

IVANETE DO SOCORRO PINHEIRO DA SILVA

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO VÍRUS
LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS – HTLV 1/2
NO ESTADO DO AMAPÁ- BRASIL**

MACAPÁ-AP
2006

IVANETE DO SOCORRO PINHEIRO DA SILVA

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO VÍRUS
LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS – HTLV 1/2
NO ESTADO DO AMAPÁ- BRASIL**

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marluísa Ishak.

MACAPÁ-AP
2006

IVANETE DO SOCORRO PINHEIRO DA SILVA

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO VÍRUS
LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS – HTLV 1/2
NO ESTADO DO AMAPÁ- BRASIL**

Dissertação de mestrado aprovada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários pela Comissão formada pelos professores:

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marluísa de Oliveira Guimarães Ishak

Departamento de Patologia, UFPA

Prof. Dr. Ricardo Ishak
Departamento de Patologia, UFPA

Prof. Dr. Antonio Carlos Rosário Vallinoto
Departamento de Patologia, UFPA

Prof. Dr. Luiz Fernando Almeida Machado
Departamento de Patologia, UFPA

Prof^a. Dra. Karla Tereza Silva Ribeiro (suplente)
Departamento de Patologia, UFPA

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 RETROVÍRUS.....	11
1.1.1 Os retrovírus HTLV-1 e HTLV- 2.....	12
1.1.2 Histórico.....	12
1.2 BIOLOGIA DO HTLV-1 e HTLV-2.....	13
1.2.1 Aspectos Morfológicos do HTLV-1 e do HTLV-2.....	13
1.2.2 Organização Genômica do HTLV-1 E HTLV-2.....	14
1.2.3 Replicação Viral do HTLV-1 E HTLV-2.....	16
1.3 HETEROGENEIDADE GENÉTICA DO HTLV-1 e HTLV-2...	18
1.4 HTLV-1 e DOENÇA.....	19
1.5 HTLV-2 e DOENÇA.....	21
1.6 EPIDEMIOLOGIA DO HTLV-1 E HTLV-2.....	21
1.6.1 Mecanismos de Transmissão.....	21
1.6.2 Distribuição Geográfica do HTLV-1 e HTLV-2.....	23
1.6.2.1 Distribuição do HTLV-1 e HTLV-2 na África.....	24
1.6.2.2 Distribuição do HTLV-1 e HTLV-2 na Ásia.....	24
1.6.2.3 Distribuição de HTLV-1 e HTLV-2 na Europa.....	25
1.6.2.4 Distribuição de HTLV-1 e HTLV-2 nas Américas.....	25
1.7 OBJETIVOS.....	26

1.7.1	Objetivo Geral.....	26
1.7.2	Objetivos Específico.....	27
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
2.1	POPULAÇÕES EXAMINADAS E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	28
2.1.1	Comunidade Afro-descendente.....	29
2.1.2	Pacientes HIV/AIDS infectados.....	30
2.1.3	População atendida no LACEN/AP.....	30
2.2	SOROLOGIA.....	31
2.2.1	Técnica de <i>Western blot</i>	31
2.3	EXTRAÇÃO DO DNA.....	34
2.3.1	Lise Celular.....	34
2.3.2	Tratamento com RNase (opcional).....	35
2.3.3	Precipitação de Proteínas.....	35
2.3.4	Precipitação do DNA.....	35
2.3.5	Hidratação do DNA.....	36
2.4	REAÇÃO EM CADEIA MEDIADA PELA POLIMERASE (PCR).....	36
2.5.	PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DA PCR.....	36
3	RESULTADOS.....	38
3.1	SOROLOGIA.....	38
3.1.1	População de Indivíduos HIV/AIDS infectado.....	39
3.1.2	Comunidade Afro-descendente de Mazagão-Amapá.....	40
3.1.3	Pacientes atendidos no LACEN-AP.....	41

3.2	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....	44
4	DISCUSSÃO.....	46
5	CONCLUSÕES.....	50
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição por sexo e faixa etária de Indivíduos HIV/AIDS infectados – Amapá-Brasil.....	40
Tabela 2 – Distribuição por sexo e faixa etária de Afro-descendentes testados para HTLV 1 e 2, provenientes do município de Mazagão – Amapá-Brasil.....	41
Tabela 3 – distribuição por sexo e faixa etária dos pacientes, testados para HTLV-1 e 2, pelo método ELISA, atendidos no LACEN– Amapá-Brasil.....	41
Tabela 4 – distribuição por sexo e faixa etária dos pacientes, testados para HTLV-1 e 2, pelo método <i>Western blot</i> , atendidos no LACEN– Amapá-Brasil.....	42
Tabela 5 – Distribuição dos casos positivos de HTLV-1 por faixa etária – LACEN/AP.....	43
Tabela 6 – Distribuição dos casos positivos de HTLV-1 do sexo feminino por faixa etária – LACEN/AP.....	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura morfológica do <i>HTLV</i>	14
Figura 2 – Interação entre o HTLV e a célula.....	16
Figura 3 – Representação esquemática do ciclo vital do HTLV-1.....	17
Figura 4 – Distribuição geográfica do HTLV-1.....	23
Figura 5 – Mapa do Estado do Amapá.....	28
Figura 6 – Mapa do município de Mazagão-AP.....	29
Figura 7: Número de casos diagnosticados de HTLV, em população de HIV/AIDS infectados, população afro-descendente e pacientes atendidos no LACEN-AP, utilizando o teste de ELISA.....	38
Figura 8 – Número de casos diagnosticados de HTLV, em indivíduos de HIV/AIDS infectados, população afro-descendente e Indivíduos atendidos no LACEN-AP, utilizando o teste de <i>Western blot</i>	39
Figura 9: Resultados do teste de <i>western blot</i> para HTLV-1/2 de pacientes atendidos no LACEN-AP.....	42
Figura 10: PCR.....	44
Figura 11: Digestão Enzimática.....	45
Figura 12: Digestão Enzimática pelas endonucleases Sac I e Dra I, das amostras positivas de indivíduos atendidos no LACEN-AP.....	45
Figura 13 – numero de casos de HTLV-1, em pacientes atendidos no LACEN, pelo método PCR.....	45

RESUMO

A distribuição geográfica da infecção pelo Vírus Linfotrófico de Células T HTLV 1/2 humanas 1 e 2 é ampla, porém existem áreas de maior endemicidade e também particularidades de acordo com o tipo de HTLV. O HTLV-1 apresenta maior soroprevalência no sudoeste do Japão, no Caribe, na América Central, nas diferentes regiões da América do Sul e nas porções centrais e ocidentais da África e Melanésia. Enquanto o HTLV-2 parece acometer grupos populacionais distintos, como as populações nativas de indígenas das Américas do Norte, Central e Sul, pigmeus da África Central, mongóis na Ásia e também usuários de drogas injetáveis. O trabalho realizado teve como objetivo descrever a epidemiologia molecular do HTLV em três populações distintas do estado do Amapá, que foram: pacientes HIV/AIDS infectado, população afro-descendente e finalmente indivíduos atendidos no Laboratório Central de Saúde Pública do Amapá (LACEN-AP), encaminhados para diagnóstico de HTLV. As amostras foram avaliadas para a presença do vírus por métodos sorológicos (ELISA e *Western blot*) e moleculares (amplificação gênica e caracterização de segmentos das regiões *pX* e *env* pela análise de polimorfismo de fragmentos de restrição por ação de endonuclease. Os resultados obtidos nas diferentes populações foram na população de indivíduos infectados pelo HIV/AIDS, todas as amostras foram negativas, na população afro-descendente, apenas uma amostra apresentou positividade na sorologia pelo método de ELISA, porém foi negativa no *Western blot* e quando submetida ao método molecular, não houve amplificação. No entanto, entre os indivíduos encaminhados para diagnóstico de HTLV, 06 (seis) amostras foram positivas, e dessas, 05 (cinco) foram confirmadas por *Western blot* e pelo método molecular. O resultado molecular demonstrou a presença de HTLV-1.

ABSTRACT

The geographical distribution of the infection by human T-cell lymphotropic virus 1/2 – HTLV 1 / 2 is extensive, nevertheless, there are areas that are more endemic and have more particularities depending on the HTLV type. The HTLV 1 shows a bigger occurrence in south west of Japan, Caribbean, Central America, in different regions of South America and in parts of Central, as well as in western Africa, while HTLV-2, seems to assault distinct groups of people, such as Indians native people from North, Central and South America, Pigmies from Central Africa, Mongols in Asia as well as in infecting drug users. The present work had as objective describing HTLV molecular epidemiology, in three different populations the State of Amapá, they are: HIV/IDS positive patients, Afro-descenig population and individuals assisted of Public Health Center Laboratory of Amapá – LACEN-AP, directed for diagnosis of HTLV. The samples were tested for the presence of virus using serological (ELISA and Western blot) and molecular assays (gene amplification and restriction fragment length polymorphism from *pX* and *env* for the analysis of polimorfismo o restriction fragments for endonuclease action. The obtained results in different populations are In the population of HIV infected people, all the samples were negative; in the Afro-descending population, only one sample was positive confirmed by serological test (ELISA), but negative according to western blot test and submitted to the molecular analysis, there wast not amplification. However, among samples of individuals directed for diagnosis of HTLV, 06 (six) were positive, 5(five) out of 6/them were confirmed by western blot test. The molecular result demonstrated the presence of HTLV-1.

1 INTRODUÇÃO

1.1 RETROVÍRUS

Os retrovírus apesar de já serem conhecidos pela comunidade científica desde o século passado, só se tornaram notórios para o público leigo, a partir da descrição do *Vírus da Imunodeficiência Humana 1* (HIV-1) (Ishak *et al*, 2003).

Os retrovírus pertencem a família *Retroviridae*, e caracteriza-se por apresentarem um genoma constituído por duas moléculas iguais de RNA de cadeia simples, cuja transcrição do RNA viral é feito com o auxílio de uma DNA polimerase RNA- dependente, que é a transcriptase reversa, enzima que deu origem ao nome *Retroviridae*. De acordo com suas propriedades morfológicas, biológicas e de patogenicidade dos componentes do grupo, a família *Retroviridae* se divide em sete gêneros: *Alpharetrovirus*, *Betaretrovirus*, *Gammaretrovirus*, *Deltaretrovirus*, *Epsilonretrovirus*, *Lentivirus* e *Spumavirus*, e esses em subgêneros e espécies, de acordo com aspectos específicos da seqüência nucleotídica e da estrutura genômica dos diferentes agentes virais (Murphy, 1996).

Dentre os vírus pertencentes à família *Retroviridae*, que são patogênicos para o homem incluem-se os Vírus linfotrópico de células T humanas 1 e 2 (HTLV-1 e HTLV-2) e os Vírus da imunodeficiência humana tipos 1 e 2 (HIV-1 e HIV-2). O HTLV-1 e o HTLV-2 estão associados com distúrbios hematológicos e neurológicos, sendo classificados no gênero *Deltaretrovirus* (Murphy, 1996). O HIV-1 e o HIV-2 são os responsáveis pela síndrome da

imunodeficiência adquirida (SIDA/AIDS) humana, sendo classificados entre os *Lentivirus* (Gallo, 1991; Murphy, 1996).

1.1.1 Os Retrovírus HTLV-1 e HTLV- 2

O HTLV-1 e HTLV-2 provém de uma mesma família de retrovírus de mamíferos, que apresentam semelhanças biológicas e moleculares entre si (Hall *et al.*, 1994).

O HTLV-1 se apresenta endêmico em regiões geográficas definidas, e a infecção está associada à leucemia de células T de adultos (LTA), a malignidade de linfócitos T CD4⁺ maduros e à uma doença neurológica crônica conhecida como paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 (PET/MAH). A infecção pelo HTLV-2 tem distribuição endêmica em um número de populações ameríndias (Maloney *et al.*, 1992; Ishak *et al.*, 1995). A infecção tem se apresentado também em taxas altas entre os usuários de drogas em parte da América do Norte e na Europa. Embora as propriedades patogênicas e os aspectos clínicos associados à infecção pelo HTLV-2 ainda sejam pouco compreendidos, há evidências que apontam para uma relação entre a infecção e os distúrbios neurológicos semelhantes à PET/MAH e às doenças linfoproliferativas (Martin *et al.*, 1993; Murphy, E.L., 1996).

1.1.2 – Histórico

Em 1980, ocorreu o primeiro isolamento de um retrovírus humano, o Vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV), em um paciente com linfoma cutâneo de células T, nos EUA (POIESZ *et al.*, 1980).

Um ano após este achado, em 1981, um novo isolamento foi feito, o *Vírus da leucemia de células T de adultos (ATLV)* (Hinuma *et al.*, 1981). Semelhanças observadas entre o HTLV e o ATLTV fez suspeitar de que se tratava de um mesmo vírus, hipótese que foi confirmada em 1984 (Watanatabe *et al.*, 1984).

Em 1982, foi isolado um segundo tipo do HTLV (Kalyanaraman *et al.*, 1982). Estudos realizados demonstraram que apesar de possuírem relação, se constituíam em agentes distintos e foram descritos como HTLV-1e HTLV-2 (Hall *et al.*, 1994).

No Brasil, o HTLV-1 foi primeiramente descrito em 1986, por Kitagawa *et al.*, em uma comunidade japonesa residente em Campo Grande (MS), sendo a maioria dos indivíduos oriundos de Okinawa, sul do Japão (Kitagawa *et al.*, 1986).

Em 2005 , dois novos retrovírus foram descobertos o HTLV-3 e HTLV-4 na África Central. O HTLV-3 foi descoberto em 2 habitantes assintomáticos do Sul de Camarões, cujas amostras de soro apresentaram sorologias indeterminadas para HTLV. HTLV-4 foi descrita entre africanos caçadores de carne silvestre (Wolfe, 2005; Calattini *et al.*, 2005)

1.2 BIOLOGIA DO HTLV-1 e HTLV-2

1.2.1 – Aspectos Morfológicos do HTLV-1 e do HTLV-2

O HTLV mede aproximadamente 100nm de diâmetro e apresenta envelope lipoprotéico (Jawetz *et al.*, 1991; Coffin, 1996). O genoma viral é constituído por duas moléculas idênticas de RNA de fita simples, com polaridade positiva (Coffin, 1996).

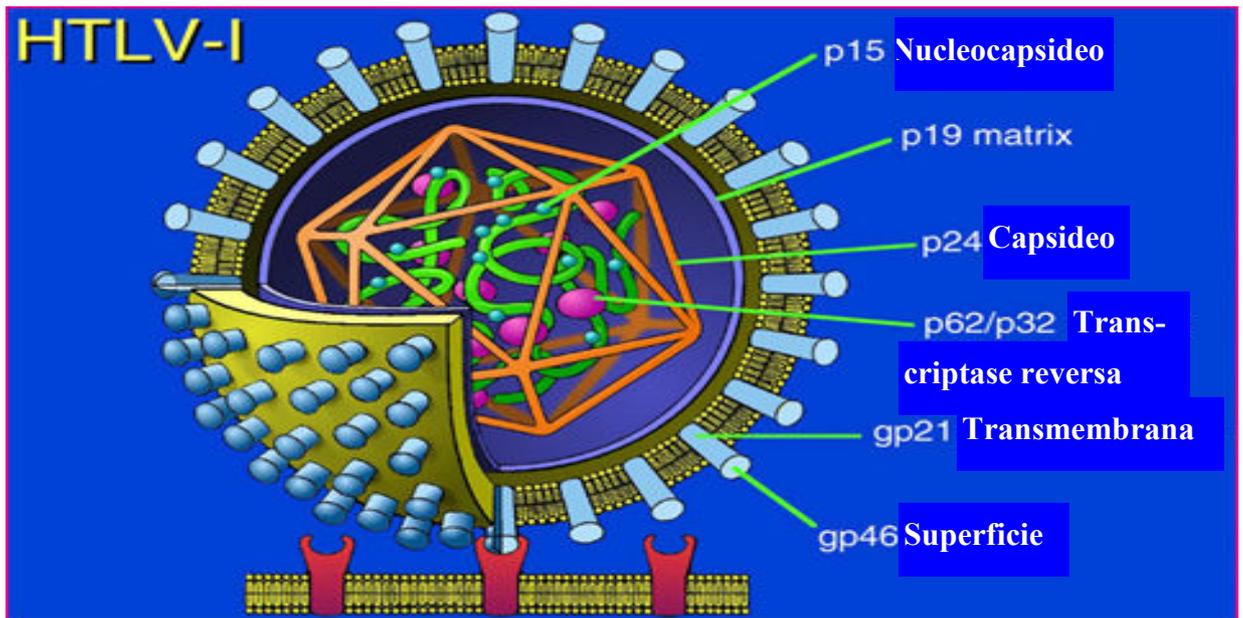


Figura 1 – Estrutura morfológica do HTLV
Fonte: www.bioon.com/biology/Microbiology/184243.shtml

O genoma diplóide de RNA de fita simples está envolvido por um envoltório protéico denominado de capsídeo, constituído pelas proteínas p15, p19 e p24 (Tangy, 1996). Denomina-se esse conjunto de elementos de nucleocapsídeo ou *core* (Hjelle, 1991). Encontram-se ainda, incluídas no *core*: a protease, a transcriptase reversa e a integrase que são enzimas de importância catalítica na replicação viral (Coffin, 1996). Na fase final de montagem do vírus, há adição de um invólucro lipoprotéico, cuja constituição base é a matriz lipídica da membrana plasmática da célula hospedeira associada às glicoproteínas virais, gp46 e gp21 (White & Fenner, 1994; Coffin, 1996; Tangy, 1996).

1.2.2 Organização Genômica do HTLV-1 E HTLV-2

O genoma viral do HTLV-1 e do HTLV-2 tem demonstrado uma similaridade na organização gênica (Germann *et al.*, 1984; Hall *et al.*, 1994). Os

retrovírus possuem três genes estruturais que são: *gag*, *env* e *pol* que são flanqueados por duas regiões conhecidas como *Long Terminal Repeats* - LTR, possuidoras de sítios de ligação para a RNA polimerase, bem como de seqüências reguladoras de transcrição viral (TATA box, *enhancers* e sinal poli-A (Shimotohno *et al.*, 1985).

As regiões *LTR* são formadas por três domínios exatamente iguais (U3-R-U5) em ambas as extremidades 5' e 3', porém apresentam função distinta de iniciador e de finalizador da transcrição, respectivamente (Gelmann *et al.*, 1984; Shimotohno *et al.*, 1985). O gene *gag* codifica uma proteína de 53.000 daltons (p53), que após clivagem proteolítica origina as proteínas estruturais p19, p24 e p15 (Yamamoto & Hinuma, 1988).

O gene *pol* codifica a transcriptase reversa, a RNase H e a integrase, as quais estão envolvidas na síntese do genoma viral e na integração do mesmo ao genoma da célula hospedeira (Ciminale *et al.*, 1992). A região codificadora da protease (*pro*), enzima viral responsável pela clivagem proteolítica das poliproteínas codificadas pelos genes *gag* e *pol*, está localizada de forma sobreposta aos genes *gag* e *pol* (Shimotohno *et al.*, 1985).

O gene *env* codifica as glicoproteínas externas do envelope, a gp 21 e a gp 46. O gene *pX* (extremidade 3') apresenta quatro estruturas de leitura aberta que codificam as proteínas reguladoras *Tax*, *Rex* (duas diferentes apresentações moleculares) e três outras proteínas com funções desconhecidas (Johnson *et al.*, 2001; Horal *et al.*, 1991; Hall *et al.*, 1994).

Além de possuírem os genes estruturais que são comuns entre os retrovírus, os *HTLV* apresentam uma região genômica designada de *pX*,

localizada entre o gene *env* e a região 3' *LTR*. Dentro dessa região, estão os genes *tax* e *rex* que codificam as proteínas Tax e Rex, respectivamente (Ciminale *et al.*, 1992).

A homologia do HTLV-1 e HTLV-2 varia de acordo com a região codificadora. Eles compartilham aproximadamente 85% das seqüências de nucleotídeos da região *gag*, mas apenas 65% do gene *env*. A região LTR tem sido utilizada para subtipar genotipicamente os dois tipos de *HTLV* (Gelmann *et al.*, 1984; Shimotohno *et al.*, 1985).

1.2.3 Replicação Viral do HTLV-1 E HTLV-2

A replicação do vírus inicia-se com a interação entre as glicoproteínas do envelope viral e receptores presentes na superfície celular resultando na entrada do nucleocapsídeo na célula, seguido da transcrição reversa do RNA genômico viral. A Fase seguinte é realizada pela maquinaria celular, caracterizada pelo processamento bioquímico e finalizada pela montagem das novas partículas virais (White & Fenner, 1994; Coffin, 1996).

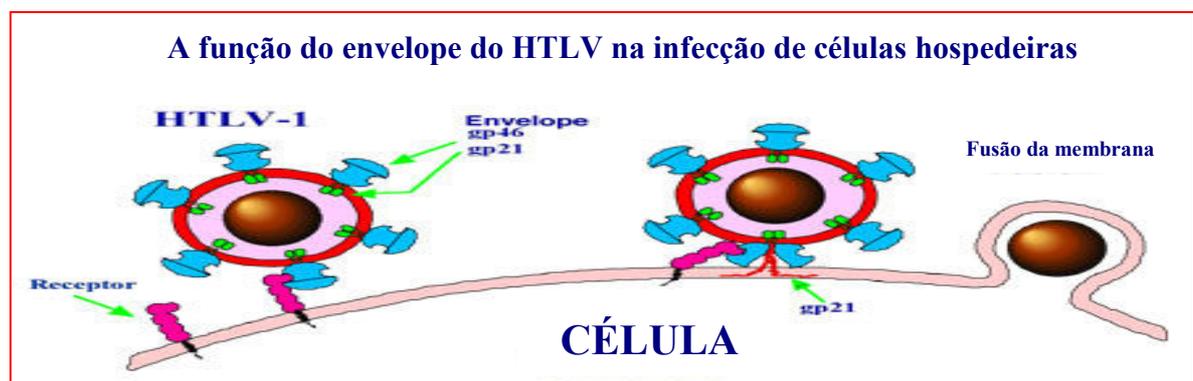


Figura 2 – Interação entre o HTLV e a célula
Fonte: www.dundee.ac.uk/biomedres/brighty.htm

Após a ligação da glicoproteína viral ao seu receptor celular, a entrada do vírus pode ocorrer pela fusão do envelope viral com a membrana da célula,

o que leva a descapsidização do vírus e à liberação do genoma viral no citoplasma (Tangy, 1996). Essa entrada do vírus pode ocorrer também por endocitose seguida de fusão de membrana (Voyles, 1993).

Após a liberação do ácido nucléico viral, a transcriptase reversa passa a agir na transcrição do RNA viral para DNA de fita dupla, com remoção adicional do RNA viral por meio da ação da ribonuclease H (RNase H) da própria transcriptase reversa (Voyles 1993).

Os retrovírus apresentam uma molécula de RNAt, que se encontra ligada à região 5' do RNA genômico, e a transcrição reversa começa se utilizando desse RNAt como iniciador (White & Fenner, 1994).

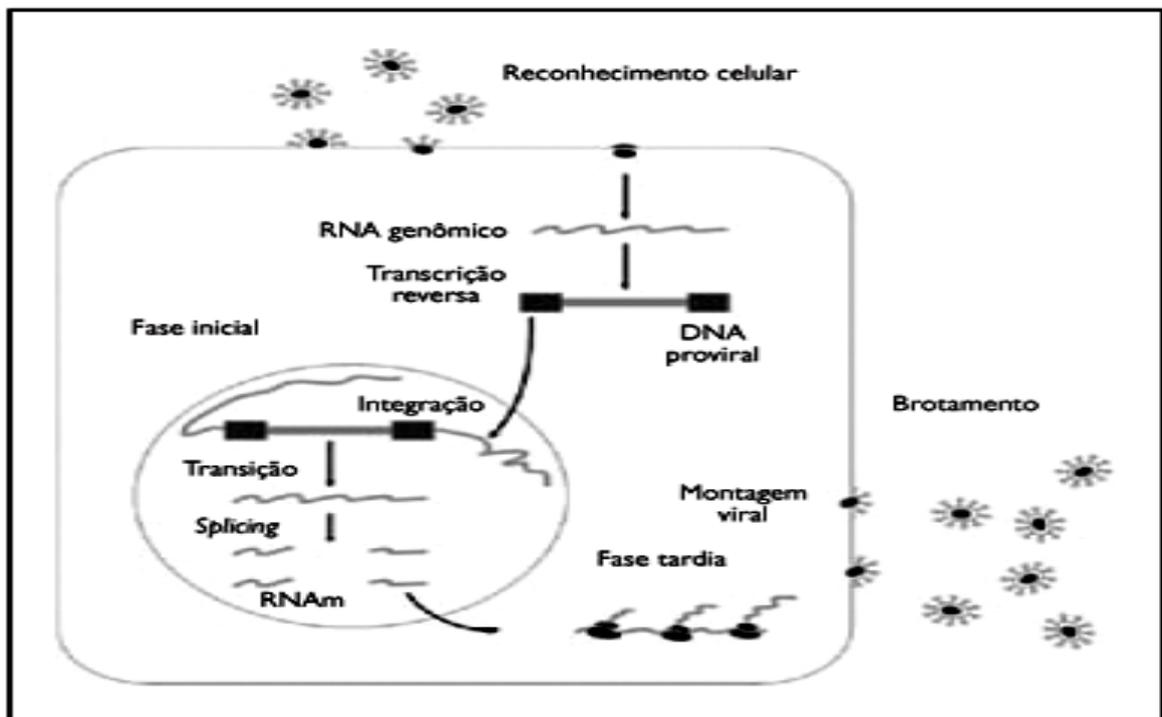


Figura 3 – Representação esquemática do ciclo vital do HTLV-1
Fonte: www.dundee.ac.uk/biomedres/brighty.htm

Para se obter o DNA de fita dupla, é necessário que a transcriptase reversa transcreva a segunda fita, agora a partir do molde de DNA. Esse

processo possui também um iniciador, que é uma seqüência de RNA, resistente à degradação pela RNase H durante a transcrição reversa, presente na extremidade 5' da região U3 (Coffin, 1996).

Ocorre em seguida a migração do DNA de fita dupla recém formado para o núcleo, que irá integrar-se ao genoma celular por ação da integrase viral; o mecanismo de transporte ainda não é conhecido e pode se dar de forma diferenciada entre os retrovírus (Tangy, 1996; Coffin, 1996).

Durante a fase de transcrição do DNA proviral, ocorre, simultaneamente, a formação de três tipos de RNAm: Um RNA subgenômico, com função de tradução das proteínas do envelope, um RNAm, com função de tradução das proteínas reguladoras Tax e Rex e finalmente, um RNA subgenômico longo, que servirá como fonte de tradução dos genes *gag*, *pro* e *pol*, e também como RNA genômico (Germann *et al.*, 1984; Shimotohno *et al.*, 1985; Ciminale *et al.*, 1992; Ferreira *et al.*, 1997).

A montagem do vírus e o brotamento ocorrem simultaneamente. As partículas virais são visualizadas como contornos crescentes na face interna da membrana celular, a qual estende-se até formar uma esfera envolta pela matriz lipídica da membrana, contendo as glicoproteínas virais. É devido a esse processo que a partícula viral imatura adquire o envelope (White & Fenner, 1994; Coffin, 1996; Tangy, 1996).

1.3 HETEROGENEIDADE GENÉTICA DO HTLV-1 e HTLV-2

O HTLV-1 apresenta seis subtipos genéticos principais baseados na origem geográfica do vírus, na comparação de seqüências e na análise

filogenética das regiões gp21 e LTR , os subtipos são: HTLV-1a (subtipo Cosmopolita), HTLV-1b (subtipo da África Central) HTLV-1c (subtipo Austrália Melanésia) HTLV-1d (subtipo Nova África Central), HTLV-1e e HTLV-1f (Miura *et al.*, 1994; Ureta-Vidal *et al.*, 1994; Van Doren *et al.*, 2001). Similarmente o HTLV-2 tem quatro subtipos moleculares 2a, 2b, 2c e 2d (Hall *et al.*, 1992; Ishak *et al.*, 1995, Vandame, 1998) .Esta heterogeneidade genética dentro do HTLV-1 e do HTLV-2 fornece informações valiosas relacionadas à transmissão viral (Hall *et al.*, 1994; Ishak *et al.*, 1995; Slaterry *et al.*, 1999; Vandamme *et al.*, 1998).

O HTLV-2 demonstrou, inicialmente, dois padrões de diferenciação intimamente relacionados, designados de HTLV-2a e HTLV-2b (Hall *et al.*, 1992; Dube *et al.*, 1993). O padrão 2a pode ser obtido pela clivagem de um produto amplificado do gene *env*, com o uso da enzima de restrição *XhoI* (Hall *et al.*, 1992; Ishak *et al.*, 1995; Eiraku *et al.*, 1996).

Ishak *et al.* (1995) e Eiraku *et al.* (1996), propuseram a ocorrência de um terceiro subtipo, denominado de HTLV-2c, entre os índios Kayapó e os usuários de drogas injetáveis do Brasil, respectivamente.

Um outro subtipo, denominado HTLV-2d, foi isolado a partir de um único indivíduo da tribo pigmeia Efe Bambuti, no Congo (Vandamme *et al.*, 1998).

1.4 HTLV-1 e DOENÇA

O HTLV-1 tem sido relacionado com a leucemia e linfoma de células T do adulto (LcLTA) (Takatsuki *et al.*, 1985).

A taxa de incidência de LcLTA é relativamente maior nos homens do que nas mulheres e a faixa etária média onde ocorre a doença é aproximadamente 55 anos. Das pessoas infectadas pelo HTLV-1, apenas 0,01 a 0,1% desenvolvem a LcLTA, que possui um período de incubação de 17 a 40 anos (Kawano *et al.*, 1984; Kim & Durak, 1988; Yamamoto & Hinuma, 1988).

A LcLTA é classificada em três formas clínicas diferentes: leucêmica aguda, crônica e forma linfomatosa. A ATL típica é encontrada nas formas agudas e linfomatosas, sendo uma neoplasia maligna de linfócitos T diferenciados caracterizada por lesões cutâneas, linfadenopatia, envolvimento visceral, circulação anormal de linfócitos, hipercalcemia e lesões ósseas (Bunn, Jr. *et al.*, 1983; Kim e Durak, 1988).

Dentre as associações do HTLV-1 com outras doenças, uma tem recebido especial atenção, que é uma doença neurológica degenerativa caracterizada por paraparesia espástica progressiva, incontinência urinária e distúrbios sensoriais. Esta Síndrome foi primeiramente descrita por Gessain *et al.* (1985), a partir de investigações realizadas na Martinica, e recebeu a denominação de Paraparesia Espástica Tropical (TSP). Em seguida, sua presença foi confirmada no Japão, sendo proposto alternativamente, o termo Mielopatia associada ao HTLV-1 (MAH), por sua ocorrência também em área de clima temperado (Osame *et al.*, 1986).

No Brasil, alguns trabalhos relatam casos suspeitos de TSP/MAH em várias regiões do país (Takayanagui *et al.*, 1991; Almeida *et al.*, 1994; Moreira *et al.*, 1994).

1.5 HTLV-2 e DOENÇA

O HTLV-2 foi isolado em 1982, primeiramente, de um paciente com leucemia, considerada benigna, que é a leucemia de células pilosas (Kalyanaraman *et al.*, 1982 *apud* Rosenblatt *et al.*, 1986). Em 1982, um segundo isolamento foi realizado a partir de um outro caso com características clínicas distintas.

Embora a infecção pelo HTLV-2 tenha demonstrado ter caráter benigno, há evidências crescentes de que o vírus possa apresentar-se como agente etiológico em doenças neurológicas e hematológicas (Murphy, 1993; Hall *et al.*, 1994; Murphy *et al.*, 1999).

Existem vários relatos que descrevem uma associação da infecção pelo HTLV-2 com distúrbios neurológicos similares a PET/MAH (Hjelle *et al.*, 1992; Harrington *et al.*, 1993; Murphy *et al.*, 1993; Sheremata *et al.*, 1993; Murphy *et al.*, 1999).

Estudos demonstraram que o HTLV-2 possui um tropismo preferencial pelo linfócitos T CD8⁺. Esta associação foi observada inicialmente em um paciente com leucemia linfocítica granular (Loughran *et al.*, 1992) e em outro com linfocitose granular. Neste último caso, a análise revelou que o provírus do HTLV-2 estava integrado apenas nos linfócitos T CD8⁺ (Martin, 1993).

1.6 EPIDEMIOLOGIA DO HTLV-1 E HTLV-2

1.6.1 Mecanismos de Transmissão

A transmissão atual de HTLV-1/2 varia de acordo com o contexto geográfico e com certos fatores de comportamento de risco associados com a

disseminação através do sangue (uso de drogas injetáveis e transfusão de hemoderivados) e outros fluidos biológicos trocados durante as relações sexuais (Hall *et al.*, 1996).

A infecção por HTLV-1 pode ocorrer tanto por transmissão vertical como horizontal. Na transmissão vertical, mãe para filho, tem fundamental importância o aleitamento materno prolongado. A probabilidade de isto acontecer é de 18% a 30% (Bittencourt, 1998; Hall *et al.*, 1996; Vrieling & Reesink, 2004).

A transmissão pela via hematogênica tem sido relevante na disseminação do HTLV-2 em áreas urbanas entre os usuários de drogas intravenosas e entre os doadores de sangue (Casseb *et al.*, 1997; Egan *et al.*, 1999). Embora a infecção pelo HTLV-1 esteja presente entre os usuários de drogas intravenosas, estudos mostraram uma maior prevalência do HTLV-2 entre esse grupo (Lee *et al.*, 1989; Egan *et al.*, 1999).

A transmissão vertical tem sido descrita como uma das principais formas de transmissão do HTLV-2 em várias populações humanas, embora estudos tenham demonstrado que essa transmissão está relacionada principalmente ao aleitamento materno (Kaplan *et al.*, 1992; Caterino-de-Araújo & De los Santos-Fortuna, 1999).

Ishak *et al.* (1995) encontraram entre seis aldeias Kayapó, no Pará, Brasil, uma alta prevalência (33%) do HTLV-2, sendo as altas taxas entre as crianças com menos de 9 anos (20%) e os idosos acima de 60 anos (60%), sugerindo que a via sexual e o aleitamento materno são as principais formas de transmissão do vírus nesse grupo populacional.

1.6.2 Distribuição Geográfica do HTLV-1 e HTLV-2

As infecções pelo HTLV estão distribuídas em todo os lugares do mundo, porém existem áreas de maior endemicidade, além de particularidades próprias do tipo de HTLV considerado. Desta forma o HTLV-1 apresenta prevalência elevada no Sudoeste do Japão, nas Ilhas do Caribe, na América Central, na América do Sul, nas regiões da África Equatorial e Melanésia (Murphy, 1990). No que diz respeito ao HTLV-2 a infecção parece acometer grupos populacionais distintos e aparentemente não relacionados entre si, habitando diversas regiões geográficas. De um lado, as populações nativas de indígenas das Américas do Norte, Central e do Sul, pigmeus da África Central e Mongóis da Ásia e, de outro, os usuários de drogas injetáveis nos Estados Unidos, em países europeus e em países asiáticos, como o Vietnã (Robert-Guroff *et al.*, 1986; Erlich *et al.*, 1989, Lee *et al.*, 1989; Heneine *et al.*, 1991; Maloney *et al.*, 1992; Hall *et al.*, 1994; Ishak *et al.*, 1995; Gessain & De Thé, 1996; Taylor, 1996; Góngora-Biachi *et al.*, 1997; Fukushima *et al.*, 1998; Salemi *et al.*, 1998; Egan *et al.*, 1999; Fujiyoshi *et al.*, 1999).

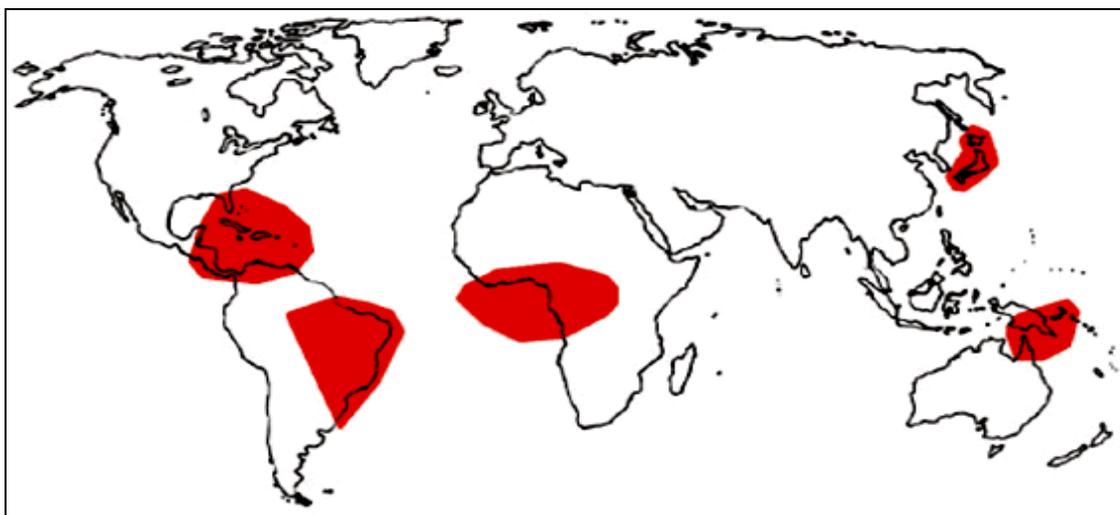


Figura 4 – Distribuição geográfica do HTLV-1

Fonte: www.google.com.br/imgres?imgurl=http://www.geografiaparatodos.com.br/img/mapasm/

1.6.2.1 Distribuição do HTLV-1 e HTLV-2 na África

Poucos estudos têm sido levados a cabo nas últimas décadas na África, e o número de indivíduos testados são limitados. Na Etiópia, doadores de sangue, a maioria sendo doadores de reposição, e vários outros grupos da população foram infectados igualmente com HTLV-1 ou HTLV-2 (1,9% e 2,5%, respectivamente) (Vrieling *et al.*, 1995; Vrieling & Reesink, 2004).

A presença do HTLV-2b na África Central sugere que algumas populações de pigmeus, tem sido durante anos, um reservatório desse subtipo viral (Gessain *et al.*, 1995). Por outro lado, os achados do HTLV-2a em prostitutas sugerem que este subtipo viral foi introduzido recentemente na África, por meio do comércio do sexo (Gessain & Thé, 1996).

1.6.2.2– Distribuição do HTLV-1 e HTLV-2 na Ásia

Na China, um número limitado de doadores de sangue e indivíduos aleatórios foram testados. Em um único estudo da região sul da China 0,15% de doadores apresentaram infecção para o HTLV-1. No Sul do Japão, 1,4% de doadores masculinos e 2,2% de doadores femininos apresentaram positividade para o HTLV-1. Na Coreia um predomínio alto de HTLV-1 (0,76%), foi observado em doadores de sangue na Ilha de Cheju, que está perto do sul do Japão. Em relação ao HTLV-2 a taxa de infecção no continente asiático, ao contrário do que se tem evidenciado para o HTLV-1, está a taxa de 3,12% (3/96) entre nativos da Mongólia, cuja análise molecular caracterizou como subtipo 2a (Hall *et al.*, 1994; Taylor, 1996; Vrieling & Reesink, 2004).

1.6.2.3 – Distribuição de HTLV-1 e HTLV-2 na Europa

No Continente Europeu a taxa de prevalência de HTLV-1 e HTLV-2 se apresenta baixa entre os doadores de sangue, porém sua taxa é elevada entre os usuários de drogas intravenosas (UDIV) (Taylor, 1996; Egan *et al.*, 1999).

As evidências de infecção pelos subtipos HTLV-2a e HTLV-2b em UDIV na Europa, reforçam a hipótese de que essa infecção pelo HTLV-2 seria provavelmente, originária da América do Norte (Vallejo *et al.*, 1996; Salemi *et al.*, 1998; Egan *et al.*, 1999).

1.6.2.4 – Distribuição de HTLV-1 e HTLV-2 nas Américas

Nos Estados Unidos doadores de sangue são rotineiramente testados sorologicamente para HTLV-1 e HTLV-2, e aproximadamente 0,009% apresentaram positividade para HTLV-1 e 0,022% para o HTLV-2 (Vrieling & Reesink, 2004).

No Brasil, a infecção por HTLV-1 e por HTLV-2, está presente em diferentes áreas geográficas como confirmada através de estudos soropidemiológicos na população em geral, assim como em grupos específicos como doadores de sangue e pacientes com doenças hematológicas e neurológicas (Andrada-Serpa *et al.*, 1989; Castro Costa *et al.*, 1989; Pombo-de-Oliveira *et al.*, 1990; Araújo *et al.*, 1993; Lessa *et al.*, 1993; Ferreira Jr. *et al.*, 1995; Farias de Carvalho *et al.*, 1997; Ishak *et al.*, 1998, 2002).

As análises realizadas no Brasil para se verificar a taxa de infecção por HTLV-1, revelaram ser elevadas o índice de infecção entre grupos de

populações que incluíam homens bissexuais, prostitutas, pacientes com SIDA/AIDS e hemofílicos. Além disso, foi observada uma prevalência entre subgrupos co-infectados pelo HTLV e HIV-1 (1% a 11%), indicando que esses retrovírus compartilham a rota sexual de transmissão (Cortes *et al.*, 1989; Vallinoto, 1998; Laurentino *et al.*, 2005;). A taxa de prevalência maior entre os pacientes com SIDA/AIDS está entre os que declararam ser usuários de drogas injetáveis, o que corrobora a importância da transmissão por meio de agulhas e seringas contaminadas (Moreira Jr. *et al.*, 1992).

O HTLV-2, no Brasil, apresenta distribuição geográfica com uma área endêmica dentro de grupos de população indígena da região Amazônica, muitas das quais ainda vivem em comunidades epidemiologicamente fechadas (Maloney *et al.*, 1992; Ishak *et al.*, 1995; Ishak, 2001; Ishak, 2003).

Alguns autores relatam uma elevada taxa de soropositividade da infecção pelo HTLV entre imigrantes de áreas endêmicas do Japão (Yamashita, 1999; Vallinoto, 2004). E também incidência em comunidades Afro-descendentes (Vallinoto, 2005).

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 Objetivo Geral

Descrever a epidemiologia molecular do Vírus linfotrópico de células T humanas do tipo 1 e 2 (HTLV-1 e HTLV-2) em três populações distintas, no estado do Amapá, que são: indivíduos infectados pelo HIV-1 e ou com SIDA/AIDS, comunidade Afro- descendente e pacientes atendidos no Laboratório Central de Saúde Pública- LACEN/AP.

1.7.2 Objetivos Específicos

- 1) Descrever a soroprevalência das infecções pelo HTLV-1 e HTLV-2 em pacientes com HIV-1 e/ou SIDA/AIDS; em comunidade Afro-descendente e em pacientes atendidos no Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Amapá – LACEN.
- 2) Identificar os subtipos de HTLV-1 e HTLV-2 circulantes entre pacientes infectados pelo HIV-1 e/ou SIDA/AIDS, em comunidades afrodescendentes e em pacientes atendidos no Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Amapá.
- 3) Levantamento da distribuição do HTLV por sexo e faixa etária.
- 4) Relacionar a Co-infecção *HIV/HTLV*, a contagem de linfócitos T CD4+ e T CD8+.
- 5) Relacionar a Co-infecção *HIV/HTLV* com a carga viral.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 POPULAÇÕES EXAMINADAS E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS



Figura 5 – Mapa do Estado do Amapá

Fonte: www.viajarmilhas.com/imagess/Amapa/mapa-do-amapa.JPG

Para a execução do presente estudo foram coletadas 356 amostras de sangue, de três populações distintas do Amapá, estado brasileiro situado a nordeste da região Norte. Tem como limites a Guiana Francesa ao Norte, Oceano Atlântico a leste, o Pará ao sul e oeste e o Suriname a noroeste. Ocupa uma área de 143.453,7 km². A capital é Macapá. As cidades mais populosas são Macapá e Santana (AMAPA.NET, 2003).

Das 356 amostras colhidas, 186 foram da comunidade afro-descendente de Mazagão município do Amapá; 140 amostras de indivíduos infectados pelo HIV-1 e/ou SIDA/AIDS; e 30 amostras de pacientes atendidos especificamente para diagnóstico de HTLV pelo LACEN-AP e a escolha dos pacientes teve como critério estar inserido em qualquer dessas três populações discriminadas

e que assinasse o termo de consentimento para que a pesquisa fosse realizada.

A coleta feita foi de 10 ml, sendo 5ml sem anticoagulante, a fim de que a fração separar o soro, para a realização da sorologia. E 5ml com anticoagulante, EDTA, para a separação do plasma e da fração celular (leucócitos), para processamento da reação em cadeia mediada pela polimerase (PCR).

Os soros foram cuidadosamente estocados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, devidamente identificadas e foram processadas no Laboratório de Saúde Pública do Amapá(Western Blot) e Universidade Federal do Pará (Sorologia e Caracterização Molecular).

2.1.1 Comunidade Afro-descendente

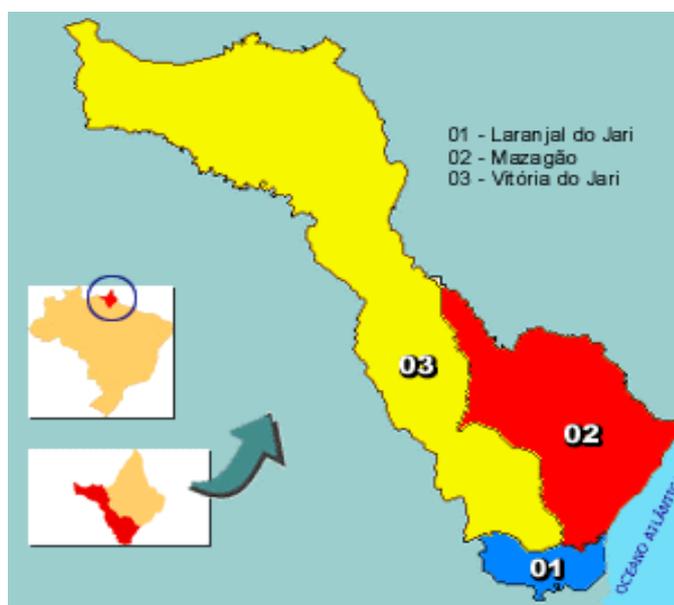


Figura 6 – Mapa do município de Mazagão-AP

Fonte: www.google.com.br/images?q=mapa+do+município+de+mazagao

Amostras de sangue foram colhidas de 186 indivíduos pertencentes a uma comunidade afro-descendente, do município de Mazagão, no estado do Amapá. Sendo 110 do sexo masculino e 76 do sexo feminino, com uma faixa etária compreendida entre 8 e 70 anos;

Mazagão é um município do estado do Amapá, que foi criado em 28 de novembro de 1890, distante 36 Km da capital. Comunidade isolada, sendo que sua origem remonta à história do povoado de Mazagão Velho, fundado em 1770 para abrigar 163 famílias portuguesas vindas da África, fugindo da guerra entre cristãos e mouros (AMAPÁ.NET, 2003).

2.1.2 – Pacientes *HIV/AIDS* infectados

Amostras de sangue de 140 pacientes infectados pelo HIV-1 e/ou SIDA/AIDS, atendidos no Laboratório Central de Saúde Pública do Amapá-LACEN/AP, residentes no estado do Amapá, foram testadas para verificar a co-infecção HIV-1/HTLV. Dentre os indivíduos analisados 71 eram do sexo masculino e 62 do sexo feminino, e a faixa etária compreendida foi de 1 a 64 anos;

2.1.3 – População atendida no LACEN/AP

30 amostras foram coletadas da população atendida pelo Laboratório Central de Saúde Pública do estado do Amapá-Brasil, especificamente para diagnóstico de HTLV. Sendo 16 do sexo masculino e 14 do sexo feminino e faixa etária compreendida entre 15 e 61 anos

2.2 – SOROLOGIA

Os soros serão testados para a presença de anticorpos para anti HTLV-1/2, usando-se um ensaio imunoenzimático, ELISA (*HTLV-I/II Ab-Capture Elisa Test System, Ortho Diagnostic Systems Inc., USA*). As amostras reativas serão submetidas à confirmação por *Western blot (HTLV Blot 2.4, GeneLab Diagnostics Ltd., Singapore)*.

2.2.1- Técnica de *Western blot*

1. Usando a pinça, retire cuidadosamente o número necessário de fitas do tubo e coloque-as em cada poço com a face numerada voltada para cima. Inclua fitas para controles reativo forte, reativo fraco e não reativo;
2. Adicione 2ml de solução tampão de lavagem diluída (20X – 1 volume de solução para 19 volume de água) a cada poço;
3. Incube as fitas durante pelo menos 5 minutos a temperatura ambiente (25 ± 3 °C) sobre uma plataforma oscilante (velocidade de 10 a 14 oscilações por minuto). Remova a solução tampão por aspiração;
4. Adicione 2ml de solução tampão para Blotting (Reconstituir o tampão estoque liofilizado com 100ml de água destilada, pipetar 20ml da solução estoque reconstituída para dissolver 1g de pó para Blotting, agite) a cada poço;
5. Adicione 20 μ l de cada soro de paciente ou de controle nos poços apropriados;

6. Cubra a bandeja com a tampa fornecida e incube durante 1h à temperatura ambiente (25 ± 3 °C) na plataforma oscilante;
7. Retire cuidadosamente a tampa, evitando salpicos ou misturar as amostras. Incline a bandeja para aspirar a mistura dos poços. Troque as ponteiros de aspiração entre as aplicações de amostras para evitar contaminação cruzada;
8. Lave cada fita três vezes com 2ml de solução de tampão de lavagem diluída deixando-as imersas durante 5 minutos sobre a plataforma oscilante, entre cada lavagem;
9. Adicione 2ml de solução de conjugado de trabalho a cada poço;
10. Cubra a bandeja e incube durante 1 hora à temperatura ambiente (25 ± 3 °C) na plataforma oscilante
11. Aspire o conjugado dos poços. Lave como na etapa 8;
12. Adicione 2 ml de Solução de Substrato a cada poço;
13. Cubra a bandeja e incube-a durante 15 minutos na plataforma oscilante;
14. Aspire o substrato e enxágüe as fitas pelo menos três vezes com água de qualidade reagente para interromper a reação;
15. Usando a pinça, retire cuidadosamente as fitas e coloque-as sobre toalhas de papel. Cubra com toalhas de papel e seque. Alternativamente, deixe as fitas secarem nos poços da bandeja;
16. Monte as fitas sobre folha de papel branco não absorvente. Não aplique fita adesiva sobre as bandas reveladas. Observe as bandas (Ver interpretação dos resultados) e interprete os resultados. Para armazenamento, conserve as fitas em local escuro.

▪ **Interpretação dos Resultados**

A banda de controle de soro serve como um controle da adição da amostra na prova. A ausência desta banda indica que não foi adicionado à fita nenhum soro de teste ou o conjugado ou o substrato, ou que ocorreram outros erros operacionais.

Localize e identifique as bandas nas fitas processadas com os controles reativos fortes. Estas fitas serão então usadas para identificar as bandas presentes nas fitas que contém as amostras sob teste.

PADRÃO	INTERPRETAÇÃO
Nenhuma reatividade com proteínas específicas do HTLV	SORONEGATIVO
Reatividade com moléculas modificadas pelo gene GAG (p19 com ou sem p24 e com duas codificadas ENV (GD21 e rgp46-I)	SOROPOSITIVO PARA HTLV-I
Reatividade com moléculas codificadas por GAG (p24 com ou sem p19) e com duas por ENV(GD21 e rgp46-II)	SOROPOSITIVO PARA HTLV-II0
Reatividade com moléculas codificadas por GAG (p19 e p24) e por ENV (GD21) Soropositivo para HTLV-I indicado se p19 ≥ p24 Soropositivo para HTLV-II indicado se p19 < p24	SOROPOSITIVO PARA HTLV*
Detecção de bandas específicas para o HTLV, mas que não preenchem os critérios de soropositividade para HTLV-I, HTLV-II ou HTLV	INDETERMINADO

No entanto, os seguintes padrões de bandeamento classificados como indeterminados podem ser interpretados como SORONEGATIVOS:

- Padrões de Western Blot com GAG do HTLV-I indeterminado (HGP) exibindo presença de p19, p26, p28, p32, p36, p53, porém ausência de p24 e de quaisquer proteína codificadas por ENV
- Quaisquer combinações de proteínas codificadas por GAG (p19, p26, p28, p32, p36, p53) porém ausência de p24 e de quaisquer proteínas codificadas por ENV

- Qualquer proteína de GAG sozinha (p19, p24, p26, p28, p32, p36, p53)
- Amostras soropositivas para HTLV nas quais não é possível fazer a tipagem podem ser melhor solucionadas usando o algoritmo de WiKtor *et al* na ausência de rgp46-I e de rgp46-II. Este algoritmo usa a reatividade relativa de p19 e de p24 e mostrou-se eficiente para diferenciar os dois sorotipos.
- A Interpretação como indeterminado baseia-se nas diretrizes da OMS de 1990. No entanto, vários estudos sugeriram que alguns padrões de bandas indeterminados (conforme indicado) podem ser interpretados como soronegativos, em especial quando provenientes de doadores de sangue sadios. Por exemplo, um estudo envolvendo 37.724 doadores de sangue sadios confirmou que HGIPs podem ser interpretados com segurança como sendo SORONEGATIVOS. No entanto, deve-se ter cautela quando os padrões indeterminados forem obtidos de usuários de drogas intravenosas ou de doadores de sangue de área endêmicas, assim como de pacientes com doenças neurológicas.

2.3 EXTRAÇÃO DO DNA

O método de extração de DNA, a partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) das amostras sororeagentes para *HTLV*, segue as instruções do fabricante (*Puregene, Gentra Systems, Inc., USA*), como se segue:

2.3.1 – Lise Celular

1. Adicionar 300 μ L de sangue total a um tubo *ependorf* com capacidade para 1,5 mL, contendo 900 μ L de solução de lise RBC. Homogeneizar por inversão e incubar por 10 minutos à temperatura ambiente;

2. Centrifugar por 20 segundos entre 13.000 e 16.000. Remover o sobrenadante com uma micropipeta, deixando ao fundo do tubo o sedimento de leucócitos com um resíduo de 10-20 μ L do líquido;
3. Agitar vigorosamente, em agitador mecânico, para resuspender o sedimento de células e facilitar a lise celular;
4. Adicionar 300 μ L de solução de lise celular e homogeneizar por pipetagem. É necessário a incubação a 37°C, caso seja possível visualizar aglomerados no sedimento.

2.3.2 – Tratamento com RNase (opcional)

1. Adicionar 1,5 μ L da RNase A às células lisadas;
2. Misturar a amostra por inversão (cerca de 25 vezes) e incubar a 37°C por 15 minutos.

2.3.3 – Precipitação de Proteínas

1. A amostra a ser analisada deve estar a temperatura ambiente;
2. Adicionar 100 μ L de solução de precipitação protéica ao lisado celular;
3. Agitar vigorosamente em agitador mecânico, em alta velocidade, por 20 segundos, objetivando uma total homogeneização;
4. Centrifugar entre 13.000 e 16.000 x g por 3 minutos. As proteínas precipitadas formarão um sedimento no fundo do tubo.

2.3.4 – Precipitação do DNA

1. Transferir o sobrenadante do tubo de *ependorf* contendo o DNA (deixando o precipitado no tubo) em um novo tubo de 1,5mL, contendo 300 μ L de isopropanol 100%;

2. Homogeneizar a amostra por inversão suave (cerca de 50 vezes).
3. Centrifugar entre 13.000 e 16.000 x g por 1 minuto. O DNA formará um precipitado branco visível a olho nu;
4. Desprezar o sobrenadante e secar o excesso com papel absorvente;
5. Adicionar 300 µL de etanol 70%. Inverter o tubo várias vezes para lavar o sedimento de DNA;
6. Centrifugar entre 13.000 e 16.000 x g por 1 minuto. Desprezar o etanol, cuidadosamente, evitando a perda do DNA;
7. Secar o excesso em papel absorvente e deixar a amostra secar ao ar por 15 minutos.

2.3.5 Hidratação do DNA

1. Adicionar 100 µL de solução de hidratação de DNA (concentração final de 100 µg/mL);
2. Deixar o DNA reidratar durante a noite (entre 12 e 16 horas) à temperatura ambiente;
3. Estocar entre 2-8°C. Posteriormente, alíquotas de DNA serão submetidas à reação em cadeia mediada pela polimerase, a PCR.

2. 4 REAÇÃO EM CADEIA MEDIADA PELA POLIMERASE (PCR)

A PCR realizada no termo-ciclador da *Perkin-Elmer Cetus Corp., USA*, permite a amplificação do DNA. E foi realizada em duas etapas (*Nested PCR*). Para amplificação das seguintes regiões genômicas: *pX*, *env* e *5 LTR*.

2.5. PURIFICAÇÃO DO PRODUTO DA PCR

O processo de purificação seguiu o protocolo da *QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Inc., USA)* como descrito abaixo:

1. Adicionar 5 volumes de tampão fosfato (200 μ L) a 1 volume (40 μ L) do produto da PCR e homogeneizar;
2. Colocar uma coluna *QIAquick* em um tubo coletor com capacidade para 2 mL e adicionar a mistura acima;
3. Centrifugar por 30-60 segundos a 30.000 x g;
4. Desprezar o conteúdo do tubo coletor e retornar a coluna *QIAquick* ao mesmo tubo;
5. Proceder a lavagem da coluna, adicionando 180 μ L de tampão de lavagem ao tubo contendo a coluna *QIAquick* e centrifugar por 30-60 segundos a 30.000 x g;
6. Desprezar o tampão de lavagem do tubo coletor. Centrifugar por mais 30 segundos a 30.000 x g;
7. Colocar a coluna *QIAquick* em um novo tubo coletor com capacidade para 1,5 mL;
8. Eluir o DNA, adicionando 30 μ L de Tris/HCl pH 8,5, 10 mM à coluna *QIAquick*; deixar 5 minutos à temperatura ambiente e em seguida, centrifugar por 30-60 segundos a 30.000 x g. Alternativamente, o DNA pode ser eluído em água deionizada estéril;
9. Após a eluição, o DNA purificado é quantificado no *GeneQuant II RNA/DNA Calculator*.

3 RESULTADOS

3.1 SOROLOGIA

De um total de 356 amostras, provenientes de 03 (três) populações distintas, 140 amostras são de pacientes HIV positivos; 186 amostras são de comunidade Afro descendentes e 30 amostras de pacientes atendidos no LACEN-AP, encaminhados especificamente para diagnóstico de HTLV. amostras colhidas dos pacientes HIV-1 positivos, nenhuma amostra foi soropositiva. Entre as amostras colhidas na comunidade afro-descendente apenas uma amostra foi positiva pelo método de ELISA, sendo negativa no teste confirmatório de *Western blot* (WB). Porém, na população de pacientes atendidos no LACEN-AP, detectou-se a presença de anticorpos em 06 (20%) amostras séricas, pelo método de ELISA.

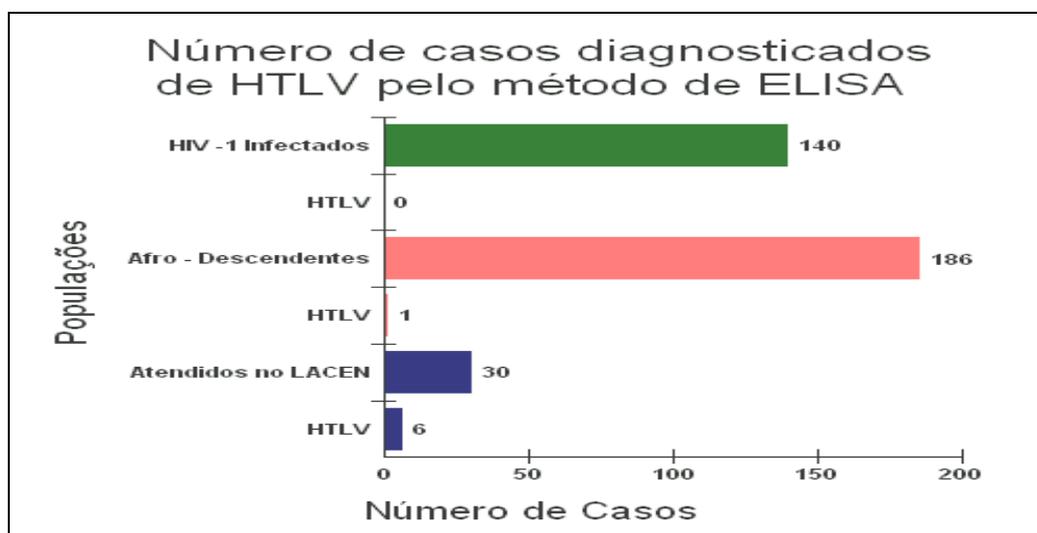


Figura 7: Número de casos diagnosticados de HTLV, em população de HIV/AIDS infectados, população afro-descendente e pacientes atendidos no LACEN-AP, utilizando o teste de ELISA
Fonte: LACEN-AP

As amostras positivas pelo teste de ELISA foram submetidas ao teste confirmatório de *WB*, sendo que a amostra positiva na população afro-

descendente foi negativa nesse método. E entre os indivíduos atendidos no LACEN, das 06 (seis) amostras positivas, apenas uma foi negativa, sendo portanto, 05 (cinco) amostras positivas pelo método *WB*, padrão I, 16,6% (Figura 8).

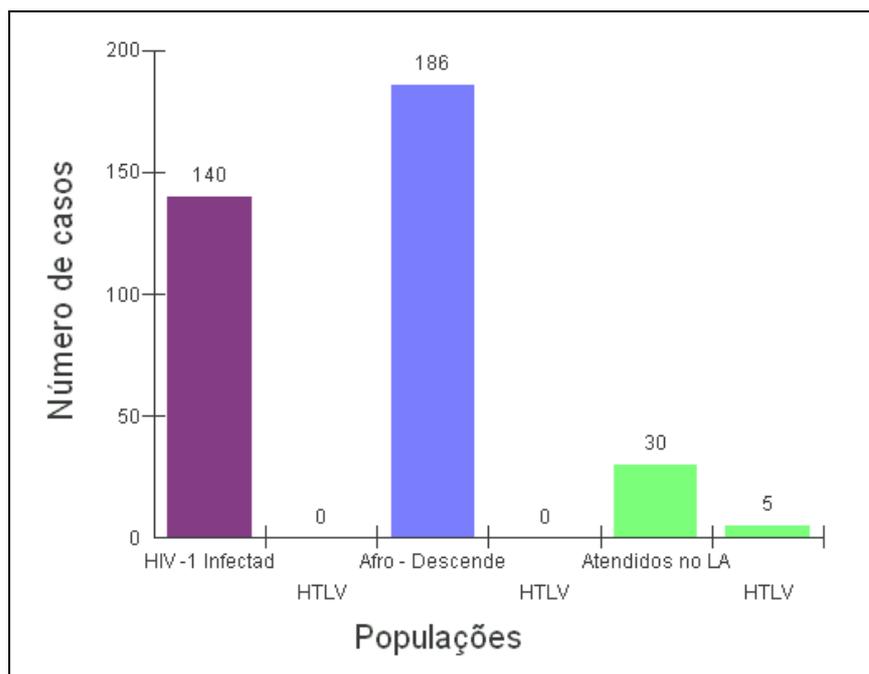


Figura 8 – Número de casos diagnosticados de HTLV, em indivíduos de HIV/AIDS infectados, população afro-descendente e Indivíduos atendidos no LACEN-AP, utilizando o teste de *Western blot*.
Fonte: LACEN/AP

3.1.1 População de Indivíduos HIV/AIDS infectado

Na população de indivíduos HIV-1 positivos, 140 amostras foram analisadas, sendo que nenhuma apresentou soropositividade para HTLV-1/2. Dos indivíduos analisados 71 eram do sexo masculino e 62 do sexo feminino, e a faixa etária compreendida foi de 1 a 64 anos, apresentando uma média de 32.5 (conforme Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição por sexo e faixa etária de Indivíduos HIV/AIDS infectados – Amapá-Brasil.

Faixa Etária	Masculino		Positivos		Feminino		Positivos		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
01 – 10	01	33.3	00	0	02	66.6	00	0	03	19.3
11 – 20	01	16.6	00	0	05	83.3	00	0	06	26.9
21 – 30	27	42.3	00	0	36	57.6	00	0	63	17.2
31 – 40	27	71.4	00	0	10	28.5	00	0	37	11.3
41 – 50	17	69.5	00	0	07	30.4	00	0	24	9.7
51 – 60	02	40.0	00	0	03	60.0	00	0	05	7.5
> 60	01	50.0	00	0	01	50.0	00	0	02	8.1
Total	76				64				140	100

3.1.2 Comunidade Afro-descendente de Mazagão-Amapá

Das 186 amostras de indivíduos afro-descendente analisados 110 eram do sexo masculino e 76 do sexo feminino, com uma faixa etária compreendida entre 8 e 70 anos, com média de 37.5. Sendo que o maior número de indivíduos analisados estava na faixa entre 16 e 25 anos (Tabela 2). Dessas amostras analisadas, apenas 01(uma) proveniente apresentou soro positividade pelo método de ELISA (1/186). Porém, quando foi submetida ao teste confirmatório de *Western blot*, a mesma apresentou reação negativa para o teste e também quando submetida à PCR, não apresentou positividade, sendo considerada negativa.

Tabela 2– Distribuição por sexo e faixa etária de Afro-descendentes testados para HTLV 1 e 2, provenientes do município de Mazagão – Amapá-Brasil.

Faixa Etária	Sexo									
	Masculino		Positivos		Feminino		Positivos		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
05 – 15	22	61.1	00	0	14	38.9	00	0	36	19.3
16 – 25	28	56.0	00	0	22	44.0	00	0	50	26.9
26 – 35	22	68.8	00	0	10	31.2	00	0	32	17.2
36 – 45	11	52.4	00	0	10	47.6	00	0	21	11.3
46 – 55	10	55.6	00	0	08	44.4	00	0	18	9.7
56 – 65	08	57.1	00	0	06	42.9	00	0	14	7.5
> 65	09	60.0	00	0	06	40.0	00	0	15	8.1
Total	110				76				186	100

3.1.3 Pacientes atendidos no LACEN-AP

A presença de anticorpos anti-HTLV 1/2, também foi pesquisada em 30 amostras de pacientes atendidos no LACEN-AP, sendo 16 do sexo masculino e 14 do sexo feminino e faixa etária compreendida entre 15 e 61 anos, com idade média de 38 anos. Dessas amostras 06(20%) foram repetidamente positivas pelo método de ELISA (Tabela 3 e Figura 7 e 8). Esses 06 (seis) pacientes soropositivos, foram submetidos a teste confirmatório de *Wb*, sendo obtido o seguinte resultado: 05 (16.6%) apresentaram soropositividade para HTLV-1 e apenas uma amostra foi negativa pelo teste confirmatório (Tabela 4 e Figura 7).

Tabela 3 – distribuição por sexo e faixa etária dos pacientes, testados para HTLV-1 e 2, pelo método ELISA, atendidos no LACEN– Amapá-Brasil.

Faixa Etária	Sexo									
	Masculino		Positivos		Feminino		Positivos		Total	

	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
15 – 25	02	40	00	0	03	60	01	33,3	05	17.9
26 – 35	04	57.1	01	33.3	03	42,9	00	0	07	25.0
36 – 45	05	62.5	00	0	03	37.5	00	0	08	28.6
46 – 55	01	0	01	33.3	03	100	02	66.7	04	7.1
56 – 65	02	50	00	0	02	50	01	50	04	14.3
66 – 75	02	100	00	0	00	00	00	0	02	7.1
Total	16				14				30	100

Tabela 4 – distribuição por sexo e faixa etária dos pacientes, testados para HTLV-1 e 2, pelo método *Western blot*, atendidos no LACEN– Amapá-Brasil.

Faixa Etária	Sexo									
	Masculino		Positivos		Feminino		Positivos		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
15 – 25	02	40	00	0	03	60	01	33,3	05	17.9
26 – 35	04	57.1	00	0	03	42,9	00	0	07	25.0
36 – 45	05	62.5	00	0	03	37.5	00	0	08	28.6
46 – 55	01	0	01	33.3	03	100	02	66.7	04	7.1
56 – 65	02	50	00	0	02	50	01	50	04	14.3
66 – 75	02	100	00	0	00	00	00	0	02	7.1
Total	16				14				30	100

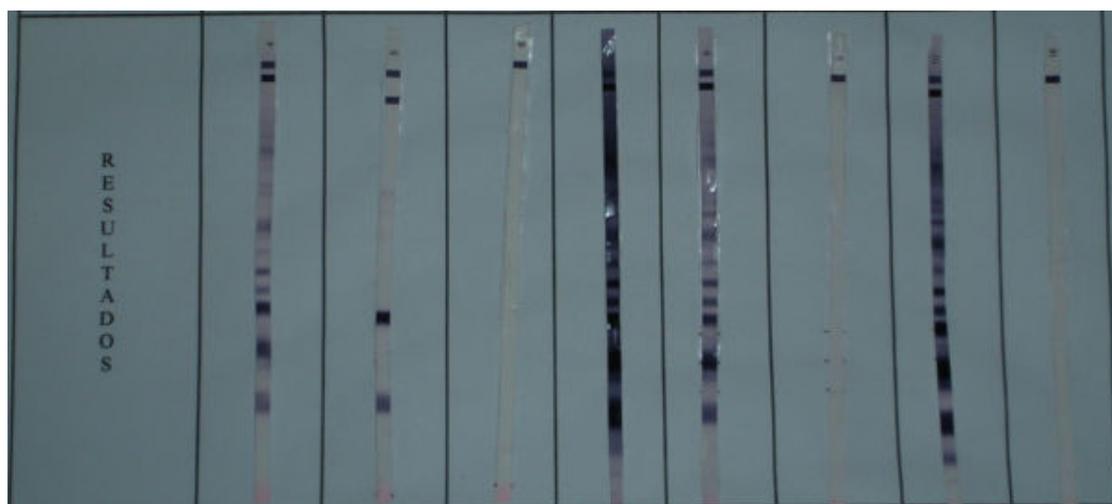


Figura 9: Resultados do teste de *western blot* para HTLV-1/2 de pacientes atendidos no LACEN-AP

Fonte: LACEN-AP

Portanto, a soroprevalência de anticorpos anti-HTLV-1 na população de pacientes atendidos no LACEN, foi de 16.6%, considerando o teste

confirmatório de *Wb* (Figura 9). A maior frequência foi de indivíduos do sexo feminino, 04(13.3%) e 01 do sexo masculino (3.33%) (Tabela 3)

Tabela 5 – Distribuição dos casos positivos de HTLV-1 por faixa etária – LACEN/AP

Classes	Xi	Fi	Percentual
15.0 – 25.0	20.0	1	20.00%
25.0 – 35.0	30.0	0	0.00%
35.0 – 45.0	40.0	0	0.00%
45.0 – 55.0	50.0	3	60.00%
55.0 – 65.0	60.0	1	20.00%
65.0 – 75.0	70.0	0	0.00%
TOTAL		5	100.00%

Tabela 6 – Distribuição dos casos positivos de HTLV-1 do sexo feminino por faixa etária – LACEN/AP

Classes	Xi	Fi	Percentual
15.0 – 25.0	20.0	1	25.00%
25.0 – 35.0	30.0	0	0.00%
35.0 – 45.0	40.0	0	0.00%
45.0 – 55.0	50.0	2	50.00%
55.0 – 65.0	60.0	1	25.00%
65.0 – 75.0	70.0	0	0.00%
TOTAL		5	100.00%

Os cinco indivíduos soropositivos (HTLV-1), diagnosticados pela técnica de *Western blot*, tiveram idades entre 22 e 61 anos, com idade média de 48.6. Sendo a taxa de positividade mais elevada entre a faixa de 46 a 55 anos (Tabela 4).

Entre os indivíduos soropositivos, apenas 02(dois), pertenciam à mesma família (marido e mulher). Os filhos desse casal até o momento da pesquisa ainda não haviam sido investigados.

Dos soropositivos 03(três) pacientes do sexo feminino apresentavam problemas hematológicos, inclusive com história de transfusão sangüínea, em 01 dos casos. E em 01 caso havia história de antecedente de óbito por Leucemia na família. Essa clínica apresentada pelos soropositivos e antecedentes, necessitam ser melhores investigados a posteriormente.

3.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

As foram submetidas a amplificação gênica pela Reação em Cadeia da Polimerase (PC). Foi realizada a digestão enzimática (região PX-Taql), onde as amostras positivas na PCR apresentaram um padrão de banda característico de HTLV-1 (figura 6). E foram submetidas a PCR para a região 5' LTR-1, e o produto foi submetido posteriormente, à digestão enzimática pelas endonucleases Sac I e Dra I, determinando que o subtipo de HTLV-1 circulante é do grupo Cosmopolita, subgrupo Transcontinental (Figura 7)

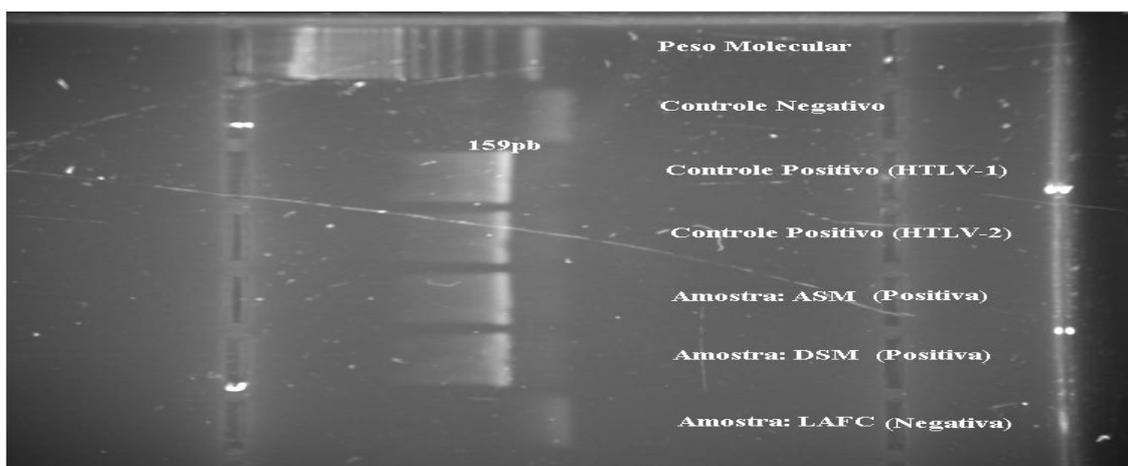


Figura 10: PCR
Fonte: LACEN/AP

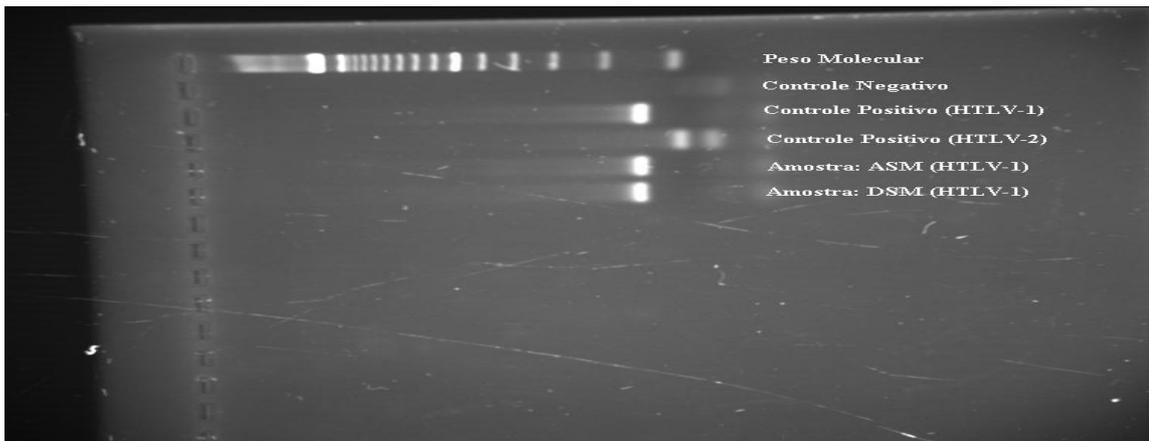


Figura 11: Digestão Enzimática
 Fonte: LACEN/AP

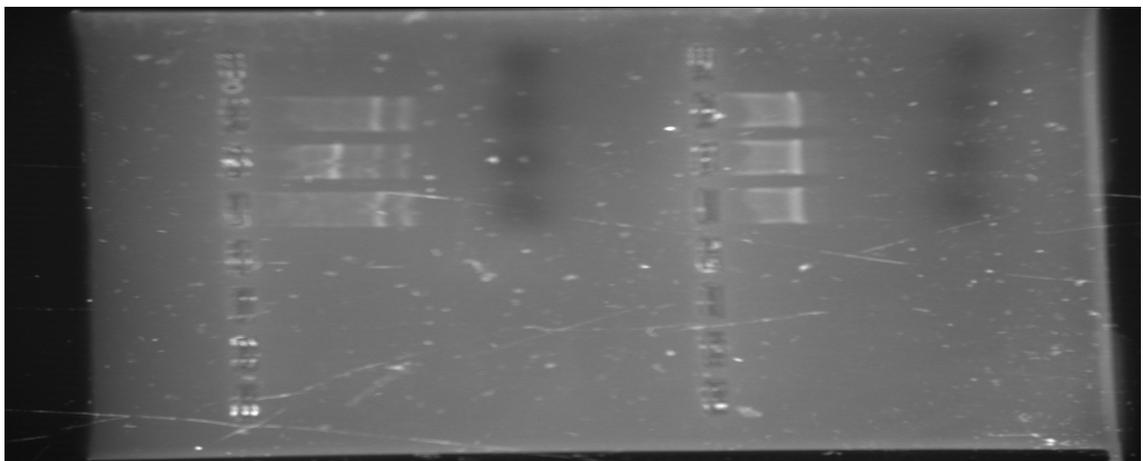


Figura 12: Digestão Enzimática pelas endonucleases Sac I e Dra I, das amostras positivas de indivíduos atendidos no LACEN-AP
 Fonte: LACEN/AP

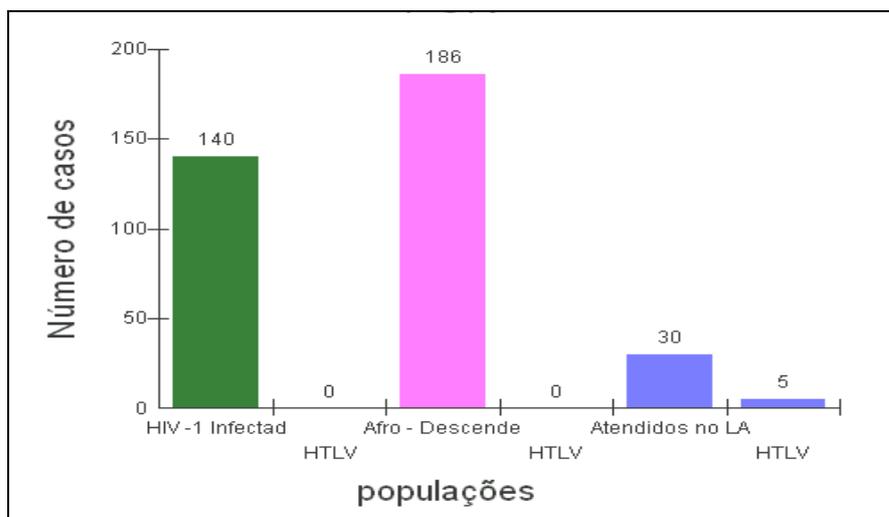


Figura 13 – numero de casos de HTLV-1, em pacientes atendidos no LACEN, pelo método PCR
 Fonte: LACEN/AP

4 DISCUSSÃO

Pesquisas tem demonstrado que o HTLV apresenta-se endêmico em várias partes do mundo. O vírus HTLV-1 apresenta taxas elevadas de endemicidade em algumas áreas geográficas definidas, como: Japão, Caribe, América Central e do Sul, África Equatorial, Oriente Médio e Melanésia (Levine & Blattner, 1987; Blattner, 1990; Santos & Lima, 2005). E o HTLV-2, tem sido encontrado principalmente entre usuários de drogas injetáveis nas Américas do Norte e do Sul, na Europa e entre ameríndios (Hall et al, 1994; Maloney et al, 1992; Ishak et al, 1995; Ishak et al, 2001; Vallinoto et al, 2001; Ishak et al, 2003).

No Brasil, o HTLV-1/2, apresenta uma taxa de endemicidade distribuída em todo território nacional, de acordo com as pesquisas soropidemiológicas da população em geral, e em grupos específicos, como: doadores de sangue, pacientes infectados pelo HIV-1, em grupos ameríndios e portadores de distúrbios hematológicos e neurológicos (Andrada Serpa *et al*, 1989; Carneiro-Proietti *et al*, 2002; Ishak *et al*, 2003; Catalan-Soares *et al*, 2005). Na Amazônia, estudos realizados demonstraram que o HTLV-1/2 possui taxa de endemicidade elevada.(Ishak *et al*,1998; Vallinoto *et al*,1998; Ishak *et al*, 2001; Ishak *et al*, 2002; Ishak *et al*, 2003; Macedo *et al*, 2004, Vallinoto *et al*, 2004; Laurentino *et al*, 2005).

No presente estudo realizado no Amapá, estado pertencente a Amazônia Brasileira, e que faz fronteira com a Guiana francesa , onde a taxa de prevalência para HTLV-1 é de 13.1%(Talarmin *et al*, 1997). Das 03 (três) populações pesquisadas: população de pacientes HIV-1 positivos, população

afro-descendente e pacientes atendidos no LACEN-AP, os resultados obtidos foram: Entre os indivíduos HIV-1 positivos a taxa encontrada foi de nula. De 140 pacientes HIV-1 infectados testados para HTLV- 1/2, nenhum apresentou soropositividade. Esse resultado não está de acordo com pesquisas realizadas no Brasil, que demonstram taxas mais elevadas de co-infecção, como na pesquisa realizada na área urbana de Belém, estado do Pará, geograficamente vizinho ao Amapá, onde a taxa de prevalência encontrada foi de 7,4% (Vallinoto *et al*, 1998). Em Salvador a taxa de prevalência de co-infecção é de 2.3% (Moreira Jr *et al*, 1993). A prevalência encontrada em São Paulo foi de 10% em indivíduos com AIDS e 1,5% em indivíduos HIV-1 infectados assintomáticos (Cortes *et al*, 1989, Casseb *et al*, 1997). Porém, a presente pesquisa encontra-se de acordo com o trabalho caracterização molecular de coinfeção HIV/HTLV em pacientes da Amazônia, onde amostras provenientes do Amapá, de indivíduos HIV-1 infectados, testadas para HTLV não apresentaram positividade (Laurentino *et al*, 2005).

Na segunda população testada, comunidade afro-descendente de Mazagão, nessa população apenas uma amostra foi positiva para HTLV, pelo método de ELISA, porém quando submetida ao teste confirmatório de Western *blot* e PCR, a amostra não apresentou positividade, sendo, portanto considerada negativa. A taxa encontrada nessa população também foi nula. Essa taxa não está de acordo com taxas de população afro-descendente estudada no Brasil, principalmente na Bahia, onde a taxa de prevalência encontrada é de 2.3% (Moreira Jr *et al*, 1993; Britto *et al*, 1998; Alcântara *et al*, 2002). E no Pará, em uma pesquisa realizada na Ilha do Marajó,, em uma

cidade chamada Santana do Arari, uma taxa de 2,06%, e em Ponta de Pedra, a taxa foi de 1%. Algumas pesquisas indicam que HTLV-1 tenha se originado na África, por transmissão interespécies, a partir de primatas não humanos, sendo levado ao novo mundo (Caribe, estados Unidos e América do Sul) pelos negros africanos, durante o período de tráfico de escravos no século 16 (Gallo *et al*, 1983; Gessain *et al*, 1992; Saksena *et al*, 1992; Song *et al*, 1995).

Entre os pacientes atendidos no LACEN-AP, de 30 (trinta), 06 (seis) amostras, foram positivas pelo método de ELISA.. As 06 amostras foram submetidas ao teste confirmatório de *Western blot*, onde 05 (cinco) amostras foram confirmadas, apresentando uma taxa de prevalência nessa população de 16,6%. As amostras foram submetidas a análise molecular e o subtipo circulante é do grupo cosmopolita, subgrupo transcontinental, esse resultado está de acordo com os trabalhos desenvolvidos na Amazônia (Laurentino *et al*, 2005; Souza *et al*, 2006).

O número de resultados falso-positivos pelo ELISA em relação ao teste confirmatório de *Western blot* foi baixa, onde apenas 01(uma) amostra, não foi confirmada. Uma hipótese seria de problemas no teste ou reação cruzada com outros anticorpos e também foram descritos resultados falso-positivos para o HTLV, pelo ELISA, em regiões endêmicas para a malária, e o Amapá é altamente endêmico para malária (Lal, 1996; Levine *et al*, 1988).

Nesse estudo houve a determinação molecular do subtipo circulante, que HTLV-1 do grupo Cosmopolita, do subgrupo Transcontinental. Esse resultado está de acordo com outros estudos realizados, que demonstram ser

esse subtipo circulante em áreas urbanas do Brasil (Segurado *et al*, 2002; Alcântara *et al*, 2003; Laurentino *et al*, 2005 ; Souza *et al*, 2006).

Apesar de vários estudos realizados, a origem desse subtipo no novo mundo ainda possui controvérsias. Algumas pesquisas sugerem que a introdução desse vírus no continente ocorreu pela migração de população mongol pelo estreito de Bering (Miura *et al*, 1997; Yamashita *et al*, 1998; Ohkura *et al*, 1999; Ramirez *et al*, 2002).

5 CONCLUSÕES

- As análises moleculares realizadas mostraram que no estado do Amapá, o tipo circulante é o HTLV-1 do subtipo Cosmopolita, pertencente ao subgrupo Transcontinental.
- Apesar da taxa de Soroprevalência entre os indivíduos HIV/AIDS infectados do estado do Amapá, encontrada tenha sido nula. Fazem-se necessárias pesquisas contínuas nessa população, devido a presença do HTLV-1 circulante no estado.
- Na população afro-descendente a taxa de soroprevalência foi nula. Porém novas pesquisas devem ser realizadas, para monitoramento. Isso porquê a população em estudo, já não permanece totalmente fechada, com tendência para a miscigenação.
- Na população pesquisada de indivíduos atendidos no LACEN, embora a amostragem tenha sido baixa(30 amostras), a taxa de positividade foi alta 05(cinco) indivíduos infectados pelo HTLV-1, subtipo Cosmopolita do subgrupo Transcontinental. Sendo a maioria de positivos, mulheres (80%) e a faixa etária predominante acima dos 40 anos (80%).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCÂNTARA, Jr. L.C.; SHINDO, N.; VAN DOOREN S.; SALEMI, M.; COSTA, M.C.R.; KASHIMA, S.; COVAS, D.T.; VANDAME, A.M. AND CASTRO, B.G. Brazilian HTLV type 2a from intravenous drug users (IDUs) appear to have originated from two sources: Brazilian Amerindians and European/North American IDUs. **AIDS res. Hum. Retrov.** **19**, 2003.
- ALMEIDA, S.M., TSUCHIYA, L.R.V., RABONI, S.M., TULIO, S., BORDIGNON, M., WERNECK, L.C. Paraparesia espástica Tropical (PET) relacionada com HTLV-I: Experiência do Hospital de Clínicas da UFPR. **Anais do simpósio Internacional sobre HTLV no Brasil**, Recife, 1994.
- ANDRADA-SERPA, M.J., TOSSWILL, J., SCHOR, D., LINHARES, D., DOBBIN, J., PEREIRA, M.S. Seroepidemiologic study for antibodies to human retroviruses in human and non-human primates in Brazil. **International Journal of Cancer**, **44**: 389-393, 1989.
- ARAUJO. A.Q. C., AFONSO, C. R., SCHOR, D. & ANDRADA-SERPA, M. J. Spastic paraparesis of obscure origin . A case-control study of HTLV-I positive and negative patients from Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of the Neurological Sciences**, **116**: 165-169, 1993.
- BITTENCOURT, A.L. Vertical Transmission of HTLV-I/II: A review. *Rev. Inst. Trop. São Paulo*, 40: 245-251, 1998.
- BLATTNER, W.A. Epidemiology of HTLV-I and associated diseases. In: **Human Retrovirology**, HTLV. BLATTNER, W.A. (ed.) . New York: Raven Press, 1990.
- BLATTNER, W.A., NOMURA, A., CLARK, J.W., HO, G.Y.F., NAKAO, Y., GALLO, R., ROBERT-GUROFF, M. Modes of transmission and evidence for viral latency from studies of human T-cell lymphotropic virus type I in Japanese migrant population in Hawaii. **Proceedings National Academy Sciences USA**, **83**:4895-4898, 1986.

- BRITTO, A.P.C.R.; GALVÃO-CASTRO B., STRAATMANN A., SANTOS-TORRES S., TAVARES-NETO J. Infecção pelo HTLV-I/II no Estado da Bahia. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 31, n. 1, 1998.
- BUNN, JR. P.A., SCHECHTER, G.P., JAFFE, E., BLAYNEY, D., YOUNG, R.C., MATTHEWS, M.J., BLATTNER, W., BRODER, S., ROBERT-GUROFF, M., GALLO, R.C. Clinical course of retrovirus associated adult T-cell lymphoma in the United States. **The New England Journal of Medicine**, **309**:257-64, 1983.
- CALATTINI, S., CHEVALIER S. A., DUPREZ, R., AFONSO P., FROMENT A., GESSAIN, A. MAHIEUX, R. Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 3: Complete Nucleotide Sequence and Characterization of the Human Tax3 Protein, *Retrovirology*, 2005.
- CASSEB, J., CATERINO-DE-ARAÚJO, A, HONG, M.A, SALOMÃO, S., GALLO, D., HENDRY, R.M., DUARTE, A J.S. Prevalence of HTLV-I e HTLV-II infections among HIV-1 infected asymptomatic individuals in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **39**: 213-215, 1997.
- CASTRO-COSTA, C. M. , SALGUEIRO, M.R., CARTON, H., VALE, O. C. & ARRUDA, A. M. Tropical spastic paraparesis in northeastern Brazil. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, **47**: 134-138, 1989.
- CATALAN-SOARES, Bernadette; CARNEIRO-PROIETTI, Anna Bárbarande F.; PROIETTI, Fernando Augusto. Distribuição geográfica heterogênea dos vírus linfotrópicos humanos de célula T tipos I e II (HTLV-I/II): prevalência na triagem sorológica de doadores de sangue de grandes áreas urbanas no Brasil. **Cad. Saúde Pública.**, Rio de Janeiro, v.21, n.3, 2005.
- CATERINO-DE-ARAÚJO, A., DE LOS SANTOS FORTUNA, E. No evidence of vertical transmission of HTLV-I and HTLV-II in children at high risk for HIV-1 infection from São Paulo, Brazil. **Journal of Tropical Pediatrics**, **45**: 42-47, 1999.

- CIMINALE, V., PAVLAKIS, G.N., DESER, D., GINNINGHAM, C.P., FELBER, B.
Complex splicing in the human T-cell leukemia virus (HTLV) family of retroviruses: novel m RNAs and proteins produced by HTLV type I. **Journal of Virology**, **66**: 1737-1745, 1992.
- COFFIN, J.M. Retroviridae In: **Fundamental Virology**. Fields, B.N., Knipe D.M., Howley, P.M., Chanok, R.M., Melnick, J.L., Monath, T.P., Roizman, B., Straus, S.E. (eds) Lippincott Raven, Philadelphia, 1996. p. 763-843.
- CORTES, E. DETELS, R. ABOULAFIA, D., XI LING LI, MOUDGIL, T., ALAM, M., BONECKER, C., GONZAGA, A, OYAFUSO, L., TONDO, M., BOITE, C., HAMMERSHLACK, N., CAPITANI, C., SLAMON, D.J., HO, D. HIV-1, HIV-2, and HTLV-I infection in high-risk groups in Brazil. **The New England Journal of Medicine**, **320**:953-958, 1989.
- DUBE, D.K.; SHERMAN, M.P., SAKSENA, N.K., BRYZ-GORNIA, V., MENDELSON, J., LOVE, J., ARNOLD, C.B., SPICER, T., DUBE, S., GLASER, J.B., WILLIAMS, A.E., NISHIMURA, M. JACOBSEN, S., FERRER, J.F., PINO, D.N. QUIRUELAS, S., POIESZ, B.J. Genetic heterogeneity in human T-cell leukemia/lymphoma virus type Ii. **Journal of Virology**, **67**: 1175-1184, 1993.
- EGAN, J.F., O'LEARY, B., LEWIS, M., MULCAHY, F., SHEEHY, N., HASEGAWA, H., FITZPATRICK, F., O'CONNOR, J.J., O'RIONDAN, J., HALL, W.W. high rate of human T-lymphotropic virus type 1-infected intravenous drug abusers in Ireland. **AIDS Research and Human Retroviruses**, **15**: 699-705, 1999.
- EIRAKU, N., NOVOA, P., FERREIRA, M.C., MONKEN, C., ISHAK, R., FERREIRA, O. C., ZHU, S.W., LORENÇO, R., ISHAK, M., AZEVEDO, V., GUERREIRO, J.F., POMBO DE OLIVEIRA, M., LOUREIRO, P., HAMMERSCHLAK, N., IJICHI, S., HALL, W.W. Identification and characterization of a new and distinct molecular subtype of human T-cell lymphotropic virus type 2. **Journal of Virology**, **70**: 1481-1492, 1996.
- ERLICH, G.D., GLASER, J.B., LAVIGNE, K., et al. Prevalence of human T-cell leukemia/ lymphoma virus (HTLV) type II infection among high-risk

individuals: Type-specific identification of HTLVs by polymerase chain reaction. **Blood**, **74**: 1658-1664, 1989.

FARIAS-DE-CARVALHO, S. M., POMBO-DE-OLIVEIRA, M.S., THULER, L.C., RIOS, M., COELHO, R.C., RUBIM, L.C., SILVA, E.M., REIS, A M.& CATOVSKY, D. HTLV-I and HTLV-II infections in hematologic disorder patients, cancer patients, and healthy individuals from Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, **15**: 238-242, 1997.

FERREIRA JR, O.C.; PLANELES, V.; ROSENBLATT, J.D. Human T-cell leukemia viruses: epidemiology, biology and pathogenesis. **Blood Reviews**, **11**: 91-104, 1997.

FERREIRA Jr., O. C., VAZ, R. S., CARVALHO, M. B., GUERRA, C., FABRON, A. L., ROSEMBLIT, J. & HAMRSCHLAK, N. Human T- lymphotropic virus type I and type II infections and correlation with risk factors in blood donors from São Paulo, Brazil. **Tranfusion**, **35**: 258-263, 1995

FUJIYOSHI, T., LI, H.C., LOU, H., YASHIKI, S., KARINO, S., ZANINOVIC, V., ONEEGLLO, S.G., CAMACHO, M., ANDRADE, R. HURTADO, L.V., GOMES, L.H., DAMIANI, E., CARTIER L., DIPIERRI, J.E., HAYAMI, M., SONODA, S., TAJIMA, K. Characteristic distribution of HTLV type I and HTLV type II carriers among native ethnic groups in South America. **AIDS research and Human retroviruses**, **15**: 12235-1239, 1999.

FUKUSHIMA, Y., LEWIS, M.J., MONKENC., KOMURO, K., KUSAGAWA, S., SATO, H., TAKEBE, Y., YAMAZAKI, S., NGUYEN, T.H., HOANG, A., HOANG, T.L., HONDA, M., HALL W.W. Identification and molecular characterization of human T-cell lymphotropic virus type II infections in intravenous drug abusers in the former South Vietnam. **AIDS Research and Human Retroviruses**, **14**: 537-540, 1998.

GALLO, R.C. Human retroviruses: A decade of discovery and link with human disease. **Journal of Infectious Diseases**, **164**: 235-243, 1991.

- GALLO, R.C., SLISKI, A., Wong-STAAAL, F. Origin of human T cell leukemia-lymphoma virus, 1983.
- GELMANN, E.P., FRANCHINI, G., MANZARI, V., WONG-STAAAL, F., GALLO, R.C. Molecular cloning of a unique T-cell leukemia virus (HTLV-II Mo) **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, **81**: 993-997, 1984.
- GESSAIN, A. & GOUT, O., Chronic myelopathy associated with human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I). **Annals of International Medicine**, **117**,1992.
- GESSAIN, A., BARIN, F., VERNANT, J.C., GOUT, O., MAURS, L., CALENDER, A., DE-THÉ, G. Antibodies to human T-lymphotropic virus type I patients with tropic spastics paraparesis. **Lancet**, **2**: 407-410, 1985
- GESSAIN, A., DE THÉ, G. What is the situation of human T-cell lymphotropic virus type II (HTLV-II) in Africa? Origin and dissemination of genomic subtypes. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, (suppl. 1), **13**: S228-S235, 1996.
- GESSAIN, A.; MAUCLÉRE, P.; FROMENT, A.; BIGLIONE, M.; LE HESRAN, J.Y.; TEKAIA, F.; MILLAN, J.; DE THÉ, G. Isolation and molecular characterization of a human T-cell lymphotropic virus type II (HTLV-II). Subtype B, from a healthy pygmy living in a remote area of Cameroon: an ancient origin for HTLV-II in Africa. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**,**92**, 1995.
- GÓGORA-BIACHI, R.A.; LAL, R.B.; RUDOLPH, D.L.; CASTRO-SANSORES, C.; GONZÁLEZ-MARTINEZ, P.; PÁVIA-RUZ, N. Low prevalence of HTLV-II in Mayan Indias in the Yucata Peninsula, Mexico. **VIII International Conference on Human Retrovirology: HTLV**, Abstract EDO2. Rio de Janeiro Brasil, 1997.
- HALL, W.W.; ISHAK R.; ZHU S.W.; NOVOA, P.; EIRAKU, N.; TAKAHASHI, H.; FERREIRA, M.C.; AZEVEDO, V.; ISHAK, M.O.; FERREIRA, O.C.;

- MONKEU, C.; KOURATA T. Human T virus type II (HTLV-II): Epidemiology molecular, and clinical features of infection, 13. p.204-214, 1996.
- HALL, W.W.; KUBO, T., IJICHI, S., TAKAHASHI, H., ZHU, S. W Human T cell leukemia/lymphoma virus, type II (HTLV-II): emergence of an important newly recognized pathogen. **Seminars in virology**, 5: 165-178, 1994.
- HARRINGTON, W.J., SHEREMATA, W., HJELLE, B., DUBE, D.K., BRADSHA, W.P., FOUNG, S.K.H., SNODGRASS, S., TOEDTER A., CABRAL, I., POIESZ, B. Spastic ataxia associated with human T-cell lymphotropic virus type II infection. **Annals of neurology**, 33: 411-414, 1993.
- HENEINE, W., KAPLAN, J.E., GRACIA, F., LAL, R., LEVINE, P.H.,REEVES, W.C. HATLV-II endemicity among Guaymi Indians in Panama (letter). **The New England Journal of Medicine**, 324: 565, 1991.
- HINUMA, Y., NAGATA, K., HANAOKA, M., MITSUOKA, M., NAKAI, M., MATSUMOTO, T., KINOSHITA, K., SHIRAKAWA, S., MIYOSHI, I. Adult T cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. **Proceedings National Academy Sciences USA**, 78: 6476-6480, 1981.
- HJELLE, B., MILLS, R., SWENSON, S., MERTZ., G., KEY, C., ALLEN, S. Incidence of Hairy cell leukemia, mycosis fungoides, and chronic lymphocytic leukemia in first know HTLV-II endemic population. **The Journal of Infectious Diseases**, 163:435-440, 1991.
- HJELLE, B.; APPENZELLER, O.; MILLS, R.; ALEXANDER, S.; TORREZ-MARTINEZ, N.; JAHNKE, R.; ROSS, G. Cronic neurodegenerative disease associated with HTLV-II infection. **Lancet**, 339: 645-646, 1992.
- HORAL, P., HALL, W.W., SVENNERHOLM, B., LYCRE, J., JEANSSON, S., RYMO, L., KAPLAN, M.H, VAHLNE, A. Identification of type-specific linear epitopes in the glycoproteins gp46 and gp21 of human T-cell leukemia viruses type I and type II using synthetic peptides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, 88: 5754-5758, 1991.

- ISHAK, R., CAVALCANTE, F., VALLINOTO, A C.R., AZEVEDO, V.N. & ISHAK, M.O.G. 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.
- ISHAK, R., CAVALCANTE, F., VALLINOTO, A C.R., AZEVEDO, V.N. & ISHAK, M.O.G. 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.
- ISHAK, R., HARRINGTON JR., W.J., AZEVEDO, V.N., EIRAKU, N., ISHAK, M.O.G., GUERREIRO, J.F., SANTOS, S.E.B., KUBO, T., MONKE, C., ALEXANDER, S., HALL, W.W. Identification of human T-cell lymphotropic virus type I infection in the Kayapo, an indigenous population of Brazil. **AIDS Research and Human Retroviruses**, **11**: 813-821, 1995.
- ISHAK, R., ISHAK, M.O.G., AZEVEDO, V.N., SANTOS, D.E.M., VALLINOTO, A.C.R., SARAIVA, J.C.P., CRESCENTE, J.A. & HALL, W.W. Detection of HTLV-IIa in blood donors in an urban area the Amazon Region of Brazil (Belém, Pará). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **31**:193-194, 1998.
- ISHAK, R., VALLINOTO A. C. R., AZEVEDO V. N., LEWIS M., HALL W. W. ISHAK M. O. G.. **Molecular evidence of mother-to-child transmission of HTLV-IIc in the Kararao Village (Kayapo) in the Amazon Region of Brazil.** *Rev. Soc. Bras. Med. Tropical.*, 2001,
- ISHAK, R., VALLINOTO, A.C.R., AZEVEDO, V.N., ISHAK, M.O.G. Epidemiological aspects of retrovirus (HTLV) infection among Indian populations in the Amazon Region of Brazil. **Cad. Saúde Pública**,**19**: 109-111, 2003.
- JAWETZ, E., MELNICK, J.L., ADELBERG, E.A., BROOKS, G.F., BUTEL, J.S., ORSNTON, L.N. Vírus tumorais e oncogenes In: **Microbiologia Médica.** Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1991.

- JOHNSON, J.M., HARROD, R. & FRANCHINI, G. Molecular biology and pathogenesis of the human T-cell leukemia/lymphotropic virus type 1 (HTLV-1). **Journal of Experimental Pathology**, **82**: 135-147. 2001.
- KALYANARAMAN, V.S., SARNGADHARAN, M.G., ROBERT-GUROFF, M. MIYOSHI, I., BLAYNEY, D., GOLDE, D., GALLO, R.C. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. **Science**, **218**:571-573, 1982.
- KAPLAN, J.E., ABRAMS, E., SHAFFER, N., CANNON, R.O., KAUL, A., KRASINSKI, K., BAMJI, M., HARTLEY, T.M., ROBERTS, B., KILBOURNE, B., THOMAS, P., ROGERS, M., HENEINE, W. Low risk of mother-to-child transmission of human T-cell lymphotropic virus type II in non-breast-fed infants. **Journal of Infectious Diseases**, **166**: 892-895, 1992.
- KAWANO, F., TSUDA, H. YAMAGUCHI, K., Unusual clinical courses of adult-T cell leukemia in siblings. **Cancer**, **54**: 131-134, 1984.
- KITAGAWA, T. et al. Antibodies to HTLV-I in Japanese immigrants to Brazil. **Journal of the American Medical Association**, **256**, 1986.
- KIM, J.H., DURAK, D.T. Manifestations of human T-lymphotropic virus type I infection. **The American Journal of Medicine**, **84**:919-928, 1988.
- LAL, R.B. Delineation of immunodominant epitopes of human T-lymphotropic virus types I and II and their usefulness in developing serologic assays for detection of antibodies to HTLV-I and HTLV-II. **Journal of acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology** **13**, 1996.
- LAURENTINO, R. V., LOPES I.G.L., AZEVEDO V. N., MACHADO L.F.A, MOREIRA M.R.C., LOBATO L., ISHAK M.O.G., ISHAK R., VALLINOTO A.CR. Molecular characterization of human T-cell lymphotropic virus coinfecting human immunodeficiency virus 1 infected patients in the Amazon region of Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 100, n. 4, 2005.

- LEE, H.H., SWANSON, P., SHORTY, V.S., ZACK, J.A., ROSEMBLATT, J.D., CHEN, I.S.Y. High rate of HTLV-II infection in seropositive intravenous drug abusers in New Orleans. **Science**, **244**: 471-575, 1989.
- LESSA, I., MORAES, D., MOURA L. & MELO, A . HTLV-I and myelopathy in Salvador (Northeastern Brazil). **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, **51**:447-451, 1993.
- LEVINE, P.H., et al. Geographic distribution of HTLV-I and identification of a new high risk population. **International Journal of Cancer**, 1988.
- LOUGHRAN, T.P., COYLE, T., SHERMAN, M.P., STARKEBAUM, G., EHRLICH, G., RUSCETTI, F.W., POIESZ, B. Detection of human T-cell leukemia/lymphoma virus type II in a patient with large granular lymphocyte leukemia. **Blood**, **80**:1116-1119, 1992.
- MACEDO, O.; RIBEIRO-LIMA, T.V.; LINHARES, A.O.; MOURA, A.; GOMES, M.L.C.; LINHARES, A.C. Infecção pelos vírus linfotrópicos humanos de células T tipos I e II entre pacientes com doença neurológica em Belém, Pará, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**. São Paulo, v. 46, n. 1, 2004.
- MALONEY, E.M., BIGGAR, R.J., NEEL, J.V., TAYLOR, M.E., HAHN, B.H., SHAW, G.M., BLATTNER, W.M. Endemic human T-cell lymphotropic virus type II infection among isolated Brazilian Amerindians. **The Journal of infectious Diseases**, **166**: 100-107, 1992.
- MARTIN, M.P., BIGGAR, R.J., HAMILIN-GREEN, G., STAAL, S., MANN, D. Large granular lymphocytosis in a patient infected with HTLV-II. **AIDS Research and Human Retroviruses**, **9**: 715-719, 1993.
- MIURA, T.; FUKUNAGA A.T.; IGARASHI A.B.T.; YAMASHITA, M.; IDOA, E.U.I.; FUNAHASHI, A.S.I.; ISHIDAC, T.; WASHIO, C.K.; UEDAC, S.; HASHIMOTO, D.E.K.I.; YOSHIDA, D.M.; OSAME, E.M.; SINGHAL, F.B.S.; ZANINOVIC, G.W.; CARTIER, H.L.; SONODA, E.S.; TAJIMA, K.; INA, J.Y. Phylogenetic subtypes of human T-lymphotropic virus type I and their relations to anthropological background. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the united states of America**, **91**, 1994.

- MIURA, T.; YAMASHITA, M.; ZANINOVIC, V.; CARTIER, L.; TAKEHISA, J.; IGARASHI, T.; IDO E.; FUJIYOSHI, T.; SONODA, S.; TAJIMA, K.; HAYAMI, M. Molecular phylogeny of human T-cell leukemia virus type I and II of Amerindians in Colombia and Chile. **Journal of Molecular Virology**, **44**, 1997.
- MOREIRA Jr., E. D., HARRINGTON Jr., W. RIBEIRO, T. T., MELO, A , BRITES, C., BADARO, SWANSON, P., LEE. H. HTLV-II and a new endemic area for HTLV-I in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **25**, 1992.
- MOREIRA Jr., E. D., RIBEIRO, T. T., SWANSON, P., SAMPAIO, C., MELO, A , BRITES, C., BADARO, R. TOEDTER, G., LEE, H. & HARRINGTON Jr., W. Seroepidemiology of Human T-cell lymphotropic virus type I/II in Northeastern Brazil. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, **6**:959-963, 1993.
- MOREIRA, P.R.R., PROIETTI, A.B.F.C., MARTINS, M.V.C.L., OLIVEIRA, D.R., PROIETTI, F. A. Soroprevalência de HTLV-I/II em pacientes com Paraparesia Espástica de Belo Horizonte, Minas Gerais. **Anais do III Simpósio Internacional sobre HTLV no Brasil**, EPI-13, Recife, 1994.
- MURPHY, E.L. HTLV-II related disease. **Lancet**, 341: 88, 1993.
- MURPHY, E.L., EGSTROM, J.W., MILLER, K., SACHER, R.A., BUSCH, M.P., HOLLINGSWORTH, C.G. HTLV-II associated myelopathy in a 43 years old woman. **Lancet**, 371: 757-758, 1993.
- MURPHY, E.L., GLYNN, S.A., FRIDEY, J., SMITH, J.W., SACHER, R.A., NASS, C.C., OWNBY, H.E., WRIGHT, D.J., NEMO, G.J. increased incidence of infectious diseases during prospective follow-up of human T-lymphotropic virus type II and I infected blood donors. Retrovirus epidemiology donor study. **Archives of International Medicine**, 159: 1485-1491, 1999.
- MURPHY, F.A. Virus Taxonomy. In: **Fundamental Virology**. Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., Chanock, R.M., Melnick, J.L., Monath, T.P.,

- Roizman, B., Straus, S.E. (eds) Lippincott Raven, Philadelphia, 1996. p. 15-57.
- OHKURA, S.; YAMASHITA, M.; CARTIER, L.; TANABE, D.G.; HAYAMI, M.; SONODA, S.; TAJIMA, K. Identification and phylogenetic characterization of a human T-cell leukaemia virus type I isolate from a native inhabitant (Rapa Nui) of Easter Island. **J. Gen. Virol.** **80**, 1999.
- OSAME, M., USUKU, K., IZUMO, S., IJICHI, N., AMITANI, H., IGATA, A., MATSUMOTO, M., TARA, M. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. **Lancet**, **1**:1031-1032, 1986.
- POIESZ, B.J., RUSCETTI, F.W., GAZDAR, A.F., BUNN, P.A., MINNA, J.D., GALLO, R.C. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proceedings National Academy Sciences USA**, **77**: 7415-7419, 1980.
- POMBO-DE-OLIVEIRA, M. S., MATUTES, E., FANADAS, L.C., SCHULZ, T.F., CALABRO, M.L., NUCCI, M., ANDRADA-SERPA, M.J., TEDDER, R.S., WEISS, R. A. & CATOWSKY, D. Adult T-cell leukaemia/ lymphoma in Brazil and its relation to HTLV-I. **Lancet**, **336**:987, 1990.
- PROIETTI, A.B.F.C.; RIBAS, J.G.R.; SOARES, B.C.C.; MARTINS, M.L.; MELO, G.E.A.B.; FILHO, O.A.M.; PINHEIRO, S.R.; ARAÚJO, A.Q.C.; CASTRO, B.G.; POMBO DE OLIVEIRA, M.S.; GUEDES, A.C. E PROIETTI, F.A. Infecção e doença pelos vírus linfotrópicos humanos de células T (HTLV I/II) no Brasil. **Ver. Soc. Brás. Méd. Trop.**, Uberaba, v. 35, n. 5, 2002.
- RAMIREZ, E.; CARTIER, L.; VILLOTA, C.; FERNANDEZ, J. Genetic characterization and phylogeny of Human T-cell lymphotropic virus type I from Chile. **Virus Res.** **20**, 2002.
- ROBERT-GUROFF, M., WEISS, S.H., GIRON, J.A., JENNINGS, A.M., GINZBURG, H.M., MARGOLIS, I.B., BLATTNER, W., GALLO, R.C. Prevalence of antibodies to HTLV-I, II and III in intravenous drug abusers from

- an AIDS endemic region. **Journal of the American Medical Association**, **255**: 3133-3137, 1986.
- ROSENBLATT, J. D., GOLDE, D.W., WACHSMAN, W., GIORGI, J.V., JACOBS, A., SCHMIDT, G.M., QUAN, S., GASSON, J.C., CHEN, I.S.Y. A second isolate of HTLV-II associated with atypical hairy-cell leukemia. **The New England Journal of Medicine**, **315**:372-377, 1986.
- SALEMI, M., VANDAMME, A.M., GRADOZZI, C., VAN LAETHEM, K., CATTANEO, E., TAYLOR, G., CASOLI, C., GOUBAU, P., DESMYTER, J., BERTAZZONI, U. Evolutionary rate and genetic heterogeneity of human T-cell lymphotropic virus type II (HTLV-II) using isolates from European injecting drugs users. **Journal of Molecular Evolution**, **46**: 602-611, 1998.
- SANTOS, Fred LUCIANO Neves; LIMA, Fernanda Washington de Mendonça. Epidemiologia, fisiopatogenia e diagnóstico laboratorial da Infecção pelo HTLV-I. **J. Brás. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v.1, n. 2, 2005.
- SEGURADO, A.C.; BIASUTTI, C.; ZEIGLER, R.; RODRIGUES, C.D.D.; JORGEM.L.S.G.; MARCHIORI, P.E. Identification of Human T-lymphotropic Virus Type I (HTLV-I) Subtypes Using Restricted Fragment Length Polymorphism In a Cohort of Asymptomatic Carriers and Patients with HTLV-I associated Myelopathy/tropical spastic Paraparesis from São Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 3, 2002.
- SHEREMATA, W.A., HARRINGTON, W.J., BRADSHAW, P.A., FOUNG, S.K.H., RAFFANTI, S.P., BERGER, J.R., SNODGRASS, S., RESNICK, L., POIESZ, B.J. Association of (tropical) ataxic neuropathy with HTLV-II. **Virus Research**, **29**: 71-77, 1993.
- SHIMOTOHNO, K., TAKAHASHI, Y., SHIMIZU, N., GOJOBORI, T., GOLDE, D.W., CHEN, I.S.Y. Complete nucleotide sequence of an infectious clone of human T-cell leukemia virus type II: an open reading frame for the protease gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, **82**: 3101-3105, 1985.

- SLATERRY, 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**, 9: 525-540. 1999.
- SONG, K.J.; NEURURKAR, V.R.; SAITOU, N.; LAZO, A.; BLAKESLEE, J.R.; MIYOSHI, I.; YANAGIHARA, R. Genetic analysis and molecular phylogeny of simian T-cell lymphotropic virus type I: evidence for independent virus evolution in Asia and Africa. **Virology**, **199**, 1994.
- SOUZA, L.A.; LOPES, G.L.; MAIA, E.L.; AZEVEDO, V.N.; MACHADO, L.F.A.; ISHAK, M.O.G.; ISHAK, R.; VALLINOTO, A. C. R. **Caracterização molecular do HTLV-1 em pacientes com paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 em Belém, Pará.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, vol. 39. 504-506, 2006.
- TAKATSUKI, K., YAMAGUCHI, K., KAWANO, F., NISHIMURA, H., SEIKI, M., YOSHIDA, M. Clinical aspects of adult T-cell leukemia/lymphoma. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, **115**: 89-97, 1985.
- TAKAYANAGUI, O.M. CANTOS, J.S., JARDIM, E. Tropical spastic paraparesis in Brazil. **Lancet**, **2**:309, 1991. Infection among Ameridians in French Guiana. **Journal of General Virology**, **80**, 1999.
- TALARMIN, A.; VION B.; VIDAL, A.U.; FOU, G.D.; MARTY, C.; KAZANJI, M. First seroepidemiological study and phylogenetic characterization of human T-cell lymphotropic virus type I and II, 1999.
- TANGY, F. Molecular Biology of HTLV-I. In: **HTLV, truths and questions.** Zaninovic, V. (eds). Colombia, Cali, FERIVA EDITORES, 1996. p. 1-13.
- TAYLOR, G.P. The epidemiology of HTLV-I in Europe. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, **13 (suppl 1)**: S8-S14, 1996.
- TSUGANE, S., WATANABE, S., SUGIMURA, H., OTSU, T., TOBNAI, K., SHIMOYAMA, M., NANRI, S., ISHII, H. Infectious states of human T lymphotropic virus type I and hepatitis B virus among Japanese immigrants

in the republic of Bolivia. **American Journal of Epidemiology**, **128**:1153-1161, 1988.

URETA-VIDAL, A.; GESSAIN, A.; YOSHIDA, M.; TEKAIA, F.; GARIN, B.; GUILLEMAIN, B.; SHULZ, T.; FARID, R.; THÉ, G.D. Phylogenetic classification of human T cell leukemia/lymphoma virus I genotypes in five major molecular and geographical subtypes. **Journal of General Virology**, **75**, 1994.

VALLEJO, A., FERRANTE, P., SORIANO, V., CALABRÒ, M.L., MANCUSO, R., HEREDIA, A., MANNELLA, E., FAVERO, A., GARCIA-SÁIZ, A., CHIECO-BIANCHI, L., GONZÁLEZ-LAHOZ, J., HEWLET, I. Nucleotide sequence and restriction fragment-length polymorphism analysis of human T-cell lymphotropic virus type II (HTLV-II) in Southern Europe evidence for the HTLV-IIa and HTLV-IIb subtypes. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**, **13**: 384-391, 1996.

VALLINOTO, A.C.R.; AZEVEDO, V.N.; SANTOS, D.E.M.; CANICEIRO, S.; MESQUITA, F.L.C.; HALL, W.W.; ISHAK, M.O.G.; ISHAK, R. Serological Evidence of HTLV-I and HTLV-II Coinfections in HIV-1 Positive Patients in Belém, State of Pará, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v.93, n. 3, 1998.

VALLINOTO, A.C.R.; MUTO, N.A.; PONTES, S.; MACHADO, L.F.A.; AZEVEDO, V.N.; SANTOS, S.E.B.; SANTOS, A.K.C.R.; ISHAK, M.O.G.; ISHAK, R. Serological and molecular evidence of HTLV-I infection among Japanese immigrants living in the Amazon region of Brazil, 2004.

VALLINOTO, A.C.R.; PONTES, G.S.; MUTO, N.A.; LOPES, I.G.L.; MACHADO, L.F.A.; AZEVEDO, V.N.; CARVALHAES, F.AP.L.; SANTOS, S.E.B.; GUERREIRO, J.F.; ISHAK, M.O.G.; ISHAK, R. Identification of human T-cell lymphotropic virus Infection in a semi-isolated Afro-Brazilian quilombo located in the Marajó Island (Pará, Brazil). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n.1, 2006.

- Van DOOREN, S.; SALEMI, M. & VANDAME, A. M., Dating the origin of the human T-cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I) subtypes. **Molecular Biology and Evolution**, **18**, 2001.
- VANDAMME, A-M, SALEMI, M., VAN BRUSSEL, M., LIU, H-F., LAETHEM, K.V., RANST, M.V., MICHELS, L., DESMYTER, J., GOUBAU, P. African origin of human T-lymphotropic virus type 2 (HTLV-2) supported by a potential new HTLV-2d subtype I Congolese Bambuti Efe Pygmies. **Journal of Virology**, **72**: 4327-4340, 1998.
- VOYLES, B.A **The Biology of Viruses**. St Louis, Missouri, Mosby, 1993. p.386.
- VRIELINK, H., SISAY, Y., REESINK, H.W., et al.: Evaluation of a combined lysate recombinant antigen anti-HTLV-I/II infection. *Transfusion*. **Med**, **5**: 135-137, 1995.
- VRIELINK, H., SISAY, Y., REESINK, H.W., et al.: HTLV-I/II Prevalence in Different Geographic Locations. *Transfusion*. **Med**, **18**: 46-51, 2004.
- WATANABE, T., SEIKI, M., YOSHIDA, M. HTLV type I (US isolate) and ATL (Japanese isolate) are the same species of human retrovirus. **Virology**, **133**:238-241, 1984.
- WHITE, D.O., FENNER, F.J. **Medical Virology**. California, Academic Press, 1994. p.603.
- WOLFE, N. D., HENEINE, W., CARR, J. K., GARCIA, A. D., SHANMUGAM V., TAMOUFE, U., TORIMIRO, J. N., PROSSER A. T., LEBRETON, M. MPOUDI-NGOLE, E., MCCUTCHAN, F. E., BIRX D. L., FOLKS T. M., BURKE D. S. , SWITZER, W. M. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters, *Conferência sobre Retrovirus e Infecções Oportunistas*, 2005.
- YAMAMOTO, N., HINUMA, Y. Retroviridae: Human T-Lymphotropic virus-I (HTLV-I) / Adult T-cell leukemia virus (ATLV). In: **Laboratory Diagnosis of**

infectious Diseases, Principles and Practice. New York: Springer-Verlag, 1988. vol.2.p. 663-676.

YAMASHITA, M.; VERONESI, R.; MANNA-BARRETO, M.; HARRINGTON, Jr. W.J.; SAMPAIO, C.; BRITES, C.; BADARÓ, R.; ANDRADE-FILHO, A.S.; OKHURA, S.; IGARASHI, T.; TAKEHISA, J.; MIURA, T.; CHAMONE, D.; BIANCHINI, O.; JARDIM, C.; SONODA, S.; HAYAMI, M. Molecular epidemiology of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) Brazil: the predominant HTLV-1s in South America differ from HTLV-1s of Japan and Africa, as well as those of Japanese immigrants and their relatives in Brazil. *Virology*, 261, 59-69, 1999.

YAMASHITA, M.; PICCHIO, G.; VERONESI, R.; OHKURA, S.; BARE, P.; HAYAMI, M. HTLV-1s in Argentina are phylogenetically similar to those of other South American countries, but different from HTLV-1 in Africa. **J. Med. Virol.** **55**, 1998.