-lymphotropic virus type I-seropositive pregnant women: a possible defense mechanism against transmission from mother to fetus. **Obstet Gynecol**, **94(2)**:279-83, 1999.
- FUJINO, T., NAGATA, Y. HTLV-I transmission from mother to child. **Journal of reproductive immunology**, **47(2)**:197-206, 2000.
- FUJISAWA, J., SEIKI, M., KIYOKAWA, T., YOSHIDA, M. Functional activation of the long terminal repeat of human T-cell leukemia virus type I by a trans-acting factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **82(8)**: 2277-81, 1985.
- GALVÃO-CASTRO, B., LOURES, L., RODRIQUES, L.G., SERENO, A., FERREIRA JÚNIOR, O.C., FRANCO, L.G., MULLER, M., SAMPAIO, D.A., SANTANA, A., PASSOS, L.M., PROIETTI, F. Distribution of human T-lymphotropic virus type I

- among blood donors: a nationwide brazilian study. **Transfusion**, **37(2)**: 242 – 3, 1997.
- GASMI, M., FAROUQI, B., D'INCAN, M., DESGRANGES, C. Long terminal repeat sequence analysis of HTLV type I molecular variants identified in four north African patients. **AIDS research and human retroviruses**, **10(10)**: 1313-5, 1994.
- GASTALDELLO, R., HALL, W.W., GALLEGRO, S. Seroepidemiology of HTLV-I/II in Argentina: an overview. **Journal of acquired immune deficiency syndromes**, **35(3)**: 301-8, 2004.
- GELMANN, E.P., FRANCHINI, G., MANZARI, V., WONG-STALL, F., GALLO, R.C. Molecular cloning of a unique t-cell leukemia virus (HTLV-II Mo). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, **81**: 993-9947, 1984.
- GESSAIN, A., VERNANT, J. C., MAURS, L., BARIN, F., GOUT, O., CALENDER, A., DE THÉ, G. Antibodies to human t-lymphotropic virus type-i in patients with tropical spastic paraparesis. **Lancet**: 407- 410, 1985.
- GESSAIN, A., LOUIE, A., GOUT, O., GALLO, R.C., FRANCHINI, G. Human T-cell leukemia-lymphoma virus type I (HTLV-I) expression in fresh peripheral blood mononuclear cells from patients with tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy. **Journal of Virology**, **65(3)**: 1628-33, 1991.
- GESSAIN, A., DE THÉ, G. What is the situation of human T cell lymphotropic virus type II (HTLV-II) in Africa? Origin and dissemination of genomic subtypes. **Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology : official publication of the International Retrovirology Association**, **13 Suppl 1**: S228-35, 1996.

- GOON, P.K., IGAKURA, T., HANON, E., MOSLEY, A.J., BARFIELD, A., BARNARD, A.L., KAFTANTZI, L., TANAKA, Y., TAYLOR, G.P., WEBER, J.N., BANGHAM, C.R. Human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I)-specific CD4+ T cells: immunodominance hierarchy and preferential infection with HTLV-I. **Journal of Immunology**, 172(3): 1735-43, 2004.
- GOTO, K., SATO, K., KURITA, M., MASUHARA, N., IJIMA, Y., SAEKI, K., OHNO, S. The seroprevalence of human T-cell leukaemia/lymphoma virus type I in patients with ocular diaseses, pregnant women and healthy volunteers in Kanto district, central Japan. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, 29: 219 – 221, 1997.
- GOUBAU, P., LIU, H., LANGE, G. G., VANDAME, A. M., DEMYSTER, J. HTLV-II seroprevalence in Pygmies across África since 1970. **AIDS research and humans retroviruses**, 9: 709 – 712, 1993.
- GREEN, P.L., ROSS, T.M., CHEN, I.S., PETTIFORD, S. Human T-cell leukemia virus type II nucleotide sequences between env and the last exon of tax/rex are not required for viral replication or cellular transformation. **Journal of virology**, 69(1): 387-94, 1995.
- GUDO, E.S., ABREU, C.M., MUSSÁ, T., DO ROSÁRIO AUGUSTO, A., OTSUKI, K., CHAMBO, E., AMADE, N., TANURI, A., FERREIRA JR O.C., JANI, I.V. Serologic and molecular typing of human T-lymphotropic virus among blood donors in Maputo City, Mozambique. **Transfusion**, IN PRESS, 2009.
- GUIMARÃES, M.L., BASTOS, F.I., TELLES, P.R., GALVÃO-CASTRO, B., DIAZ, R.S., BONGERTZ, V., MORGADO, M.G. Retrovirus infections in a sample of injecting drug users in Rio de Janeiro City, Brazil: Prevalence of HIV-1 subtypes,

- and co-infection with HTLV-I/II. **Journal of Clinical Virology**, **21**: 143 – 151, 2001.
- HAHN, B.H., SHAW, G.M., POPOVIC, M., LO MONICO, A., GALLO, R.C., WONG-STAAAL, F. Molecular cloning and analysis of a new variant of human T-cell leukemia virus (HTLV-ib) from an African patient with adult T-cell leukemia-lymphoma. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, **34(5)**: 613-8, 1984.
- HALL, W. W., TAKAHASHI, H., LIU, C., KAPLAN M.H., SHEEWINF, O., IJICHI, S., NAGASHIMA, K., GALLO, R.C. Multiple isolates and characteristics of human T-cell leukemia virus type II. **Journal of Virology**, **66**: 2456-2463, 1992.
- HALL, W. W., KUBO, T., IJICHI, S., TAKAHASHI, H., ZHU, S. W. Human T-cell leukemia virus type II (HTLV-II): emergence of a important newly recognized pathogen. **Seminars of Virology**, **5**: 165-178, 1994.
- HALL, W. W. et al. Human T-lymphotropic virus type II (HTLV-II): Epidemiology, molecular properties and clinical features of infections. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, **13 (suppl. 1)**: S204 – S214, 1996.
- HARRINGTON Jr., W.J., SHEREMATA, W., HJELLE, B., DUBE, D.K., BRADSHA, W.P., FOUNG, S.K.H., SNODGRASS, S., TOEDTER, A., CABRAL, L., POIESZ, B. Spastic ataxia associated with human T-cell lymphotropic virus type II infection. **Annals of Neurology**, **33**: 411-414, 1993.
- HENEINE, W., KAPLAN, J., GARCIA, F., LAI, R., TOBERTS, B., LEVINE, P. H., REEVES, W. C.. HTLV-II endemicity among Guaymi Indians in Panama. **New England Journal of Medicine**, **324**: 565, 1991.

- HJELLE, B., APPENZELLER, O., MILLS, R., ALEXANDER, S., TORREZ-MARTINEZ, N., JAHNKE, R., ROSS, G. Chronic neurodegenerative disease associated with HTLV-II infection. **Lancet**, **339**: 645-646, 1992.
- HJELLE, B., ZHU, S.W., TAKAHASHI, H., IJICHI, S., HALL, W.W. Endemic human T-cell leukemia virus type II infection in Southwestern US indians involving two prototype variants of virus. **Journal of Infections Diseases**, **168**: 737 – 740, 1993.
- ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4, Abril 2006.** Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/>> Acesso em 25/03/2008.
- IJICHI, S., RAMUNDO, M.B., TAKAHASHI, H., HALL, W.W. In vivo cellular tropism of human T cell leukemia virus type II (HTLV-II). **The Journal of experimental medicine**. **176(1)**: 293-6, 1992.
- ISHAK, R., ISHAK, M.O.G., AZEVEDO, V.N., HARRINGTON JR, W.J., EIRAKU, N., GUEREIRO, J.F., SANTOS, S.B., KUBO, T., MONKEN, C., ALEXANDER, S., HALL, W.W. Identification of Human T cell Lymphotropic Virus Type IIa Infection in the Kayapo, an Indigenous Population of Brazil. **AIDS Research and Human Retroviruses**, **11 (7)**: 813-821, 1995.
- ISHAK, R., ISHAK, M. O. G., AZEVEDO, V. N., SANTOS, D. E. M., VALLINOTO, A. C. R., SARAIVA, J. C. P., CRESCENTE, J. A., HALL, W. W. Detection of HTLV-IIa in blood donors in an urban area of the Amazon Region of Brazil (Belém, PA). **Revista da sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **31**: 193 - 197, 1998.
- ISHAK, R., VALLINOTO, A.C., AZEVEDO, V.N., LEWIS, M., HALL, W.W., GUIMARÃES ISHAK, M.O. Molecular Evidence of mother to child transmission of HTLV-IIc in the Kararao village in the Amazon Region of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **35**: 519 – 525, 2001.

- ISHAK, R., CAVALCANTE, F., VALLINOTO, A.C., AZEVEDO, V.N., ISHAK, M.O. HTLV-I associated myelopathy in the northern region of Brazil (Belém-Pará): serological and clinical features of three cases. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **35(3)**: 243 – 246, 2002.
- ISHAK, R., VALLINOTO, A.C., AZEVEDO, V.N., ISHAK, M.D.E.O. Epidemiological aspects of retrovirus (HTLV) infection among Indian populations in the Amazon Region of Brazil. **Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro**, **19(4)**: 901 – 914, 2003.
- JACOBSON, S., LEHKY, T., NISHIMURA, M., ROBINSON, S., MCFARLIN, D.E., DHIB-JALBUT, S. Isolation of HTLV-II from a patient with chronic, progressive neurological disease clinically indistinguishable from HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Annals of Neurology**, **33**: 392-396, 1993.
- JINNO, A., HARAGUCHI, Y., SHIRAKI, H., HOSHINO, H. Inhibition of Cell-Free Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Infection at a Postbinding Step by the Synthetic Peptide Derived from an Ectodomain of the gp21 Transmembrane Glycoprotein. **Journal of Virology**, **73**: 9683–9689, 1999.
- JONES, K. S., AKEL, S., PETROW-SADOWSKI, C., HUANG, Y., BERTOLETTE, D. C., RUSCETTI, F. W. Induction of Human T Cell Leukemia Virus Type I Receptors on Quiescent Naive T Lymphocytes by TGF- β . **Journal of Immunology**, **174**: 4262- 4270, 2005.
- KAJIYAMA, W., KASHIWAGI, S., IKEMATSU, H., HAYASHI, J., NOMURA, H., OKOCHI, K. Intrafamilial transmission of adult T-cell leukemia virus. **The Journal of Infectious Diseases**, **154**: 851- 857, 1986.

- KALYANAMARAM, V.S., SARNGADHARAN, M.G., ROBERT-GUROFF, M., MIYOSHI, I., BLAYNEY, D., GOLDE, D., GALLO, R.C. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. **Science**, **218**: 571-573, 1982.
- KAPLAN, J. E., OSAME, M., KUBOTA, H., IGATA, A., NISHITANI, H., MAEDA, Y., KHABBAZ, R. F., JANSSEN, R. S. The risk of development of HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.**, **3**: 1096-1101, 1990.
- KASHIMA, S., ALCANTARA, L.C., TAKAYANAGUI, O.M., CUNHA, M.A., CASTRO, B.G., POMBO-DE-OLIVEIRA, M.S., ZAGO, M.A., COVAS, D.T. Distribution of human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) subtypes in Brazil: genetic characterization of LTR and tax region. **Aids Research and Human Retroviruses**, **22(10)**: 953-959, 2006.
- KAZANJI, M., GESSAIN, A. Human T-cell Lymphotropic Virus types I and II (HTLV-I/II) in French Guiana: clinical and molecular epidemiology. **Cadernos de saúde pública**, **19(5)**: 1227-1240, 2003.
- KHABBAZ, R.F., ONORATO, I.M., CANNON, R.O., HARTLEY, T.M., ROBERTS, B., HOSEIN, B., KAPLAN, J.E. Seroprevalence of HTLV-1 and HTLV-2 among intravenous drug users and persons in clinics for sexually transmitted diseases. **N Engl J Med**, **326(6)**:375-80, 1992.
- KIBLER, K.V., JEANG, K.T. CREB/ATF-dependent repression of cyclin a by human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein. **Journal of Virology**, **75(5)**: 2161-73, 2001.

- KINOSHITA, K., HINO, S., AMAGASKI, T., IKEDA, S., YAMADA, Y., SUZUYAMA, J., MOMITA, S., TORIYA, K., KAMIHIRA, S., ICHIMARU, M. Demonstration of adult T-cell leukemia virus antigen in milk from three seropositive mothers. **Gann**, **75(2)**:103-5, 1984.
- KIRA, J., KOYANAGI, Y., YAMADA, T., ITOYAMA, Y., GOTO, I., YAMAMOTO, N., SASAKI, H., SAKAKI, Y. Increased HTLV-I proviral DNA in HTLV-I-associated myelopathy: A quantitative polymerase reaction study. **Ann. Neurol.** **29**: 194-201, 1991.
- KROON, E.G., PROIETTI, A.B.F.C. Vírus Linfotrópicos de Células T Humanas Tipos 1 e 2 (HTLV-1/2) – Histórico, Estrutura e Ciclo de Multiplicação Viral. In: **Cadernos Hemominas HTLV**. Proietti, A.B.F.C *et al.* (eds.) Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006. p.11 – 20.
- KUBOTA, R., NAGAI, M., KAWANISHI, T., OSAME, M., JACOBSON, S. Increased HTLV type 1 tax specific CD8⁺ cells in HTLV type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: correlation with HTLV type 1 proviral load. **Aids research and human retroviruses**, **16(16)**: 1705-1709, 2000.
- LAGRENADE, L., HANCHARD, B., FLETCHER, V., CRANSTON, B., BLATTNER, W. Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. **Lancet**, **336(8727)**:1345-7, 1990.
- LAL, R.B., OWEN, S. M., RUDOLPH, D.L., DAWSON, C., PRINCE, H. In vivo cellular tropism of human T-lymphotropic virus type II is not restricted to CD8⁺ cells. **Virology**, **210**: 441-447, 1995.
- LARSEN, O., ANDERSSON, S., DA SILVA, Z., HEDEGAARD, K., SANDSTRÖM, A., NAUCLÉR, A., DIAS, F., MELBYE, M., AABY, P. Prevalences of HTLV-1

- infection and associated risk determinants in an urban population in Guinea-Bissau, West Africa. **J Acquir Immune Defic Syndr.**, **25(2)**:157-63, 2000.
- LAURENTINO, R.V., LOPES, I.G., AZEVEDO, V.N., MACHADO, L.F., MOREIRA, M.R., LOBATO, L., ISHAK, M.O., ISHAK, R., VALLINOTO, A.C. Molecular characterization of human T-cell lymphotropic virus coinfecting human immunodeficiency virus 1 infected patients in the Amazon region of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **100(4)**: 371 – 376, 2005.
- LEE, H., SWANSON, P., SHORTY, V.S., ZACK, J.A., ROSENBLATT, J.D., CHEN, I.S. High rate of HTLV-II infection in seropositive i.v. drug abusers in New Orleans. **Science**, **244(4903)**:471-5, 1989.
- LEE, H.H., WEISS, S.H., BROWN, L.S., MILDVAN, D., SHORTY, V., SARAVOLATZ, L., CHU, A., GINZBURG, H.M., MARKOWITZ, N., DES JARLAIS, D.C., *et al.* Patterns of HIV-1 and HTLV-I/II in intravenous drug abusers from the middle atlantic and central regions of the USA. **J Infect Dis**, **162(2)**:347-52, 1990.
- LEE, H., IDLER, K.B., SWANSON, P., APARICIO, J.J., CHIN, K.K., LAX, J.P., NGUYEN, M., MANN, T., LECKIE, G., ZANETTI, A., *et al.* Complete nucleotide sequence of HTLV-II isolate NRA: comparison of envelope sequence variation of HTLV-II isolates from US blood donors US and Italian i. v. drug users. **Virology**, **196**: 57 – 69, 1993.
- LEÓN, G., QUIRÓS, A.M., LÓPEZ, J.L., HUNG, M., DÍAZ, A.M., GONCALVES, J., DA COSTA, O., HERNÁNDEZ, T., CHIRINOS, M., GÓMEZ, R. Seropositivity for human T-lymphotropic virus types I and II among donors at the Municipal Blood

- Bank of Caracas and associated risk factors. **Pan American journal of public health**, **13(2-3)**: 117-23, 2003.
- LIU, H., LEUNG, P., GLYNN, S., MURPHY, E.L. Human T-lymphotropic virus type II RFLP subtypes a0 and b4/b5 are associated with different demographic and geographic characteristics in the United States. **Virology**, **279(1)**: 90-6, 2001.
- MAHIEUX, R., IBRAHIM, F., MAUCLERE, P., HERVE, V., MICHEL, P., TEKAIA, F., CHAPPEY, C., GARIN, B., VAN DER RYST, E., GUILLEMAIN, B., LEDRU, E., DELAPORTE, E., DE THE, G., GESSAIN, A. Molecular epidemiology of 58 new African human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) strains: identification of a new and distinct HTLV-1 molecular subtype in Central Africa and in Pygmies. **Journal of Virology**, **71(2)**: 1317-33, 1997.
- MANEL, N., KIM, F. J., KINET, S., TAYLOR, N., SITBON, M., BATTINI, J. L. The Ubiquitous Glucose Transporter GLUT-1 Is a Receptor for HTLV. **Cell**, **115**: 449-459, 2003.
- MANEL, N., BATTINI, J. L., TAYLOR, N., SITBON, M. HTLV-1 tropism and envelope receptor. **Oncogene** , **24**: 6016–6025, 2005.
- MANNS, A., WILKS, R.J., MURPHY, E.L., HAYNES, G., FIGUEROA, J.P., BARNETT, M., HANCHARD, B., BLATTNER, W.A. A prospective study of transmission by transfusion of HTLV-I and risk factors associated with seroconversion. **Int J Cancer**, **51(6)**:886-91, 1992.
- MANNS, A., HISADA, M., GRENADE, L. L. Human T-lymphotropic virus type I infection. **The Lancet**, **353**: 1951–1958, 1999.

- MARTINS, M.L., STANCIOLI, E.F.B. Patogênese da infecção pelo HTLV. In: **Cadernos Hemominas HTLV**. Proietti, A.B.F.C. *et al.* (eds.) Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006. p.21 – 45.
- MATSUOKA, M. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) infection and the onset of adult T-cell leukemia (ATL). **Retrovirology**, **2**: 27, 2005.
- MAUCLÈRE, P., LE HESRAN, J.Y., MAHIEUX, R., SALLA, R., MFOUPOUENDOUN, J., ABADA, E.T., MILLAN, J., DE THÉ, G., GESSAIN, A. Demographic ethnic and geographic differences between human T-cell lymphotropic virus (HTLV) type I seropositive carriers and persons with human T-cell leukaemia/lymphoma virus type I Gag indeterminate Western blots in Central Africa. **Journal of Infections Diseases**, **176**: 505 – 509, 1997.
- MENNA-BARRETO, M., BENDER, A.L., BONATTO, S.L., FREITAS, L.B., SALZANO, F.M., TSUNETO, L.T., PETZL-ERLER, M.L. Human T-cell lymphotropic virus type II in Guaraní Indians, Southern Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, **21(6)**: 1947-1951, 2005.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de Manejo Clínico do Paciente com HTLV. Brasília, Série A. Normas e Manuais Técnicos - MS. Séries Manuais; nº 3- CN- DST e AIDS. 2004.
- MIURA, T., FUKUNAGA, T., IGARASHI, T., YAMASHITA, M., IDO, E., FUNAHASHI, S., ISHIDA, T., WASHIO, K., UEDA, S., HASHIMOTO, K., YOSHIDA, M., OSAME, M., SINGHAL, B.S., ZANINOVIC, V., CARTIER, L., SONODA, S., TAJIMA, K., INA, Y., GOJOBORI, T., HAYAMI, M. Phylogenetic subtypes of human T-lymphotropic virus type I and their relations to the

- anthropological background. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **91(3)**: 1124-7, 1994.
- MIURA, T., YAMASHITA, M., ZANINOVIC, V., CARTIER, L., TAKEHISA, J., IGARASHI, T., IDO, E., FUJIYOSHI, T., SONODA, S., TAJIMA, K., HAYAMI, M. Molecular Phylogeny of Human T-Cell Leukemia Virus Type I and II of Amerindians in Colombia and Chile. **Journal of Molecular Evolution**, **44(Suppl 1)**: S76–S82, 1997.
- MOCHIZUKI, M., YOSHIMURA, K., SHIRAO, M., WATANABE, T., MORI, S., ARAKI, S., MIYATA, N., YAMAGUCHI, K., TAKATSUKI. HTLV-I uveitis. **Anais do V International Conference on Human Retrovirology, HTLV**, W-23, Kumamoto, Japão, 1992.
- MONTANHEIRO, P.A., OLIVEIRA, A.C., POSADA-VERGARA, M.P., MILAGRES, A.C., TAUIL, C., MARCHIORI, P.E., DUARTE, A.J., CASSEB, J. Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) proviral DNA viral load among asymptomatic patients and patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Brazilian journal of medical and biological research**, **38(11)**: 1643-7, 2005.
- MORIMOTO, H. K., CATERINO-DE-ARAÚJO, A., MORIMOTO, A. A., REICHE, E. M. V., UEDA, L. T., MATSUO, T., STEGMANN, J. W., REICHE, F. V. Seroprevalence and Risk Factors for Human T Cell Lymphotropic Virus Type 1 and 2 Infection in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients Attending AIDS Referral Center Health Units in Londrina and Other Communities in Paraná, Brazil. **Aids research and human retroviruses**, **21**: 256 - 262, 2005.

- MOTA-MIRANDA, A.C., ARAÚJO, S.P., DIAS, J.P., COLIN, D.D., KASHIMA, S., COVAS, D.T., TAVARES-NETO, J., GALVÃO-CASTRO, B., ALCANTARA, L.C. HTLV-1 infection in blood donors from the Western Brazilian Amazon region: seroprevalence and molecular study of viral isolates. **Journal of Medical Virology**, **80(11)**: 1966-1971, 2008.
- MUELLER, N. The epidemiology of HTLV-I infection. **Cancer causes & control : CCC**, **2(1)**: 37-52, 1991.
- MUELLER, N., OKAYAMA, A., STUVER, S., TACHIBANA, N. Findings from the Miyazak cohort study. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, **13 (supl I)**: S2 – S7, 1996.
- MURPHY, E.L., FIGUEROA, J.P., GIBBS, W.N., BRATHWAITE, A., HOLDING-COBHAM, M., WATERS, D., CRANSTON, B., HANCHARD, B., BLATTNER, W.A. Sexual transmission of T-lymphotropic virus type I (HTLV-I). **Annals of internal medicine**, **111**: 555 – 560, 1989a.
- MURPHY, E.L., HANCHARD, B., FIGUEROA, J.P., GIBBS, W.N., LOFTERS, W.S., CAMPBELL, M., GOEDERT, J.J., BLATTNER, W.A. Modeling the risk of adult T-cell leukemia/lymphoma in persons infected with human T-lymphotropic virus type I. **Int. J. Cancer** **43**: 250-253, 1989b.
- MURPHY, E.L., FIGUEROA, J.P., GIBBS, W.N., HOLDING-COBHAM, M., CRANSTON, B., MALLEY, K., BODNER, A.J., ALEXANDER, S.S., BLATTNER, W.A. Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) seroprevalence in Jamaica. I. Demographic determinants. **American journal of epidemiology**, **133(11)**: 1114-24, 1991.

- MURPHY, E.L., WILKS, R., HANCHARD, B., CRANSTON, B., FIGUEROA, J.P., GIBBS, W.N., MURPHY, J., BLATTNER, W.A. A case-control study of risk factors for seropositivity to human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) in Jamaica. **Int J Epidemiol**, **25(5)**:1083-9, 1996.
- MURPHY, E. L. et al. HTLV-associated myelopathy in a cohort of HTLV-I and HTLV-II infected blood donors. **The REDS investigators**, **48**: 315- 320, 1997.
- MURPHY, E.L., BUSCH, M.P., TONG, M., CORNETT, P., VYAS, G.N. A prospective study of the risk of transfusion-acquired viral infections. *Transfus Med*, **8(3)**:173-8, 1998.
- NAGAI, M., USUKU, K., MATSUMOTO, W., KODAMA, D., TAKENOUCI, N., MORITOYO, T., HASHIGUCHI, S., ICHINOSE, M., BANGHAM, C.R., IZUMO, S., OSAME, M. Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. **Journal of neurovirology**, **4(6)**: 586-93, 1998.
- NAGAI, M., YAMANO, Y., BRENNAN, M.B., MORA, C.A., JACOBSON, S. Increased HTLV-I proviral load and preferential expansion of HTLV-I Tax-specific CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from patients with HAM/TSP. **Annals of neurology**, **50(6)**: 807-12, 2001.
- NISOLE, S., SAÏB, A. Early steps of retrovirus replicative cycle. **Retrovirology**, **1**: 9, 2004.
- NOVOA, P., PENALVA DE OLIVEIRA, A.C., POSADA VERGARA, M.P., DA SILVA DUARTE, A.J., CASSEB, J. Molecular characterization of human T-cell lymphotropic virus type 2 (HTLV-II) from people living in urban areas of Sao Paulo

- city: evidence of multiple subtypes circulation. **Journal of Medical Virology**, **79(2)**: 182-187, 2007.
- OKOCHI, K., SATO, H., HINUMA, Y. A retrospective study on transmission of adult T-cell leukemia virus by blood transfusion: seroconversion in recipients. **Vox Sanguinis**, **46**: 245 – 253, 1984.
- OLINDO, S., LÉZIN, A., CABRE, P., MERLE, H., SAINT-VIL, M., EDIMONANA KAPTUE, M., SIGNATE, A., CÉSAIRE, R., SMADJA, D. HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells quantified in 100 HAM/TSP patients: a marker of disease progression. **Journal of the neurological sciences**, **237(1-2)**: 53-9, 2005.
- ORLAND, J.R., ENGSTROM, J., FRIDEY, J., SACHER, R.A., SMITH, J.W., NASS, C., GARRATTY, G., NEWMAN, B., SMITH, D., WANG, B., LOUGHLIN, K., MURPHY, E.L., HTLV Outcomes Study. Prevalence and clinical features of HTLV neurologic disease in the HTLV Outcomes Study. **Neurology**, **61(11)**: 1588-1594, 2003.
- OROSZLAN, S., SARNGADHARAN, M.G., COPELAND, T.D., KALYANARAMAN, V.S., GILDEN, R.V., GALLO, R.C. Primary structure analysis of the major internal protein p24 of human type C T-cell leukemia virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **79(4)**: 1291-4, 1982.
- OSAME, M., USUKU, K., IZUMO, S. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. **Lancet**: 1031-1032, 1986.
- OSAME, M., MATSUMOTO, M., USUKU, K., IZUMO, S., IJICHI, N., AMITANI, H., TARA, M., IGATA, A. Chronic progressive myelopathy associated with

- elevated antibodies to human T lymphotropic virus type I and adult T cell leukemia like cells. **Annals of Neurology**, **21**: 117-122, 1987
- PINHEIRO, S.R., LANA-PEIXOTO, M.A., PROIETTI, A.B., ORÉFICE, F., LIMA-MARTINS, M.V., PROIETTI, F.A. HTLV-I associated uveitis, myelopathy, rheumatoid arthritis and Sjögren's syndrome. **Arq Neuropsiquiatr**, **53(4)**:777-81, 1995.
- POIEZ, B.J., RUSCETTI, F.W., GADZAR, A.F., BUNN, P.A., MINNA, J.D., GALLO, R.C. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, **77**: 7415, 1980.
- POSADA-VERGARA, M.P., MONTANHEIRO, P., FUKUMORI, L.M., BONASSER, F., DUARTE, A.J., PENALVA DE OLIVEIRA, A.C., CASSEB, J. Clinical and epidemiological aspects of HTLV-II infection in São Paulo, Brazil: presence of tropical spastic paraparesis/HTLV-associated myelopathy (TSP/HAM) simile diagnosis in HIV-1-co-infected subjects. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **48(4)**: 207-210, 2006.
- POULIQUEN, J.F., HARDY, L., LAVERGNE, A., KAFILUDINE, E., KAZANJI, M. High Seroprevalence of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 in Blood Donors in Guyana and Molecular and Phylogenetic Analysis of New Strains in the Guyana Shelf (Guyana, Suriname, and French Guiana). **Journal of Clinical Microbiology**, **42(5)**: 2020 – 2026, 2004.
- PROIETTI, F.A., LIMA-MARTINS, M.V., PASSOS, V.M., BRENER, S., CARNEIRO-PROIETTI, A.B. HTLV-I/II seropositivity among eligible blood donors from Minas Gerais State, Brasil. **Vox sanguinis**, **67(1)**: 77, 1994.

- PROIETTI, F. A., CARNEIRO-PROIETTI, A. B., CATALAN-SOARES, B. C., MURPHY, E. L. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. **Oncogene**, **24**: 6058 – 6068, 2005.
- QUISPE, N.C., FERIA, E.B., SANTOS-FORTUNA EDE, L., CATERINO-DE-ARAÚJO, A. Confirming the presence of HTLV-1 infection and the absence of HTLV-2 in blood donors from Arequipa, Peru. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **51(1)**: 25-29, 2009.
- RENNER, J.D., LAURINO, J.P., MENNA-BARRETO, M., SCHMITT, V.M. Molecular evidence of HTLV-II subtype B among an urban population living in South Brazil. **AIDS Research and Human Retroviruses**, **22(4)**: 301-306, 2006.
- RICHARDSON, J.H., EDWARDS, A.J., CRUICKSHANK, J.K., RUDGE, P., DALGLEISH, A.G. In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. **Journal of Virology**, **64 (11)**: 5682-7, 1990.
- ROMÁN, G.C., OSAME, M. Identity of HTLV-I associated tropical spastic paraparesis and HTLV-I associated myelopathy. **Lancet**, **1(8586)**: 651, 1988.
- ROSENBERG, A. R., DELAMARRE, L., PREIRA, A., DOKHELAR, M.-C. Analysis of Functional Conservation in the Surface and Transmembrane Glycoprotein Subunits of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. **Journal of Virology**, **72**: 7609-7614, 1998.
- ROSENBLATT, J. D., GOLDE, D. W., WACHSMAN, W., GIORGI, J. V., JACOBS, A., SCHMIDT, G. M., QUAN, S., GASSON, J.C. & CHEN, I. S. A second isolate of HTLV-II associated with atypical hairy-cell leukemia. **New England Journal of Medicine**, **315**: 372–377, 1986.

- ROSENBLATT, J.D., TOMKINS, P., ROSENTHAL, M., KACENA, A., CHAN, G., VALDERAMA, R., HARRINGTON Jr., W., SAXTON, E., DIAGNE, A., ZHAO, J.Q. Progressive spastic myelopathy in a patient co-infected with HIV-1 and HTLV-II autoantibodies to the human homologue of rig in blood and cerebrospinal fluid. **AIDS**, **6**: 1151-1158, 1992.
- ROSS, T.M., MINELLA, A.C., FANG, Z.Y., PETTIFORD, S.M., GREEN, P.L. Mutational analysis of human T-cell leukemia virus type 2 Tax. **Journal of virology**, **71(11)**: 8912-7, 1997.
- ROUCOUX, D.F., WANG, B., SMITH, D., NASS, C.C., SMITH, J., HUTCHING, S.T., NEWMAN, B., LEE, T.H., CHAFETS, D.M., MURPHY, E.L.; HTLV OUTCOMES STUDY INVESTIGATORS. A prospective study of sexual transmission of human T lymphotropic virus (HTLV)-I and HTLV-II. **The Journal of infectious diseases**, **191(9)**:1490-7, 2005.
- SALEMI, M., CATTANEO, E., CASOLI, C., BERTAZZONI, U. Identification of IIa and IIb molecular subtypes of human T-cell lymphotropic virus type II among Italian injecting drug users. **Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology: official publication of the International Retrovirology Association**, **8(5)**: 516-20, 1995.
- SALEMI, M., VAN DOOREN, S., AUDENAERT, E., DELAPORTE, E., GOUBAU, P., DESMYTER, J., VANDAMME, A.M. Two new human T-lymphotropic virus type I phylogenetic subtypes in seroindeterminates, a Mbuti pygmy and a Gabonese, have closest relatives among African STLV-I strains. **Virology**. **246(2)**: 277-87, 1998.

- SANCHEZ-PALACIOS, C., GOTUZZO, E., VANDAMME, A.M., MALDONADO, Y. Seroprevalence and risk factors for human T-cell lymphotropic virus (HTLV-I) infection among ethnically and geographically diverse Peruvian women. **International journal of infectious diseases**, **7(2)**:132-7, 2003.
- SANGER, F., NICHLEN, S., COULSON, A. R. DNA sequences with chain termination inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, **74**: 5463 – 5468, 1977.
- SANTOS, E.L., TAMEGÃO-LOPES, B., MACHADO, L.F.A., ISHAK, M.O.G., ISHAK, R., LEMOS, J.A.R., VALLINOTO, A.C.R. Molecular Characterization of HTLV-1/2 among blood donors in Belem, State of Para: first description of HTLV-2b subtype in the Amazon region. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, IN PRESS, 2009.
- SANTOS, T.J.T., COSTA, C.M.C., GOUBAU, P., VANDAMME, A-M., DESMYTER, J., VAN DOOREN, S., MOTA, R.M.S., COSTA, F.B.C., OLIVEIRA, A.C.S., GOMES, V.B.A.F., CARNEIRO-PROIETTI, A.B., DE BRUIN, V.M.S., DE SOUSA, F.C.S., ORIÁ, R.B. Western Blot Seroindeterminate Individuals for Human T-lymphotropic Virus 1/2 (HTLV-1/2) in Fortaleza (Brazil): A Serological and Molecular Diagnostic and Epidemiological Approach. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, **7(3)**: 202 – 209, 2003.
- SARKODIE, F., ADARKWA, M., ADU-SARKODIE, Y., CANDOTTI, D., ACHEAMPONG, J.W., ALLAIN, J.P. Screening for viral markers in volunteer and replacement blood donors in West Africa. **Vox sanguinis**, **80(3)**: 142-7, 2001.
- SCHREIBER, G.B., MURPHY, E.L., HORTON, J.A., WRIGHT, D.J., GARFEIN, R., CHIEN, H.C., NASS, C.C. Risk factors for human T-cell lymphotropic virus types I

- and II (HTLV-I and -II) in blood donors: the Retrovirus Epidemiology Donor Study. NHLBI Retrovirus Epidemiology Donor Study. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol**, **14(3)**:263-71, 1997.
- SEGURADO, A.A., BIASUTTI, C., ZEIGLER, R., RODRIGUES, C., DAMAS, C.D., JORGE, M.L., MARCHIORI, P.E. Identification of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) subtypes using restricted fragment length polymorphism in a cohort of asymptomatic carriers and patients with HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis from São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **97(3)**: 329-333, 2002.
- SEIKI, M., HATTORI, S., HIRAYAMA, Y., YOSHIDA, M. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, **80 (12)**: 3618-3622, 1983.
- SEIKI, M., INOUE, J., TAKEDA, T., YOSHIDA, M. Direct evidence that p40x of human T-cell leukemia virus type I is a trans-acting transcriptional activator. **The EMBO journal**, **5(3)**: 561-5, 1986.
- SHIMOTOHNO, K., TAKAHASHI, Y., SHIMIZU, N., GOJOBORI, T., GOLDE, D.W., CHEN, I.S., MIWA, M., SUGIMURA, T. Complete nucleotide sequence of an infectious clone of human T-cell leukemia virus type II: an open reading frame for the protease gene. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, **82**: 3101 – 3105, 1985.
- SILVERMAN, L.R., PHIPPS, A.J., MONTGOMERY, A., RATNER, L., LAIRMORE, M.D. Human T-cell lymphotropic virus type 1 open reading frame II-encoded p30II

- is required for in vivo replication: evidence of in vivo reversion. **Journal of virology**, **78(8)**: 3837-45, 2004.
- SILVA, F. A., MEIS, E., DOBBIN, J. A., POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S. Adult T cell leukemia-lymphoma in Brasil: epidemiology, treatment and controverstial aspects. **Revista Brasileira de Cancerologia**, **48**: 585-595, 2002a.
- SILVA, E.A., OTSUKI, K., LEITE, A.C., ALAMY, A.H., SÁ-CARVALHO, D., VICENTE, A.C. HTLV-II infection associated with a chronic neurodegenerative disease: clinical and molecular analysis. **Journal of Medical Virology**, **66**: 253-257, 2002b.
- SOUZA, L.A., LOPES, I.G., MAIA, E.L., AZEVEDO, V.N., MACHADO, L.F., ISHAK, M.O., ISHAK, R., VALLINOTO, A.C. Caracterização molecular do HTLV-1 em pacientes com paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 em Belém, Pará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** **39(5)**: 504 - 506, 2006.
- STIGUM, H., MAGNUS, P., SAMDAL, H.H., NORD, E. Human T-cell lymphotropic virus testing of blood donors in Norway: a cost-effect model. **International journal of epidemiology**, **29(6)**: 1076-84, 2000.
- STUVER, S.O., TACHIBANA, N., OKAYAMA, A., SHIOIRI, S., TSUNETOSHI, Y., TSUDA, K., MUELLER, N.E. Heterosexual transmission of human T cell leukemia/lymphoma virus type I among married couples in southwestern Japan: an initial report from the Miyazaki Cohort Study. **J Infect Dis**, **167(1)**:57-65, 1993.
- SWITZER, W.M., BLACK, F.L., PIENIAZEK, D., BIGGAR, R.J., LAL, R.B., HENEINE, W. Endemicity and phylogeny of human T cell lymphotropic virus type

- II subtype A from the Kayapo Indians of Brazil: evidence for limited regional dissemination. **AIDS Research and Human Retroviruses**, **12**: 635 – 640, 1996.
- TAJIMA, K., KUROISHI, T. Estimation or Rate of Incidence of ATL among ATLV (HTLV-I) carriers in kyusshu, Japan. **Jpn. J. Clin. Oncol.**, **15**: 423-430, 1985.
- TAKAYANAGUI, O.M., CASTRO-COSTA, C.M. Mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP). In: **Cadernos Hemominas HTLV**. Proietti, A.B.F.C. *et AL.* (eds.) Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006. p.115 – 139.
- TAMEGÃO-LOPES, B.P., REZENDE, P.R., MARADEI-PEREIRA, L.M.C., LEMOS, J.A.R. Carga proviral do HTLV-1 e HTLV-2: um método simples através da PCR quantitativa em tempo real. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **39(6)**: 548-552, 2006.
- TAMURA, K., DUDLEY, J., NEI, M., KUMAR, S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution** **24**: 1596-1599, 2007.
- TANGY, F. Molecular Biology of HTLV-I. In: **HTLV, truths and questions**. Zaninovic,V. (eds.). Colombia, Cali, Feriva Editores, 1996. p.1-13.
- TAYLOR, G. P. The epidemiology of HTLV-I in Europe. **Journal Acquired Immune Deficiency Syndromes & Human Retrovirology**, **13(suppl 1)**: S8 – S14, 1996.
- TAYLOR, G.P., HALL, S.E., NAVARRETE, S., MICHIE, C.A., DAVIS, R., WITKOVER, A.D., ROSSOR, M., NOWAK, M.A., RUDGE, P., MATUTES, E., BANGHAM, C.R., WEBER, J.N. Effect of lamivudine on human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) DNA copy number, T-cell phenotype, and anti-tax cytotoxic

- T-cell frequency in patients with HTLV-1-associated myelopathy. **Journal of Virology**, **73(12)**: 10289-10295, 1999.
- THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F., HIGGINS, D.G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, **25(24)**: 4876 – 4882, 1997.
- TSELIYOU, P.M., SPANAKIS, N., SPILIOTAKARA, A., POLITIS, C., LEGAKIS, N.J., TSAKRIS, A. HTLV-I and -II in southwestern Greece. **Transfusion**, **43(11)**: 1641-2, 2003.
- UCHIYAMA, T., YODOI, J., SAGAWA, K., TAKATSUKI, K., UCHINO, H. Adult T-Cell Leukemia: Clinical and Hematologic Features of 16 Cases. **Blood**, **50**: 481-492, 1977.
- URETA-VIDAL, A., ANGELIN-DUCLOS, C., TORTEVOYE, P., MURPHY, E., LEPÈRE, J.F., BUIGUES, R.P., JOLLY, N., JOUBERT, M., CARLES, G., POULIQUEN, J.F., DE THÉ, G., MOREAU, J.P., GESSAIN, A. Mother-to-child transmission of human T-cell-leukemia/lymphoma virus type I: Implication of high antiviral antibody titer and high proviral load in carrier mothers. **International Journal of Cancer. Journal international du cancer**, **82(6)**: 832-6, 1999.
- VALLINOTO, A. C. R., AZEVEDO, V. N., SANTOS, D. E. M., CANICEIRO, S., MESQUITA, R. C. L., HALL, W. W., ISHAK, M. O. G., ISHAK, R. Serological evidence of HTLV-I and HTLV-II coinfections in HIV-1 positive patients in Belém, State of Pará, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **93**: 407-409, 1998.
- VALLINOTO, A.C., ISHAK, M.O., AZEVEDO, V.N., VICENTE, A.C., OTSUKI, K., HALL, W.W., ISHAK, R.. Molecular epidemiology of human T-lymphotropic virus

- type II infection in Amerindian and urban populations of the Amazon region of Brazil. **Human Biology**, **74**: 633 - 644, 2002.
- VALLINOTO, A.C., MUTO, N.A., PONTES, G.S., MACHADO, L.F., AZEVEDO, V.N., DOS SANTOS, S.E., RIBEIRO-DOS-SANTOS, A.K., ISHAK, M.O., ISHAK, R. Serological and Molecular Evidence of HTLV-I Infection among Japanese Immigrants Living in the Amazon Region of Brazil. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, **57**: 156 – 159, 2004.
- VALLINOTO, A.C., PONTES, G.S., MUTO, N.A., LOPES, I.G., MACHADO, L.F., AZEVEDO, V.N., CARVALHAES, F.A., SANTOS, S.E., GUERREIRO, J.F., ISHAK, M.O., ISHAK, R. Identification of human T-cell lymphotropic virus infection in a semi-isolated Afro-Brazilian quilombo located in the Marajó Island (Pará, Brazil). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **101(1)**: 103-105, 2006.
- VANDAMME, A.M., LIU, H.F., GOUBAU, P., DESMYTER, J. Primate T-lymphotropic virus type I LTR sequence variation and its phylogenetic analysis: compatibility with an African origin of PTLV-I. **Virology**, **202(1)**: 212-23, 1994.
- VANDAMME, A-M., SALEMI, M., VANBRUSSEL, M., LIU, H-F., LAETHEM, K.V., RANTS, M.V., MICHELS, L., DESMYTER, J., GOUBAU, P. African origin of human T-lymphotropic virus type 2 (HTLV-2) supported by a potential new HTLV-2d subtype in Congolose Bambuti Efe Pygmies. **Journal of Virology**, **72**: 4327-4340, 1998.
- VAN DOOREN, S., GOTUZZO, E., SALEMI, M., WATTS, D., AUDENAERT, E., DUWE, S., ELLERBROK, H., GRASSMANN, R., HAGELBERG, E., DESMYTER, J., VANDAMME, A.M. Evidence for a post-Columbian introduction

- of human T-cell lymphotropic virus [type I] [corrected] in Latin America. **The Journal of general virology**, **79 (Pt 11)**: 2695-708, 1998.
- VAN DOOREN, S., SALEMI, M., VANDAMME, A. M. Dating the origin of the human T-cell lymphotropic virus Type-I (HTLV-I) subtypes. **Molecular Biology and Evolution**, **18**: 661 – 671, 2001.
- VERNANT, J.C., MAURS, L., GESSAIN, A., BARIN, F., GOUT, O., DELAPORTE, J.M., SANHADJI, K., BUISSON, G., DE-THÉ, G. Endemic tropical spastic paraparesis associated with human T lymphotropic virus type I: a clinical and seroepidemiological study of 25 cases. **Annals of Neurology**, **21**: 123-130, 1987.
- VICENTE, A.C.P., ALCÂNTARA, L.C.J., HADDAD, S.K. Epidemiologia Molecular do HTLV no Brasil. In: **Cadernos Hemominas HTLV**. Proietti, A.B.F.C *et al.* (eds.) Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006. p.86 – 92.
- VIDAL, A.U., GESSAIN, A., YOSHIDA, M., TEKAIA, F., GARIN, B., GUILLEMAIN, B., SCHULZ, T., FARID, R., DE THÉ, G. Phylogenetic classification of human T cell leukaemia/lymphoma virus type I genotypes in five major molecular and geographical subtypes. **The Journal of general virology**, **75 (Pt 12)**: 3655-66, 1994.
- WANG, D., GUO, M.X., HU, H.M., ZHAO, Z.Z., QIU, H.L., SHAO, H.J., ZHU, C.G., XUE, L., SHI, Y.B., LI, W.X. Human T-cell leukemia virus type 1 oncoprotein tax represses ZNF268 expression through the CREB/ATF pathway. **The Journal of biological chemistry**, 2008 (no prelo).

- WATANABE, T., SEIKI, M., YOSHIDA, M. HTLV type I (US isolate) and ATL (japanese isolate) are the same species of human retrovirus. **Virology**, **133**: 238-241, 1984.
- WOLFE, N.D., HENEINE, W., CARR, J.K., GARCIA, A.D., SHANMUGAM, V., TAMOUFE, U., TORIMIRO, J.N., PROSSER, A.T., LEBRETON, M., MPOUDINGOLE, E., MCCUTCHAN, F.E., BIRX, D.L., FOLKS, T.M., BURKE, D.S., SWITZER, W.M. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. **The National Academy of Sciences of the USA**, **102**: 7994 – 7999, 2005.
- YAMAGUCHI, K. Human T-Lymphotropic Virus Type I in Japan. **Lancet**, **43**: 213 – 216, 1994.
- YAMAGUCHI, K. **Retroviroses humanas: doenças associadas ao HTLV: etiologia, patogenia, patologia clínica, tratamento, prevenção**. Veronesi, R., Focaccia, R. (eds.). São Paulo. Atheneu, 2000. 65-69p.
- YAMANO, Y., NAGAI, M., BRENNAN, M., MORA, C., SOLDAN, S., TOMARU, U., TAKENOUCHE, N., IZUMO, S., OSAME, M., JACOBSON, S. Correlation of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) mRNA with proviral load, virus-specific CD8+T cells, and disease severity in HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP). **Blood**, **99(1)**: 88-94, 2002.
- YOSHIDA, M., MIYOSHI, I., HINUMA, Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell and its implication in the disease. **Proceeding of the National of Academy Sciences of the USA**, **79**: 2031-2035, 1982.
- YOUNIS, I., GREEN, P.L. The human T-cell leukemia virus Rex protein. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, **10**: 431-45, 2005.

ZEHENDER, G., MERONI, L., VARCHETTA, S., DE MADDALENA, C., CAVALLI, B., GIANOTTO, M., BOSISIO, A.B., COLASANTE, C., RIZZARDINI, G., MORONI, M., GALLI, M. Human T-lymphotropic virus type 2 (HTLV-2) provirus in circulating cells of the monocyte/macrophage lineage in patients dually infected with human immunodeficiency virus type 1 and HTLV-2 and having predominantly sensory polyneuropathy. **Journal of Virology**, **72(9)**: 7664-7668, 1998.

ANEXO 1



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
LABORATÓRIO DE VIROLOGIA

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

1. Estou sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa sobre a *caracterização clínico-epidemiológica e molecular da infecção pelo Virus linfotrópico de células T humanas (HTLV) infectando pacientes com PET/MAH*, que está sendo desenvolvida no Laboratório de Virologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.
2. Para que eu decida ou não em participar da pesquisa me foram prestadas as seguintes informações:
3. O título do projeto é: *Caracterização clínico-epidemiológica e molecular da infecção Virus linfotrópico de células T humanas em pacientes com Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia Associada ao HTLV*.
4. O pesquisador responsável é o Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto, Biomédico, Professor Adjunto da Universidade Federal do Pará.
5. O objetivo da pesquisa é a avaliação clínico-epidemiológica e molecular da infecção pelo *Virus linfotrópico de células T humanas (HTLV)* no Estado do Pará em pacientes com PET/MAH, contribuindo para o conhecimento da prevalência e do perfil da infecção pelo HTLV na região.
6. Essa pesquisa não oferece riscos, porque as práticas são de uso rotineiro. Uma pequena quantidade de sangue (5mL) será coletada e posteriormente estocadas a -20°C no Laboratório de Virologia da UFPA para pesquisas futuras.
7. Toda nova pesquisa a ser feita com o material estocado será submetida para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição.
8. Ninguém é obrigado a participar da pesquisa, assim como qualquer pessoa poderá deixar a pesquisa no momento que quiser, pois não haverá prejuízo pessoal por esta causa.
9. Não haverá nenhum tipo de despesas para participação da pesquisa, assim como não haverá nenhuma forma de pagamento para participação.
10. O grande benefício desta pesquisa para todos os que participam, é possibilitar uma melhor fundamentação do conhecimento da prevalência e do perfil da infecção pelo HTLV na região e auxiliar no estabelecimento das condutas diagnósticas e de seguimento clínico-terapêutico mais adequadas.
11. A participação na pesquisa é sigilosa, isto significa que, somente os pesquisadores ficarão sabendo de sua participação. Os dados utilizados na pesquisa terão uso exclusivo neste trabalho, sem a identificação individual do participante.

Assinatura do Pesquisador Responsável

CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro que li as informações acima sobre a pesquisa, que me sinto perfeitamente esclarecido(a) acerca do conteúdo da mesma, assim como seus riscos e benefícios. Declaro ainda que, por minha livre vontade, aceito participar da pesquisa cooperando com a coleta de material para exame.

Belém, ____ / ____ / ____

Assinatura da participante

Prontuário: _____

Protocolo: _____

ANEXO 2

QUESTIONÁRIO PARA HTLV

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO:

Nome: _____ Sexo: _____ Estado Civil: _____

Data de nascimento: _____ Profissão: _____ Procedência: _____

HISTÓRIA CLÍNICA:

Início da sintomatologia:

Qual? _____

Uso de drogas endovenosas antes? () Não () Sim Compartilhada? () Não () Sim

Transfusão de sangue ou hemocomponentes celular? () Não () Sim

Data _____

Cirurgias () Não () Sim Qual(is)? _____ Data _____

Tatuagem? () Não () Sim Quando? _____

Já teve/tem alguma DST? () Não () Sim Qual? _____

Usa preservativo nas relações sexuais? () Não () Sim () As vezes

Acidente durante relação com preservativo? () Não () Sim

Relacionamento: () Estável () Promiscuo n° de parceiros sexuais nos últimos 6 meses:

Homossexual? () Não () Sim Bissexual? () Não () Sim

ASPECTOS CLÍNICOS :

Força muscular diminuída? () Não () Sim Dor lombar? () Não () Sim

Dor nas pernas? () Não () Sim Parestesia / Formigamento? () Não () Sim

Distúrbios Miccional? () Retenção () Incontinência () Urgência () ausentes

Constipação Intestinal? () Não () Sim Incontinência fecal? () Não () Sim

Diminuição sexual do libido? () Não () Sim

Disfunção erétil? () Não () Sim

Apresenta problemas oftálmicos? () Uveíte () Xeroftalmia (

) outros _____

INSPEÇÃO GERAL:

Pele:

Dermatites? ()Infecciosa ()Escabiose ()Outras ()Ausentes

Lesões maculo papulares? ()Não ()Sim

Nódulos? ()Não ()Sim

Eritrodermia generalizada? ()Não ()Sim

Palpação:

Gânglios:Linfadenopatias? ()Não ()Sim

Abomem:Hepatomegalia? ()Não ()Sim

Esplenectomia? ()Não ()Sim

DADOS RELATIVOS AOS COMUNICANTES:

Nº de gestações _____ Nº de partos _____ Nº de Abortos _____

Amamentou? ()Não ()Sim Quanto tempo? _____

Tem pais vivos?()Mãe viva ()Mãe Falecida Motivo? _____

()Pai vivo ()Pai Falecido Motivo? _____

Nº de irmãos _____ Tem alguma patologia?

Tem história de câncer na família? ()Não ()Sim Qual _____

Utiliza Objetos(tesourinha, alicates de unha, gilete,escova dental) em comum? ()Não ()Sim

Qual? _____

Já fez /faz uso de barbeador,navalha em Salão de Beleza? ()Não ()Sim

RESULTADO DE EXAMES:

Hemograma:

Anemia(Hb↓10) ()Não ()Sim Valor: _____

Flows cells ()Não ()Sim Valor: _____

Leucocitose (↑ 10 000) ()Não ()Sim Valor: _____

Leucopenia (↓ 5.000) ()Não ()Sim Valor: _____

Plaquetopenia (↓ 140 000) ()Não ()Sim Valor: _____

Linfócitos atípicos? ()Não ()Sim Valor: _____

EXAMES DIRECIONADOS AO HTLV:

Teste sorológico anti-HTLV(Elisa)

Resultado Positivo→ data _____ data _____ data _____

Resultado Negativo→ data _____ data _____ data _____

Teste de Western Blot

Resultado positivo→ data _____ data _____ data _____

Resultado Negativo→ data _____ data _____ data _____

PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

Resultado positivo→ data _____ data _____ data _____

Resultado Negativo→ data _____ data _____ data _____

EXAME DA MOTRICIDADE:

1. Atitude () Normal () Alterada

2. Equilíbrio:

Estático: Prova de Humberg

() Negativo () positivo -Labirintico
-Cerebelar
-Sensitiva (tabética)

Dinâmico: () Marcha normal () Marcha alterada

3. Coordenação Motora:

Dedo/ Nariz () Sim () Não

Calcanhar/ Joelho () Sim () Não

4. Tônus muscular

() Normal () Hipotonia () Hipertonia () Espasticidade () Rigidez

5. Reflexos:

ANEXO 3



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JOÃO DE BARROS BARRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



TERMO DE APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário João de Barros Barreto da Universidade Federal do Pará analisou o projeto de pesquisa intitulado “**Caracterização clínico-epidemiológica e molecular da infecção Vírus linfotrópico de células T humanas em pacientes com Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia Associada ao HTLV (PET/MAH)**”, protocolo nº 2061/2005, com a participação dos pesquisadores. *Luiz Fernando Almeida Machado, José Alexandre Rodrigues de Lemos, Marluísa de Oliveira Guimarães Ishak, Bruna Pedroso Tamegão Lopes e Eduardo Leitão Maia*, sob a Coordenação do *Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto*, obtendo **APROVAÇÃO** na reunião do dia 20/02/2006, por estar de acordo com a Resolução nº 196/96 e suas complementares, do Conselho Nacional de Saúde / Ministério da Saúde do Brasil.

Belém, 20 de fevereiro de 2006

Dr. João Soares Felício

P/ COORDENADOR DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA / H.U.JBB/UFPA