



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

AKIM FELIPE SANTOS NOBRE

**DIVERSIDADE GENÉTICA DOS VÍRUS LINFOTRÓPICOS DE CÉLULAS T DO
TIPO 1 NA REGIÃO METROPOLITANA DE BELÉM.**

BELÉM

2015

AKIM FELIPE SANTOS NOBRE

**DIVERSIDADE GENÉTICA DOS VÍRUS LINFOTRÓPICOS DE CÉLULAS T DO
TIPO 1 NA REGIÃO METROPOLITANA DE BELÉM.**

Dissertação de mestrado apresentada à banca examinadora do Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, como requisito para a obtenção do título de mestre em Doenças Tropicais sob orientação da Profa. Dra. Rita Catarina Medeiros de Sousa e co-orientação da Profa. Dra. Máisa Silva de Sousa.

BELÉM

2015



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

AKIM FELIPE SANTOS NOBRE

**DIVERSIDADE GENÉTICA DOS VÍRUS LINFOTRÓPICOS DE CÉLULAS T DO
TIPO 1 NA REGIÃO METROPOLITANA DE BELÉM.**

Dissertação de Mestrado apresentada para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Aprovada em:

Conceito:

Banca Examinadora

Profa. Dra. Rita Catarina Medeiros Sousa
Orientadora – NMT/UFPA

Profa. Dra. Maísa Silva de Sousa
Co-orientadora – NMT/UFPA

Prof. Dr. Antônio Carlos do Rosário Vallinoto
Membro - ICB/UFPA

Prof. Dra. Luísa Carício Martins
Membro – NMT/UFPA

Prof. Dr. Felipe Bonfim Freitas
Membro – Instituto Evandro Chagas

AGRADECIMENTOS

Ao que habita e reina do Seu Santo Trono. Formoso em majestade e sublime em perfeição. Te agradeço Pai por tudo o que És e por tudo que tens feito por mim. Este trabalho é fruto de Tua misericórdia e à Ti o dedico. Permaneça conosco pois És o dono de toda a forma de Sabedoria que possa vir a existir. *Apeguemo-nos com firmeza à esperança que professamos, pois aquele que prometeu é fiel: Hebreus 10:23.*

Aos meu familiares e amigos que estiveram (e ainda estão) ao meu lado durante todo o período acadêmico, ora dando forças ou criticando de forma construtiva, me estimulando sempre a dar o melhor. Aos meus pais e irmãos que são minha motivação eterna, minha maior riqueza nesta terra: seus sorrisos são a minha recompensa. À minha querida namorada que sempre me apoiou (e continua apoiando) em tudo o que faço, sendo força fundamental no equilíbrio entre minha razão e emoção.

Aos meus grandes amigos do Instituto Evandro Chagas;

Aos meus grandes amigos do Núcleo de Medicina Tropical;

Às minhas orientadoras;

Aos meus amigos da AD Templo Central (meu apoio espiritual);

Aos amigos da *Team 1 Brazillian Jiu-Jitsu* (corpo são, mente sã. Oss !);

À todos que possam vir a ler este trabalho, o meu muito obrigado. Sintam-se incluídos nestas linhas;

Aos que puderam dar algum tipo contribuição à este projeto, muito obrigado ! Deus os abençoe. Não costumo citar nomes para não correr o risco de esquecer alguém. No entanto, TODOS, sintam-se agradecidos e abraçados por mim!

Um pouco de ciência nos afasta de Deus.
Muito, nos aproxima.

Louis Pasteur

RESUMO

O *Vírus Linfotrófico de células T Humano do tipo 1* (HTLV-1) é um *Deltaretrovírus* que foi isolado pela primeira vez a partir de uma amostra de sangue de um paciente afro-americano com linfoma cutâneo de células T, em meados de 1970; o linfoma foi posteriormente classificado como leucemia/linfoma de células T do adulto (LLcTA) doença severa que acomete os linfócitos T. Posteriormente, o vírus também foi associado à paraparesia espática tropical/mielopatia associada ao HTLV, (PET/MAH), de caráter crônico e progressivo que causa danos principalmente ao nível da medula espinhal torácica. Sua diversidade genética varia de acordo com a região estudada, e sua taxa de mutação é muito baixa (cerca de 1% a cada mil anos) se comparada a de outros vírus. O objetivo deste trabalho foi verificar a diversidade genética do HTLV-1 na região metropolitana de Belém, bem como a frequência dos seus genótipos e a comparação das amostras obtidas com as sequências disponíveis em bancos de dados como o GenBank. Foram utilizadas amostras de sangue coletadas de pacientes atendidos pelo NMT/UFPA entre o período de janeiro de 2010 à dezembro de 2013. Em seguida, tais amostras foram submetidas à extração do DNA e à amplificação da região PX do HTLV, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos, a partir da técnica de PCR em duas etapas: interna e externa (*Nested-PCR*). As amostras positivas, posteriormente, foram submetidas à digestão enzimática da enzima *TaqI*, para que pudéssemos identificar e diferenciar os HTLV 1 e 2. Em seguida, foi realizada a amplificação da região 5'LTR também por *Nested-PCR* das amostras positivas, que, posteriormente, foram submetidas ao sequenciamento genético. Utilizando o método de máxima verossimilhança, foi construída uma árvore filogenética para a visualização do agrupamento em clados das sequências em questão. Uma análise bayesiana (relógio molecular) para a visualização do perfil evolutivo das amostras também foi realizada. Os testes identificaram 78 amostras positivas para HTLV-1, destas, 44 foram sequenciadas. O genótipo aA foi frequente em 100% das amostras; os diferentes subtipos obtiveram a seguinte taxa de diversidade e mutações por sítio por ano: a- $2 \cdot 10^{-3}$; b- $2,69 \cdot 10^{-2}$; c- $6,23 \cdot 10^{-2}$; d- $3,08 \cdot 10^{-2}$; e- $6 \cdot 10^{-2}$; f- $1,78 \cdot 10^{-3}$; g- $2,2 \cdot 10^{-2}$ mutações por sítio por ano. Foi revelada então uma baixa diversidade genotípica e uma alta estabilidade genética entre as amostras positivas para HTLV-1 na região.

ABSTRACT

The human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is a DELTARETROVIRUS which was first isolated from a blood sample of a patient with african american cutaneous T-cell lymphoma, in the mid 1970s; Hodgkin was later classified as leukemia / lymphoma adult T-cell (LLcTA) severe disease that affects T lymphocytes Subsequently, the virus was also associated with tropical spastic paraparesis / HTLV-associated myelopathy (HAM / TSP), character chronic and progressive causing damage mainly at the thoracic spinal cord. Their genetic diversity varies according to the region studied, and its mutation rate is very low (about 1% per thousand years) compared to other viruses. The objective of this study was to assess the genetic diversity of HTLV-1 in the metropolitan area of Belém, as well as the frequency of genotypes and the comparison of samples obtained with the sequences available in databases such as GenBank. We used blood samples collected from patients enrolled in the NMT / UFPA between the period January 2010 to December 2013. Then these samples were subjected to DNA extraction and amplification of HTLV PX region, using oligonucleotides iniciadores specific, from the PCR in two steps: internal and external (nested PCR). Positive samples then were subjected to enzymatic digestion of TaqI enzyme so that we could identify and differentiate the HTLV 1 and 2. Next, we performed amplification of the 5' LTR region also by nested PCR positive samples, which, then were subjected to genetic sequencing. Using the method of maximum likelihood, we constructed a phylogenetic tree for the group display in clades of sequences in question. A Bayesian analysis (molecular clock) to visualize the evolutionary profile of the samples was also performed. The tests identified 78 samples positive for HTLV-1, of these, 44 were sequenced. The aa genotype was common in 100% of samples; the different subtypes had the following range rate and mutations per site per year: a- $2 \cdot 10^{-3}$; b- $2,69 \cdot 10^{-2}$; c- $6,23 \cdot 10^{-2}$; d- $3,08 \cdot 10^{-2}$; e- $6 \cdot 10^{-2}$; f- $1,78 \cdot 10^{-3}$; g- $2,2 \cdot 10^{-2}$ changes per site per year. It was then revealed a low genotypic diversity and a high genetic stability of the samples positive for HTLV-1 in the region.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Representação esquemática da estrutura e composição da partícula de HTLV
- Figura 2 Divisão esquemática da região LTR do HTLV
- Figura 3 Divisão da família *Retroviridae* em gêneros
- Figura 4 Ciclo replicativo do HTLV
- Figura 5 Distribuição mundial do HTLV-1 de acordo com o subtipo e subgrupo
- Figura 6 Origem e disseminação do HTLV-1 baseado em dados filogenéticos e antropológicos
- Figura 7 Prevalência do HTLV-1/2 (/1000 doadores) nos doadores de sangue de 26 capitais brasileiras e Distrito Federal
- Figura 8 Análise filogenética a partir do sequenciamento nucleotídico de 744 pb correspondentes à região 5'LTR do HTLV-1, pelo método de máxima verossimilhança, utilizando-se bootstrap de 10000 vezes
- Figura 9 Relógio molecular a partir do sequenciamento genético da região 5'LTR do HTLV-1, calculado por inferência bayesiana
- Figura 10 Pacientes assintomáticos e sintomáticos atendidos pelo ambulatório do NMT/UFPA entre 2010 e 2013
- Quadro 1 Condições de amplificação para a primeira etapa de PCR
- Quadro 2 Condições de amplificação para a 2ª etapa da PCR
- Quadro 3 Taxa de evolução genética do HTLV-1 por grupos

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLV	<i>Vírus da Leucima Bovina</i>
HIV	<i>Vírus da Imunodeficiência Humana</i>
HSRV	<i>Spumaretrovirus Humanos</i>
HTLV	<i>Vírus Linfotrópico de Células T de Humano</i>
HTLV-1	<i>Vírus Linfotrópico de Células T de Humano do tipo 1</i>
HTLV-2	<i>Vírus Linfotrópico de Células T de Humano do tipo 2</i>
HTLV-3	<i>Vírus Linfotrópico de Células T de Humano do tipo 3</i>
HTLV-4	<i>Vírus Linfotrópico de Células T de Humano do tipo 4</i>
IEC	Instituto Evandro Chagas
INF- γ	Interferon- γ
ITU	Infecção do Trato Urinário
LABMOL	Laboratório de Biologia Celular e Molecular
LLcTA	Leucemia/Linfoma de células T do Adulto
NMT	Núcleo de Medicina Tropical
PCR	Reação em Cadeia Mediada pela Polimerase
PET/MAH	Paraparesia Espática Tropical/Mielopatia
PTLV	<i>Vírus Linfotrópicos de Células T de Primatas</i>
SIV	<i>Vírus da Imunodeficiência em Símios</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
STLV	<i>Vírus Linfotrópico de Células T de Símios</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α
UFPA	Universidade Federal do Pará

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	HISTÓRICO DO HTLV	15
2.2	TAXONOMIA E CARACTERÍSTICAS MOLECULARES	15
2.3	FILOGENIA	17
2.4	CICLO REPLICATIVO	19
2.5	MECANISMOS DE TRANSMISSÃO	21
2.6	DOENÇAS ASSOCIADAS AO HTLV-1	21
2.6.1	Leucemia/Linfoma das Células T de Adultos (LLcTA)	21
2.6.2	Paraparesia Espática Tropical/Mielopatia associada ao HTLV-1 (PET/MAH)	22
2.6.3	Uveíte associada ao HTLV	23
2.6.4	Outras doenças associadas	23
2.7	EPIDEMIOLOGIA	23
2.8	EVOLUÇÃO VIRAL	27
3	JUSTIFICATIVA	29
4	OBJETIVOS	30
4.1	OBJETIVO GERAL	30
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
5	MATERIAIS E MÉTODOS	31
5.1	TIPO DE ESTUDO	31
5.2	POPULAÇÃO DE ESTUDO	32
5.2.1	Critérios de Inclusão	31
5.2.2	População de Estudo	31
5.3	ASPECTOS ÉTICOS	31

5.4	DETECÇÃO VIRAL E SEQUENCIAMENTO GENÉTICO	31
5.4.1	Coleta do material biológico	32
5.4.2	Extração do DNA proviral	32
5.4.3	Amplificação da B globina humana (controle interno da reação)	32
5.4.4	Amplificação e Genotipagem do HTLV	32
5.4.5	Digestão enzimática para caracterização do tipo de HTLV	33
5.4.6	Amplificação da região 5'LTR do HTLV-1	34
5.4.7	Purificação do produto de PCR	35
5.4.8	PCR pré-sequenciamento	35
5.4.9	Eletroforese do DNA sequenciado	36
5.4.10	Análise das sequencias e construção da árvore filogenética	36
5.4.11	Cálculo e estimativa da taxa de diversidade genética do HTLV-1	37
6	RESULTADOS	38
7	DISCUSSÃO	41
8	CONCLUSÕES	46
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
	ANEXO I	56
	ANEXO II	57

1- INTRODUÇÃO

O *Vírus Linfotrópico de células T Humano do tipo 1* (HTLV-1) é um *Deltaretrovírus* que foi isolado pela primeira vez a partir de uma amostra de sangue de um paciente afro-americano com linfoma cutâneo de células T, em meados de 1970; o linfoma foi posteriormente classificado como leucemia/linfoma de células T do adulto (LLcTA) doença severa que acomete os linfócitos T (POIESZ *et. al.*, 1980). Mais tarde, o vírus também foi associado à paraparesia espática tropical/mielopatia associada ao HTLV, (PET/MAH), de caráter crônico e progressivo que causa danos principalmente ao nível da medula espinhal torácica (TSUKASAKI & TOBINAI, 2013).

Estima-se que 15 a 20 milhões de pessoas ao redor do mundo estejam infectadas pelo HTLV-1 (COOK *et. al.*, 2013). O vírus é endêmico no sul do Japão, Bacia do Caribe, África Central, América Central e do Sul, Ilhas da Melanésia na Bacia do Pacífico e na população aborígine da Austrália. A soroprevalência do HTLV-1 varia entre 1 a 30 % na população de áreas endêmicas. A infecção esporádica por HTLV-1 ocorre entre os grupos de risco em áreas não endêmicas, incluindo regiões metropolitanas nos Estados Unidos e em países da Europa Ocidental (GESSAIN & CASSAR, 2012).

No Brasil, o HTLV-1 foi detectado pela primeira vez em imigrantes japoneses na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, em 1986 (MIURA *et. al.*, 1984) e a maioria dos dados epidemiológicos sobre essa infecção no Brasil refere-se à prevalência em populações específicas. Em doadores de sangue, observa-se um gradiente de indivíduos infectados com taxas mais elevadas nas regiões norte/nordeste e as mais baixas na região sul (DOS SANTOS *et. al.*, 2009).

O único estudo de base populacional no Brasil foi realizado em Salvador, Bahia, e demonstrou 1,8% de prevalência na população geral, sendo que 2% em mulheres e 1,2% em homens, mas, aumentando em indivíduos com mais de 50 anos para 9 e 6,3% nos sexos masculino e feminino, respectivamente (DOURADO *et. al.*, 2003).

Doenças associadas à infecção pelo HTLV-1 têm sido descritas em diferentes estados do Brasil (CASSEB *et. al.*, 2012; GALVÃO-CASTRO *et. al.*, 2009). Na Bahia, têm sido descritos casos de PET/MAH, sarna crostosa e estrongiloidíase em portadores de HTLV-1; e os pacientes infectados por este vírus também apresentam uma maior prevalência de tuberculose. Assim como em outros países, esta infecção atinge com maior frequência

indivíduos menos favorecidos socialmente, particularmente as mulheres, com baixo grau de escolaridade (GALVÃO-CASTRO *et. al.*, 2009).

O HTLV-1 é um vírus de replicação lenta e alguns estudos já estão sendo realizados no desenvolvimento de uma vacina (SUNDARAM *et. al.*, 2003). Raros trabalhos abordaram esta temática na região amazônica, reforçando a necessidade de estudos mais abrangentes e representativos da população infectada para subsidiar pesquisas com possíveis vacinas e antivirais contra o HTLV-1. O conhecimento da diversidade genética viral, aliado às técnicas utilizadas em biotecnologia têm contribuído para produção de vacinas e novos fármacos (CORTESE *et. al.*, 2013).

Neste contexto, visto que o vírus está associado a doenças altamente debilitantes e é endêmico na Amazônia, torna-se importante investigar sua epidemiologia e variabilidade genética na região metropolitana de Belém, a maior concentração populacional da Região norte do Brasil (ISHAK *et. al.*, 2003; VALLINOTO *et. al.*, 2006; CASSEB *et. al.*, 2012; TSUKASAKI & TOBINAI, 2013).

2-REFERENCIAL TEÓRICO

2.1-HISTÓRICO DO HTLV

O HTLV é um *deltaretrovírus* que foi isolado pela primeira vez a partir da amostra de sangue de um paciente afro-americano com linfoma cutâneo de células T; o linfoma foi posteriormente classificado como leucemia/linfoma de células T do adulto (LLcTA) doença severa que ataca os linfócitos T. Quatro linhagens distintas de HTLV têm sido identificadas desde a descoberta do tipo 1, em meados dos anos 1980. No entanto, apenas o HTLV-1 tem sido associado a casos de doenças em seres humanos (POIESZ *et. al.*, 1980; FIELDS VIROLOGY, 2007).

Em 1986 a infecção pelo HTLV-1 foi associada a uma mielopatia progressiva, denominada de paraparesia espática tropical (PET) na Martinica Francesa, e também a uma doença neurológica em pacientes japoneses, que foi posteriormente denominada de mielopatia associada ao HTLV-1 (MAH). Ambas foram posteriormente classificadas como a mesma patologia, sendo chamada de PET/MAH (OSAME *et. al.*, 1986). A infecção pelo HTLV-1 também tem sido associada a uma série de doenças crônicas, incluindo a dermatite infecciosa, uveíte e artropatia (COOK *et. al.*, 2013).

O *Vírus Linfotrópico de células T Humano* do tipo 2 (HTLV-2) foi descoberto em 1982, quando foi isolado de um paciente com leucemia de células pilosas (KALYANARAMAN *et. al.*, 1982). No Brasil, este vírus tem sido encontrado em populações indígenas da Amazônia, usuários de drogas injetáveis das grandes áreas urbanas e doadores de sangue (ALCANTARA *et. al.*, 2003). O HTLV-2 é geneticamente (possui 70% de similaridade) e imunologicamente relacionado ao HTLV-1 e, embora tenha sido originalmente isolado a partir de um paciente com uma forma pouco comum de LLcTA, o seu papel nas doenças ainda não foi bem definido (FIELDS VIROLOGY, 2007).

Por último, Wolfe e colaboradores identificaram o HTLV-3 e o HTLV-4 na população da África Central (WOLFE *et. al.*, 2005); entretanto, a biologia destes vírus e sua associação com doenças ainda permanece desconhecida (CALATTINI *et. al.*, 2005).

2.2-TAXONOMIA E CARACTERÍSTICAS MOLECULARES

Os HTLV-1 e HTLV-2 pertencem à família *Retroviridae*. Segundo características relacionadas à sua patogenicidade, são classificados como pertencentes à subfamília

Orthoretrovirinae, distinta da subfamília *Lentivirinae*, a qual inclui o *Vírus da Imunodeficiência Humana* (HIV). Empregando-se, no entanto, como padrão taxonômico a análise filogenética para avaliar a similaridade genotípica de diferentes isolados virais, pode-se constatar que a família *Retroviridae* apresenta sete agrupamentos maiores, hoje reconhecidos como gêneros distintos. Destes, três gêneros devem ser destacados, por incluírem retrovírus associados com patologia humana: *deltaretrovirus*, que contém HTLV-1 e HTLV-2, ao lado do *Vírus da Leucemia Bovina* (VLB); os *lentivírus*, dos quais fazem parte o HIV e o *Vírus da Imunodeficiência em Símios* (SIV) e, por fim, os *spumavirus*, incluindo os *Spumaretrovirus Humanos* (HSRV) (VERDONCK *et. al.*, 2007).

O HTLV possui formato esférico, com aproximadamente 100 nm de diâmetro, com um core esférico central, envolto por um envelope lipoproteico, que é sintetizado durante o processo de brotamento através da membrana celular da célula hospedeira. O vírus possui um genoma composto por duas fitas simples de RNA (ácido ribonucléico) com polaridade positiva. O envelope é composto por proteínas transmembrana e de superfície, que se projetam através da estrutura viral. A proteína transmembrana serve como fixador para a proteína de superfície. Um capsídeo com formato icosaédrico, composto pelas proteínas p15, p19 e p24, envolve o material genético e as proteínas enzimáticas importantes no ciclo celular do vírus: a protease viral, a transcriptase reversa e a integrase, como mostra a figura 1:

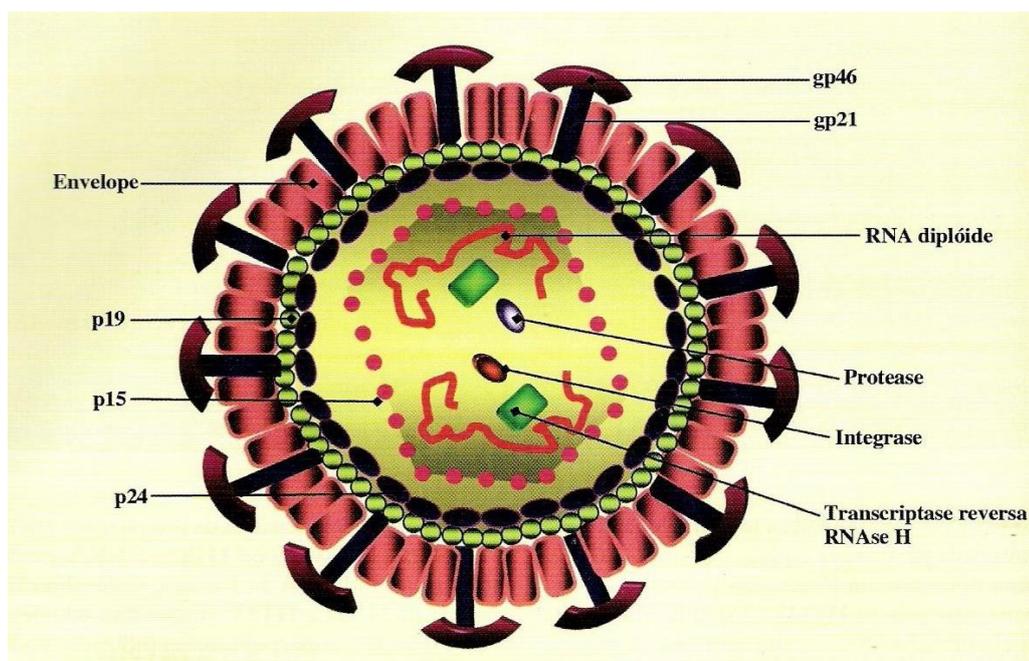


Figura 1 – Representação esquemática da estrutura e composição da partícula de HTLV.

Fonte: adaptada de ROMANOS *et al.*, 2008.

O DNA viral integrado contém duas regiões LTR (Terminal de Repetição Longo) em cada extremidade do genoma. A região 5'LTR consiste em um promotor de genes virais de cadeias maiores, enquanto a 3'LTR em um promotor de genes virais de cadeia menores. Semelhante a outros retrovírus, o HTLV-1, codifica genes virais estruturais, incluindo *gag*, *pol* e *env* (Figura 2). Além disso, existe a codificação da região pX e outros genes reguladores e acessórios, tais como: *rex*, *p30*, *p12*, *HBZ*. Estes genes reguladores controlam a expressão gênica proviral e a proliferação das células infectadas (EDWARDS *et al.*, 2011). A região situada imediatamente antes da região LTR 3', denominada pX, contém 4 *Orfs* (Open Reading Frames). A *orf-I* do gene pX codifica a proteína p12 (KORALNIK *et al*, 1992; KORALNIK *et al*, 1993; FUKUMOTO *et al*, 2009). As proteínas p13 e p30 são codificadas pelo *orf-II* do gene pX (KORALNIK *et al*, 1992; CIMINALE *et al*, 1992) e as proteínas *Tax* (p40) e *Rex* (p27) responsáveis pela regulação da replicação viral, são codificadas pelas *Orfs* IV e III, respectivamente (Figura 2).

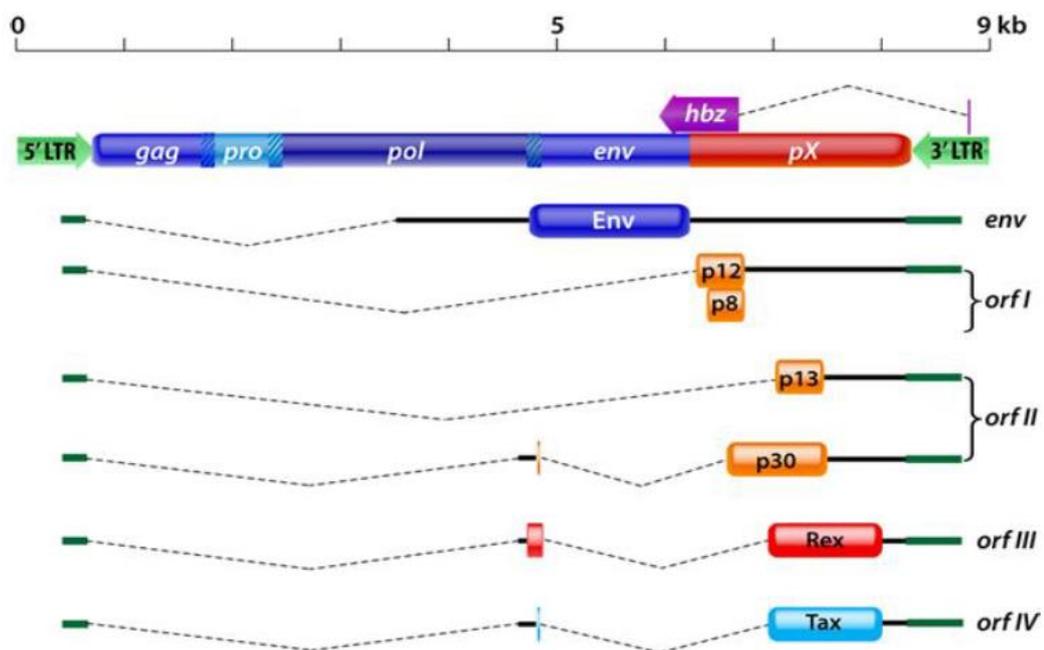


Figura 2: Divisão esquemática da região LTR do HTLV. **Fonte:** Edwards *et al.* 2011

2.3-FILOGENIA

Pouco depois da descoberta do HTLV-1, algumas espécies de primatas não humanos foram encontradas contendo um vírus geneticamente relacionado a este patógeno (HOMMA *et al.*, 1984). A descoberta de vírus divergentes em habitantes da Melanésia e da Austrália na

década de 1990 (SHERMAN *et. al.*, 1992), impulsionou o surgimento de mais pesquisas sobre a diversidade genética do HTLV.

O *Vírus Linfotrófico de Células T de Símios* (STLV) é o correspondente não humano do HTLV. Como os aspectos moleculares e biológicos do HTLV e do STLV são muito similares, ambos são convenientemente catalogados no grupo do *Vírus Linfotróficos de Células T de Primatas* (PTLV). Os correspondentes não humanos do HTLV-1 e HTLV-2 são, respectivamente, o STLV-1 e o STLV-2 (SLATTERY *et. al.*, 1999; MANDELL *et. al.*, 2004).

Análises filogenéticas demonstram uma forte relação entre o HTLV-3 e o STLV-3, sendo este seu correspondente primata não humano (CALATINNI *et. al.*, 2005). O HTLV-4, porém, é um membro de uma linhagem filogenética distinta de todos os outros HTLVs e STLVs previamente conhecidos. Enquanto uma possível origem símia pode ser relacionada ao HTLV-3, a origem do HTLV-4 não é clara, pois o mesmo não tem um correspondente primata conhecido (WOLFE *et. al.*, 2005).

Os HTLVs do tipo 1 ao 4 são retrovírus do tipo C (retrovírus com envelope, presença de espículas e um *core* central), classificados juntamente com o seu correspondente primata não humano, o STLV 1-3 e com o VLB, como pertencente à família *Retroviridae*, dentro do gênero *Deltaretrovirus*. Baseada na organização genômica e na filogenia, a família *Retroviridae* é dividida em sete gêneros: *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus*, *Lentivirus* e *Spumavirus* (Figura 3) (VAN DOOREN *et. al.*, 2005).

As propriedades oncogênicas e a estrutura molecular dos PTLVs os distinguem dos Retrovírus HIV-1 e HIV-2, que são membros do gênero *Lentivirus*. Os *Deltaretrovírus* e os *Lentivírus* são capazes de causar infecção assintomática prolongada. No entanto, enquanto o vírus HIV tem efeito citopático sobre as células T humanas, o HTLV pode transformar estas células, resultando em linhagens celulares imortalizadas (MANDELL *et. al.*, 2004).

Baseada nas análises filogenéticas das regiões LTR e env de cepas provenientes de todas as regiões geográficas do mundo, o HTLV-1 foi classificado em sete subtipos: 1) a ou Cosmopolita disseminado por tudo o mundo (MIURA *et. al.*, 1994). 2) b ou subtipo Centro-africano de isolados provenientes de populações da África Central (VANDAMME *et. al.*, 1994). 3) c, ou subtipo da Melanésia caracterizado a partir de isolados provenientes de indivíduos de Papua Nova Guiné e de aborígenes australianos (GESSAIN *et. al.*, 1992). 4) d, isolados de

pigmeus da Republica Central Africana e de dois pacientes de Camarões e Gabão (MAHIEUX *et. al.*, 1997); e os subtipos: e, e f isolados respectivamente de um pigmeu Efe Mbuti do Congo e de um indivíduo do Gabão (SALEMI *et. al.*, 1998) e 6) g, proveniente da República Central Africana (WOLFE *et. al.*, 2005). O subtipo Cosmopolita é dividido em cinco subgrupos: 1) A ou Transcontinental; 2) B ou Japonês; 3) C ou Norte - africano; 4) D ou Oeste-africano (VIDAL *et. al.*, 1994) e 5) E isolado proveniente de negros do Peru (VAN DOOREN *et. al.*, 1998).

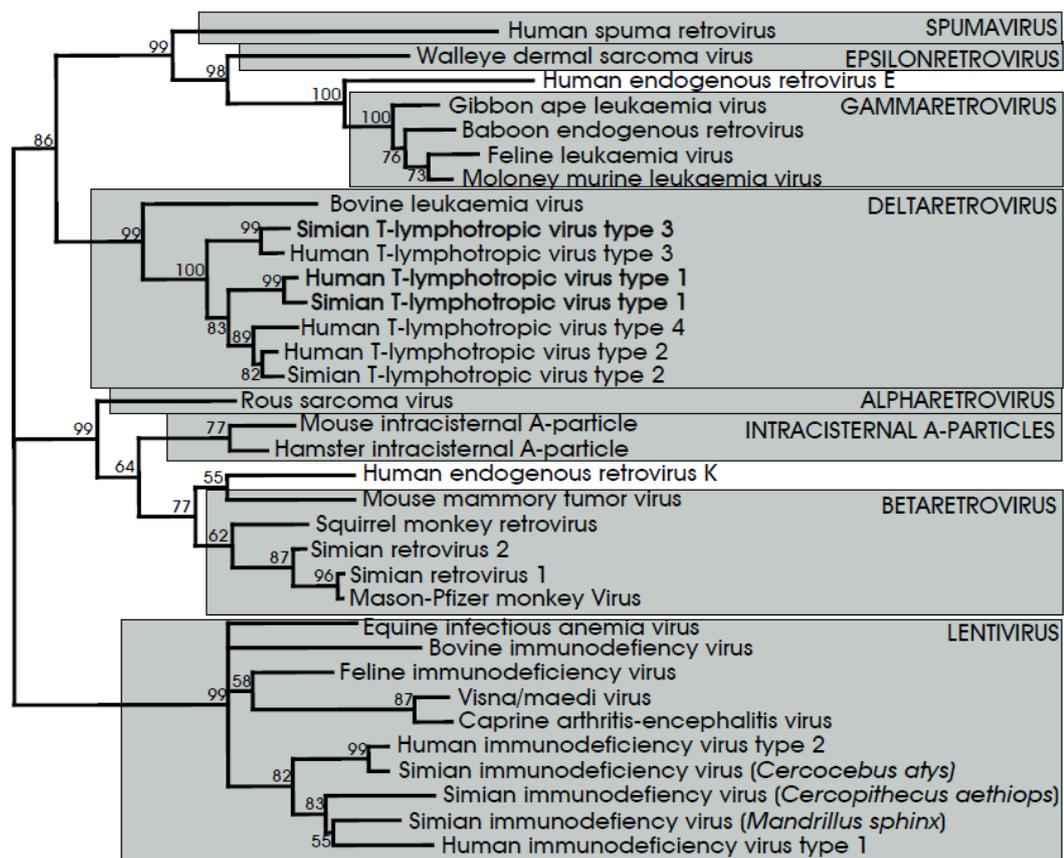


Figura 3: Divisão da família *Retroviridae* em gêneros. **Fonte:** FIELDS VIROLOGY, 2007.

2.4- CICLO REPLICATIVO

A infecção pelo HTLV tem início a partir da invasão de células-alvo, linfócitos TCD4+, por partículas virais. Isso ocorre devido à transmissão viral célula a célula a partir de outras células já infectadas, uma vez que nessa retrovirose, habitualmente, não são

encontradas partículas do vírus em circulação nos fluidos biológicos dos indivíduos infectados. Após a entrada do vírus no ambiente celular, observa-se a liberação de seu material genético no citoplasma do linfócito infectado. Esse material genético, composto de RNA, sofre ação da enzima transcriptase reversa, e passa então a assumir características de uma molécula de DNA (FIELDS VIROLOGY, 2007; GESSAIN & CASSAR, 2012).

Após migrar até o núcleo, este DNA incorpora-se ao genoma da célula hospedeira, através da ação da enzima integrase. O genoma viral integrado agora passa a ser denominado genoma proviral, e será passível de replicação e transcrição no momento da divisão celular. A transcrição viral produz inicialmente moléculas de RNA mensageiro, capazes de codificar a síntese de proteínas reguladoras do processo de replicação viral (TSUKASAKI & TOBINAI, 2013).

Mais tardiamente, no entanto, após acúmulo de Rex, esta proteína passa a exercer atividade reguladora pós-transcricional, provocando a formação de RNA mensageiro genômico, capaz de codificar as proteínas estruturais da matriz, do core e do envelope, e conseqüentemente, favorecer a formação de novas partículas virais. Estas emergem da superfície celular por brotamento, carregando consigo parte da membrana celular bilipídica como constituinte de seu envelope, como mostra a figura 4 (FIELDS VIROLOGY, 2007; TSUKASAKI & TOBINAI, 2013).

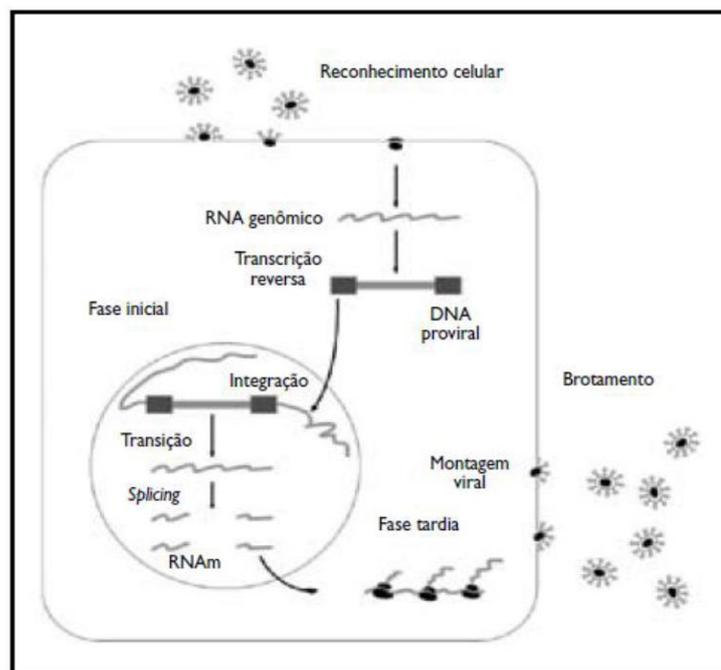


Figura 4: Ciclo replicativo do HTLV. **Fonte:** SANTOS & LIMA, 2005.

2.5- MECANISMOS DE TRANSMISSÃO

O HTLV-1 pode ser transmitido por três vias: a) sexual, com maior eficiência de transmissão de homem para mulher. Estima-se que esta eficiência seja de cerca de 60%, sendo de 4% no sentido inverso; b) sangüínea, através de transfusão de sangue ou pelo uso de agulhas e/ou seringas contaminadas e c) perinatal, da mãe para o filho, principalmente pelo aleitamento materno. Para que ocorra a transmissão há a necessidade da presença de células infectadas (GALVÃO-CASTRO *et. al.*, 2009).

A transmissão materno-infantil pode ser intrauterina (comunicação transplacentária), perinatal (contato direto com o sangue), e, principalmente, pela amamentação. O aleitamento materno é responsável por uma prevalência de até 25% de transmissão da infecção em crianças nascidas de mães soropositivas (NAKANO *et. al.*, 1984; GESSAIN & CASSAR, 2012).

No entanto, a transmissão do HTLV pela transfusão de sangue parece ser o meio mais eficaz. Pode acontecer com a transfusão de produtos celulares do sangue (sangue total, células vermelhas e plaquetas), mas não com a fração de plasma ou derivados (COOK *et. al.*, 2013; TSUKASAKI & TOBINAI, 2013).

2.6-DOENÇAS ASSOCIADAS À INFECÇÃO PELO HTLV-1

O HTLV-1 está associado à casos de LLcTA, bem como à uma forma de doença neurológica progressiva, conhecida como Mielopatia Associada ao HTLV-1, também denominada Paraparesia Espástica Tropical (PET/MAH). Outras manifestações clínicas também têm sido relacionadas à infecção pelo HTLV-1: Uveíte, dermatite, disfunção erétil, anormalidades no funcionamento da bexiga, periodontite (MANDELL *et. al.*, 2004; RODPOTHONG *et. al.*, 2012).

2.6.1-Leucemia-Linfoma de Células T do Adulto (LLcTA)

A LLcTA é uma patologia bastante agressiva. As células T infectadas nesta patologia são as maduras. Todos os subtipos têm uma integração monoclonal do DNA proviral do HTLV-1 no genoma celular, indicando que as células T malignas são monoclonais e originárias de uma única linhagem de células T infectadas pelo vírus (TAKATSUKI *et. al.*, 1985). Baseado nos achados clínicos e na morfologia celular, a LLcTA é classificada em

quatro subtipos clínicos: LLcTA latente, LLcTA crônica, LLcTA linfoma e LLcTA aguda (BANGHAM *et. al.*, 2013).

A LLcTA latente pode perdurar por anos. Já a LLcTA aguda é a mais agressiva, com menor tempo de sobrevida (SHIMOYAMA *et. al.*, 1991). O risco de desenvolvimento de LLcTA, ao longo do tempo, nos portadores do HTLV-1 é estimado em 1 a 4% (TAJIMA *et. al.*, 1985) e o período de latência, entre a infecção atual e o desenvolvimento da doença é estimado em 30 a 50 anos (MURPHY *et. al.*, 1989).

Alguns estudos mais recentes apontam evidências de que a doença possa ocorrer por volta de, em média, 30 anos após a infecção e que a idade de início das manifestações varia de acordo com a região geográfica estudada, ocorrendo mais cedo em indivíduos infectados das Américas Central e do Sul, quando comparados com aqueles do Japão. Outro dado apontado pelos investigadores é que os homens infectados têm um risco de 4 a 5 vezes maior de desenvolver a doença do que as mulheres com a infecção (IWANAGA *et. al.*, 2012).

2.6.2-Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia (PET/MAH) associada ao HTLV-1

A PET/MAH é definida como uma mielopatia lentamente progressiva, com a presença de anticorpos contra HTLV-1 no soro e no líquido cérebro-espinhal. Trata-se de uma doença desmielinizante crônica e progressiva, que afeta o cordão espinhal e a substância branca do sistema nervoso central (SNC). Fatores imunológicos são considerados importantes na patogênese da doença. O vírus ativa os linfócitos T, que espontaneamente passam a produzir citocinas. Indivíduos com PET/MAH produzem altos níveis de interferon- γ (INF- γ) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (SOUZA *et. al.*, 2012). A alta prevalência da doença em áreas endêmicas para o HTLV-1, o achado de anticorpos anti HTLV-1 no soro e fluido cérebro-espinhal da maioria dos casos, a síntese de IgG HTLV-1-específico e o isolamento do vírus no fluido cérebro-espinhal, são evidências que apoiam o HTLV-1 como agente etiológico da patologia (KAPLAN *et. al.*, 1990).

Os sintomas iniciais da doença incluem fraqueza e espasticidade dos membros inferiores, comumente associados à parestesia, sensação de peso dos membros e dor lombar. A fraqueza dos membros é usualmente simétrica e lentamente progressiva. Alguns pacientes também podem apresentar fraqueza nos membros superiores. Urgência miccional, incontinência urinária, distúrbios intestinais e impotência em homens também são comuns. Em muitos indivíduos, problemas urinários e sexuais são os primeiros sintomas da doença e

desordens no esvaziamento da bexiga podem levar a infecção do trato urinário (ITU) por várias vezes. Porém, muitos sintomas urinários referidos pelos pacientes, que podem sugerir ITU, correspondem, na verdade, ao quadro da bexiga neurogênica (HÖLLSBERG *et. al.*, 1993).

2.6.3-Uveíte associada ao HTLV

A Uveíte é uma doença inflamatória que pode comprometer totalmente a úvea ou uma de suas partes (íris, corpo ciliar e coróide). Em alguns casos, a inflamação atinge também o nervo óptico e a retina. Em 1992, Mochizuki e colaboradores, no sudoeste do Japão, encontraram uma elevada prevalência de HTLV-1 em pacientes portadores de uveíte, até então idiopática (35,4 – 44,8%) (MOCHIZUKI *et. al.*, 1992).

Em um estudo para identificar a prevalência de lesões oculares em portadores do HTLV-1 na cidade de Salvador, Rathsem-Pinheiro e colaboradores estudaram 140 portadores do vírus. Noventa deles eram assintomáticos e 50 eram portadores de PET/MAH. Dos 140 pacientes, 2,8% tinham uveíte e 36% tinham ceratoconjuntivite seca; nestes últimos, a prevalência foi significativamente mais elevada nos pacientes com PET/MAH (RATHSAM-PINHEIRO *et. al.*, 2009).

2.6.4-Outras doenças associadas

Além das patologias já citadas, uma variedade de condições reumatológicas tem sido descrita, nas quais o genoma viral e/ou proteínas virais são detectadas nos tecidos alvo. Exemplos destas condições são: polimiosite, pneumonite bronquioalveolar, tireoidite auto-imune e artrite. Entretanto, a associação do HTLV-1 com estas patologias reumatológicas ainda necessita de maiores evidências epidemiológicas (IWANAGA *et. al.*, 2012; COOK *et. al.*, 2013).

2.7-EPIDEMIOLOGIA

Os HTLV-1 e 2 infectam populações humanas há milhares de anos, possuindo uma distribuição mundial. No entanto, a maioria dos estudos relacionados à prevalência deste vírus se baseia em grupos populacionais distintos, como gestantes, doadores de sangue, pacientes hematológicos e usuários de drogas injetáveis, o que não representa uma amostra significativa da população geral (GESSAIN & CASSAR, 2012).

Apesar disso, estima-se que a infecção pelo HTLV-1 representa uma epidemia global. As prevalências variam de acordo com a área geográfica estudada, com a composição sociodemográfica da população e com os comportamentos de risco individuais. Estes fatores determinam uma variação espacial das taxas de prevalência dentro de cada área específica. A figura 5 mostra a distribuição mundial do HTLV-1 de acordo com o subtipo e subgrupo (GESSAIN & CASSAR, 2012).



Figura 5: Distribuição mundial do HTLV-1 de acordo com o subtipo e subgrupo. **Fonte:** Araújo *et. al.*, 2012.

As principais áreas endêmicas da infecção compreendem África, América do Sul e Central, Caribe, Japão, Melanésia e Oriente Médio. Na América do Sul e Central se destacam Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Colômbia, Honduras, Panamá, Peru e Venezuela. A província equatorial do Congo apresenta a prevalência mais elevada desta infecção na África. Foram detectadas infecções em tribos de pigmeus que vivem isoladas em áreas remotas da República Centro-Africana, Camarões e nordeste do Congo. Baseado na existência destas infecções na África Equatorial e em descendentes de africanos no Caribe e na América Latina sugere-se que a África seria a fonte primária deste vírus (GALVÃO-CASTRO *et. al.*, 2009).

O sudoeste do Japão tem uma prevalência elevada da infecção, com regiões onde a mesma atinge até 37% da população adulta (YAMAGUCHI *et. al.*, 1994). No oeste da África, uma prevalência de 1,5% foi encontrada na República do Benim, sendo maior entre as mulheres, comparado aos homens (2% contra 1%). A maior prevalência foi detectada na região nordeste do país, na província de Atakora (5,4%) (MURPHY *et. al.*, 2009). Na República do Gana, também no oeste africano, uma prevalência de 0,5% foi encontrada em doadores voluntários de sangue (DUMAS *et. al.*, 1991).

Nas ilhas da Melanésia também tem sido descrita uma prevalência elevada do vírus. Em uma região rural da Papua-Nova Guiné, a prevalência encontrada da infecção foi de 26% da população estudada (KAZURA *et. al.*, 1987; GESSAIN & CASSAR, 2012).

Na América do Norte e na Europa, principalmente na Europa Ocidental, a infecção pelo HTLV-1 é pouco prevalente. É encontrada principalmente entre imigrantes de áreas endêmicas, seus descendentes (e respectivos contatos sexuais), em profissionais do sexo e usuários de drogas injetáveis. Em doadores de sangue nos EUA, a prevalência de soropositivos é de 0,01% a 0,03%. Na Espanha, estudo recente mostrou uma prevalência de 0,06% em pacientes ambulatoriais atendidos em 16 hospitais. Destes, a maioria era composta por imigrantes Latino-Americanos (TREVINO *et. al.*, 2012).

Existem duas hipóteses propostas para explicar a origem deste retrovírus no continente americano. Uma delas sugere que a migração pré-histórica de população infectada pelo Estreito de Bering, trouxe o vírus do nordeste da Ásia para o continente. A outra sugere que os africanos e japoneses introduziram o vírus no continente com a vinda de negros escravos e posteriormente de imigrantes japoneses (VERDONCK *et. al.*, 2007) (Figura 6).

O HTLV-1 foi detectado pela primeira vez no Brasil, em imigrantes japoneses na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul em 1986 (MIURA *et. al.*, 1994). Posteriormente foi constatado em outros grupos populacionais (FERREIRA JÚNIOR *et. al.*, 1995). A maioria dos dados epidemiológicos da infecção no Brasil refere-se à prevalência em populações específicas. Em doadores de sangue observa-se um gradiente de indivíduos infectados, com taxas mais elevadas nas regiões norte/nordeste e as mais baixas na região sul (GALVÃO-CASTRO *et. al.*, 1997). Salvador e São Luiz são as cidades que apresentam as maiores prevalências em doadores de sangue no território nacional (GALLO *et. al.*, 1983).

Tem-se observado uma diminuição da prevalência em doadores de sangue no Brasil (GALVÃO-CASTRO *et. al.*, 2009).

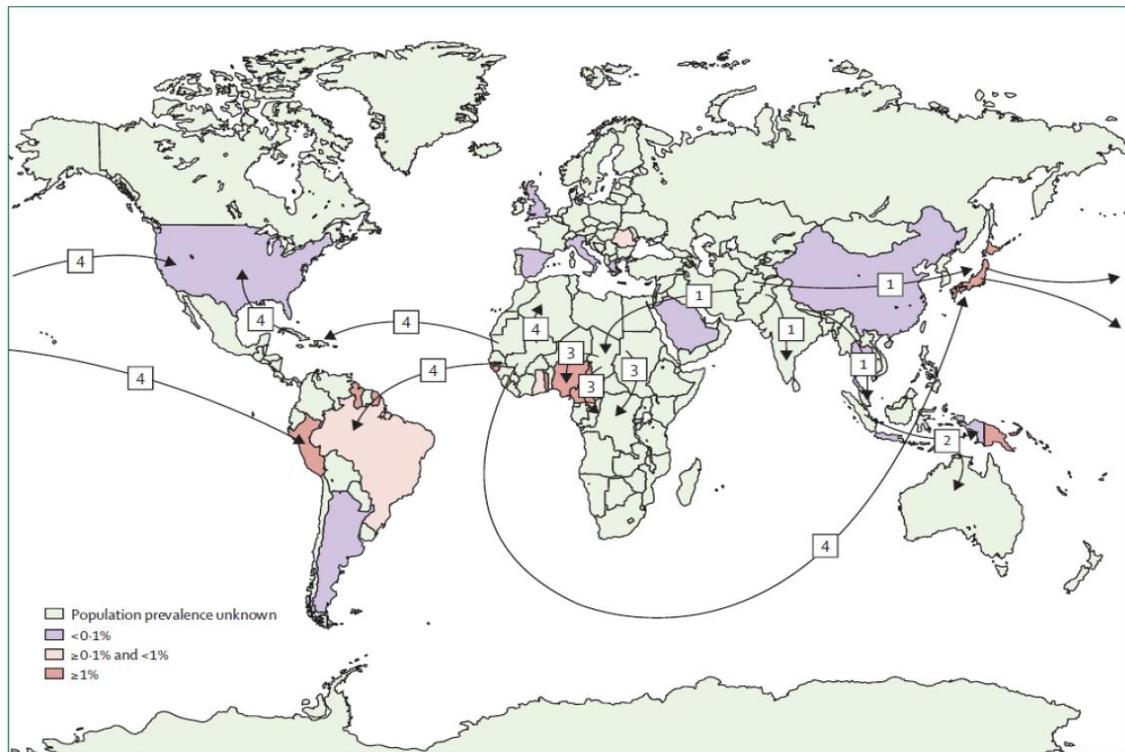


Figura 6: Origem e disseminação do HTLV-1 baseado em dados filogenéticos e antropológicos. **Fonte:** VERDONCK *et. al.*, 2007.

Não existe ainda um estudo epidemiológico, com metodologia adequada, que tenha determinado a prevalência na população geral do Brasil. No entanto, baseados nos dados de prevalência em doadores de sangue estima-se que no Brasil existam 2,5 milhões de portadores de HTLV-I (MUELLER *et. al.*, 1991). O único estudo de base populacional no Brasil foi realizado em Salvador, Bahia, e demonstrou 1,8% de prevalência na população geral, sendo que 2% em mulheres e 1,2% em homens, mas, aumentando em indivíduos com mais de 50 anos para 9% e 6,3% nos sexos masculino e feminino respectivamente (DOURADO *et. al.*, 2003).

Entre 1995 e 2000 foi realizado outro levantamento sorológico para o HTLV-1/2 entre os doadores de sangue, agora em 26 capitais brasileiras e no Distrito Federal. Os resultados mostraram uma grande heterogeneidade entre as capitais, com prevalências variando de 0,4/1000 em Florianópolis, localizada na região sul do país, até 10,0/1000 em São Luís, na região nordeste (Figura 7) (CATALAN- SOARES *et. al.*, 2005).

A cidade de Salvador tem uma das maiores prevalências de HTLV-1 do país, variando de 1,35% a 1,80% de acordo com diversos estudos. Em um estudo populacional, Dourado e colaboradores encontraram uma prevalência de 1,70%, estimando que 40.000 pessoas possam estar infectadas pelo vírus (DOURADO *et. al.*, 2003).

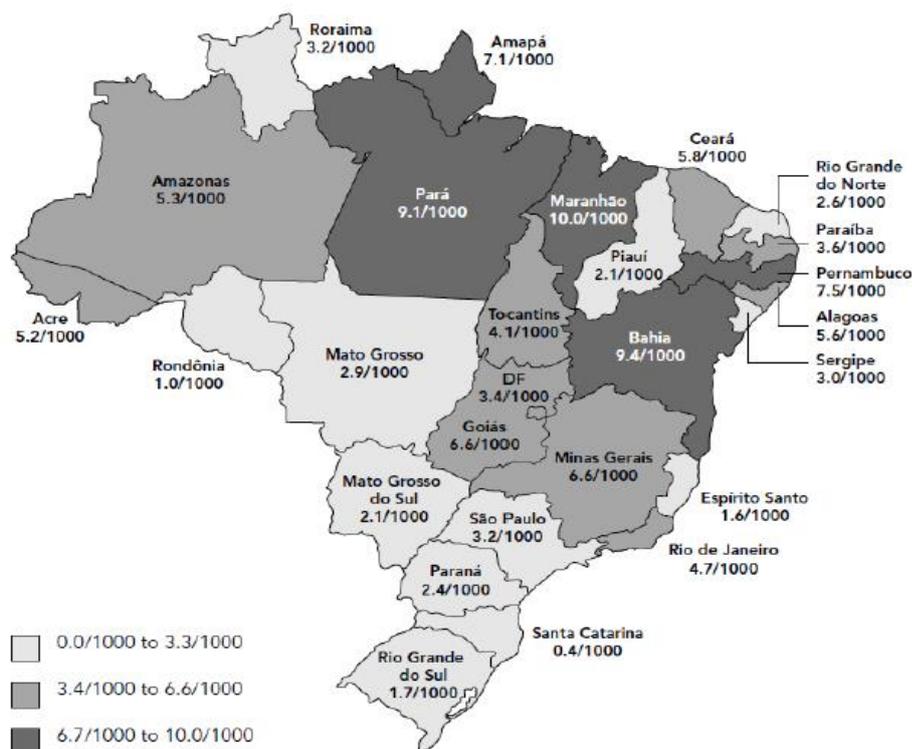


Figura 7: Prevalência do HTLV-1/2 (/1000 doadores) nos doadores de sangue de 26 capitais brasileiras e Distrito Federal. **Fonte:** CATALAN-SOARES *et. al.*, 2005.

Em outro estudo feito com população de usuários de drogas injetáveis em Salvador detectaram-se prevalências de 25,5% e 8,8% para HTLV-1 e HTLV-2 respectivamente. As prevalências de co-infecções foram para HTLV-1/HIV-1; HTLV-2/HIV-1 e HTLV-1/HTLV-2/HIV-1 de 21,6%; 10,6% e 0,9% respectivamente. Observou-se, dois anos depois, uma redução das prevalências de infecções pelo HIV-1 e HTLV-1/2 de 49,5% e 35,2% em 1998 para 7,1% e 5,0% em 2000 (GALVÃO-CASTRO *et. al.*, 2009).

2.8-EVOLUÇÃO VIRAL

Os vírus são transmitidos entre seus hospedeiros com diversos graus de eficiência. Com o objetivo de infectar a célula de forma mais eficiente, o vírus precisa lançar mão de várias partículas infecciosas (vírions), o que pode deixá-lo vulnerável a resposta imune do hospedeiro. Uma resposta imune eficiente, por sua vez, propicia uma forte pressão seletiva, que leva o vírus a criar mecanismos de escape, como as mutações genéticas (RODPOTHONG *et. al.* 2012).

A estabilidade genética do HTLV-1 foi indicada por várias estimativas para a taxa de evolução do vírus. A investigação de infecções intrafamiliares por HTLV-1 demonstrou a presença de infecção por HTLV-1 sequências quase idênticas em vários membros da família da amostra ao longo de várias gerações (NERURKAR *et. al.* 1993; LIU *et. al.* 1994)

De um modo mais preciso, a taxa de evolução de infecção por HTLV-1, medida pelo número de substituições de nucleótidos por sítio por ano, tem sido estimada por análise filogenética usando métodos diferentes. A abordagem convencional, implica na divisão da diferença de comprimentos dos ramos de uma árvore filogenética pela diferença no tempo de isolamento (CALATTINI *et. al.*, 2005).

Todos os cálculos que tem por finalidade estimar a taxa evolutiva do HTLV-1 são baseados na divergência entre sequências genéticas obtidas ao longo da história da migração da população humana. Estas informações são obtidas a partir de estudos antropológicos e filogenéticos; por isso, quanto maior a precisão destes estudos, maior será a fidedignidade da estimativa da taxa de evolução do HTLV-1, a qual se torna uma ferramenta importante no monitoramento de mutações, as quais podem estar associadas a manifestações clínicas ainda desconhecidas ou a diferentes graus de virulência do patógeno (VAN DOOREN *et. al.*, 2004).

3-JUSTIFICATIVA

Os trabalhos sobre o HTLV realizados atualmente no Brasil baseiam-se, em sua maioria, em dados sorológicos, os quais detectam a presença de anticorpos contra o vírus mas não evidenciam qual o seu tipo e subtipo. Estes estudos, conduzidos em diversas cidades brasileiras, apontam diferentes prevalências do vírus. Sua presença tem sido associada às diversas doenças já citadas, e apesar de ser um agente infeccioso emergente, acometendo cerca de 20 milhões de pessoas ao redor do mundo, ainda continua sendo pouco investigado, ressaltando ainda mais a importância da implementação de um estudo sobre a dinâmica molecular do HTLV-1 (CATALAN-SOARES *et. al.*, 2005; BANGHAM *et. al.*, 2013).

A Região Amazônica é endêmica para o HTLV, portanto, torna-se imprescindível o monitoramento da circulação do vírus na região metropolitana de Belém. O conhecimento dos subtipos de HTLV-1 circulantes permitirá estudos sobre a associação das manifestações clínicas à determinada cepa viral e a comparação dos dados gerados com outros descritos na literatura, com o objetivo de conhecer a dinâmica molecular do vírus na região, bem como propor medidas de controle e prevenção contra o agente infeccioso.

4-OBJETIVOS

4.1-OBJETIVO GERAL

Verificar a diversidade genética dos HTLV-1 circulantes na região metropolitana de Belém.

4.2-OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever a frequência dos genótipos de HTLV-1
- Determinar a taxa de evolução da região 5'LTR entre os genótipos de HTLV-1
- Identificar os subtipos e subgrupos de HTLV-1 circulantes
- Realizar análise filogenética comparando as sequencias obtidas com outras sequencias disponíveis no GenBank

5-MATERIAIS E MÉTODOS

5.1- TIPO DE ESTUDO

O presente estudo foi classificado como transversal, retrospectivo.

5.2- POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foram utilizadas amostras de pacientes com sorologia positiva para HTLV-1/2, confirmados por métodos de biologia molecular (PCR) para o HTLV-1, atendidos no Núcleo de Medicina Tropical (NMT) da Universidade Federal do Pará (UFPA), no período de janeiro de 2010 a dezembro de 2013.

5.2.1- Critérios de Inclusão

Foram incluídos no estudo pacientes de ambos os sexos e todas as idades atendidos no NMT/UFPA durante o período citado, sendo priorizados os casos índices, e que tenham concordado e assinado o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) (Anexo 1).

5.2.2- Critérios de Exclusão

Foram excluídos do estudo pacientes que possuíam amostras inadequadas para análise, e/ou que tenham se recusado a assinar o TCLE.

5.3- ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do NMT/UFPA, obedecendo às normas e diretrizes do PPGDT/UFPA. (Anexo 2).

5.4- DETECÇÃO VIRAL E SEQUENCIAMENTO GENÉTICO

As etapas de extração viral e amplificação do material genético através de reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR e Nested-PCR), foram executadas no Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LABMOL) do NMT, utilizando-se os reagentes e protocolos implantados na rotina laboratorial. A etapa de sequenciamento do material genético foi executada em parceria com o Instituto Evandro Chagas (IEC), através da técnica de terminação em cadeia (SANGER *et. al.*, 1977), obedecendo às normas e protocolos utilizados pela instituição. Todas estas etapas são melhor descritas a seguir.

5.4.1-Coleta do material biológico

Alíquotas (5 mL) de sangue foram coletadas em tubos contendo EDTA, para que posteriormente fosse feita a separação entre o plasma e a camada de leucócitos (células mononucleadas do sangue periférico - PBMC), que permaneceram congeladas a -20°C até a etapa de análise.

5.4.2- Extração do DNA proviral

A extração do DNA proviral foi realizada a partir da camada de células leucocitárias após centrifugação do sangue total colhido, utilizando o *kit Wizard® Genomic DNA Purification*, Promega, conforme as recomendações do fabricante.

5.4.3- Amplificação da β globina humana (controle interno da reação):

Para avaliação da integridade do material genético extraído, foi realizada a amplificação da β globina humana, utilizando-se os oligonucleotídeos G73 (5' GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3') e G74 (5'-CAACTTCATCCACGTTCACC-3') (GREER *et al.*, 1991).

5.4.4- Amplificação e genotipagem do HTLV

Após a primeira etapa de amplificação do DNA proviral, foi realizada uma reação de *Nested-PCR*, seguida de digestão enzimática, para confirmação da infecção e diferenciação dos tipos 1 e 2 de HTLV. Para isso, foi amplificada a região pX do vírus. Para a reação da 1ª etapa da PCR foi utilizada uma solução com 5,0 μ L de *Go Taq Green Master Mix*, 2,0 μ L de água, 1 μ L (10 pmol) de cada iniciador HTLV_Externo F 5'-TTCCCAGGGTTTGGACGAAG-3' (7219-7238, direto) e HTLV_Externo R 5'-GGGTAAGGACCTTGAGGGTC-3' (7483-7464, reverso) e 1,0 μ L de DNA, para um volume final de 10 μ L. As condições de amplificação estão descritas no quadro 1:

CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO					
	DESNATURAÇÃO	ANELAMENTO	EXTENSÃO	EXTENSÃO FINAL	RESFRIAMENTO
TEMPERATURA	94° C	51,6° C	72° C	72° C	10° C
TEMPO	40 segundos	30 segundos	40 segundos	10 minutos	10 minutos
CICLO(S)	35		35	35 Único	Único

Quadro 1: Condições de amplificação para a primeira etapa de PCR.

A identificação molecular do genoma viral foi realizada por uma *Nested-PCR*, onde utilizaram-se as mesmas quantidades de *Go Taq Green Master Mix*, 1 µL (10 pmol) de cada oligonucleotídeo, HTLV_interno F 5'CGGATACCCAGTCTACGTGTT3' (7248-7268, direto) e HTLV_interno R 5'GAGCCGATAACGCGTCCATCG3' (7406-7386, reverso), 2,5 µL de água e 0,5 µL do produto da primeira PCR, gerando um fragmento de 159 pb.

O protocolo de amplificação seguiu 35 ciclos (repetições), com temperatura de desnaturação de 94°C por 30 segundos, a temperatura de anelamento de 51,6°C por 30 segundos e a temperatura de extensão de 72°C por 30 segundos, seguido da temperatura de extensão final a 72°C, por 10 minutos, e 10°C por 10 minutos (TUKE *et al.*, 1992). As condições de amplificação estão descritas no quadro 2:

CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO					
	DESNATURAÇÃO	ANELAMENTO	EXTENSÃO	EXTENSÃO FINAL	RESFRIAMENTO
TEMPERATURA	94° C	51,6° C	72° C	72° C	10° C
TEMPO	30 segundos	30 segundos	30 segundos	10 minutos	10 minutos
CICLO(S)	35	35	35	Único	Único

Quadro 2: Condições de amplificação para a 2ª etapa da PCR

Foram utilizados os controles positivo (amostra sabidamente positiva) e negativo (amostra negativa) em cada reação de PCR. Os produtos da amplificação foram visualizados após eletroforese (100 V/60 minutos) em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio em tampão TAE 1x (TAE 50x estoque – Tris-Base 1,6 M, Acetato de Na 0,8 M e EDTA-Na2 40 mM/1000 mL de água deionizada), mediante a utilização de um transiluminador ultravioleta.

5.4.5. Digestão enzimática para caracterização do tipo de HTLV

Após a identificação dos casos com resultados de PCR positivos, através do gel de agarose a 2%, foi feita a digestão enzimática (RFLP - polimorfismos do comprimento de fragmentos de restrição) do produto amplificado, para identificar o tipo de HTLV-1/2 presente nas amostras.

A reação de RFLP do produto do gene pX (159pb) foi realizada misturando-se 6,0 µL do produto amplificado, 7 µL de H₂O, 1,5 µL de tampão E (Promega, Madison WI, USA) e 0,5 µL da enzima de restrição TaqI (10 U/µL, Promega, Madison WI, USA), com posterior incubação a 65°C por 2 horas.

A presença do sítio de restrição (T/CGA), gera dois fragmentos (85 pb e 53 pb), este sítio encontra-se presente no HTLV-2, porém, ausente no HTLV-1.

Os produtos de digestão enzimática foram visualizados em gel de agarose de 3% a 100 V durante 60 minutos em tampão TAE 1x (TAE 49x estoque-Tris Base 1,6 M, Acetato de Na 0,8 M e EDTA-Na₂ 40 Mm/1000 ml de água deionizada), mediante a utilização de transiluminador ultravioleta.

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

Para a amplificação da região 5'LTR de HTLV-1 as reações foram executadas em um volume total de 25 µL, contendo 500 ng de DNA extraído, 125 µM de cada dNTP, 10 pmol/µL de cada iniciador, MgCl₂ 3,0 µM, KCl 50 mM, Tris-HCl pH 8,3 10 mM e 0,1 U de Taq DNA polimerase. O par de iniciadores usado na reação de amplificação para HTLV-1 foi: (LTR-I.01) 5'-TGACAATGACCATGAGCCCCAA-3' e (LTR-I.02) 5'-CGCGGAATAGGGCTAGCGCT-3', correspondendo aos nucleotídeos 1-22 e 823-842, da cepa HTLV-1 ATK (SEIKI *et al.*,1983).

A reação de amplificação teve como ciclos a desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 25 ciclos de 40 segundos a 94°C, 30 segundos a 62°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C. Os 25 ciclos seguiram por uma extensão final de 10 minutos a 72°C gerando um fragmento de 844pb.

No segundo passo da amplificação (*Nested-PCR*) foram utilizados 2,0 µL do produto da amplificação anterior e um par de iniciadores internos à região anteriormente amplificada, que possuem as seguintes sequências: (LTR-I.03) 5' -GGCTTAGAGCCTCCCAGTGA-3' e (LTR-I.04) 5'-GCCTAGGGAATAAAGGGGCG-3', correspondentes aos nucleotídeos 30-49 e 781-800 da cepa HTLV-1ATK (SEIKI *et al.*,1983).

Seguindo o protocolo de amplificação, após a desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 40 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C. Os 25 ciclos seguiram por uma extensão final de 10 minutos a 72°C, gerando um fragmento de 744 pb.

Afim de evitar o risco de contaminação com DNA exógeno e ter uma comprovação precisa dos resultados, em cada conjunto de amostras submetidas à reação de PCR foi

utilizado um controle negativo, composto por todos os reagentes da mistura da reação, exceto o DNA e um controle positivo que continha a mistura da reação mais o DNA de uma amostra sabidamente positiva.

Os produtos da amplificação foram visualizados após eletroforese (100 V/60 minutos) em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio em tampão TAE 1x (TAE 50x estoque – Tris-Base 1,6M, Acetato de Na 0,8M e EDTA-Na2 40 mM/1000 mL de água deionizada), mediante a utilização de um transiluminador com fonte de luz ultravioleta.

5.4.7- Purificação do produto da PCR

A reação de purificação dos produtos amplificados da região 5'LTR a partir da *Nested-PCR* visou otimizar o processo de sequenciamento das bases nucleotídicas.

As amostras que apresentaram o amplicon de 744pb foram purificadas do produto da PCR, utilizando o kit comercial *QIAquick PCR Purification* (QIAGEN), seguindo as instruções do fabricante. Em um microtubo de 0,5mL foi inserido o produto de PCR e acrescentado 5x o volume de tampão (PB), seguindo-se de agitação por 15 segundos. Em seguida, a mistura foi transferida para coluna com membrana contendo sílica acoplada ao tubo coletor, incubada a temperatura ambiente por 2 minutos e centrifugada por 1 minuto a 14.000 rpm. O filtrado foi descartado e foram adicionados 750 µL de tampão de lavagem (PE), incubando-se por 1 minuto e sendo realizada uma nova centrifugação a 14.000 rpm durante 1 minuto. Posteriormente, o filtrado foi desprezado e a coluna submetida à centrifugação a 14.000 rpm por 30 segundos. O tubo coletor foi descartado e a coluna encaixada em microtubo de 1,5 mL devidamente identificado, foi acrescentado 20 µL de tampão de eluição (EB) em cada coluna. Após incubação por 1 minuto as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 1 minuto e armazenadas a -20° C até o momento do uso.

5.4.8- PCR pré-sequenciamento

Para a reação de sequenciamento foi utilizado o Kit *Big Dye® terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystem). Foram preparadas misturas de reação com volume final de 10 µL, composta por 2µL de Big Dye, 1µL de tampão, 2µL de DNA (50ng) e 5 pmol/µL de cada oligonucleotídeo (os mesmos da segunda etapa da PCR '5 LTR) e 3 µL de água deionizada (quando necessário), em reações separadas.

Esta mistura foi processada em termociclador automático (Master Cycler, Eppendorf, Birkmann Instrument) onde se executou 1 ciclo a 94°C por 2 min, seguido de 25 ciclos cada um composto por 94°C por 45 segundos, 50°C por 30 segundos e 60°C por 4 minutos.

5.4.9- Eletroforese do DNA Sequenciado

Após a purificação do produto da PCR (região 5' LTR), o DNA foi submetido ao sequenciamento automático. A metodologia empregada foi baseada na síntese bioquímica da cadeia de DNA através do método de Sanger *et al.*, 1977, utilizando kit da *ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems).

As amostras foram aplicadas em placas de 96 poços, submetidas à desnaturação por 95°C durante 5 minutos e em seguida introduzidas em gelo por 2 minutos. A eletroforese foi realizada em sequenciador automático *ABI Prism 3130xl* (Applied Biosystem), baseada no método de terminação de cadeia por didesoxirribonucleotídeos marcados com moléculas fluorescentes, que ao contato com raios laser, emitem fluorescência de diferentes comprimentos de ondas correspondentes a cada um dos quatro nucleotídeos que compõem basicamente a molécula de DNA (A,C,T,G) localizados na extremidade 3'.

5.4.10- Edição e Alinhamento das sequências

As sequências nucleotídicas obtidas foram analisadas e editadas utilizando-se o programa *GENEIOUS 4.8.5*, e alinhadas com sequências de outros vírus isolados e disponíveis no banco de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando o programa *MAFFT v.7*.

5.4.11- Análise das sequências e construção da árvore filogenética

As árvores filogenéticas, bem como a matriz de distância foram construídas utilizando-o programa *IqTREE*. O método utilizado para construção das árvores foi o de máxima verossimilhança, que busca a árvore mais verossímil para explicar a evolução. Para análise do *bootstrap*, foram consideradas 1000 réplicas para gerar maior confiança aos valores dos grupamentos, sendo repetido o processo por 10 vezes. A edição das árvores foi realizada a partir do software *FigTree* (FARIA *et. al.*, 2014).

5.5.12- Cálculo e estimativa da taxa de diversidade genética do HTLV-1

A taxa de diversidade genética entre as sequências encontradas entre si e comparadas com outras sequências disponíveis no GenBank, foi calculada a partir do software *BEAST* v. 1.8., utilizando-se um total de 200 amostras (contendo todos os subtipos de HTLV-1), gerando 300.000.000 (trezentos milhões) de árvores comparativas. Esta análise foi realizada a partir de inferência bayesiana (LEMEY *et. al.*, 2010), que tem como fundamento o Teorema de Bayes:

$$p(\theta|y, M) = \frac{p(y|\theta, M) \cdot p(\theta|M)}{p(y|M)}$$

Onde:

- $p(y | \theta, M)$: Verossimilhança ou distribuição de probabilidade dos dados y condicionais nos parâmetros θ e nas hipóteses do modelo M , que fornece a plausibilidade de cada um dos possíveis valores do parâmetro θ ;
- $p(\theta | M)$: Distribuição *a priori*, que expressa o conhecimento sobre os parâmetros antes de examinar os dados;
- $p(y | M)$: Evidência, ou constante de normalização;
- $p(\theta | y, M)$: Distribuição *a posteriori* que expressa o conhecimento sobre o parâmetro após examinar os dados.

6- RESULTADOS

Foram identificadas 78 amostras positivas para HTLV-1, referentes à pacientes atendidos no NMT durante o período de janeiro de 2010 à dezembro de 2013, sendo 55 (70,5%) indivíduos do sexo feminino e 23 (29,5%) do sexo masculino, com a média de idade de 44 anos. Destas amostras, 44 puderam ser submetidas ao sequenciamento genético da região 5'LTR. A frequência do genótipo HTLV-1 aA (Cosmopolita Transcontinental) entre as amostras investigadas foi de 100%, como mostra a árvore filogenética (figura 8):

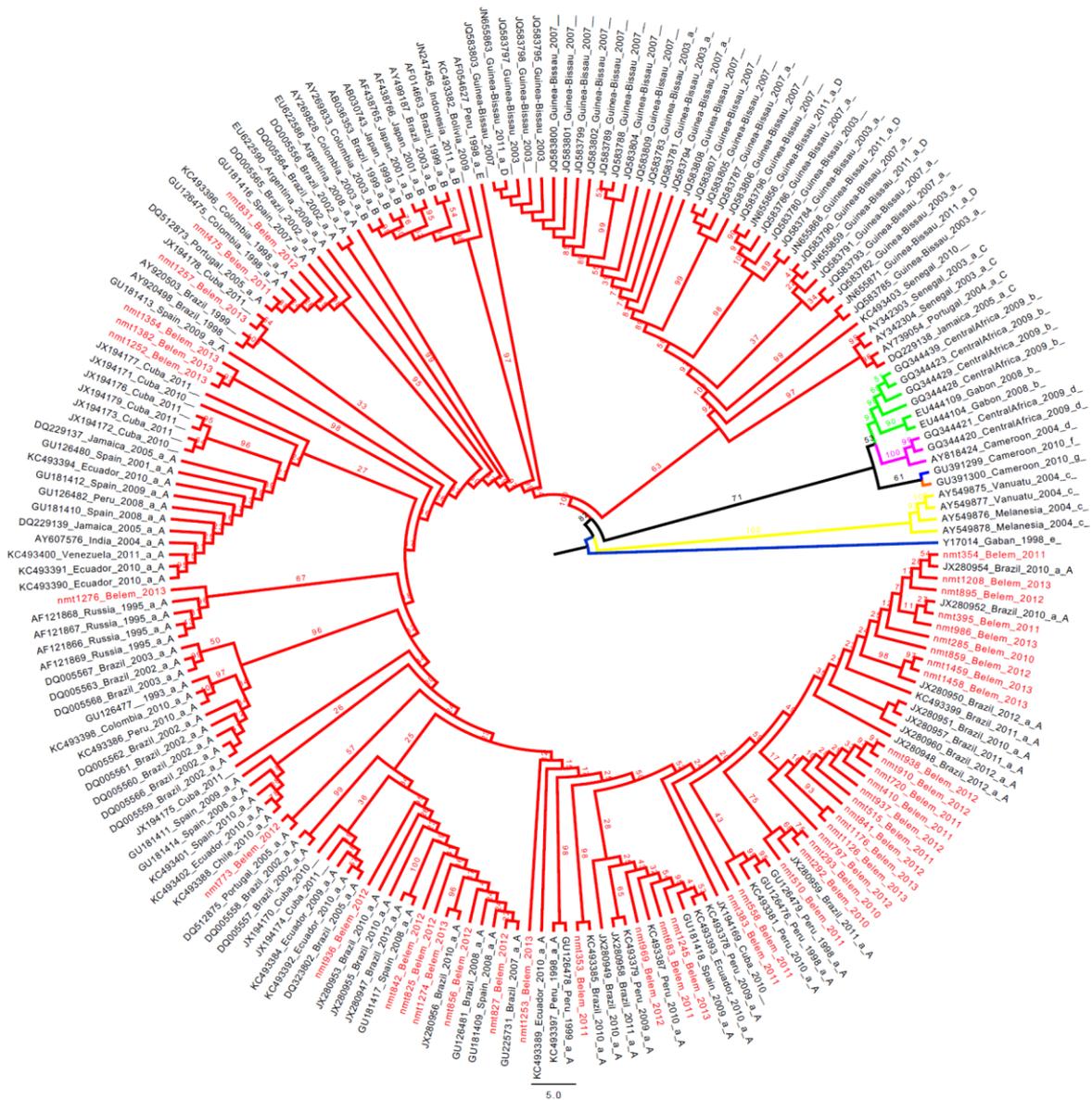


Figura 8: Análise filogenética a partir do sequenciamento nucleotídico de 744 pb correspondentes à região 5'LTR do HTLV-1, pelo método de máxima verossimilhança, utilizando-se bootstrap de 10000 vezes.

A análise da diversidade genética (figura 9), comparando 200 amostras de HTLV-1 dos 7 subtipos gerando 300 milhões de árvores comparativas, revelou uma taxa de evolução para os grupos: a- 2.10^{-3} ; b- $2,69 \cdot 10^{-2}$; c- $6,23 \cdot 10^{-2}$; d- $3,08 \cdot 10^{-2}$; e- $6 \cdot 10^{-2}$; f- $1,78 \cdot 10^{-3}$; g- $2,2 \cdot 10^{-2}$ (quadro 3) mutações por sítio por ano:

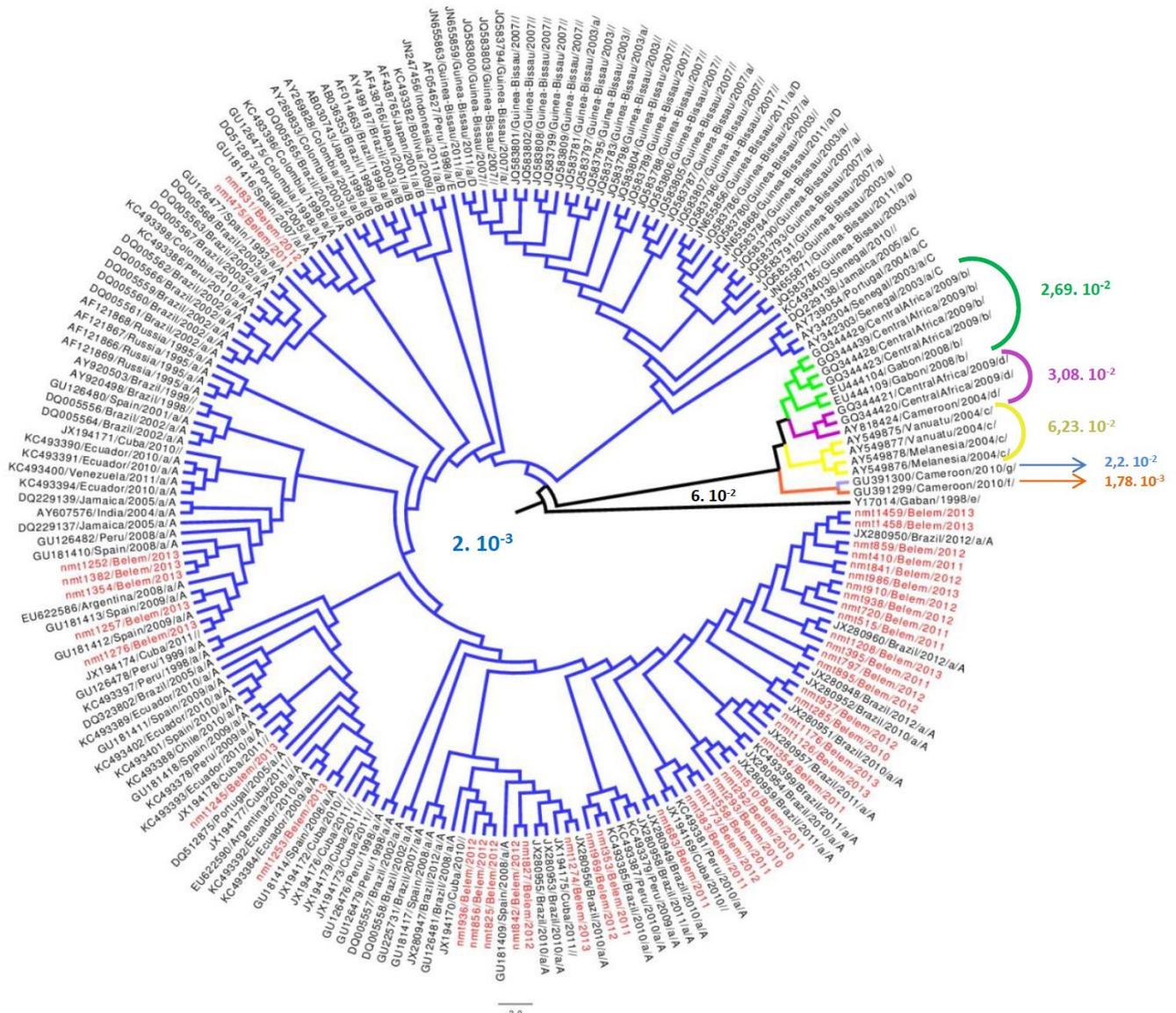


Figura 9: Relógio molecular a partir do sequenciamento genético da região 5'LTR do HTLV-1, calculado por inferência bayesiana, executado em computador de 98 Gb de memória RAM, 1 TB de HD e processador Intel® Xeon®.

GRUPOS	a	B	c	d	e	f	g
TAXA DE EVOLUÇÃO	$2 \cdot 10^{-3}$	$2,69 \cdot 10^{-2}$	$6,23 \cdot 10^{-2}$	$3,08 \cdot 10^{-2}$	$6 \cdot 10^{-2}$	$1,78 \cdot 10^{-3}$	$2,2 \cdot 10^{-2}$

Quadro 3: Taxa de evolução genética do HTLV-1 por grupos

Entre os 78 pacientes investigados, apenas 50 foram acompanhados no ambulatório do NMT/UFPA. Dentre estes, identificamos 16 (32%) sintomáticos com sinais e sintomas sugestivos de PET/MAH, e 34 (68%) assintomáticos (figura 10).

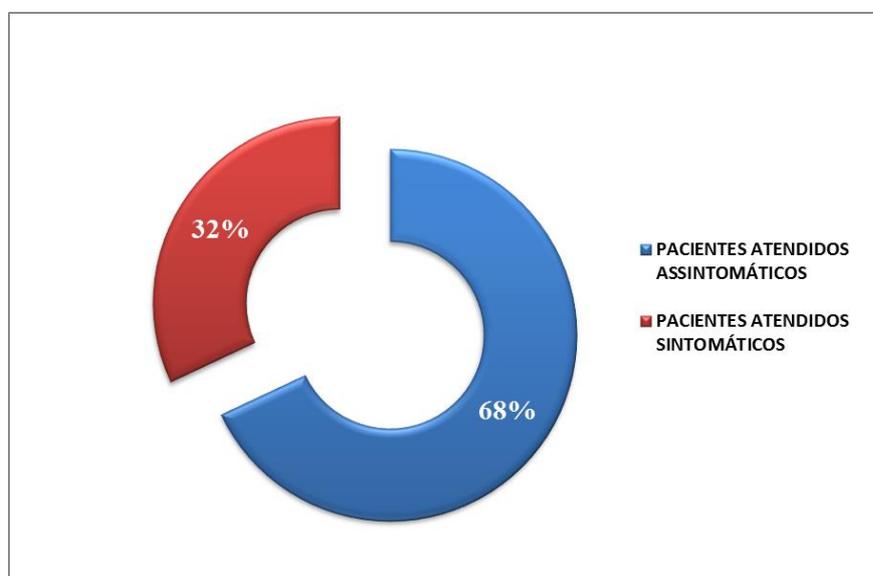


Figura 10: Pacientes assintomáticos e sintomáticos atendidos pelo ambulatório do NMT/UFPA entre 2010 e 2013.

7-DISCUSSÃO

O HTLV-1 possui distribuição mundial, variando a sua prevalência de acordo com a região investigada. Muitos estudos apontam a miscigenação e a migração geográfica ao longo da história da humanidade como alguns dos fatores responsáveis pela disseminação deste vírus, que infecta hoje aproximadamente 20 milhões de pessoas. Nosso estudo evidenciou a circulação do genótipo aA do HTLV-1 na região metropolitana de Belém, corroborando com o que a literatura descreve sobre a frequência deste subtipo na América Latina, mais especificamente no Brasil.

Entre os genótipos do HTLV-1, o subtipo aA realmente destaca-se como um dos mais frequentes entre as mais diferentes populações, principalmente em áreas de intensa migração, como é o caso da região Norte do país, devido às atividades de extrativismo mineral e ao crescimento dos investimentos no setor industrial. Estes fatores podem, talvez, explicar a alta frequência deste genótipo na região metropolitana de Belém, uma vez que outras regiões metropolitanas de outros países emergentes, principalmente da América Latina, também apresentam este mesmo perfil de circulação do patógeno (GESSAIN & CASSAR, 2012; TSUKASAKI & TOBINAI, 2013).

Alguns fatores imunológicos predisõem determinados indivíduos à infecção viral, como no caso de alguns grupos populacionais específicos do Japão, que apresentam uma característica genética distinta, além de fatores socioculturais que aumentam a susceptibilidade destes à infecção pelo HTLV (TAJIMA *et. al.*, 1985). No Brasil, nenhum estudo abrangente foi realizado especificamente com este intuito, o que não nos permite afirmar que a população brasileira, mais especificamente a população da região metropolitana de Belém está imunologicamente mais suscetível a esta infecção.

Ainda não foi relatado nenhum caso onde houve severidade nas doenças relacionada diretamente a algum subtipo ou subgrupo específico, embora haja algumas diferenças na patogenia do HTLV-1 e HTLV-2; o que não é tomado como regra para os diversos genótipos de HTLV-1 circulantes. A maioria dos dados sobre a patogênese do vírus provém de populações não brasileiras, e não é conclusiva quanto a real contribuição dos fatores virais e do hospedeiro na manifestação de doença e na progressão dela (VERDONCK *et. al.*, 2007; COOK *et. al.*, 2013).

Existem poucos estudos sobre a diversidade genética do HTLV-1 no Brasil; a maioria dos trabalhos conduzidos no país baseia-se em investigação sorológica, em grupos populacionais específicos, o que não permite discorrer com maior propriedade sobre o perfil genotípico da circulação do vírus entre a população geral. Apesar dos dados epidemiológicos serem relativamente escassos, também se pode notar o fenômeno de distribuição heterogênea do vírus, sendo as maiores prevalências observadas nos estados do Maranhão (São Luis: 10.0/1000 doadores de sangue), Bahia (Salvador: 1,8% na população geral, ou 9.4/1000 doadores de sangue), Pará (Belém: 9.1/1000 doadores de sangue) e Pernambuco (Recife-7.5/1000 doadores de sangue) (CATALAN-SOARES *et al.*, 2005; DOURADO *et al.*, 2003).

Como mencionado anteriormente, todas as amostras positivas para o HTLV-1 agruparam no clado pertencente ao genótipo aA na árvore filogenética, juntamente com amostras da Colômbia, Espanha, Rússia, Jamaica, Equador, Peru, Portugal, Japão, Senegal e outros países incluindo também o Brasil. Entre as 44 amostras, houve algumas que apresentaram um agrupamento muito próximo entre si, explicitando uma conservação do vírus disseminado na região durante o período de estudo.

Outras amostras agruparam em clados que abrangiam isolados de outros países tanto da América Latina como da África e Europa, sugerindo que alguns destes casos tenham sido importados. Como o Brasil é uma importante rota migratória, não se torna incomum a identificação de casos deste tipo. Todas as 44 amostras investigadas foram de casos índice, ou seja, de pacientes que não possuem parentesco direto entre si, e mesmo assim, como também descreve a literatura, o vírus presente nestes possui grande semelhança genética.

Estudos de epidemiologia molecular de cepas virais demonstram a acentuada relação filogenética entre isolados de HTLV-1 da América Latina e de isolados da África do Sul, quando comparado com isolados do oeste da África, dados que refletem a intensa entrada de sul-africanos no Brasil, durante o tráfico de escravos, entre os séculos XIV a XIX, e a maior prevalência do vírus em população afro-descendente no Brasil (DOURADO *et al.*, 2003; MOTA *et al.*, 2007).

A investigação molecular do HTLV-1 permite esclarecer não só a origem, mas também a disseminação deste retrovírus nas diversas populações humanas. Resultados semelhantes, aos encontrados em nosso estudo, foram relatados por Rego e colaboradores em 2008, onde tanto a prevalência da infecção, bem como a epidemiologia molecular do vírus foi avaliada em três distritos populacionais (Taquarandi, Junco e Alegre) do Vale do São

Francisco, no estado da Bahia, revelando uma baixa diversidade genética viral. Os dados da avaliação molecular reforçam a possibilidade de introdução múltipla do vírus no país, podendo ser tanto de origem Pré como Pós-Colombiana (REGO *et al.*, 2008).

Os genótipos b, c, d, e, f e g não foram identificados no nosso estudo. Alguns trabalhos têm mostrado que estes subtipos possuem uma circulação peculiar, ou seja, são encontrados quase que exclusivamente em áreas específicas do planeta, como por exemplo, os genótipos e e f que foram isolados de um pigmeu Efe Mbuti do Congo e um indivíduo do Gabão, respectivamente. Estes achados reafirmam a hipótese de que existe uma maior probabilidade de se identificar o genótipo Cosmopolita Transcontinental em locais que fogem deste padrão de circulação mencionado (SALEMI *et al.*, 1998; GESSAIN & CASSAR, 2012).

Atualmente, existem apenas 15 seqüências completas (genoma) de HTLV-1 no GenBank, que foram classificadas como subtipos aA (n = 8), aB (n = 2), aC (n = 2) e 1b (n = 1) e 2 não atribuídos, para os quais algumas das sequências têm o país de amostragem indicado. Entre elas, havia 3 sequencias identificadas no Brasil. A análise detalhada do genoma proviral demonstra que as regiões LTR e env do HTLV-1 apresentam uma ampla variabilidade, enquanto as regiões gag e pol uma alta similaridade entre diferentes isolados provirais. Por essa razão, as sequências LTR são particularmente preferidas para a caracterização genética dos subtipos virais, e por este motivo, também escolhemos esta região para o desenvolvimento deste estudo, com o objetivo de poder ter uma melhor comparação filogenética entre as sequencias obtidas e as disponíveis em bancos de dados (RATNER *et al.* 1991, SANTOS & LIMA 2005).

Diversos estudos demonstram que o HTLV-1 apresenta alta estabilidade genética quando comparado a outros retrovírus (GESSAIN *et al.*, 1992). Sua taxa de evolução gira em torno de $3,44 \times 10^{-7}$ e $6,55 \times 10^{-7}$ substituições por sítio por ano para env e LTR, respectivamente (LEMEY *et al.*, 2005). Também foi relatada uma taxa de substituição da ordem de 1% a cada 1000 anos (SHERMAN *et al.*, 1992; GESSAIN *et al.*, 1996). Essa estabilidade genética está provavelmente relacionada à estratégia de replicação viral (WATTEL *et al.*, 1996). Além disso, tem sido demonstrada uma estreita associação entre o polimorfismo genético do HLTV e a sua origem geográfica (MALIK *et al.*, 1988; GRAY *et al.*, 1990, RATNER *et al.*, 1991, GESSAIN *et al.*, 1996, LEMEY *et al.*, 2005). Para o HTLV-1, há divergência de 2 a 8% em diferentes subtipos, e a taxa de variação genética intra-subtipo

é menor que 0,5% (DAENKE *et al.* 1990; GESSAIN *et al.* 1996). Para o HTLV-2, essa diferença chega a 4,3% para a região env quando comparados os subtipos a e b (SWITZER *et al.* 1995).

A necessidade de um maior número de estudos sobre a diversidade genética do HTLV-1 torna-se a cada ano mais alarmante. É necessário um rastreamento minucioso do vírus em casos positivos sintomáticos e também assintomáticos, para que se possa conhecer quais subtipos estão ou não associados à LLcTA, PET/MAH, uveíte e estrogiloidíase, bem como saber sobre quais destes subtipos estão circulando de maneira silenciosa entre a população. O NMT tem somado forças para tentar conduzir pesquisas neste sentido, gerando dados que têm contribuído para um melhor entendimento sobre este tema altamente complexo.

A baixa diversidade genética e a alta conservação da região LTR demonstrada, nos estimulam a buscar estratégias de contenção ao HTLV-1. A região LTR não sofre, teoricamente, pressão seletiva, diferentemente da região env, que está diretamente ligada à expressão de proteínas de ligação viral. Com isso, a env pode ser um dos possíveis alvos de uma vacina ou outra modalidade de fármaco, uma vez que estudos filogenéticos também demonstram a sua alta conservação. Estudos *in vitro*, através da inativação de glicoproteínas essenciais do vírus como a gp46 e gp21, puderam demonstrar a neutralização da atividade infecciosa do vírus em células animais com sucesso.

A árvore evolutiva revelou a taxa de $2 \cdot 10^{-3}$ mutações por sítio por ano para as amostras do subgrupo a, grupo ao qual pertencem as 44 amostras do nosso estudo. Essa taxa de evolução é extremamente baixa, quando comparada à outras taxas de evolução viral como a do *influenzae*, rotavírus e varicela. Um detalhe curioso é que, apesar da alta mutação, para estes 3 vírus já se possui vacina, enquanto que para o HTLV-1, que pouco muta, ainda não (FIELDS VIROLOGY, 2007).

Esta árvore evolutiva foi gerada comparando todos os subtipos de HTLV-1, e não apenas um único subtipo, sendo assim considerada uma árvore relaxada. A tendência deste tipo de análise seria mostrar taxas evolutivas mais altas, já que também foram comparados subtipos muito divergentes, como c, e, f e g. No entanto, mesmo para estes subtipos, a taxa evolutiva não foi tão alta, sendo respectivamente: $6,23 \cdot 10^{-2}$, $6 \cdot 10^{-2}$, $1,78 \cdot 10^{-3}$, $2,2 \cdot 10^{-2}$. Um mesmo modelo de comparação evolutiva foi utilizado por Lemey *et al.*, em 2005, só que usando apenas uma amostra de cada grupo, mostrando taxas de divergência mais baixas do

que as que encontramos em nosso estudo, porém, utilizamos 200 amostras, sendo um dos motivos que explica as taxas evolutivas um pouco mais altas.

Neste contexto, é necessário que o governo se faça mais atuante em relação a questões diretamente ligadas ao HTLV. São necessários incentivos à pesquisa e a divulgação dos riscos aos quais a população está exposta, já que pouca informação é veiculada sobre o tema. A prevenção e controle são as principais estratégias no combate ao patógeno, impedido que ainda mais pessoas possam ser infectadas e conseqüentemente venham a desencadear doenças altamente debilitantes, e que até o momento, não possuem um tratamento eficaz.

8- CONCLUSÕES

Ao final deste projeto, concluímos que:

- O HTLV-1 não possuiu diversidade genotípica na região metropolitana de Belém: apenas o subtipo viral aA foi detectado durante o período de investigação;
- A taxa de evolução encontrada entre amostras positivas para HTLV-1 foi muito baixa, revelando alta estabilidade genética da região 5'LTR;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- OSAME, M.; USUKU, K.; IZUMO S. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. **Lancet**, 1031-1032. 1986.
- KALYANARAMAN, V. S.; NARAYANAN, R.; FEORINO, P. Isolation and characterization of a human T cell leukemia virus type II from a hemophilia-A patient with pancytopenia. **Embo. J.**, 4(6):1455-1460. 1985.
- CALATTINI, S.; CHEVALIER, S. A.; DUPREZ, R. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. **Retrovirology**, 2 (1):30. 2005.
- HOMMA, T.; KANKI, P. J.; KING, N. W.; HUNT, R. D. Lymphoma in macaques: association with virus of human T lymphotropic family. **Science**, 225 (4663):716-718. 1984.
- SHERMAN, M. P.; SAKSENA, N. K.; DUBE, D. K. Evolutionary insights on the origin of human T cell lymphoma/leukemia virus type I (HTLV-I) derived from sequence analysis of a new HTLV-I variant from Papua New Guinea. **J. Virol.**, 66(4):2556-2563. 1992.
- ALCANTARA, L. C. J.; SHINDO, N.; VAN DOOREN, S.; SALEMI, M.; COSTA, M. C. R.; KASHIMA, S. 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**, Jun;19(6):519–23. 2003.
- KALYANARAMAN, V. S.; SARNGADHARAN, M. G.; ROBERT-GUROFF, M.; MIYOSHI, I.; 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** (New York, N.Y.). Nov 5;218(4572):571–3. 1982.
- WOLFE, N. D.; HENEINE, W.; CARR, J. K.; GARCIA, A. D.; SHANMUGAM, V. TAMOUFE, U. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, May 31;102(22):7994–9. 2005.
- VERDONCK, K.; GONZÁLEZ, E.; VAN DOOREN, S.; VANDAMME, A. M.; VANHAM, G.; GOTUZZO, E. Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. **The Lancet infectious diseases**, Apr;7(4):266–81. 2007.
- SLATTERY, J. P.; FRANCHINI, G.; GESSAIN, A. Genomic evolution, patterns of global dissemination, and interspecies transmission of human and simian T-cell leukemia/lymphotropic viruses. **Genome research**, Jun;9(6):525–40. 1999.

CALATTINI, S.; CHEVALIER, S. A.; DUPREZ, R.; BASSOT, S.; FROMENT, A.; MAHIEUX, R. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. **Retrovirology**, Jan;2:30. 2005.

VAN DOOREN, S. Molecular investigation of the evolutionary history and diversity of primate T-lymphotropic virus types 1 and 3. **University Utrecht**, p. 1–242. 2005.

MANDELL, G. L.; BENNETT, J. E.; DOLIN, R. Human T-Cell Lymphotropic Virus Types I and II. **Principles and Practice of Infectious Disease. Sixth.** p. 2098–118. 2004.

SHIMOYAMA, M. Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). **British journal of haematology**. Nov;79(3):428–37. 1991.

MURPHY, E. L.; HANCHARD, B.; FIGUERO, A. J. P.; GIBBS, W. N.; LOFTERS, W. S.; CAMPBELL, M. Modelling the risk of adult T-cell leukemia/lymphoma in persons infected with human T-lymphotropic virus type I. *International journal of cancer*. **International Journal of Cancer**, Feb 15;43(2):250–3. 1989.

IWANAGA, M.; WATANABE, T.; YAMAGUCHI, K. Adult T-cell leukemia: a review of epidemiological evidence. **Frontiers in microbiology**. Jan;3(322):1–13. 2012.

SOUZA, A.; TANAJURA, D.; TOLEDO-CORNELL, C.; SANTOS, S.; CARVALHO E. Immunopathogenesis and neurological manifestations associated to HTLV-1 infection. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. Oct;45(5):545–52. 2012.

KAPLAN, J. E.; OSAME, M.; KUBOTA, H.; IGATA, A.; NISHITANI, H.; MAEDA, Y. The risk of development of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. **Journal of acquired immune deficiency syndromes**. Jan;3(11):1096–101. 1990.

HÖLLSBERG, P.; HAFNER, D. A. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Pathogenesis of diseases induced by human lymphotropic virus type I infection. **The New England journal of medicine**. Apr 22;328(16):1173–82. 1993.

RATHSAM-PINHEIRO, R. H.; BOA-SORTE, N.; CASTRO-LIMA-VARGENS, C.; PINHEIRO, C. A.; CASTRO-LIMA, H.; GALVÃO-CASTRO, B. Ocular lesions in HTLV-1 infected patients from Salvador, State of Bahia: the city with the highest prevalence of this

infection in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** 42(6):633–7. 2009.

MOCHIZUKI, M.; WATANABE, T.; YAMAGUCHI, K.; TAJIMA, K.; YOSHIMURA, K.; NAKASHIMA, S. Uveitis associated with human T lymphotropic virus type I: seroepidemiologic, clinical, and virologic studies. **The Journal of infectious diseases.** Oct;166(4):943–4. 1992.

YAMAGUCHI, K. Human T-lymphotropic virus type I in Japan. **The Lancet.** Jan;343(8891):213–6. 1994.

DUMAS, M.; HOUINATO, D.; VERDIER, M.; ZOHOUN, T.; JOSSE, R.; BONIS, J. Seroepidemiology of human T-cell lymphotropic virus type I/II in Benin (West Africa). **AIDS research and human retroviruses.** May;7(5):447–51. 1991.

KAZURA, J. W.; SAXINGER, W. C.; WENGER, J.; FORSYTH, K.; LEDERMAN, M. M.; GILLESPIE, J. A. Epidemiology of human T cell leukemia virus type I infection in East Sepik Province, Papua New Guinea. **The Journal of infectious diseases.** Jun;155(6):1100. 1987.

TREVIÑO, A.; AGUILERA, A.; CABALLERO, E.; BENITO, R.; PARRA, P.; EIROS, J.M.; Trends in the prevalence and distribution of HTLV-1 and HTLV-2 infections in Spain. **Virology journal.** Jan;9:71. 2012.

MIURA, T.; FUKUNAGA, T.; IGARASHI, T.; YAMASHITA, M.; IDO, E.; FUNAHASHI, S. 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.** Feb 1;91(3):1124–7. 1994.

FERREIRA JÚNIOR, O. C.; VAZ, R. S.; CARVALHO, M. B.; GUERRA, C. FABRON, A.; ROSEMBLIT, J. Human T-lymphotropic virus type I and type II infections and correlation with risk factors in blood donors from São Paulo, Brazil. **Transfusion.** Mar;35(3):258–63. 1995.

GALVÃO-CASTRO, B.; LOURES, L.; RODRIQUES, L. G.; SERENO, A.; FERREIRA JÚNIOR, O. C.; FRANCO, L. G. Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. **Transfusion.** Feb;37(2):242–3. 1997.

GALLO, R. C.; KALYANARAMAN, V. S.; SARNGADHARAN, M. G.; SLISKI, A.; VONDERHEID, E. C.; MAEDA, M. Association of the human type C retrovirus with a subset of adult T-cell cancers. **Cancer research**. Aug;43(8):3892–9. 1983.

MUELLER, N. The epidemiology of HTLV-I infection. **Cancer causes & control: CCC**. Jan;2(1):37–52. 1991.

DOURADO, I.; ALCANTARA, L. C. J.; BARRETO, M. L.; DA GLORIA TEIXEIRA, M.; 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** (1999). Dec 15;34(5):527–31. 2003.

CATALAN-SOARES, B. C.; CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F.; PROETTI, F. A. Os vírus linfotrópicos de células T humanos (HTLV) na última década (1990-2000). **Revista Brasileira de Epidemiologia**. v.4, n.2, p.81-95, 2001.

GALVÃO-CASTRO, B. Epidemiologia e origem do HTLV-I em Salvador estado da Bahia: A cidade com a mais elevada prevalência desta infecção no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**. 79(1): 3-10, 2009.

TAKATSUKI, K.; YAMAGUCHI, K.; KAWANO, F.; HATTORI, T.; NISHIMURA, H.; TSUDA, H. Clinical diversity in adult T-cell leukemia-lymphoma. **Cancer research**. Sep;45(9 Suppl):4644s–4645s. 1985.

TAJIMA, K.; KUROISHI, T. Estimation of rate of incidence of ATL among ATL (HTLV-I) carriers in Kyushu, Japan. **Japanese journal of clinical oncology**. Jun;15(2):423–30. 1985.

VANDAMME, A. M.; LIU, H. F.; GOUBAU, P.; DESMYTER, J. Primate Tlymphotropic virus type I LTR sequence variation and its phylogenetic analysis: compatibility with an African origin of PTLVI. **Virology**. 202:212-223, 1994.

GESSAIN, A.; GALLO, R. C.; FRANCHINI, G. Low degree of human T-cell leukemia/lymphoma virus type I genetic drift in vivo as a means of monitoring viral transmission and movement of ancient human populations. **J. Virol**. 66:2288-2295, 1992.

MAHIEUX, R.; IBRAHIM, F.; MAUCLERE, P.; HERVE, V.; MICHEL, P.; TELAOA, F.; CHAPPEY, C.; GARIN, B.; VAN DER, E.; GUILLEMAIN, B.; LEDRU, E.; DELAPORTE, E.; GESSAIN, A. Molecular epidemiology of 58 new African Human T-cell Leukemia Virus

Type I (HTLV-I) strains: identification of a new and distinct HTLVI molecular subtype in Central Africa in Pygmies. **J. Virol.** 71:1317-1333, 1997.

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 STLVI strains. **Virology.** 246:277-287, 1998.

VIDAL, A. U.; GESSAIN, A.; YOSHIDA, M.; TEKAIA, F.; GARIN, B.; GUILLERMAIN, B.; SCHULS, T.; FARID, R. Phylogenetic classification of human T cell leukaemia/lymphoma virus type I genotypes in five major molecular and geographical subtypes. **J Gen Virol.** 75:3655, 1994.

VAN DOOREN, S.; GOTUZZO, E.; SALEMI, M.; WATTS, E.; AUDENAERT, S.; DUWE, H.; ELLERBROK, R.; GRASSMANN, J.; DESMYTER VANDAMME. Evidence for a Post-Colombian introduction of human T-cell lymphotropic virus in Latin America. **J Gen Virol** 79:2695-2708, 1998.

EDWARDS, D.; FENIZIA, C.; GOLD, H.; CASTRO-AMARANTE, M. F.; BUCHMANN, C.; CYNTHIA, A. Orf-I and Orf-II-Encoded Proteins in HTLV-1. Infection and Persistence. **Viruses.** 2011.

ARAÚJO, T. H. Desenvolvimento De Um Banco De Dados (*Htlv-1 Molecular Epidemiology Database*) Para *Datamining E Data Management De Sequências Do Htlv-1.* **Fiocruz.** 2012.

COOK, L. B.; MARJET, E.; AILEEN, G.; ROWAN, B, A. HTLV-1: Persistence and pathogenesis. **Virology,** 435. 131–140. 2013.

KNIPE, D.; HOWLEY, P. **FIELDS VIROLOGY: FIFTH EDITION.** Massachusetts: **Lippincott Williams & Wilkins,** 2007.

BANGHAM, C. R.; COOK, L. B.; MELAMED, A. HTLV-1 clonality in adult T-cell leukaemia and non-malignant HTLV-1 infection. **Semin Cancer Biol.** Dec 6. 2013.

GESSAIN, A.; CASSAR, O. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. **Frontiers in Microbiology,** 2012.

RODPOTHONG, P.; PRASERT, A. Viral evolution and transmission effectiveness. **World Journal of Virology.** October 12; 1(5): 131-134. 2012.

VAN DOOREN, O.; PYBUS, M.; SALEMI, H. F. The Low Evolutionary Rate of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type-1 Confirmed by Analysis of Vertical Transmission Chains. **Mol. Biol. Evol.** 21(3):603–611. 2004.

TSUKASAKI, K.; TOBINAI, K. Biology and treatment of HTLV-1 associated T-cell lymphomas. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, 26 3–14. 2013.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Nat Ac Sci**; 74:5463-67. 1977.

POIESZ, B. J.; RUSCETTI, F. W.; GAZDAR, A. F. 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**. 77(12):7415-7419. 1980.

HINUMA, Y.; KOMODA, H.; CHOSA, T. Antibodies to adult T-cell leukemia virus-associated antigen (ATLA) in sera from patients with ATL and controls in Japan: a nationwide seroepidemiological study. **International Journal of Cancer**. 29:631. 1982.

BLATTNER, W.; KALYANARAMAN, V.; ROBERT-GUROFF, M. The human type-C retrovirus, HTLV, in blacks from the Caribbean region and relationship to adult T-cell leukemia/lymphoma. **International Journal of Cancer**. 30:257. 1982.

SCHNEIDER, J.; YAMAMOTO, N.; HINUMA, Y. Sera from adult T-cell leukemia patients react with envelope and core polypeptides of adult T-cell leukemia virus. **Virology**. 132(1):1-11. 1984.

MERINO, F.; ROBERT-GUROFF, M.; CLARK, J. Natural antibodies to human T-cell leukemia/lymphoma virus in healthy Venezuelan populations. **International Journal of Cancer**. 34:501. 1984.

ASHER, D. M.; GOUDSMIT, J.; POMEROY, K. Antibodies to HTLV-I in populations of the southwestern Pacific. **Journal of Medical Virology**. 26:339. 1988.

GESSAIN, A.; MAHIEUX, R. A virus called HTLV-1. Epidemiological aspects. **La Presse Médicale**. 29(40):2233-2239. 2000.

MATSUOKA, M.; JEANG, KT.; Human T-cell leukemia virus type I at age 25: a progress report. **Cancer Research**. 65(11):4467-4470. 2005.

KITAGAWA, T.; FUJISHITA, M.; TACAGUSHI, H.; MIYOSHI, I.; TADOKORO, H.; Antibodies to HTLV-I in Japanese immigrants in Brazil. **JAMA**. 256:2342, 1986.

DOURADO, I.; ALCANTARA, L. C. J.; BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G.; GALVÃO-CASTRO, B. HTLV-1 in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. **Journal of Acquired Immune Deficiens Syndroms** 34: 527–531, 2003.

DOS SANTOS, E. L.; TAMEGÃO-LOPES, B.; MACHADO, L. F. A.; ISHAK, M. ; ISHAK, R.; LEMOS, J. A.; VALLINOTO, A. C. Caracterização molecular do HTLV-1/2 em doadores de sangue em Belém, Estado do Pará: primeira descrição do subtipo HTLV-2b na região Amazônica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 271-276, 2009.

SUNDARAM, R.; SUNI, Y.; WALKER, C, M.; LEMONNIER, F.; JACOBSON S. K.; KAUMAYAA, P. A novel multivalent human CTL peptide construct elicits robust cellular immune responses in HLA-A*0201 transgenic mice: implications for HTLV-1 vaccine design. **Vaccine**, 2003.

MACÊDO, O. Human T-cell lymphotropic virus types I and II infections in a cohort of patients with neurological disorders in Belém, Pará, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.46, n.1, p.13-17, 2004.

NOBRE, V. Lesões dermatológicas em pacientes infectados pelo vírus linfotrópico humano de células T do tipo I (HTLV I). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 38: 43-52, 2005.

FIGUEIRÓ-FILHO, E. A. Infecção pelo vírus linfotrópico de células T humanas e transmissão vertical em gestantes do estado da Região Centro-Oeste do Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. vol.27:719-725, 2005.

LEMEY, P.; PYBUS, O.; VAN DOOREN, S.; VANDAMME, A. M. A Bayesian statistical analysis of human T-cell lymphotropic virus evolutionary rates. **Infection, Genetics and Evolution**. 5, 291–298. 2005.

LEMEY, P.; RAMBAUT, A.; WELCH, J. Phylogeography Takes a Relaxed Random Walk in Continuous Space and Time. **Mol. Biol. Evol.** 27(8):1877–1885. 2010.

REGO, F. F. A.; ALCANTARA, L. C. J.; MOURA NETO, J. P.; MOTA-MIRANDA, A. C. A.; PEREIRA, O. S.; GONÇALVES, M. S.; GALVÃO-CASTRO, B. HTLV-1 molecular study in Brazilian villages with African characteristics giving support to the post-Columbian introduction hypothesis. **AIDS Res and Huma Retrov.** 24(5), 673-677, 2008.

SEIKI, M; HATTORI, S; HIRAYAMA, Y; YOSHIDA, M. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. **Proc Natl Acad Sci USA**. 80, 3618-3622, 1983.

RATNER, L.; PHILPOTT, T.; TROWBRIDGE, D. B. Nucleotide sequence analysis of isolates of human T-lymphotropic virus type 1 of diverse geographical origins. **AIDS Res Hum Retroviruses**. 7:923-941. 1991.

ISHAK, R; VALLINOTO, A. C. R.; AZEVEDO, V. N.; ISHAK, M. O. G. The epidemiological aspects of retrovirus (HTLV) infections among Indian populations of the Amazon region of Brazil. **Cad Saúde Pública**. 19, 901-914, 2003.

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 Marajo Island (Para, Brazil). **Mem Inst Oswaldo Cruz** 101: 103-105. 2006.

SHERMAN, M. P.; DUBE, S.; SPICER, T. P.; KANE, T. D.; LOVE, J. L.; SAKSENA, N. K.; LANNONE, R.; GIBBS, C. J.; YANAGIHARA, J. R.; DUBE, D. K.; POIESZ, J. R. Sequence Analysis of an Immunogenic and Neutralizing Domain of the Human T-Cell Lymphoma/Leukemia Virus Type I gp46 Surface Membrane Protein among Various Primate T-Cell Lymphoma/Leukemia Virus Isolates Including Those from a Patient with Both HTLV-I-associated Myelopathy and Adult T-Cell Leukemia. **Cancer Research**. 53, 6067-6073, 1992.

WATTEL, E.; VARTANIAN, J. P.; PANNETIER, C.; WAIN-HOBSON, S. Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type I-infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. **Journal of Virology**. 69(5), 2863-2868. 1995.

MALIK, K. T.; EVEN, J.; KARPAS, A. Molecular cloning and complete nucleotide sequence of an adult T cell leukaemia virus/human T cell leukaemia virus type I (ATLV/HTLV-I) isolate of Caribbean origin: relationship to other members of the ATLV/HTLV-I subgroup. **J Gen Virol**. 69, 1695-1710, 1988.

GRAY, G. S.; WHITE, M.; BARTMAN, T.; MANN, D. Envelope gene sequence of HTLV-1 isolate MT-2 and its comparison with other HTLV-1 isolates. **Virology**. 177: 391-395. 1990.

SWITZER, W. M.; PIENIAZEK, D.; SWANSON, P.; SAMDAL, H. H.; SORIANO, V.; KHABBAZ, R. F.; KAPLAN, J. E.; LAL, R. B.; HENEINE, W. Phylogenetic relationship and geographic distribution of multiple human T-cell lymphotropic virus type II subtypes. **J Virol.** 69: 621-632. 1995.

DAENKE, S.; NIGHTINGALE, S.; CRUICKSHANK, J. K.; BANGHAM, C. R. Sequence variants of human T-cell lymphotropic virus type I from patients with tropical spastic paraparesis and adult T-cell leukemia do not distinguish neurological from leukemic isolates. **J Virol.** 64: 1278-1282. 1990.

GESSAIN, A.; MAHIEUX, R.; DE THE, G. Genetic variability and molecular epidemiology of human and simian T cell leukemia/lymphoma virus type I. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.** 13 Suppl 1: 132-145. 1996.

SANTOS, F. L. N.; LIMA, F. W. M. Epidemiology, physiopathogenesis and laboratorial diagnosis of the HTLV-I infection. **J Bras Patol Med.** Lab41:105-16. 2005.

KORALNIK, I. J.; LEMP, J. F.; GALLO, R. C.; FRANCHINI, G. In vitro infection of human macrophages by human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I (HTLV-I). **AIDS Res Hum Retroviruses.** 8:1845-1849, 1992.

KORALNIK, I. J.; FULLEN, J.; FRANCHINI, G. The p12I, p13II, and p30II proteins encoded by human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I open reading frames I and II are localized in three different cellular compartments. **J Virol.** 67:2360-2366, 1993.

FUKUMOTO, R.; ANDRESEN, V.; BIALUK, T. In vivo genetic mutations define predominant functions of the human T-cell leukemia/lymphoma virus p12I protein. **Blood.** 113:3726-3734, 2009.

NERURKAR, V. R.; BABU, P. G.; SONG, K. J.; MELLAND, R. R.; GNANAMUTHU, C.; SARASWATHI, N. K.; CHANDY, M.; GODEC, M. S.; JOHN, T. J.; YANAGIHARA, R. J. **Gen Virol.** Dec;74 2799-805. 1993.

LIU, B.; HONG, S.; TANG, Z.; YU, H.; GIAM, C. Z. **Proc Natl Acad Sci. U S A.** Jan 4;102(1):63-8. Epub Dec 27. 2004.

ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO (TCLE)



ANEXO I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE

Título: Diversidade genética do *Vírus Linfotrópico de células T humanas* do tipo 1 na região metropolitana de Belém

O texto abaixo busca prestar esclarecimentos sobre o estudo envolvendo pacientes atendidos no Núcleo de Medicina Tropical.

O *Vírus Linfotrópico de células T humanas* 1 e 2 (HTLV 1 e 2) pode provocar doenças no sistema nervoso que podem levar a paralisia nas pernas, impotência, perdas no controle urinário entre outros sintomas, além de estar associado a casos de Leucemia/Linfoma (tipo raro de câncer). A transmissão familiar se dá através do contato sexual (homem e mulher) ou aleitamento materno (da mãe para o filho). Esta pesquisa tem como objetivo avaliar a transmissão familiar do HTLV em pacientes e seus familiares atendidos no Núcleo de Medicina Tropical (NMT).

Caso você aceite participar, será coletado um pouco de sangue por profissionais treinados para este tipo de trabalho, para que não ocorra nenhum problema durante a coleta.

Posteriormente, nessa amostra de sangue, será investigada a presença do vírus, que será realizada em laboratório especializado da Universidade Federal do Pará (UFPA). Os exames realizados pela pesquisa serão gratuitos, não necessitando nenhum custo por parte do sujeito da pesquisa.

Os casos positivos para a infecção serão orientados e convidados para o acompanhamento clínico-ambulatorial e laboratorial no Núcleo de Medicina Tropical/UFPA, onde serão esclarecidos sobre as formas de se evitar a transmissão do HTLV e sobre as principais doenças relacionadas.

Todas as informações coletadas serão mantidas em sigilo, assegurando o anonimato dos participantes, para evitar qualquer dano moral, uma vez que serão utilizados apenas pelos pesquisadores.

Fica claro que o sujeito da pesquisa ou o seu representante legal, pode a qualquer momento, retirar seu consentimento, que esta pesquisa não apresenta nenhum tipo de ônus para o sujeito da pesquisa e que sua desistência em nada comprometerá o atendimento deste sujeito aos serviços oferecidos pela equipe do projeto.

Consentimento:

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

Belém, / / 2010.

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável

Akim Felipe Santos Nobre
(Pesquisador responsável)

Endereço: Cidade Nova IX WE 4B, nº 71- Ananindeua-PA; Fone: (91) 81495864; 32352400
Ambulatório do Núcleo de Medicina Tropical: Av. Generalíssimo Deodoro, nº 92, Umarizal;
Fone:32016812.

Belém / / 2010

ANEXO 2- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA NMT/UFPA