

# Caracterização molecular do HTLV-1 em pacientes com paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 em Belém, Pará

Molecular characterization of HTLV-1 among patients with tropical spastic paraparesis/HTLV-1 associated myelopathy in Belém, Pará

Lucinda A. Souza<sup>1</sup>, Ivina G.L. Lopes<sup>1</sup>, Eduardo Leitão Maia<sup>2</sup>, Vânia N. Azevedo<sup>1</sup>, Luiz Fernando A. Machado<sup>1</sup>, Marluísa O.G. Ishak<sup>1</sup>, Ricardo Ishak<sup>1</sup> e Antonio Carlos R. Vallinoto<sup>1</sup>

## RESUMO

*O presente estudo avaliou a ocorrência da infecção pelo HTLV-1 e seus subtipos em amostras de sangue de pacientes com diagnóstico clínico de paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1. A detecção da infecção pelo HTLV realizou-se através de testes sorológico e molecular. Cinco amostras estavam infectadas pelo HTLV-1 do subtipo Cosmopolita, subgrupo Transcontinental. Os resultados obtidos confirmam a ocorrência de infecção pelo HTLV-1 em pacientes com diagnóstico clínico de paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 em Belém, Pará.*

**Palavras-chaves:** Paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1. Caracterização molecular.

## ABSTRACT

*The present study evaluated the occurrence of HTLV-1 and its subtypes in blood samples of patients presenting symptoms of tropical spastic paraparesis/HTLV-1 associated myelopathy. The detection of HTLV infection was performed by serological and molecular assays. Five patients were infected by HTLV-1 of the Cosmopolitan subtype, subgroup Transcontinental. The results confirm the occurrence of HTLV-1 infection among patients with clinical diagnosis of tropical spastic paraparesis/HTLV-1 associated myelopathy in Belém, Pará.*

**Key-words:** Tropical spastic paraparesis/HTLV-1 associated myelopathy. Molecular characterization.

O vírus linfotrópico de células T humanas 1 (HTLV-1) é um retrovírus associado a patologias humanas como leucemia/linfoma de células T do adulto (LLcTA) e paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV (PET/MAH)<sup>17</sup>. O HTLV-1 tem sido também associado a casos de polimiosite, poliartrite e uveíte<sup>12 13 14 15</sup>.

A paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV (PET/MAH) é uma doença desmielinizante crônica e progressiva associada à infecção pelo HTLV-1 e 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<sup>7 25</sup>.

Além disso, uma síndrome neurológica similar a PET/MAH tem sido descrita em raros pacientes portadores da co-infecção HIV-1/HTLV-2<sup>19</sup> e pelo menos um paciente infectado com HTLV-2 já foi identificado com uma doença neurodegenerativa progressiva crônica clinicamente indistinguível de PET/MAH<sup>6 21</sup>.

Embora a ocorrência de PET/MAH seja elevada em algumas áreas geográficas, até o presente momento são raras as informações acerca das características moleculares do HTLV-1 que possam justificar a ocorrência de apenas 1 a 5% dos indivíduos infectados apresentarem PET/MAH. Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar o perfil

1. Laboratório de Virologia, do Departamento de Patologia do Centro de Ciências Biológicas do Universidade Federal do Pará, Belém, PA. 2. Hospital Universitário João de Barros Barreto da Universidade Federal do Pará, Belém, PA.

**Endereço para correspondência:** Dr. Antonio Carlos R. Vallinoto. Rua Oliveira Belo 238/1002, Umarizal, 66050-380 Belém, PA.

Telefax: 55 91 3201-7587

e-mail: vallinoto@ufpa.br

Recebido para publicação em 31/01/2006

Aceito em 10/8/2006

molecular do HTLV-1 infectando pacientes apresentando sintomas de PET/MAH atendidos no Hospital Universitário João de Barros Barreto da Universidade Federal do Pará.

Dez pacientes apresentando distúrbios neurológicos, atendidos no Hospital Universitário João de Barros Barreto, foram submetidos a exames neurológicos. Cinco 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<sup>2</sup>.

Após o diagnóstico clínico, os pacientes foram encaminhados ao Laboratório de Virologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, onde alíquotas de sangue foram coletadas em tubos contendo EDTA, com posterior separação de plasma e de leucócitos (células mononucleadas do sangue periférico - PBMC), que foram congelados a -20°C até o momento do uso.

Os soros foram testados para a presença de anti-HTLV-1/2, usando-se um ensaio imunoenzimático, ELISA (*HTLV-1/2 Ab-Capture ELISA Test System, Ortho Diagnostic Systems Inc., USA*).

A extração de DNA foi realizada, a partir de PBMC das amostras sororreativas para anti-HTLV-1/2, usando-se o método de extração de DNA total, de acordo com o protocolo da *Puregene, Gentra Systems, Inc, USA*.

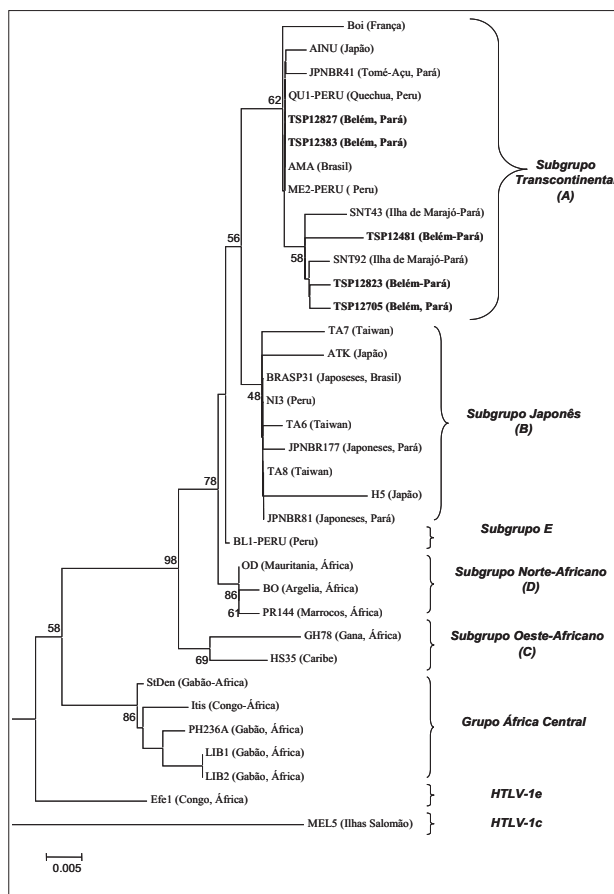
A reação de amplificação gênica foi efetuada em duas etapas (*nested PCR*), para a amplificação de 159pb da região pX do DNA proviral do HTLV-1/2, seguida da digestão enzimática com *TaqI* para a caracterização do tipo viral<sup>23</sup>. O subtipo viral foi determinado a partir das amostras caracterizadas como HTLV-1 utilizando-se uma *nested PCR* e o seqüenciamento 788pb do segmento 5'LTR como descrito previamente<sup>10</sup>.

Após a purificação do produto da região 5'LTR, o DNA foi submetido ao seqüenciamento automático usando-se o kit da *ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing (Perkin Elmer, USA)* usando-se o equipamento *ABI 373 DNA Sequencer (Perkin Elmer, USA)*.

O alinhamento das seqüências nucleotídicas da região 5'LTR, foi efetuada usando o programa *Clustal X*<sup>22</sup>. O grau de divergência genética, a partir das seqüências obtidas e o padrão do mapa de restrição foi determinado usando-se o programa *BioEdit 5.09v4*. O perfil filogenético das cepas foi realizado por meio do método de agrupamento de vizinhos (*Neighbor-Joining - NJ*) utilizando o modelo evolutivo de Kimura-2 parâmetros com o auxílio do programa *MEGA - Molecular Evolutionary Genetics Analysis* versão 3.1<sup>9</sup>. Para testar a confiabilidade da análise foram utilizadas 1.000 réplicas de *bootstrap*.

Das 10 amostras de pacientes investigadas, apenas cinco (50%) apresentaram sororeatividade para anti-HTLV-1/2. A análise de região pX identificou a infecção pelo HTLV-1. O seqüenciamento da região 5'LTR caracterizou as cepas como pertencentes ao subtipo Cosmopolita, subgrupo Transcontinental (Figura 1).

Com a análise das seqüências nucleotídicas foi possível verificar elevada similaridade entre as amostras e com



**Figura 1 - Árvore filogenética mostrando as relações das cepas do vírus linfotrófico de células T humanas descritas no presente trabalho (TSP18323, DQ897682; TSP12481, DQ897683; TSP12705, DQ897684; TSP12823, DQ897685 e TSP12827, DQ897686) com aquelas disponíveis no GenBank. A árvore foi construída por meio do método de Neighbor-Joining após o alinhamento de 410 nucleotídeos da região 5'LTR. A amostra Mel5 foi usada como grupo externo (outgroup). O suporte estatístico foi efetuado por meio do uso de 1.000 réplicas de bootstrap.**

amostras isoladas de pacientes assintomáticos, cujas seqüências estão descritas na literatura, não tendo sido determinado qualquer padrão molecular característico associado a PET/MAH. O mapa de restrição das amostras, obtido a partir da análise das seqüências nucleotídicas, demonstrou similaridade de 66,7% entre as mesmas.

Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam, por métodos moleculares, a ocorrência de infecção pelo HTLV-1 em pacientes portadores de diagnóstico clínico de PET/MAH em Belém (Pará) e corroboram achados sorológicos anteriores que descreviam a associação da infecção pelo HTLV-1 com PET/MAH na região<sup>5</sup> e no Brasil<sup>1 3 20</sup>.

A identificação de todas as amostras como pertencentes ao subtipo Cosmopolita, subgrupo Transcontinental, está de acordo com estudos anteriores que demonstram a maior freqüência deste subtipo viral em pacientes com PET/MAH no Brasil, o qual é predominante, também, em casos assintomáticos<sup>8 20</sup>. Ademais, esse subgrupo tem sido o único encontrado, até então, infectando indivíduos da área urbana e rural do Estado do Pará<sup>10 16</sup>, à exceção de imigrantes japoneses residentes em Tomé-Açu, onde o subgrupo Japonês também foi encontrado<sup>24</sup>.

Este subgrupo viral foi, também, encontrado em pacientes chilenos com PET/MAH<sup>18</sup>, o que corrobora estudos anteriores que relatam que a maioria das cepas de HTLV-1 isoladas da América do Sul pertence ao subgrupo Transcontinental<sup>11 26</sup>.

As comparações das seqüências nucleotídicas da região 5'LTR e do mapa de restrição entre as amostras com PET/MAH e entre estas com cepas isoladas de pacientes assintomáticos descritos na literatura, revelou elevada similaridade não havendo diferenças significativas que possam justificar a patogenicidade do vírus e, o fato de que apenas 0,2 a 5% dos indivíduos infectados desenvolvem a PET/MAH<sup>25</sup>. Contudo, somente um estudo envolvendo um número maior de indivíduos com diagnóstico desta patologia poderá confirmar ou não essa hipótese.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Castro LHM, Chaves CJ, Callegaro D, Nóbrega JPS, Scaff M. HTLV-I associated myelopathy in Brazil, a preliminary report. *Arquivos de Neuropsiquiatria* 47: 501-502, 1989.
- Castro-Costa CM, Araújo AQC, Menna-Barreto M, Penalva-de-Oliveira AC, Membros da Equipe Técnica do Programa Nacional de DST e AIDS do Ministério da Saúde. Guia de manejo clínico do paciente com HTLV: aspectos neurológicos. *Arquivos de Neuropsiquiatria* 63: 548-551, 2005.
- Castro-Costa CM, Vale OC, Goubau P, Desmyter J, Carton H. HTLV-I and tropical spastic paraparesis in Fortaleza (northeastern Brazil). *Journal of Tropical and Geographical Neurology* 1: 45-48, 1991.
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis, 1999.
- Ishak R, Cavalcante F, Vallinoto ACR, Azevedo VN, Ishak MOG. 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: 243-246, 2002.
- Jacobson S, Lehky T, Nishimura M, Robinson S, Mcfarlin DE, 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.
- Kaplan JE, Osame M, Kubota H, Igata A, Nishitani H, Maeda Y, Khabbaz RF, Janssen RS. The risk of development of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndrome and Human Retrovirology* 3: 1096-1101, 1990.
- Kashima S, Alcântara LCJ, Takayanagui OM, Carreto R, Galvão-Castro B, Covas DT. Phylogenetic analysis of Human T-cell lymphotropic viruses type I (HTLV-I). *AIDS Research and Human Retroviruses* 17 (supl 1): S38, 2001.
- Kumar S, Tamura K and Nei M. MEGA 3.1: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163, 2005.
- Laurentino RV, Lopes IGL, Azevedo VN, Machado LF, Moreira MR, Lobato L, Ishak MOG, Ishak R, Vallinoto ACR. 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: 371-376, 2005.
- Miura T, Fokunaga T, Igarashi T, Yamashita M, Ido E, Funahashi S, Ishida T, Washio K, Ueda S, Hashimoto K, Yoshida M, Osame M, Singhal BS, Zaninovic V, Cartier L, Sonoda S, Tajima K, Ina Y, Gojobori T, Hayami M. Phylogenetic subtypes of HTLV-I and the relations to the anthropological background. *Proceedings National Academic Science* 91: 1124-1127, 1994.
- Mochizuki M, Tajima K, Watanabe T, Yamaguchi K. Human T lymphotropic virus type I uveitis. *British Journal Ophthalmology* 78: 149-154, 1994.
- Mochizuki M, Yoshimura K, Shirao M, Watanabe T, Mori S, Araki S, Miyata N, Yamaguchi K, Takatsuki. HTLV-I uveitis (Abstract). *In: Anais do V International Conference on Human Retrovirology, HTLV, Kumamoto, Japão, p. W-23, 1992.*
- Morgan OStC, Rodgers-Johnson P, Mora C, Char G. HTLV-I and polymyositis in Jamaica. *Lancet* 2:1184-1187, 1989.
- Nishioka K, Nakajima T, Hasunuma T, Sato K. Rheumatic manifestation of human leukemia virus infection. *Rheumatic Diseases Clinics of North America* 19: 489-503, 1992.
- Pontes GS, Muto NA, Lopes IGL, Azevedo VN, Machado LFA, Ishak MOG, Ishak R, Vallinoto ACR. Seroepidemiology and molecular epidemiology of HTLV infection in rural and urban populations from the Amazon Region of Brazil. *Virus Review and Research* 8 (supl 1): 211, 2003.
- Proietti FA, Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares B, Murthy E. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene* 24: 6058-6068, 2005.
- Ramirez E, Cartier L, Villota C, Fernandez J. Genetic characterization and phylogeny of human T-cell lymphotropic virus type I from Chile. *Virus Research* 84: 135-149, 2002.
- Rosenblatt JD, Tomkins P, Rosenthal M, Kacena A, Chan G, Valderama R, Harrington Jr W, Saxton E, Diagne A, Zhao JQ. 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.
- Segurado ACC, Biasutti C, Zeigler R, Rodrigues C, Damas CD, Jorge MMSG, Machiori PE. 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: 329-333, 2002.
- Silva EA, Otsuki K, Leite AC, Alamy AH, Sá-Carvalho D, Vicente AC. HTLV-II infection associated with a chronic neurodegenerative disease: clinical and molecular analysis. *Journal of Medical Virology* 66: 253-257, 2002.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: 4876-4882, 1997.
- Vallinoto ACR, Ishak MOG, Azevedo VN, Vicente ACP, Otsuki K, Hall WW, 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 ACR, Muto NA, Pontes GS, Machado LFA, Azevedo VN, Santos SEB, Santos AKCR, Ishak MOG, 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: 156159, 2004.
- Vernant JC, Maurs L, Gessain A, Barin F, Gout O, Delaporte JM, 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.
- Yamashita M, Ido E, Miura T, Hayami M. Molecular epidemiology of HTLV-I in the world. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology* 13: S124-S131, 1996.