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

Transmissão intrafamiliar do Vírus Linfotrópico de Células T Humanas tipo 1 em Belém, Pará, Brasil.

DANILO DE SOUZA ALMEIDA

Belém - Pará
2012

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

Transmissão intrafamiliar do Vírus Linfotrópico de Células T Humanas tipo 1 em Belém, Pará, Brasil.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais para obtenção parcial do título de Mestre em Doenças Tropicais da Universidade Federal do Pará.

Orientando: DANILO DE SOUZA ALMEIDA.

Orientadora: Profª. Drª. Maísa Silva de Sousa,

Belém - Pará

2012

Danilo de Souza Almeida

Transmissão intrafamiliar do Vírus Linfotrópico de Células T Humanas tipo 1 em Belém, Pará, Brasil.

Dissertação apresentada à aprovação como requisito para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais pelo Núcleo de Medicina Tropical da UFPA, pela Comissão formada pelos professores:

Conceito: _____

Aprovado em: _____ /_____/_____

Banca Examinadora

_____
Profa. Dra. Maísa Silva de Sousa
Orientadora: NMT/UFPA

_____
Prof. Dr. Antônio Carlos Rosário Vallinoto
Membro: ICB/UFPA

_____
Prof. Dr. Eduardo José Melo dos Santos
Membro: ICB/UFPA

_____
Profa. Dra. Greice de Lemos Cardoso
Membro: ICB/UFPA

_____
Profa. Dra. Edna Aoba Yassui Ishikawa
Membro: NMT/UFPA

Belém – Pará
2012

Aos meus pais,
Carlos Esdras e Inês Almeida,
como forma de minha gratidão pela educação recebida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela assistência e amparo;

À minha orientadora e mãe cientifica Professora Dra. Maísa Silva Sousa, pelas diretrizes seguras e permanente incentivo ao desenvolvimento deste trabalho;

Ao Msc. Carlos Costa, médico do ambulatório do NMT, pela amizade, ensinamentos e atenção durante as discussões sobre a dissertação desenvolvida;

À Professora Dra. Carla pela extraordinária contribuição para o desenvolvimento dos experimentos realizados no setor de Bacteriologia do IEC que sem este auxilio o trabalho não teria sido concluído;

Ao Professor Dr. Alexandre Linhares, pela valiosa contribuição dada à realização dos experimentos práticos;

À Professora Dra. Luiza Caricio pela amizade e por me apresentar à minha orientadora;

À Professora Dra. Edna Ishikawa pela amizade e ensinamentos durante o desenvolvimento da dissertação;

Ao Professor Dr. Antônio Vallinoto, pelo apoio técnico cientifico repassado para a realização deste trabalho;

À Msc. Roberta Fusco pelo apoio e ensinamentos das técnicas de sequenciamento repassados;

À minha noiva Erika Dayane, pois através dela eu sei o que é o sossego;

Aos amigos de laboratório Jaqueline, Louise, Camila, Raimunda, Sheyla e Ildson, (NMT); Jean e Emylin (IEC) e Ethienne e Barbara (ICB,) pela amizade durante essa jornada;

Aos amigos Adenielson e Marcos, pelas tardes e noites resolvendo exercícios de bioestatística, seminários entre outros atributos intelectuais;

Aos pacientes que contribuíram, aceitando em participar desta pesquisa;

Ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da UFPA, pela oportunidade de engrandecimento;

À CAPES pelo auxilio da bolsa de estudo;

E a todas as outras pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram para realização dessa dissertação.

“Aprender é a única coisa que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”.

Leonardo da Vinci

Resumo

Os retrovírus pertencem a um grupo de agentes infecciosos que receberam maior atenção da comunidade científica a partir dos anos 1970[6], quando foram descritos os oncogenes celulares relacionados a eles. A partir destes estudos preliminares foi descrito o primeiro retrovírus humano, o vírus linfotrópico de células T humanas 1 (HTLV-1)[20]. Além da leucemia/linfoma de células T do adulto, o HTLV-1 também é causador de uma doença neurológica degenerativa denominada mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) [7, 21]. Amostras de sangue de pacientes e seus familiares, portadores do vírus, atendidos no NMT/UFPA foram analisadas por método molecular, objetivando investigar a transmissão intrafamiliar do HTLV-1. Observou-se transmissão intrafamiliar com 100% de similaridade entre as bases nucleotídicas em nove (75%) das 12 famílias investigadas, das quais duas famílias apresentaram transmissão vertical, três famílias apresentaram transmissão sexual e três famílias que apresentaram os dois tipos de transmissão. Foi observado que em três famílias ocorreu mudança em mais de um par de bases nucleotídicas, sendo que em duas famílias houve divergência de 0,2% e 0,4%, ou seja, apresentaram alta similaridade entre os seus nucleotídeos (> 99,4%), neste caso sugerindo que houve transmissão intrafamiliar do HTLV-1. Em uma família ocorreu uma divergência de 1,83%, indicando que não houve transmissão intrafamiliar. A sequência nucleotídica do segmento 5'*LTR* e a análise filogenética mostraram alta similaridade entres as amostras isoladas no presente estudo e confirmaram a ocorrência do subtipo Cosmopolita subgrupo Transcontinental. O presente estudo fornece evidências moleculares da transmissão intrafamiliar do HTLV-1 em pacientes atendidos no Núcleo de Medicina Tropical da UFPA. Neste estudo a vias de transmissão como a amamentação e a relação sexual, foi a mais preponderante para essa disseminação.

Palavras chave: HTLV-1; Transmissão intrafamiliar; Transmissão sexual; Transmissão vertical; Transmissão silenciosa.

Abstract

Retroviruses belong to a group of infectious agents that have received more attention from the scientific community since the early 19706, when cellular oncogenes have been reported related to them. From these preliminary studies it was described the first human retrovirus, virus Human T lymphotropic 1 (HTLV-1)[20]. Besides the leukemia/lymphoma adult T cell, HTLV-1 is also causing a degenerative neurological disease associated myelopathy tropical spastic HTLV-1/paraparesia (HAM / TSP) [7, 21]. Blood samples from patients and their families living with the virus, seen in the NMT/UFPA were analyzed by molecular method, aiming to investigate the intrafamilial transmission of HTLV-1. Intrafamilial transmission was observed with 100% similarity between the nucleotide bases in nine (75%) of the 12 families studied, of which two families showed vertical transmission, sexual transmission had three families and three families who had both types of transmission. It was observed that three families change occurred in more than one nucleotide base pair, and in two families diverged by 0.2% and 0.4%, ie, had high similarity between their nucleotides (> 99.4 %), suggesting that in this case there intrafamilial transmission of HTLV-1. In one family there was a difference of 1.83%, indicating no intrafamilial transmission. The nucleotide sequence of the 5 'LTR segment and phylogenetic analysis showed high similarity entres the strains isolated in this study and confirmed the occurrence of the Cosmopolitan subtype Transcontinental subgroup. This study provides molecular evidence of intrafamilial transmission of HTLV-1 in patients treated at the Tropical Medicine Center UFPA. In this study the routes of transmission as breastfeeding and sex, was more prevalent for this spread.

Keyworlds: HTLV-1; Familial transmission; Sexual transmission; Vertical transmission; Silent transmission.

Lista de figuras

Figura 1	Árvore filogenética não enraizada mostrando o relacionamento entre os vírus descritos em primatas PTLV-1 (HTLV-1/STLV-1); PTLV-2 (HTLV-2/STLV-2) PTLV-3 (HTLV-3/STLV-3).	23
Figura 2	Desenho esquemático do HTLV-1	25
Figura 3	DNA proviral do HTLV-1 com respectivos genes e proteínas codificadas.	25
Figura 4	Distribuição do HTLV no mundo.	28
Figura 5	Possíveis caminhos de chegada do HTLV no Brasil.	29
Figura 6	Taxa de prevalência do HTLV-1 e HTLV-2, em doadores de sangue expressos em /1000 doações nas capitais de 26 estados e Distrito Federal do Brasil.	30
Figura 7	Transmissão célula-célula, por sinampse virológica.	36
Figura 8	Transmissão célula-célula do HTLV-1 através de reuniões extracelulares (a, b e c);	37
Figura 9	Modelo esquemático que ilustra o ciclo viral e os possíveis mecanismos através dos quais o HTLV-1 vence e evade o sistema imune do hospedeiro.	44
Figura 10	"*Flower cell*" típica do sangue periférico de um paciente com LLcTA.	45
Figura 11	Fluxograma dos casos investigados para transmissão intrafamiliar do HTLV-1.	60
Figura 12	Árvore demonstrando as relações filogenéticas entre as amostras de 12 famílias com suspeita de transmissão intrafamiliar do HTLV-1.	61
Figura 13	Pictoheredograma representativo da propagação do HTLV-1 no grupo familiar 04.	63
Figura 14	Pictoheredograma representativo da propagação do HTLV-1 no grupo familiar 11.	64

Figura 15 Pictoheredograma representativo da propagação do HTLV-1 no grupo familiar 12. 65
Figura 16 Pictoheredograma representativo da propagação do HTLV-1 no grupo familiar 17. 66
Figura17 Pictoheredograma representativo da propagação do HTLV-1 no grupo familiar 19. 67
Figura 18 Pictoheredograma representativo da propagação do HTLV-1 no grupo familiar 21. 68
Figura 19 Pictoheredograma representativo da propagação do HTLV-1 no grupo familiar 23. 69
Figura 20 Pictoheredograma representativo da propagação do HTLV-1 no grupo familiar 34. 70
Figura 21 Pictoheredograma representativo da propagação do HTLV-1 no grupo familiar 37. 71
Figura 22 Pictoheredograma representativo da propagação do HTLV-1 no grupo familiar 20. 73
Figura 23 Pictoheredograma representativo da propagação do HTLV-1 no grupo familiar 27. 74
Figura 24 Pictoheredograma representativo da propagação do HTLV-1 no grupo familiar 39. 75
Figura 25 Árvore enraizada demonstrando as relações filogenéticas entre as amostras de HTLV-1 disponíveis no *Genbank* com as amostras descritas no presente estudo. 77

Lista de abreviaturas e siglas

APC	Célula apresentadora de antígeno
APOBEC3G	Apolipoprotein B-editing catalytic polypeptide 3G
ATL	Leucemia de Células T do Adulto
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BLV	Vírus da Leucemia Bovina
b-ZIP	Basic Leucine Zipper Domain
CBP/p300	CREB binding protein
CMV	Citomegalovirus
CREB-2	Activating transcription factor 2
DHL	de-hidrogenase lática
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EIE	Ensaio Imuno Enzimático
ELISA	Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay
Env	Gene do envelope viral
Gag	Gene que codifica as proteinas estruturais
GenBank	Banco de genes
GMSI	Crioglobulinemia gamopatia monoclonal
Gp21	Glicoproteína 21
Gp46	Glico proteína 46
HAM	Mielopatia associada ao HTLV
HBZ	*Basic leucine zipper protein*
HDIg	High-dose gamma globulin
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
Htert	Human Telomerase Reverse Transcriptase
HTLV	Vírus Linfotrópico de Células T Humanas
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
ICB	Instituto de Ciências Biológicas

IEC	Instituto Evandro Chagas
IFN-γ	Interferon-gamma
IgE	Imuno globulina E
IGM	Imuno globulina M
IL-13	Interleucina 13
IL-15	Interleucina 15
IL-2	Interleucina 2
IL-2Rα	Interleucina 2Ralfa
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
kDA	Kilo Daltons
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen-1
LFA-3	lymphocyte function-associated antigen-3
LLcTA	Leucemia Linfoma de Clulas T de Adultos
LTC	Linfócitos T citotóxicos
LTR	Repetição de Terminação Longa
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Principal
mM	mile Molar
mmol/L	mile moles por litro
mRNA	Ácido Ribonucleico mensageiro
MTOC	Centro organizador de microtubulo
NC	Nucleo capsídeo
Ng	nano grama
NJ	Neighbor-Joining
Nm	Nanômetro
NMT	Núcleo de Medicina Tropical
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Open Reading Frame
PBMC	Células mononucleadas do sangue periférico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PET/MAH	Paraparesia Espástica
Pmol	pico moles
PTLV	Vírus Linfotrópico de Células T de Primatas

pX	Gene Px
Rex	Gene regulatório Rex
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
RNA	Ácido Ribonucléico
SELL	L-selectina
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SNC	Sistema Nervoso central
STLV	Vírus Linfotrópico de Células T de Símios
TAE	Tris-acetato EDTA
Tax	Gene regulatório Tax
TCD4+	Linfócitos TCD4
TCD8+	Linfócitos TCD8
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	Receptores de células T
TSP	Paraparesia Espástica Tropical
UFPA	Universidade Federal do Pará
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
WB	Westerns-Bloting
µL	micro litro

SUMÁRIO **Página**

1.	**INTRODUÇÃO**.....	15
2.	**JUSTIFICATIVA**.....	17
3.	**REFERENCIALTEÓRICO**.....	18
3.1.	CONTEXTO HISTÓRICO DOS VIRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS – HTLV.....	18
3.2.	BIOLOGIA DO HTLV-1.....	24
3.3.	TAXONOMIA DO HTLV-1.....	26
3.4.	EPIDEMIOLOGIA.....	27
3.5.	TRANSMISSÃO INTRAFAMILIAR DO HTLV-1.....	32
3.5.1.	PATOGÊNESE VIRAL E CICLO DE REPLICAÇÃO.....	31
3.5.1.1.	**Fatores virais**.....	31
3.5.1.2.	Transmissão célula a célula.....	33
3.5.2.	Produtos proteicos.....	35
	Fatores do hospedeiro.....	
3.5.3.	**Influência da rota inicial da infecção.**.....	36
3.5.4.	**Resposta imune ao HTLV-1 e carga viral**.....	37
3.5.5.	**Ciclo de replicação**.....	38
3.6.	DOENÇAS ASSOCIADAS AO HTLV-1.....	41
3.6.1.	**Leucemia linfoma de células T do adulto – LLcTA**.....	41
3.6.1.1.	Forma latente.....	42
3.6.1.2.	Forma crônica.....	42
3.6.1.3.	Forma linfomatosa.....	42
3.6.1.4.	Forma aguda.....	43
3.6.2.	**Paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 – PET/MAH**.....	43
3.6.3.	**Dermatite infectiva associada ao HTLV-1 – DIH**.....	45
3.6.4.	**Uveite**.....	46
3.6.5.	**Estrongiloidíase**.....	47
3.7.	EPIDEMIOLOGIA.....	47
4.	**OBJETIVOS**.....	53

4.1. OBJETIVO PRINCIPAL..... 53
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 53
5. MATERIAL E MÉTODOS..... 54
5.1. CASUÍSTICA..... 54
5.2. COLETA DE SANGUE..... 54
5.3. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA HTLV 55
5.4. EXTRAÇÃO DE DNA..... 55
5.5. PESQUISA MOLECULAR..... 55
5.5.1. Amplificação do gene da β-globina humana..... 55
5.5.2. Amplificação da região do gene *pX* do HTLV-1..... 56
5.5.3. Digestão enzimática para caracterização do tipo de HTLV..... 57
5.5.4 Amplificação da região 5'*LTR* do HTLV-1..... 57
5.5.5. Purificação dos produtos de PCR..... 58
5.5.6. Reação em cadeia da polimerase pré-sequenciamento..... 59
5.5.7. Eletroforese do DNA sequenciado..... 59
5.5.8 Analises, edição das sequencias nucleotídicas e construção das árvores filogenéticas...... 60
6. RESULTADOS..... 61
6.1. CONFIRMAÇÃO MOLECULAR DA TRANSMISSÃO INTRAFAMILIAR DO HTLV-1..... 62
6.1.1. Famílias com 100% de similaridade entre as sequências..... 64
6.1.2. Famílias em que houve divergência entre as sequências..... 73
6.1.3. Análise filogenética entre as amostras do estudo com as do Genbank..... 77
7. DISCUSSÃO..... 79
8. CONCLUSÃO..... 85
REFERENCIAS..... 86
APÊNDICE..... 105
ANEXO I..... 106

1. INTRODUÇÃO

Os retrovírus fazem parte de um grupo de agentes infecciosos que receberam maior atenção da comunidade científica a partir dos anos 1970 (COFFIN, 1996), quando foram descritos os oncogenes celulares relacionados a eles. A partir destes estudos preliminares foi descrito o primeiro retrovírus humano, o vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1) (POIESZ et al, 1980).

Até o presente momento foram descritos quatro tipos de HTLV (1, 2, 3 e 4) em todo o mundo. O HTLV-1 ocorre em todos os continentes. O HTLV-2 está presente na África, Asia e no continente Americano (MALONEY et al., 1992; HALL et al., 1994). Os HTLV-3 e 4 foram descobertos na área rural do sul de Camarões e até o presente momento são restritos a esta região (WOLFE et al. 2005, CALATTINI et al. 2005).

No Brasil a infecção pelo HTLV encontra-se presente em todas as regiões, variando suas prevalências de um estado para o outro, sendo mais elevadas na Bahia (1,35%), em São Paulo (0,4%), em Pernambuco e Rio de Janeiro (0,33%) e (0,08%) Manaus e Florianópolis (GABBAI et al. 1993; GALVÃO-CASTRO et al., 1997; CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002).

No estado do Pará, Cidade de Belém, foi realizado um estudo que investigou amostras provenientes do Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará, onde foi demonstrado que o HTLV-1 subtipo Cosmopolita, subgrupo Transcontinental possui uma maior frequência (SANTOS et al., 2009), exceto em imigrantes japoneses de Tomé-açú, onde foi identificado o subgrupo Japonês (VALLINOTO et al. 2004).

Em outro estudo realizado no mesmo estado, o qual se caracteriza por ser uma região endêmica para a infecção do HTLV-1, foi observada em comunidades ribeirinhas uma prevalência de 1,14%, demonstrando a importância de se conhecer a epidemiologia do HTLV-1 nessa área (FERREIRA et al., 2010).

O HTLV-1 pode ser transmitido através de linfócitos infectados (OKOCHI et al., 1986) e em populações endêmicas é transmitido principalmente da mãe para o filho, através do leite materno, e do homem para a mulher, pela via sexual. A transfusão sanguínea e o compartilhamento de seringas contaminadas durante o uso de drogas intravenosas contribuíram para uma maior dispersão epidêmica do HTLV durante o

século 20 (OKOCHI et al., 1984), por conta disso os Hemocentros através de triagens sorológicas (que no Brasil ocorreu a partir de 1993) controlaram este avanço (ALCANTARA et al., 2003).

O diagnóstico clínico é subsidiado por exame imunoenzimático (ELISA) que testa a presença de anticorpos contra o vírus no sangue do paciente, equivalendo como o teste de triagem, e pelo teste de confirmação (identificação do tipo viral) que é feito através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) seguido da digestão enzimática, que detecta diretamente o material genético viral possuindo elevada sensibilidade e especificidade (CARNEIRO-PROIETTI, 2002).

A infecção pelo HTLV-1 está associada com o desenvolvimento de doenças graves como leucemia/linfoma de células T do adulto (LLcTA) (UCHIYAMA et al., 1977), mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (PET/MAH) (OSAME et al., 1986), estrongiloidíase, uveíte, além de síndromes inflamatórias e complicações infecciosas (MOCHIZUKI et al., 1992; LENZI et al., 1996; BITTENCOURT & OLIVEIRA, 2001; HIRATA et al., 2006).

Dependendo da rota de transmissão e o tempo de exposição ao HTLV-1, estudos experimentais sugerem que o individuo pode desenvolver PET/MAH, quando relacionado ao sangue periférico (transmissão horizontal), e LLcTA quando está correlacionada a casos de exposição ao vírus através das mucosas (transmissão vertical) (KAPLAN et al., 1990; KANNAGI et al., 2000). Neste contexto, alguns estudos tem demonstrado a alta prevalência da infecção por HTLV entre os familiares portadores do vírus. Um destes estudos, que acompanhou 138 familiares a partir de 32 infectados, entre 1991 a 1995, identificou que a taxa geral de prevalência encontrada foi de 27,5%, sendo 18 vezes maior que a taxa geral de infecção na população que era de 1,5% (DUMAS et al., 1991; HOUINATO et al., 1998). Entretanto, a maioria dos trabalhos se baseava apenas em testes sorológicos sem que houvesse a confirmação molecular da possível transmissão intrafamiliar do HTLV-1.

2. JUSTIFICATIVA

O vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 pode provocar doenças no sistema nervoso que se caracteriza pela paralisia nas pernas, impotência sexual, perdas no controle urinário, além de estar associado a casos de leucemia/linfoma. Outro dado relevante é que a infecção caracteriza-se por lenta, persistente e assintomática, o que torna a maioria dos infectados a principal fonte de infecção para comunicantes e familiares.

Um estudo de base molecular contribui de certa forma, para traçar o perfil epidemiológico dos subtipos circulantes do HTLV-1 na população de Belém. Deste modo, o conhecimento da epidemiologia molecular do HTLV-1 pode controlar as vias de transmissão intrafamiliar, uma vez que núcleos familiares são mais fáceis de serem sensibilizados sobre as formas mais importante de transmissão do vírus, que é a transmissão sexual e/ou aleitamento materno.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. CONTEXTO HISTÓRICO DO VIRUS LINFOTRÓPICO DE CELULAS T HUMANAS – HTLV

A observação inicial de que os virus poderiam causar câncer foi feita em 1908, através do experimento realizado por Ellerman & Bang, ao demonstrar que células retiradas de sarcomas de galinhas eram responsáveis por produzir leucose em galinhas sadias. Este achado deu subsídios dois anos depois em 1910, a um famoso experimento de transmissão de um vírus cancerígeno, no Instituto Rockefeller, USA, ao pesquisador Peyton Rous que demonstrou a transmissão de tumores entre aves injetando filtrado de células tumorais em galinhas sadias.

Levaram anos de pesquisas para classificar a família do HTLV e em meados das décadas de 1960-1970, Temin & Mizutani descobriram uma proteína que convertia RNA em DNA e a denominaram de transcriptase reversa. Este evento marcou a descoberta da família *Retroviridae*.

Nos anos seguintes, em 1977, Kiyoshi Takatsuki e colaboradores descobriram uma variável de leucemia de células T em japoneses adultos com um único conjunto de propriedades que justificou a classificação da doença como uma síndrome chamada de leucemia de células T do adulto (ATL) (TAKATSUKI et al., 1977).

Em 1979, foi descrito o primeiro vírus humano que convertia RNA em DNA pela ação da transcriptase reversa, pelo grupo do pesquisador Robert Gallo no Instituto de Virologia Humana da Universidade de Maryland, em Baltimore, nos Estados Unidos.

Foi pesquisando partículas virais e pelo uso de microscopia eletrônica, em linhagens celulares T linfoblásticas, estabelecidas em cultura de células do sangue periférico e linfonodos de um paciente afro-americano, que esta doença foi originalmente identificada como linfoma cutâneo agressivo de células T, posteriormente classificada como Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto (LLcTA) (POIESZ et al., 1980).

Este agente provou ser imunologicamente distinto de outros vírus conhecidos. Assim, Gallo e o grupo composto pelo bolsista de pós-doutoramento Bernard Poiesz

identificaram o primeiro retrovírus humano, o qual foi nomeado HTLV-1 (vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1) (POIESZ et al., 1980).

Na época, no entanto, não ficou claro se HTLV-1 realmente desempenhava um papel na promoção da leucemia. Entretanto em 1981, Yorio Hinuma e colaboradores observaram partículas de retrovírus similares produzidas por uma linhagem celular de leucemia derivada de pacientes com LLcTA (HINUMA et al., 1981). Este vírus acabou sendo idêntico ao HTLV-1. Então os investigadores ligaram o HTLV-1 à LLcTA, mostrando que os pacientes com LLcTA, exceto os indivíduos-controle, produziram anticorpos à antígenos reconhecidos especificamente expresso em células T humanas infectadas com HTLV-1. Estes achados sugeriram um papel causal para HTLV-1 em LLcTA (JAVIER e BUTEL, 2008).

Ao longo dos seguintes anos, evidências que apoiaram a associação de HTLV-1 com LLcTA rapidamente se acumularam (LEVINE, 1991). Algumas das evidencias, que devem ser consideradas, na associação do HTLV-1 à promoção do LLcTA (LEVINE, 1991; MATSUOKA e JEANG, 2007) são:

- A distribuição geográfica de LLcTA no Japão se assemelhava com as distribuições geográficas de infecções por HTLV-1, e novos casos de infecção por HTLV-1 descoberto ao longo das regiões Central e costeiras Africanas, e menos frequentemente na bacia do Caribe, Taiwan, e Papua Nova Guiné, também foram ligados a LLcTA;
- Virtualmente cada paciente LLcTA tinha anticorpos anti-HTLV-1;
- Todas as células leucêmicas cultivadas a partir de pacientes com LLcTA continham DNA proviral de HTLV-1;
- A infecção por HTLV-1 de células T humanas normais induziu transformação como evidenciado pela imortalização celular;
- O vírus da leucemia bovina e o vírus da leucemia de células T-1 símia, retrovírus relacionados com o HTLV-1, causam leucemia em seus respectivos hospedeiros animais. Tais resultados de estudos epidemiológicos e estudos moleculares implicam o HTLV-1 como o agente etiológico da LLcTA. Ressaltando a importância desta descoberta.

Mani e colaboradores (1969) realizaram um estudo sobre casos de uma síndrome espástica paraplégica identificada no sul da Índia e Jamaica, quando então já se especulava a hipótese do envolvimento de um vírus como agente causal das desordens neurológicas (MANI et al., 1969). Entretanto somente em 1985, Gessain e colaboradores, relacionaram pela primeira vez o HTLV-1 com a Paraparesia Espástica Tropical (PET ou TSP do inglês) ao identificar anticorpos para HTLV-1 em 10 (59%) de 17 pacientes com PET na Martinica, enquanto no grupo controle de sadios houve apenas 4% de positividade (GESSAIN et al., 1985).

Neste contexto, pesquisadores japoneses da cidade de Kagoshima, na ilha de Kyushu, no sul do Japão, publicaram a associação do HTLV-1 com uma síndrome neurológica similar a PET (OSAME et al. 1986) que nomearam como HAM ou Mielopatia Associada ao HTLV-1 (MAH). Em 1988 um comitê da Organização Mundial da Saúde (OMS) recomendou o termo TSP/HAM (ou PET/MAH) como uma denominação conciliatória para a doença.

Em 1982, um segundo retrovírus humano isolado a partir de um caso de tricoleucemia (leucemia de células pilosas) foi descoberto pelo grupo de pesquisadores do laboratório de Gallo. A caracterização molecular e biológica do novo retrovírus foi relatada como próxima, porém distinta do HTLV-1, sendo então nomeado como Vírus Linfotrópico de Células T Humanas do tipo 2 ou HTLV-2 (KALYANARAMAN et al., 1982; EIRAKU et al., 1996).

No ano de 2005 foram descritos na zona rural da República dos Camarões, na África, os retrovírus HTLV-3 e HTLV-4, aparentemente transmitidos à espécie humana a partir de primatas não humanos do velho mundo, através de mordidas e arranhões provocados naqueles que comercializavan a carne desses animais. O HTLV-3 é semelhante ao STLV-3 (vírus linfotrópico de células T de símios do tipo 3) e o HTLV-4 não se assemelha a qualquer outro HTLV (CALATTINI et al.,2005, 2006; WOLFE et al., 2005; MAHIEUX et al., 2009).

Dada a importância desses vírus em produzir doenças (tanto em humanos quanto em símios, como a leucemia) o nome PTLV (vírus linfotrópico de células T de primatas) foi proposto para definir a espécie dos vírus relacionados que tem como hospedeiros primatas humanos (HTLV) e não humanos (STLV). Alguns estudos sugerem que o HTLV tenha emergido do contato entre humanos e primatas não-

humanos infectados (WATANABE et al., 1984; SONG et al., 1994; IMBRAHIM, DE THÊ e GESSAIN, 1994).

A possibilidade de transmissão zoonótica do STLV (vírus linfotropico de células T de símios) para populações humanas naturalmente expostas aos primatas, através da atividade como caça, merece atenção da saúde publica devido a natureza transmissível e patogênica desses vírus humanos. A homologia do genoma de linhagens do HTLV-1 com linhagens do STLV pode ser maior que entre HTLV-1 e HTLV-2. Os vírus HTLV-1 e HTLV-2 se originaram independente e estão relacionados ao STLV-1 e STLV-2, respectivamente (GOUBAU et al., 1994; GOUBAU; VANDAME; DESMYTER, 1996).

O HTLV-1 relacionado com vírus símio, chamado STLV-1, foi descoberto em vários primatas não humanos na África e na Ásia, e eles são também caracterizados por uma elevada estabilidade genômica (WATANABE et al., 1986; SONG et al.1994; IBRAHIM, DE THÉ e GESSAIN, 1995). Essa estabilidade do genoma (LIU et al., 1994), se deve à estratégia de replicação adotada por esses vírus, que ocorre mais em função da expansão clonal das células infectadas do que usando a transcrição reversa (WATTEL et al., 1995).

O HTLV-1 e STLV-1 Africano não podem ser separados em linhagens filogenéticas distintas de acordo com as suas espécies de origem, mas, ao contrário, parecem estar relacionadas de acordo com a origem geográfica de seu hospedeiro, deste modo o termo “vírus linfotrópico de células T de primata tipo 1" (PTLV-1) foi introduzida para descrever este grupo de vírus. (VANDAMME, SALEMI et al., 1998).

Neste contexto os segmentos genômicos provirais do HTLV-1 que exibem maior variabilidade genotípica são as sequências *LTR* e o gene *env*. Com base na comparação de sequências e análise filogenética do segmento *LTR* viral e da glicoproteína gp21, o HTLV-1 foi classificado em seis subtipos de acordo com a sua origem geográfica: HTLV-1a (Subtipo Cosmopolita), HTLV-1b (subtipo da África Central), HTLV-1c (subtipo Melanésio), HTLV-1d (novo subtipo da África Central) (HAHN et al.,1984; MIURA et al., 1994; MAHIEUX et al., 1997). Os HTLV-1e e HTLV-1f identificados em indivíduos da República Democrática do Congo e do Gabão, respectivamente (SALEMI et al., 1998).

A análise molecular da região *LTR* possibilitou a divisão do grupo Cosmopolita em quatro subgrupos que estão baseados na sua distribuição geográfica:

Transcontinental ou subgrupo A, Japonês ou subgrupo B, Oeste da África ou subgrupo C, norte da África ou subgrupo D. (GASMI et al., 1994; URETA- VIDAL et al., 1994; SALEMI et al., 1999b).

A maioria dos HTLV-1 encontrados na América do Sul pertence ao grupo Cosmopolita e subgrupo Transcontinental que é largamente disseminado na maioria dos continentes (YAMASHITA et al., 1999; POLIQUEN et al., 2004; RAMIREZ et al, 2002). No Brasil, em investigações multicêntricas (São Paulo, Bahia e Porto Alegre) todos os HTLV-1 identificados foram do grupo Cosmopolita, sendo a maioria do subgrupo Transcontinental (YAMASHITA et al., 1999; ALCANTARA et al., 2003).

Liu e colaboradores, 1996, mostraram que os três subtipos humanos (HTLV-1a, HTLV-1b e HTLV-1c) surgiram de três reservatórios símios geograficamente distintos da região Ocidental e Central Africana e na Indonésia, respectivamente (LIU et al., 1996).

Os novos subtipos (HTLV-1d, HTLV-1e e HTLV-1f) também parecem ter surgido a partir de transmissões recentes de símio para humanos na África (MAHIEUX et al., 1998; SALEMI et al., 1998b).

O parente símio mais próximo do HTLV-2, chamado STLV-2, em analogia com HTLV-1/STLV-1, foi isolado a partir de bonobos Africanos (*Pan paniscus*) (GIRI et al., 1994; LIU et al., 1994).

Em contraste com HTLV-1/STLV-1, o STLV-2 encontra-se em uma linhagem filogenética distinta, a respeito do HTLV-2, sugerindo uma transmissão interespécies ancestrais na África ou uma co-evolução de STLV-2/HTLV-2 entre suas espécies hospedeiras (VANDAMME et al., 1996) (fig., 1).

A história evolutiva dos PTLV é interessante tanto por razões teóricas quanto por razões práticas. Sobretudo por que o HTLV-1 é um patógeno humano importante. Análises filogenéticas das sequências do DNA, usando um bom modelo de substituição de nucleotídeos, podem ser usadas para responder diferentes perguntas epidemiológicas, tais como a disseminação relativa global dos diferentes subtipos genéticos.

Além disso, relatos recentes parecem sugerir que as infecções por STLV são mais difundidas do que se pensava anteriormente, em função do crescente interesse por xenotransplante, a investigação da sua origem e a capacidade de evolução para

transmissão interespécies devendo ser considerada com muita atenção (VANDAMME, SALEMI e DESMYTER 2000).

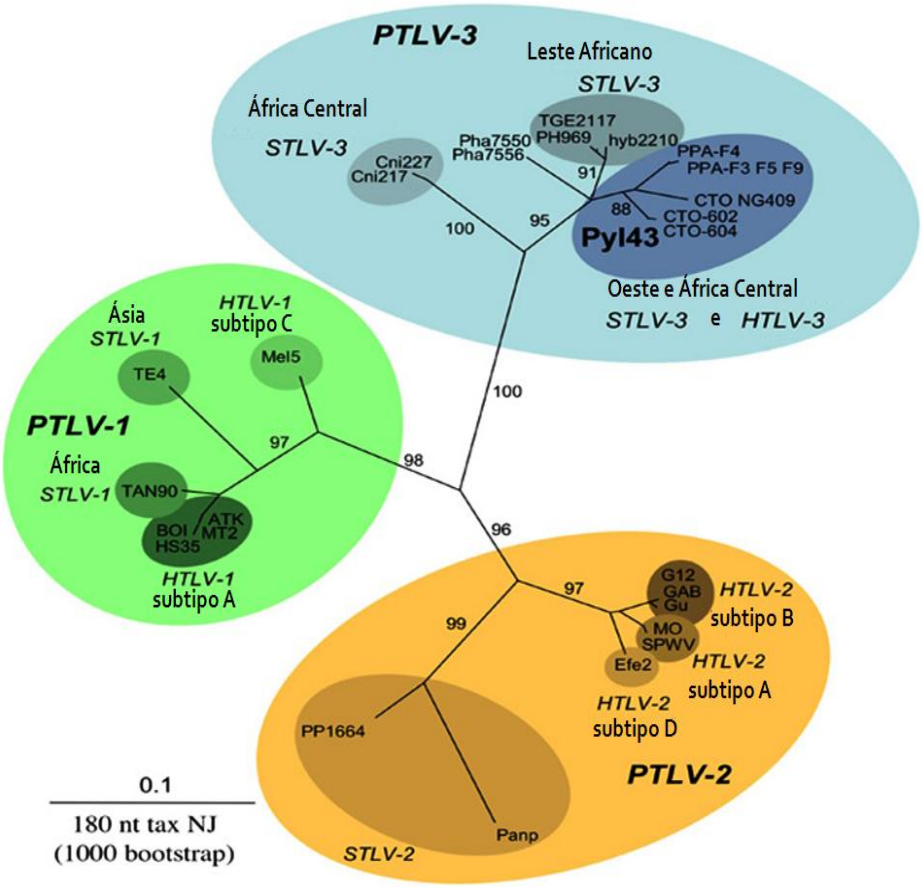

Figura 1: Árvore filogenética não enraizada mostrando o relacionamento entre os retrovírus descritos em primatas PTLV-1 (HTLV-1/STLV-1), PTLV-2 (HTLV-2/STLV-2) e o PTLV-3 (STLV-3 e HTLV-3).
Fonte: adaptado de WOLFE et al., 2005.

3.2. BIOLOGIA DO HTLV-1

O HTLV-1 é um retrovírus de aproximadamente 100 a 120nm de diâmetro (COFFIN, 1996), que possui envelope lipoprotéico formado durante o processo de brotamento da partícula viral (maturação) através da membrana plasmática celular do hospedeiro. O material genético é envolvido pelas proteínas do capsídeo, p15, p19, p24, que constituem o core viral (HJELLE, 1991; TANGY, 1996).

Uma glicoproteína transmembrana, gp21, serve como âncora para a proteína de superfície, gp46, e, junto à membrana lipídica encontra-se a proteína da matriz (WHITE & FENNER,1994; ARBEITSKREIS BLUT, 1999).

No interior da partícula viral, além do próprio genoma (duas fitas simples de RNA), está presente uma protease viral, a transcriptase reversa (TR) e a integrase (COFFIN, 1996a; Fig., 2) enzimas codificadas pelo vírus. Quando o RNA penetra nas células, principalmente linfócitos TCD4+, é convertido em DNA de fita dupla, que pela ação da transcriptase reversa e sua extremidade *5'LTR*, se integra ao genoma celular (BOGLIOLO, 2006), passando a ser chamado de provírus (TAMEGÃO-LOOPES, 2006).

Adicionalmente esse retrovírus possui em seu mapa genético regiões codificadoras (reguladoras de síntese proteica) chamadas de *gag* (antígenos grupo específicos), *pol* (polimerase) e *env* (envelope), além de uma região denominada pX que codifica duas proteínas regulatórias(Tax, Rex) (JOHNSON et al., 2001), proteínas acessórias (p12, p13, p30) e quatro ORFs (Open Reading Frame – quadros de leituras abertas) (FRANCHINE et al., 2000) e foi identificado também às margens da região pX o fator b-ZIP do HTLV-1 (HBZ) (JOHNSON et al., 2001; GAUDRAY et al., 2002) (fig., 3).

O genoma do HTLV-1 possui ainda, nos seus terminais carboxilas 5' e 3', as regiões chamadas LTR (repetição terminal longa) que contém o promotor e outros elementos reguladores. As proteínas estruturais são codificadas pelos genes *gag* e *env*. Os genes estruturais codificam poliproteínas que quando processadas geram as proteínas funcionais. A poliproteína do *Gag* (p55) é clivada pela protease viral em proteínas da matriz (MA, p19), capsídeo (CA, p24) e nucleocapsídeo (NC, p15) e a poliproteína p61 do gene *env* dá origem a duas subunidades, a proteína de

superfície (SU, gp46) e uma proteína transmembrana (TM, gp21) (RUSSO-CARBOLANTE et al., 2007) (fig., 3).

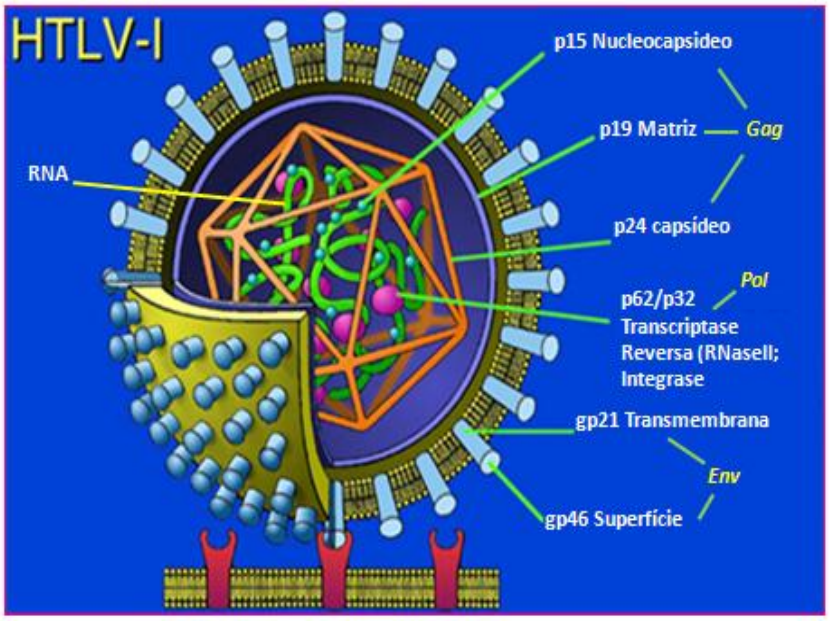

Figura 2: Desenho esquemático do HTLV-1.
Fonte: adaptado de COFFIN, 1996.

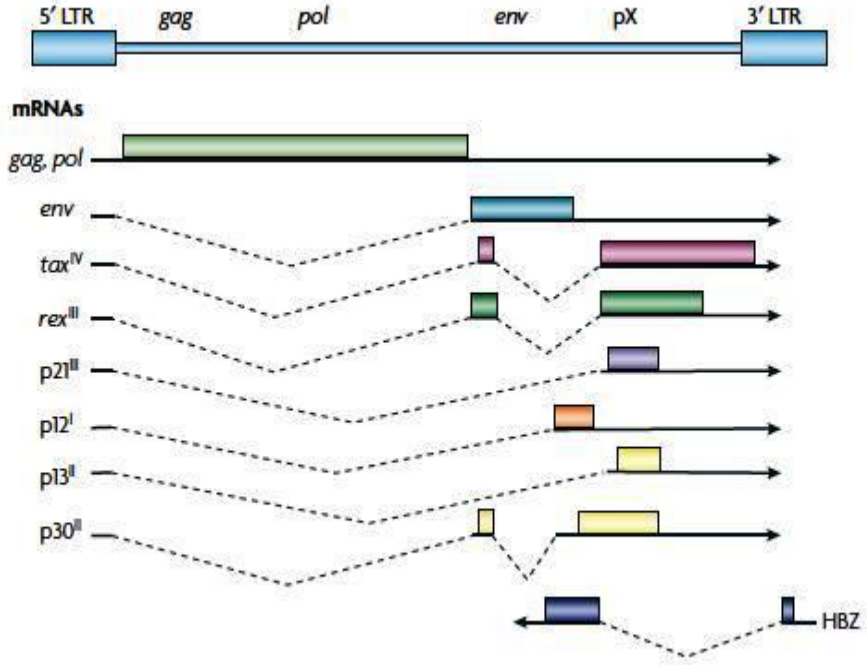

Figura 3: DNA proviral do HTLV-1 com respectivos genes e proteínas codificadas.
Fonte: Adaptado de MATSUOKA e JEANG, 2007.

3.3. TAXONOMIA DO HTLV-1

Os retrovírus constituem um único grupo de vírus RNA diplóides, que se caracterizam por síntetizar DNA de dupla fita, a partir de uma simples cadeia de RNA. Este DNA ou provírus passa, subsequentemente, a integrar o genoma celular do hospedeiro e serve como um molde para a replicação viral (BALTIMORE, 1970).

A família *Retroviridae* é representada por duas subfamílias: *Orthoretrovirinae* e *Spumavirinae*. O HTLV-1, do gênero *Deltaretrovirus* (COFFIN, 1996), pertence à subfamília *Orthoretrovirinae*, na qual também estão classificados o vírus da Leucemia bovina (BLV) e o vírus linfotrópico de células T de símio (STLV)[1].

Tabela 1 – Classificação das retroviroses

Subfamílias		
Oncovirinae	***Lentivirinae***	***Spumavirinae*: Spumaviroses**
1. Viroses da leucemia e sarcoma **a)** Aviária – ALV, ASV; **b)** Murina–MuLV, MuSV; **c)** Felina – FeLV, FeSV, RD-114; **d)** Bovina – BLV; **e)** Baboon – BaEV; **f)** Símia *Wolly* – SSV; **g)** Símia do Gibão – GaLV; **h)** Símia – STLV-1; **i)** Humana – HTLV- 1, HTLV-2 HTLV-3 , HTLV-4.	1. Anemiagênica 2. Equina – EIAV 3. Neurotrópica a) Unguladas – Viroses *Visna* e *Maedes* 4. Imunossupresivas a) Felina – FTV (FTLV); b) Bovina – BIV; c) Símia – SIV (STLV-3); d) Humana – HIV-1, HIV-2 (HTLV- 3/LAV, LAV-2).	a) Felina – FeSFV b) Váriasespecies c) Humana – HuSFV
2. Viroses carcinomatosas **a)** Murina – MMTV; **b)** Símia – MPMV. 3. Viroses imunossupressivas **a)** Felina – FeLV-FAIDS **b)** Símia – SRV		

Fonte: apud COSTA, 2009/Adaptado de GALLO RC. - *Book "Retrovirus Biology and Human Disease"*, 1989.

[1]. http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp.version

3.4. EPIDEMIOLOGIA

O HTLV infecta de 15 a 20 milhões de pessoas em todo o mundo (Fig.4) (MARTINS-FILHO et al., 2005), mas as taxas de soroprevalência diferem de acordo com a área geográfica, a composição socioeconômica e os comportamentos de risco individuais (LOPES e PROIETTI, 2008). Estas áreas de grande prevalência incluem o Japão, África subsaariana, bacia Caribenha, América do Sul, Melanésia e Oriente Médio (PROIETTI et al.,2005).

O HTLV-2 é endêmico da África e populações indígenas da América (MALONEY et al., 1992; HALL et al., 1994). Os HTLV-3 e 4 foram os últimos a serem descobertos e até o presente momento estão restritos a área rural do sul de Camarões (WOLFE et al. 2005, CALATTINI et al. 2005).

A descoberta sobre a diversidade do HTLV tem implicações no diagnostico da infecção e na triagem da doação de sangue, especialmente em regiões onde os vírus foram identificados (WOLFE et al., 2005).

A caracterização molecular do HTLV-2 em cepas da América do Norte, Europa e Sul da Ásia tem demonstrado a existência de dois subtipos principais HTLV-2a e HTLV-2b, exibindo uma divergência nucleotídica de 4% a 6%, de acordo com a região genômica investigada (DUENAS-BARAJAS et al. 1992; HALL et al. 1992; EIRAKU et al. 1996).

Nas Américas, as maiores taxas de prevalência para o HTLV são encontradas em alguns países do Caribe, como Jamaica e Trinidad e Tobago. Taxas de soroprevalência um pouco menores são encontrados em vários países da América do Sul, incluindo Brasil e Colômbia (CARNEIRO-PROIETTI, 2006).

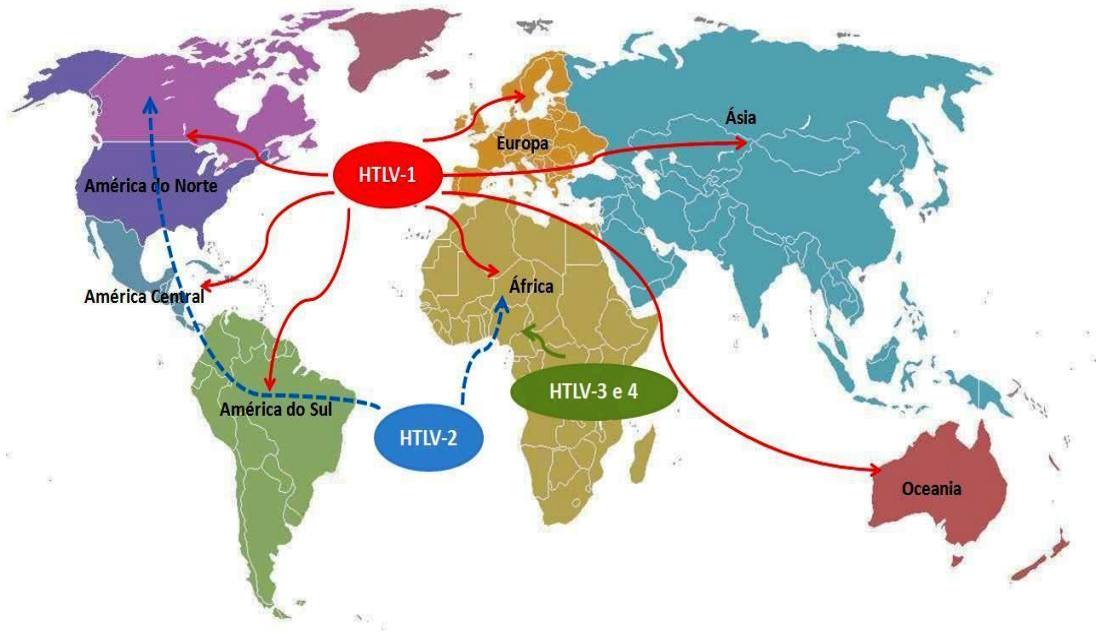

Figura 4: Distribuição do HTLV no Mundo.
Fonte: Adaptado de MALONEY et al., 1992; HALL et al., 1994; PROIETTI et al.,2005; MAHIEUX e GESSAIN, 2009.
Mapa: http://painenseausente.blogspot.com.br/2010_06_01_archive.html.

Neste contexto, através do perfil demográfico é provável que o HTLV-1 e HTLV-2 tenham chegado ao Brasil através de três vias (Fig. 5).

1) HTLV-1 e HTLV-2 presente na população nativa ameríndia que originou-se da Ásia;

2) através da migração de escravos africanos e;

3) através da migração japonesa no início de 1900.

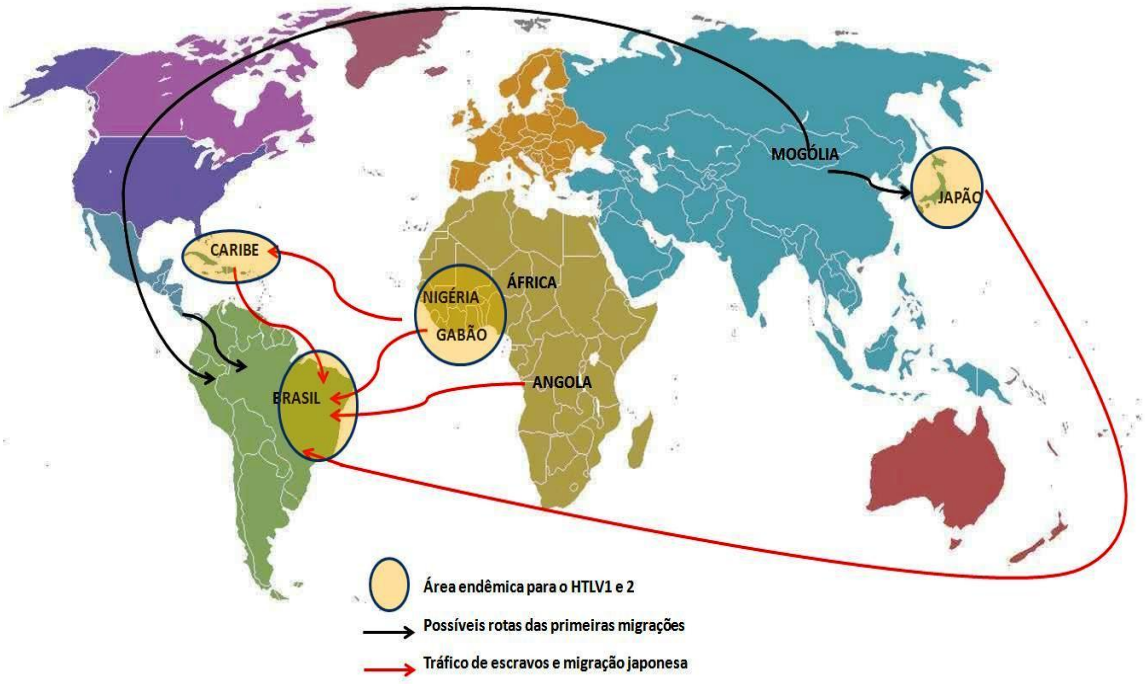

Figura 5: Possíveis caminhos da chegada do HTLV no Brasil.
Fonte: adaptado de OLIVEIRA et al., 1996;
Mapa: http://painenseausente.blogspot.com.br/2010_06_01_archive.html.

Os vírus linfotrópico de células T humana tipo 1 e 2 são endêmicos no Brasil. A prevalência do HTLV-1 varia entre as regiões geográficas no país e está geralmente presente em grupos de populações urbanas. No Brasil, ele está presente em todos os estados em que foi pesquisado, com prevalências variadas (CARNEIRO-PROIETTI, 2006) (Fig. 6).

O HTLV-2 é mais prevalente em tribos indígenas, embora também seja encontrado nas populações urbanas, principalmente em usuários de drogas (ALCANTARA et al., 2003).

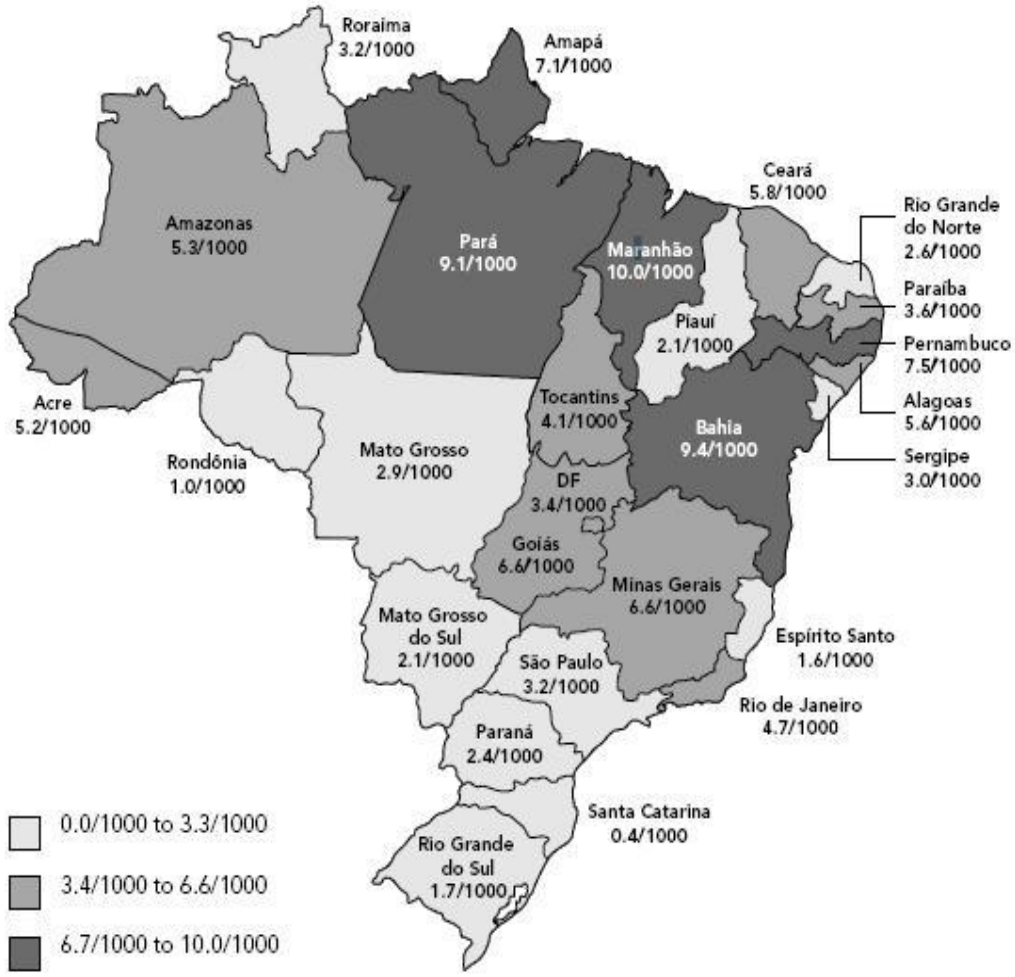

Figura 6: Taxa de prevalência de HTLV-1 e HTLV-2, em doadores de sangue expressos em /1000 doações nas capitais de 26 estados e do Distrito Federal do Brasil.
Fonte: CATALAN-SOARES et al., (2005).

O primeiro relato do HTLV-1 no Brasil foi feito em 1986 em uma comunidade japonesa residente em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, com soroprevalência de 13%, sendo a maioria dos indivíduos oriundos de Okinawa, sul do Japão (KITAGAWA et al .,1986; apud LOUREIRO, 2008,p. 24).

Estudo realizado por Nakauchi et al*.,* (1990), investigando a prevalência de anticorpos para HTLV-1 em 137 amostras de soro de duas populações da região Amazônica do Brasil, utilizando ensaio imunoenzimático (ELISA), detectaram soropositividade em 43 (31,4%) amostras.

Nakauchi e colaboradores (1991) usando o método imuno-enzimático (ELISA) e a análise por “Westerns-Bloting” (WB), em soro de um menino de 12 anos com a

síndrome de Guillain-Barré, proveniente de Bragança, área rural do estado do Pará, detectou pela primeira vez anticorpos para o HTLV-1. Não houve evidências de infecção por poliovírus, uma vez que a tentativa do isolamento de enterovírus a partir do material fecal resultou negativa, assim como a análise das amostras pareadas de soro obtidas durante a fase aguda e a convalescente.

Não foram detectadas imunoglobulinas de classe M (IgM) específicas para citomegalovírus (CMV), a reação de Paul-Bunnell foi negativa e a sorologia específica para o vírus de Epstein-Barr não era disponível. Por outro lado, a reatividade para HTLV-1 por EIE (Ensaio Imunoenzimático) do soro da criança foi posteriormente confirmada por *WB*, que revelou reação para o peptídeo p19 da região Gag (NAKAUCHI et al., 1991).

Em outro estudo que visou determinar a prevalência do HTLV entre 353 indivíduos com distúrbios neurológicos no Estado do Pará, utilizando EIE, encontrou prevalência geral de anticorpos específicos para HTLV em 8,8% (31/353) (LIMA, 2006).

Inquérito realizado em amostras de soro obtidas de 379 doadores de sangue do Centro de Hemoterapia do Pará (HEMOPA) positivas quanto à presença de anticorpos para HTLV, foram examinadas no Instituto Evandro Chagas (IEC) visando-se à confirmação dos resultados. O exame em duplicata de cada soro, pelo método imunoenzimático (ELISA), exibiu positividade em 112 (29,5%) dos espécimes previamente caracterizados como reativos na triagem inicial. Tais amostras também se revelaram positivas à análise pelo procedimento de *Western-BloIting*, com presença de anticorpos para HTLV-1 em 66 (59%), para HTLV-2 em 15 (13,4%) e resposta indeterminada em 31 (27,7%) indivíduos (LIMA et al.,1999).

Vallinoto e colaboradores (2004), ao investigarem 168 imigrantes Japoneses, residentes no município de Tomé-Açu no Estado do Pará, detectaram através do ELISA, presença de anticorpos anti-HTLV em 3 (1,96%) indivíduos, esse resultado foi confirmado através realização de PCR (VALLINOTO et al., 2004).

Em um estudo envolvendo comunidades ribeirinhas da região nordeste do Estado do Pará, no qual se avaliou a prevalência de HTLV em 175 ribeirinhos, através da realização de ELISA e confirmação por PCR, obteve-se prevalência total de 1.14% (n=2) para HTLV-1 (FERREIRA et al.,2010).

A primeira detecção, em Belém, da infecção pelo HTLV em doadores de sangue foi feita através da amplificação parcial das regiões genômicas *pX* e *env*, e evidenciou a ocorrência do subtipo molecular HTLV-2c (ISHAK et al., 1998).

Embora a abordagem sobre HTLV-2 não faça parte de nosso estudo, outro estudo identificou pela primeira vez na Amazônia Brasileira, um perfil molecular de infecção característico do subtipo HTLV-2b, demonstrando claramente a importância epidemiológica de estudos contínuos de investigação da emergência de novos agentes infecciosos em novas áreas geográficas, principalmente quando se considera que Belém, provavelmente, representa a principal porta de entrada deste vírus na Amazônia Brasileira (SANTOS et al., 2009).

3.5. TRANSMISSÃO INTRAFAMILIAR DO HTLV-1

No que se refere no modo de transmissão o HTLV-1 é transmitido principalmente por duas vias: verticalmente e horizontalmente (IGAKURA et al., 2003).

A transmissão vertical ocorre quando a mãe infectada transmite o vírus para o feto ou para o recém-nascido, através do aleitamento materno prolongado (por mais de seis meses) e está associado a uma probabilidade de transmissão de 10,5% a 39,6%. Os principais fatores de risco para a transmissão do vírus são a alta carga proviral, o alto percentual de células mononucleares infectadas presentes no leite materno e os altos títulos de anticorpos no soro. Outra forma de transmissão vertical é pela via placentária, entretanto é menos frequente (KOMURO et al., 1983; KINOSHITA et al., 1984; TAKE et al., 1993).

A transmissão horizontal pode ocorrer pelo contato sexual e se dá principalmente de homem infectado para mulher, pela presença de células infectadas com o retrovírus presente no sêmen. Nos casos mulher-homem e homem-homem, ocorrem com uma baixa frequência (OKOCHI et al., 1984; NAKANO et al., 1986).

Na transmissão parenteral os vírus podem ser transmitidos pelos componentes celulares durante a transfusão de sangue (OKOCHI et al., 1984), compartilhamento de agulhas e seringas contaminadas (MANNS et al., 1999), ou transplante de órgãos e tecidos contaminados (ZARRANZ, 2003). Entretanto, estima-se que a transmissão

viral por transfusão ocorra em baixos, porém significativos níveis (SCHREIBER, et al., 1996; BUSCH et al., 1997).

Alguns estudos sugerem que a transmissão vertical é mais prevalente no gênero feminino que no masculino (URETA-VIDAL et al.,1999; CATALAN-SOARES et. al., 2004; ESHIMA et. al., 2009).

Em outro estudo de soroprevalência em adolescentes, realizado no Japão, sugere que a infecção por HTLV-1 é mais comum no gênero masculino até os 20 anos de idade, quando a transmissão sexual do homem para a mulher se torna mais provável. Isto sugere que a transmissão de mãe para filho é mais comum no gênero masculino (ESHIMA et. al., 2009).

Estudos nacionais e internacionais têm mostrado a alta prevalência da infecção por HTLV entre as famílias de portadores do vírus. Em áreas de alta endemicidade no Japão, foram identificadas prevalências mais elevadas, de 38,5% nos familiares de infectados (KAJIYAMA et al., 1986) e 47,7% nos familiares de gestantes portadoras de HTLV-1 (TAKE et al., 1993).

Em familiares de 20 doadores de sangue soropositivos para HTLV-1 em Twain foi encontrada uma prevalência de 38,8% (LU et al., 2003). No Chile, a taxa da infecção entre familiares de portadores de PET/MAH foi de 29,1%, sendo 30 vezes maior que na população (TOSHINOBU et al., 1999).

Em estudo retrospectivo realizado em 120 mães peruanas infectadas com HTLV-1, a prevalência geral da infecção nas suas proles foi de 23,3% (28/120) e de 32,6% (23/76) nos amamentados por mais de seis meses (GOTUZZO et al., 2000).

No Brasil, estudo realizado na região metropolitana de Belo Horizonte (MG), a partir de doadores soropositivos, identificou-se evidências de agregação familiar da infecção por HTLV-1 e HTLV-2. A transmissão sexual foi à via mais significativa, principalmente no sentido homem → mulher (48,8%), já que no sentido mulher → homem foi de apenas 7%. A transmissão vertical foi de 17,5%, sendo que 73,5% dos filhos infectados eram mulheres (CATALAN-SOARES et al., 2004).

Evidências epidemiológicas sugerem que a transmissão sexual do HTLV-1 é a principal via de transmissão que leva ao desenvolvimento posterior de PET/MAH. Essa teoria é apoiada pela predominância de PET/MAH no sexo feminino (MALONEY et al., 1998) e pela atividade sexual iniciada mais cedo nos pacientes

com PET/MAH quando comparados com portadores assintomáticos (KRAMER *et al.,* 1995).

Costa em 2009 investigou uma possível transmissão familiar em 85 portadores atendidos no Núcleo de Medicina Tropical, Belém, Pará, e identificou através do método sorológico (ELISA) que 40,2% das famílias apresentaram pelo menos um comunicante familiar reagente ao anti-HTLV-1/2, ou seja, no mínimo com dois infectados no grupo familiar.

Existem divergências na literatura sobre qual seria a via de transmissão de maior importância. Estudo realizado em Nagasaki, no Japão considerou a transmissão vertical como a principal via (HINO et al.,1985). Assim como no Zaire, África central, um estudo realizado em 82 familiares de 16 portadores de HTLV-1 encontrou 15 pares mãe e filho, todos eles soropositivos, concluindo uma maior importância da transmissão vertical (LIU et al., 1994). Já em um estudo brasileiro de MG a transmissão horizontal foi a via mais significativa de disseminação do HTLV, resultado semelhante visto no estudo de Costa, 2009, que achou uma proporção superior a seis vezes no sentido homem para mulher da transmissão do HTLV-1 (CATALAN-SOARES et. al., 2004, COSTA, 2009).

Quanto à direção preferencial da transmissão do HTLV entre casais, alguns estudos sugerem que a transmissão ocorra muito mais acentuadamente do homem para a mulher que no sentido inverso. Estudo que abordou essa questão foi realizado na década de 1980, no Japão, prospectou que em dez anos a transmissão sexual seria maior que 60 vezes na via de transmissão do homem para a mulher que no caso contrário (KAJIYAMA et al., 1986).

Miyazaki propôs em seus estudos realizados com 534 casais, que a paridade global da transmissão sexual independe do *status* sorológico feminino, mas sim a duração da relação e o *status* sorológico do marido (STUVER, et. al., 1993), corroborando ainda mais com os estudos de Catalan-Soares e Costa.

Essa preferência de direção da transmissão da infecção do HTLV entre os casais é justificada por fatores biológicos (HOUINATO et al., 1998), sendo os linfócitos do semêm experimentalmente comprovados como transmissores da infecção (IWAHARA et. al., 1990). Há de se levar em conta, a maior frequência que os homens têm em se relacionar com múltiplos parceiros sexuais do que as

mulheres, enfatizando o papel do gênero masculino na disseminação do HTLV (COSTA, 2009).

3.6. PATOGÊNESE VIRAL E CICLO DE REPLICAÇÃO.

Os estudos que abordam a patogênese de doenças associadas ao HTLV-1 têm explorado a influência de fatores biológicos, específicos do vírus e os que derivam do hospedeiro, como a rota inicial da infecção, a carga proviral e o tipo de resposta imune apresentada (BARMARK et al., 2002).

O entendimento dos eventos celulares e moleculares, que acompanham a infecção pelo HTLV, é essencial para esclarecer as diferenças entre os mecanismos de patogênese que levam para uma ou para outra doença, ou seja, definir quais os fatores que determinam se o infectado irá desenvolver LLcTA, PET/MAH ou permanecerá assintomático, e quais são as diferenças nos processos patogênicos dessas doenças.

Estudos com esse objetivo, tem sido direcionados ao esclarecimento das ações de proteínas codificadas na região *pX* do genoma viral, especialmente a proteína Tax (trans-ativador x, fosfoproteina com 40 KDa) que desempenha um significativo papel na replicação viral e na transformação de células do hospedeiro (BARMAK et al., 2002).

3.6.1. Fatores virais

3.6.1.1. Transmissão célula a célula

Achados clínicos importantes tem sido associados com infecções por HTLV-1 desde os experimentos pioneiros de Poiesz e colaboradores (POIESZ et al., 1980), na qual as formas de transmissão do HTLV estão bem definidas e são dependentes principalmente do contato entre células infectadas e células não infectadas. Essa transmissão célula a célula permite uma rápida evasão frente ao sistema imune de hospedeiro e seus anticorpos neutralizantes (SATTENTAU, 2008).

Estudos realizados por IGAKURA e colaboradores em 2003, MATSUOKA & JEANG em 2007, sugeriaram que o centro organizador de microtúbulos (MTOC) é

polarizado nas junções célula-célula formando a sinapse virológica na membrana (IGAKURA et., al 2003; MATSUOKA & JEANG, 2007) (fig., 7).

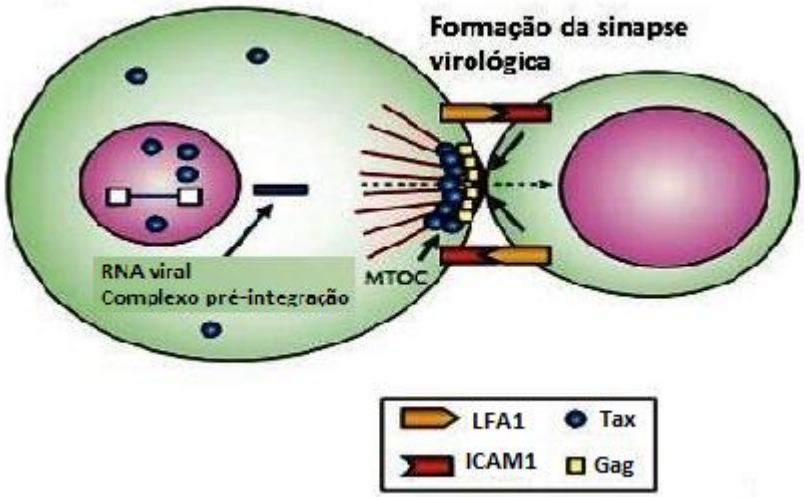

Figura 7: Transmissão célula-célula do HTLV-1 ocorrendo através da sinapse virológica.
Na figura 7, o g*ag* viral do HTLV-1 e o complexo RNA genômico acumulam-se na saída da sinapse passando para a célula não infectada. Pela mediação da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM1) a polarização do MTOC é aumentada no ponto de contato, indicando que a interação de ICAM1 e antígeno associado à função de linfócitos-1 (LFA1) é importante para a infecção de HTLV-1 (BARNARD et al., 2005). Além disso, no contato célula-célula, a formação de sinapses também aciona a proteína Tax do HTLV-1, que pode ser encontrada em torno do MTOC e na região de contato a qual tem sido empregada a promover a formação de MTOC e ligação do ICAM1 (MAJOROVITS et al., 2008). LFA3, L-selectina (SELL) e molécula de adesão de célula vascular-1 (VCAM-1) são também reguladas pela Tax (TANAKA et al., 1995; VALENTIN, H. et al., 1997). Como LFA1 é expressa em linfócitos T, este mecanismo é consistente com a infecção preferencial dos linfócitos T por HTLV-1 in vivo na qual integra o seu genoma aleatoriamente no hospedeiro (DOI et al., 2005).
Fonte: adaptado de MATSUOKA & JEANG, 2007.

Outra explicação sobre o modo de transmissão de célula-célula foi proposta por JONES & GREEN em 2009, que sugeriram que a transmissão do HTLV-1 ocorre também através das reuniões virais extracelulares como visto na figura 8. Neste contexto as analises de sequências nos locais de integração evidenciam que a

proliferação de HTLV-1 às células infectadas é clonal (WATTEL et al., 1995) e persistente (ETOH et al., 1997; CAVROIS et al., 1998).

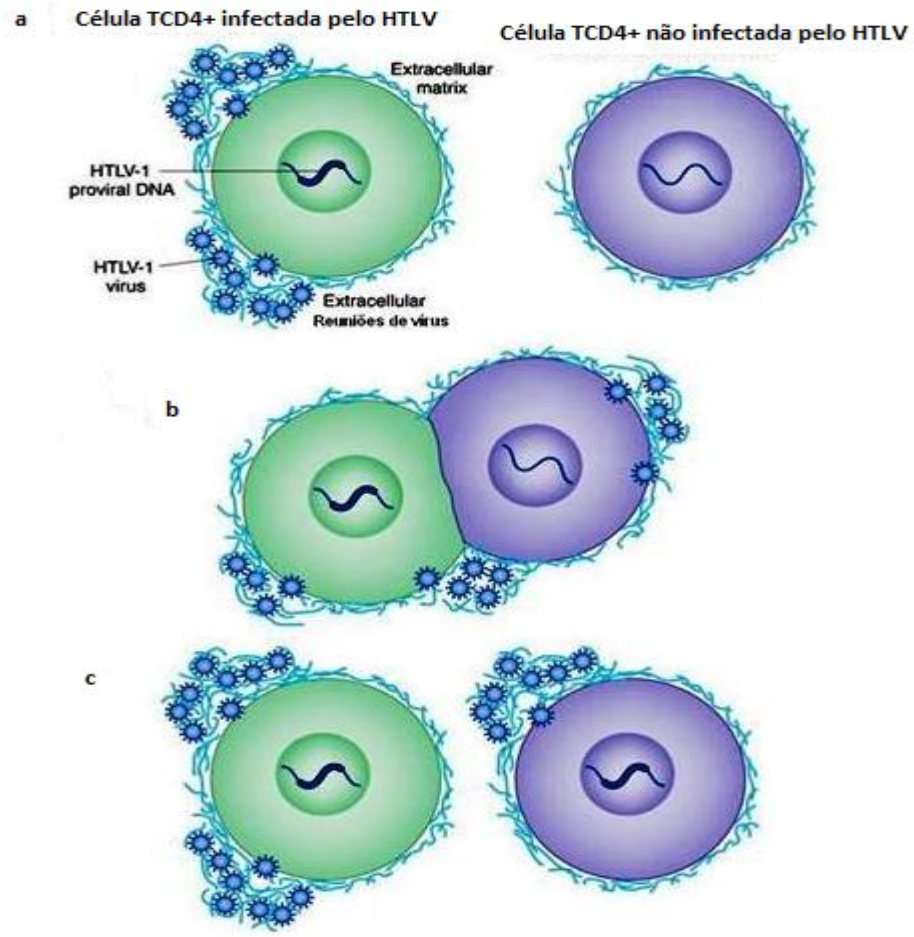

Figura 8: Em a, b e c: Transmissão célula-célula pelo HTLV-1 através das reuniões extracelulares.
Em (a) podemos observar que as células TCD4+ não infectadas, como a maioria das células, é coberta por uma matriz extracelular que consiste de proteoglicanos, proteínas estruturais e outras proteínas especializadas. Células TCD4+ infectadas por HTLV-1 expressam quantidades mais elevadas de vários componentes específicos da matriz extracelular e proteínas celulares que se deslizam para locais onde virions de HTLV-1 estão brotando para formar a montagem viral extracelular; (b,c). Quando a célula infectada pelo HTLV-1 interage com a célula TCD4+ não infectada, estas reuniões virais são rapidamente transferidas para a superfície da célulanão infectada (b) que resulta em infecção da célula-alvo (c) (MATSUOKA & JEANG, 2007).

3.6.1.2. Produtos proteicos

A proteína *Tax* é um fator crítico para ativação do genoma e atua como transativador transcricional, aumentando a expressão gênica viral, através da interação da terminação 5'*LTR* do genoma proviral com fatores celulares. Interage também com fatores de transcrição celular e de sinalização molecular para reforçar ou reprimir a expressão gênica celular (BARMAK et al., 2002).

A regulação gênica celular desordenada provocada pela proteína *Tax* contribui para a patogênese de doenças induzidas pelo HTLV-1. Essa atividade da *Tax* afeta a expressão de vários fatores que tornam produtiva a replicação viral e a transformação celular observada na LLcTA; aumenta a expressão de várias citocinas (IL-2, IL-2Rα, IL-15), de receptores envolvidos na proliferação e crescimento de células e a expressão de vários fatores de transcrição de proto-oncogenes; inibe supressores de tumor como: P161NK4a, p151NK4b e hDlg e também a expressão celular de genes envolvidos no reparo de DNA e de apoptose, bem como reprime a expressão dos fatores de transcrição p181NK4c e p53 (BARMAK et al., 2002).

A combinação do aumento de fatores de indução do crescimento e a diminuição de fatores de reparo de DNA e de apoptose, nas células infectadas pelo HTLV-1, favorecem o desenvolvimento de transformações das células T e a consequente gênese da LLcTA (BARMAK et al., 2002).

Considerando a raridade da ocorrência de ambas as doenças (PET/MAH e LLcTA) no mesmo portador de HTLV-1, supõe-se que cepas do vírus teriam comportamentos distintos e poderiam ser neuropatogênicas ou leucemogênicas, mas estudos nesse sentido não foram conclusivos (BANGHAM, 2003; TILMANN et al.,1994).

Provírus encontrados no Sistema Nervoso Central (SNC) de pacientes com PET/MAH apresentavam ausência de uma porção do gene *Tax*, sugerindo o papel da *Tax* na gênese de mutantes defeituosos na PET/MAH (KIRA et al., 1991).

Outros estudos demonstraram a existência de mutantes de escape *Tax* durante o desenvolvimento de LLcTA em alguns pacientes. Análises filogenéticas revelaram dois subgrupos de genes *Tax*, um deles significativamente incidente nos casos de

PET/MAH quando comparado com a LLcTA ou portadores assintomáticos (FURUKAWA et al., 2001).

Estudo da sequência *Tax* do HTLV-1 de gêmeos homozigotos, sua mãe e irmão, todos infectados e com PET/MAH, indicou uma árvore de infecção dos indivíduos com uma sequência *Tax* consensual compartilhada. O exame da sequência *Tax* de outros gêmeos homozigotos infectados e assintomáticos diferiu em cinco posições de nucleotídeos, incluindo quatro substituições que resultaram em trocas de aminoácidos incorporados dentro da proteína correspondente (NAKANE et al., 2000).

Desde a descoberta do HTLV-1, tem havido avanços significativos para a compreensão sobre a imunologia e oncogênese relacionadas à infecção pelo vírus. No entanto, o mecanismo preciso da oncogênese ainda não foi determinado. Recentes e intensas pesquisas sobre o gene *antisense HBZ* (*basic leucine zipper protein*) renderam uma nova e importante visão no processo da patogênese viral (MATSUOKA & GREEN, 2009):

O gene *HBZ* parece ser o único gene viral que está constantemente expresso em células infectadas por HTLV-1 e células da LLcTA. Os dados são consistentes sobre o *HBZ* desempenhar um papel crítico na proliferação das células infectadas, bem como transformá-las em células da LLcTA. Portanto, abordagem terapêutica direcionada contra *HBZ* representa uma perspectiva promissora para o tratamento da LLcTA, bem como para a PET/MAH (MATSUOKA & GREEN, 2009).

Por outro lado, Saito et al., (2009) quantificaram os níveis de expressão de mRNA do HBZ e da *Tax* no sangue periférico de 56 pacientes de PET/MAH. A carga de mRNA do *HBZ*, mas não da *Tax*, foi positivamente correlacionada com a severidade da doença e com concentração neopterina (os níveis elevados resultam de ativação do sistema imunitário, doença maligna, rejeição a aloenxertos e infecções virais) no liquido céfalo- raquidiano (LCR) de pacientes com PET/MAH.

Além disso, a expressão do mRNA *HBZ* nas células infectadas por HTLV-1 diminuiu após o tratamento bem sucedido para PET/MAH, com imunomoduladores. Estes resultados sugerem que a expressão do HBZ “in vivo” desempenha um papel na patogênese da PET/MAH (SAITO et al., 2009).

3.6.2. Fatores do Hospedeiro

Ao falarmos de fatores do hospedeiro não podemos deixar de considerar sobre o antígeno leucocitário humano (HLA), uma vez que seus alelos estão relacionados com a proteção contra o desenvolvimento de PET/MAH, e também com o aumento do risco de LLcTA (BARMAK et al., 2002).

Indivíduos que possuem moléculas de HLA da classe I que predispõe a LLcTA (HLA-A*26, HLA-B*4002, HLA-B*4006 e HLA-B*4801) têm incapacidade no reconhecimento de 59 diferentes peptídeos *Tax* do HTLV-1, não estando habilitados a gerar uma eficiente população de linfócitos T citotóxicos (CTL). Essa ausência dos CTL *Tax* específicos resulta em acentuada diminuição da morte de células T infectadas, ocasionando suas sobrevivências e eventuais transformações (YASHIKI et al., 2001).

As moléculas do HLA da classe I que predispõem a PET/MAH têm uma grande capacidade de ligação com peptídeos *Tax*. Os pacientes, neste caso, montam uma forte resposta CTL sobre esta proteína imunodominante. Essa eficiente resposta provoca lise de células infectadas com HTLV-1, incluindo linfócitos T CD4+ e elimina células com potencial de tornarem-se leucêmicas. A população eficiente de CTL *Tax* específicos pode provocar a lise de células alvo infectadas e de populações celulares circunvizinhas residentes no SNC, favorecendo o processo patológico da PET/MAH (JACOBSON et al., 1990).

Estudos indicam que o alelo HLA-A*02 protege contra o desenvolvimento de PET/MAH (JEFFREY et al., 1999), mas outro estudo, discordante, demonstra que a frequência do alelo HLA-A*02 não tem significativa diferença em portadores assintomáticos do vírus (YASHIKI et al., 2001). Por outro lado, o alelo HLA de classe II, HLA-DR*010 parece aumentar o risco de PET/MAH, mas esta predisposição foi observada apenas em pacientes que careciam do alelo protetor HLA-A*02 (JEFFERY et al., 1999).

3.6.3. Influência da rota inicial da infecção

Estudos experimentais sugerem que a rota inicial de exposição ao HTLV-1 através do sangue periférico está correlacionada com casos de PET/MAH e a

exposição ao vírus através das mucosas favorece a gênese da LLcTA (KAPLAN et al., 1990; KANNAGI et al., 2000).

Quando inoculados, oral ou intravenosa, com HTLV-1 (linhagem celular MT-2), ratos imunocompetentes tornam-se persistentemente infectados. Todos os inoculados de forma intravenosa produziram níveis significativos de anticorpos anti-HTLV-1 e geraram uma resposta proliferativa de células T contra o vírus. Esta resposta não ocorreu nos inoculados pela via oral (KANNAGI et al., 2000).

Os resultados indicam que a exposição por mucosa, não induz a uma reposta imune, tanto humoral quanto celular. Isto pode ocasionar a sobrevivência e eventual transformação da população de células infectadas conduzindo a gênese leucêmica relacionada com a LLcTA.

Uma forte resposta imune antiviral na inoculação intravenosa em ratos conduz a destruição de células alvo infectadas com HTLV-1, incluindo células TCD4+ e células residentes no SNC. O resultado final deste processo gera uma consistente inflamação e destruição celular característica de doença neurodegenerativa induzida pelo HTLV-1 (BARMAK et al., 2003).

3.6.4. Resposta imune ao HTLV-1 e carga proviral

Pacientes de PET/MAH apresentam altos níveis de anticorpos anti-HTLV tanto no soro como no LCR. CTL precursores *Tax* específicos foram encontrados em níveis de 40 a 280 vezes superior em pacientes com PET/MAH que em portadores assintomáticos de HTLV-1 (ELOOVARA et al., 1993).

Consistente com este achado, pacientes com PET/MAH exibem um aumento da resposta CTL CD8+, sendo a maioria especifica para *Tax*. Estes CTL CD8+ foram ausentes em pacientes sem doenças neurológicas (JACOBSON et al*.,* 1990).

Não foi definida uma correlação entre a expansão de células T CD8+ e a carga do DNA proviral. A atividade de CTL CD8+ *Tax* específica tem sido demonstrada, tanto no sangue periférico como no LCR dos pacientes com PET/MAH (GRETEN et al., 1998).

Os níveis de CTL CD8+ *Tax* específica são 2,5 vezes superior no LCR, sugerindo um papel na mediação da inflamação e destruição celular dentro do SNC. A longevidade *Tax* específica destes linfócitos foi observada, de forma consistente,

durante nove anos em um paciente de 19 anos acompanhado desde o início dos sintomas (GRETEN et al., 1998).

Análise imunohistoquímica da medula espinhal demonstrou que a maior atividade das CTL está presente nas lesões inflamatórias ativas (LEVIN et al., 1997).

Se o HTLV-1 infecta células do SNC, CTL *Tax* específicas podem matar diretamente as células que estão expressando a proteína *Tax*. As células neuronais podem ser mortas por um mecanismo onde a expressão de citocinas tóxicas inflamatórias induz a apoptose de células vizinhas não infectadas. CTL *Tax* especificas também podem matar populações de células residentes no SNC por expressão de uma determinante reação cruzada celular (BARMAK et al., 2003).

A carga de DNA proviral é elevada tanto na PET/MAH como na LLcTA se comparada com portadores assintomáticos do HTLV-1 (MATSUZAKI et al., 2001).

Pacientes com PET/MAH apresentam um significativo aumento de 10 a 100 vezes no DNA proviral dentro das células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) (KIRA et al*.,* 1991). Entretanto, um pequeno número de pacientes desenvolve PET/MAH mesmo com uma baixa carga proviral. Isto, provavelmente, se deve a fatores do hospedeiro que influenciam na resposta imune, como o haplótipo do HLA (NAGAI et al., 1998).

O principal mediador da defesa celular é o linfócito T. A população de linfócitos T se divide em células T auxiliares (CD4+), em células citotóxicas (CD8+) e em células T supressoras (CD8+). Os linfócitos T auxiliares e citotóxicos circulam entre os órgãos linfóides ou não linfóides e o sangue periférico, procurando complexos de histocompatibilidade principal (MHC) na superfície das células (BRAND et al, 2009).

Esses linfócitos interagem através dos seus receptores de células T (TCR) com os MHC das células apresentadoras de antígenos (APC) no processo de formulação da resposta imune específica, enquanto os linfócitos T supressores modulam a resposta imunológica negativamente. Na infecção pelo HTLV-1, os CTL destroem as células CD4+ infectadas controlando a carga proviral, sendo, portanto, um dos principais reguladores da infecção (BRAND et al, 2009).

Todavia, foi mostrado que, durante a infecção natural com HTLV-1, os CTL também podem ser infectados; em consequência, esses CTL se programam para a autodestruição e, assim, limitam a defesa antiviral (BRAND et al, 2009).

O intervalo entre a infecção e a soroconversão depende da via de infecção. Em receptores de produtos sanguíneos infectados pelo HTLV-1, a média do período de janela imunológica tem sido estimada em torno de 51 dias. No entanto, em crianças infectadas por suas mães, os anticorpos para HTLV-1 desenvolverem-se cerca de três anos após o nascimento. Em indivíduos infectados por contato sexual, o momento exato da conversão é desconhecido, embora um intervalo de mais de três anos tenha sido descrito (VRIELINK, 2004).

3.6.5. Ciclo de Replicação

Um modelo esquemático que ilustra o ciclo e os possíveis mecanismos através dos quais o HTLV-1 vence e escapa do sistema imune do hospedeiro está representado na figura 9. A seqüência de eventos está marcada numéricamente e são as seguintes:

(1): adsorção e entrada de um virion em uma célula alvo; **(2)**: desnudamento do cápsideo liberando o RNA viral; **(3)**: baixa frequência da edição de RNA genômico por APOBEC3G, um possível mecanismo para silenciamento epigenético; **(4)**: a transcrição reversa em dupla fita de DNA; **(5)**: integração proviral no genoma do hospedeiro; **(6)**: transcrição inicial e exportação completa/duplo *splicing* do mRNA viral por fatores celulares do hospedeiro; **(7)**: tradução favorável da *Tax* devido a uma forte sequência Kozak; **(8)**: transativação da *Tax* do LTR viral para promover a expressão do gene viral; **(9)**: aumento da transcrição celular da *Tax*, promoção de danos no DNA, regulação do ciclo celular e induçãoda proliferação de celulas geneticamente alteradas. A *Tax* também aumenta a função hTERT inicialmente para induzir a transformação de células infectadas com vírus, mas posteriormente baixas modulações de hTERT que ocasiona acúmulo de rearranjos cromossômicos mantendo a transformação; **(10)**: expressão elevada de*Tax* pelas células infectadas pelo vírus resultam em sua eliminação pela CTL *Tax*-específico induzindo morte celular;**(11)**: Expressão de proteínas acessórias virais como *p12* e *p13* facilitam a persistência viral no hospedeiro. Além disso, a extração insuficiente do CTL HBZ-específico não lisa células LLcTA devido à baixos níveis de expressão de proteínas HBZ em todas as linhagens celulares de LLcTA e em linhagens de celulas HTLV-1 transformadas. Isso ajuda na evasão ao sistema imune, ocasionando a persistência

viral; **(12)**: a proteína acessória, *p30*, translocada para o núcleo forma complexos de ribonucleoproteína com *Rex* para reter mRNA T*ax/rex* no núcleo, na verdade reprime a expressão de*Tax*; **(13)**: O HBZ reprime o nível transcricional de *Tax* pela competição do CREB-2 e CBP/p300, e ao nível de proteína, compete pelo aumento da expressão de PDLIM2. Além disso, HBZ complementa a redução da atividade da *Tax* pela ativação de fatores celulares para induzir transformação e proliferação de células geneticamente instáveis; **(14)**: mecanismos de silenciamento epigenéticos também resultam na diminuição de níveis de expressão de *Tax* facilitando a persistência viral; **(15)**: redução de *Tax* e aumento dos níveis de HBZ reativam hTERT, que é um evento chave na progressão da LLcTA.

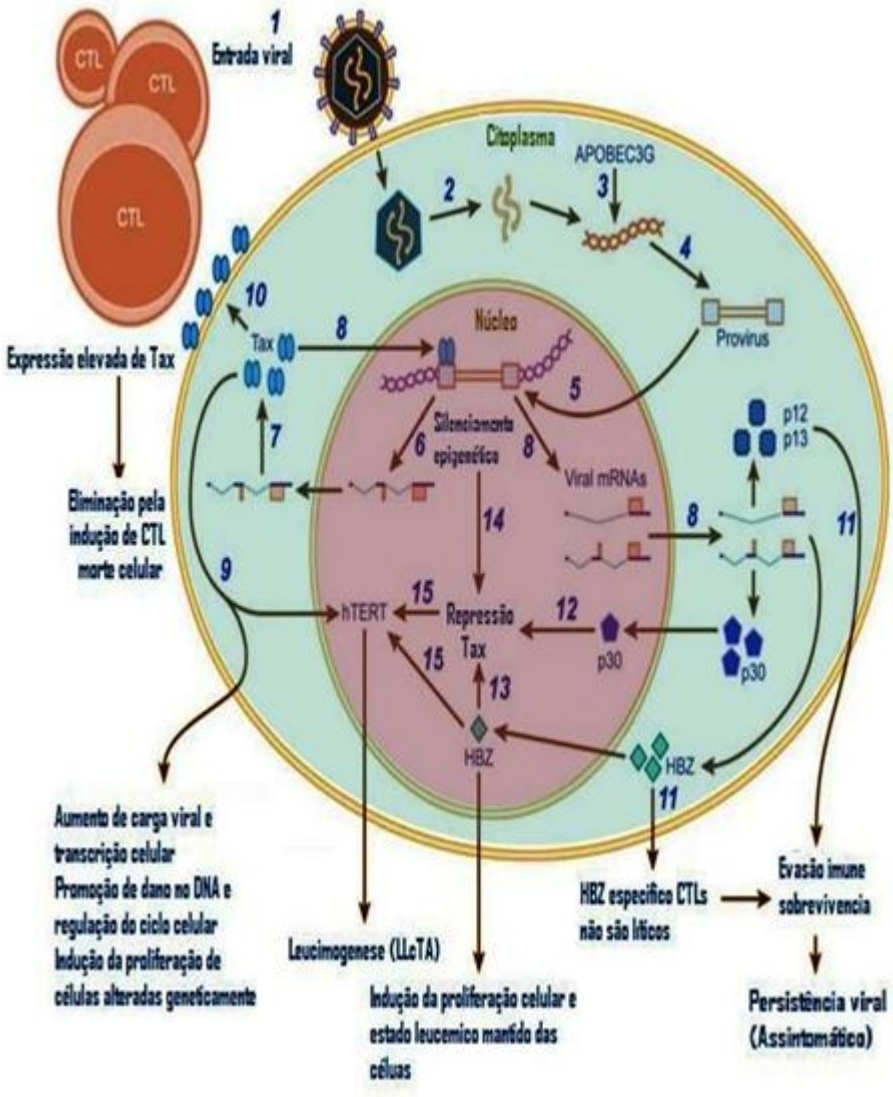

Figura 9: Modelo esquemático que ilustra o ciclo viral e os possíveis mecanismos através dos quais o HTLV-1 vence e evade o sistema imune do hospedeiro.
Fonte: Adaptado de PRIYA KANNIAN e PATRICK L. GREEN, 2010.

3.7. DOENÇAS ASSOCIADAS AO HTLV

3.7.1. Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto (LLcTA)

LLcTA é uma doença leucêmica maligna agressiva que ocorre pela expansão clonal de células T CD4+ maduras do hospedeiro, e não pela replicação do vírus, em 1 a 5% dos infectados pelo HTLV-1, com predomínio no sexo feminino e mais frequente entre os 40 e 60 anos de idade, sugerindo um longo período de latência depois da infecção neonatal (BAZARBACHI & HERMINI, 2001; YASUNAGA & MATSUOKA, 2006).

A expansão monoclonal é característica nos casos de LLcTA, sendo a sua identificação fundamental para o diagnóstico da doença (TAKEMOTO et al., 1994). Também é caracterizada por células tumorais pleomórficas com núcleos hipersegmentados, em formato de flor, chamadas "*flower cells*" (fig., 10) (YASUNAGA & MATSUOKA, 2006).

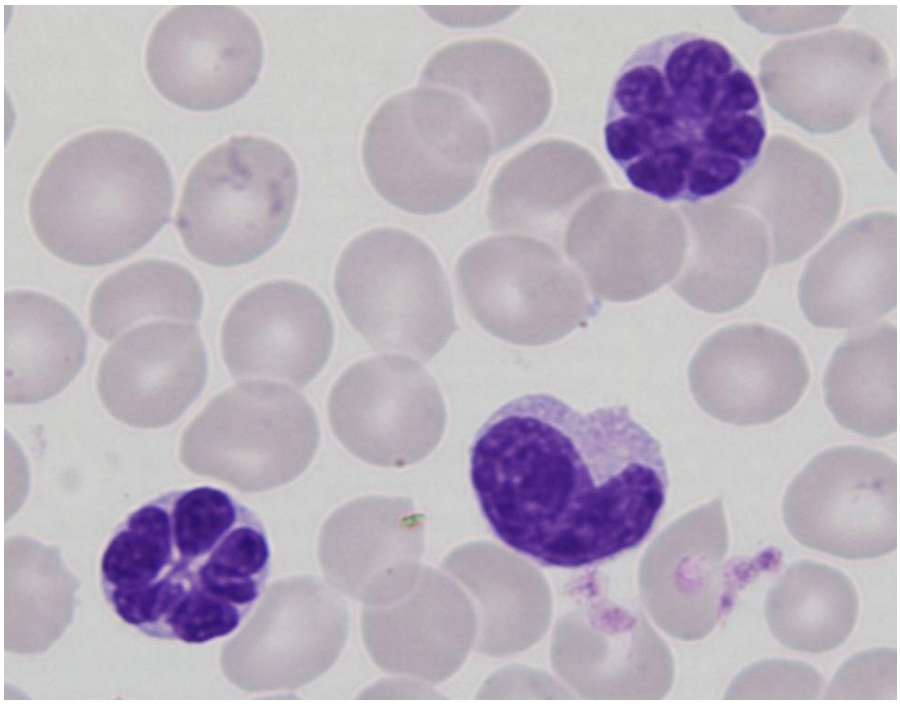

Figura 10 "*Flower cell*" típica do sangue periférico de um paciente com LLcTA.
Fonte: MATSUOKA, 2005.

As diversas formas clínicas foram classificadas por Shimoyama (1991), em quatro modalidades baseadas na extensão da doença, tempo de evolução, alterações linfocitárias e bioquímicas.

3.7.1.1. Forma Latente (*smoldering*)

Forma mais benigna, com ausência de linfoadenopatia, ascite (ou derrames cavitários) e sem envolvimento do fígado, baço, sistema nervoso central (SNC), gastrointestinal e ossos. Presença de 5% ou mais de linfócitos T anormais no sangue periférico e linfócitos normais em nível menor que 4000/mL. Ausência de hipercalcemia (nível de cálcio inferior a 2,74 mmol/L) e com lactato desidrogenase (DHL) no máximo até 1,5 vezes do limite superior normal.

No caso de menos de 5% de anormalidade dos linfócitos T no sangue periférico, deve existir pelo menos a comprovação histológica de infiltração na pele ou lesões pulmonares devem estar presentes.

3.7.1.2. Forma crônica

Linfoadenopatia e envolvimento de fígado, baço, pele e pulmão podem estar presentes. Ausência de ascite, derrame pleural ou comprometimento do SNC, ossos e trato gastrointestinal. Presença de linfocitose absoluta (4000/mL ou superior) com linfócitos T acima de 3500/mL e mais de 5% de linfócitos T anormais no sangue periférico da maioria dos casos. Ausência de hipercalcemia e DHL com valor de até duas vezes o limite superior normal.

3.7.1.3. Forma de Linfomatosa

Classificada como linfoma não Hodgkin, sua comprovação é realizada por histopatologia de linfonodos, apresentando ou não lesões extranodais. Ausência de linfocitose e os linfócitos T anormais são inferiores a 1 %.

3.7.1.4. Forma aguda

Forma leucêmica mais comum e mais agressiva da doença, caracterizada por infiltração de linfonodos, vísceras e pele por células malignas, assim como pela manifestação de lesões tumorais.Linfócitos circulantes anormais e células em forma de flor (*Flower cell*) geralmente são observados. Hipercalcemia, elevação de DHL e lesões líticas dos ossos são comuns.

O mesmo estudo realizado por Shimoyama (1991) observando 818 pacientes de LLTA, 448 femininos e 370 masculinos, com idade média de 57 anos. O tempo médio de sobrevivência para as três formas mais graves foi de 13,3 meses a partir do diagnóstico, sendo 6,2 meses para a forma aguda, 10,2 meses para a forma linfomatosa e 24,3 meses para a forma crônica. Para a forma latente, ou *smoldering*, 62,8 % dos pacientes ainda sobreviviam após quatro anos do inicio do estudo.

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

É uma doença de evolução lenta na maioria dos casos, progressiva, cujos pacientes geralmente já apresentavam sintomas por anos antes do diagnóstico. Acomete três vezes mais o sexo feminino que o masculino, provavelmente como reflexo da maior proporção da infecção por HTLV na mulher (SPALTON, 1991).

Um estudo de meta-análise sobre 34 artigos publicados em 15 diferentes países, apresentando descrições clínicas relativas a 3008 portadores de PET/MAH, relatado por Castro-Costa e colaboradores (2006), define sumariamente a caracterização típica da PET/MAH como: “Sorologia positiva para HTLV-1 e um quadro clínico insidioso crônico de Paraparesia Espástica não remitente, em paciente adulto, com sinais piramidais nos membros inferiores, associados com perturbações esfincterianas e alterações sensoriais leves”.

Relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS) publicado em 1988 estabeleceu critérios diagnósticos clínicos e laboratoriais para a PET/MAH, apresentando uma descrição bem mais detalhada, exposta a seguir:

Um quadro clínico clássico de paraparesia espástica crônica nem sempre é observado na primeira consulta do paciente. Um único sinal ou sintoma físico pode

ser uma evidência inicial. A doença é esporádica e ocorre principalmente em adultos, com predomínio no gênero feminino. Algumas vezes a PET/MAH apresenta uma característica familiar e excepcionalmente é observada na infância.

A instalação da doença é geralmente insidiosa, mas pode ser súbita. Apresenta evolução crônica da espasticidade, progride lentamente, mas em alguns casos permanece estável após o aparecimento. Uma queixa frequente é a fraqueza dos membros inferiores, a maioria das vezes mais acentuada em localização proximal.

Os distúrbios esfincterianos que comprometem a função urinária podem ser precoces, mas a obstipação intestinal é geralmente tardia. São comuns a impotência sexual, algumas vezes precoce, e a diminuição da libido.

Sensações de dormência, formigamento, zumbido, ardência, pontadas (“agulhadas”) e outras parestesias, são mais presentes que sinais físicos objetivos.

A dor lombar com irradiação para os membros inferiores ocorre com frequência. Sinais objetivos como o sentido da vibração está prejudicado, mas a propriocepção (a capacidade em reconhecer a localização espacial do corpo) é geralmente preservada.

Estão presentes a hiperreflexia dos membros inferiores, clonus e o sinal de Babinski. Nos membros superiores a paresia espástica geralmente está ausente, mas a hiperreflexia e os sinais de Hoffman e Tromner são frequentemente positivos; o reflexo mandibular está exaltado em alguns pacientes.

Sinal de comprometimento cerebelar, surdez, atrofia óptica, nistagmo e tremores estão ausentes ou são raros. Também são raros: as convulsões, distúrbios cognitivos e demência.

Outras manifestações neuromusculares que podem estar associados com a PET/MAH são: atrofia muscular, fasciculações, polimiosite, neuropatia periférica, polirradiculoneuropatia, neuropatia craniana, meningite e encefalopatia sistêmica.

Algumas manifestações clínicas ou síndromes bem definidas, não neurológicas, podem acompanhar um quadro da PET/MAH, tais como: alveolite pulmonar, uveíte, síndrome de Sjögren, artropatia, vasculite, ictiose, crioglobulinemia, gamopatia monoclonal (GMSI) e excepcionalmente a LLcTA.

O diagnóstico é firmado pela presença de antígenos ou anticorpos de HTLV-1 no sangue periférico ou líquido cefalorraquidiano (LCR), o qual pode apresentar leve pleocitose linfocítica e aumento leve ou moderado de proteínas. Linfócitos lobulados

podem estar presentes tanto no sangue como no LCR. Em associação com a clínica do paciente, o isolamento do HTLV-1 no sangue ou LCR é o principal exame laboratorial para fechar o diagnóstico de PET/MAH, desde que se disponha de um serviço com condições para a sua realização (KAPLAN et al., 1990; ARAÚJO & SILVA, 2006; CASTRO-COSTA et al., 2006).

Os portadores de HTLV assintomáticos ou pouco sintomáticos constituem o grupo problema de real desafio diagnóstico, portanto, todas as queixas dos pacientes devem ser valorizadas no sentido de aprofundar a investigação. Por outro lado, pelo fato da doença se manifestar a partir da quarta década de vida, outras doenças degenerativas dificultam o diagnóstico da PET/MAH por apresentarem sinais e sintomas semelhantes, exigindo o estabelecimento de um bom diagnóstico diferencial (RIBAS & MELO, 2002).

3.7.3. Dermatite infectiva associada ao HTLV-1 (DIH)

Uma forma de eczema infantil extenso e infectado, de localização preferencial na face, couro cabeludo e pescoço, sem associação com atopia ou história familiar, foi descrita na Jamaica por Sweet (1966), sendo por ele denominada como dermatite infectiva (DIH). Vinte e quatro anos depois, La Granade et al.,(1990) relataram a clara associação dessa DIH com a infecção por HTLV-1 (LENZI et al., 1996; BITTENCOURT & OLIVEIRA, 2001), e posteriormente estabeleceram critérios de diagnósticos baseados em características clínicas e laboratoriais.

O diagnóstico diferencial da DIH na infância deve ser realizado principalmente com dermatite atópica e, quando a criança entra na puberdade, com a dermatite seborréica (BITTENCOURT & OLIVEIRA, 2001).

Até hoje, a DIH é a única dermatopatia especificamente associada com a infecção pelo HTLV-1, entretanto, diversos relatos acusam a presença de lesões dermatológicas em infectados pelo vírus, especialmente, em portadores de LLcTA ou PET/MAH, mas também em assintomáticos.

Baseado em classificações anteriores de Rueda & Blank (1996) e La Grenade (1998), Nobre et. al., (2004), classificaram as lesões dermatológicas em pacientes infectados por HTLV-1 em três grupos: a) Lesões diretamente provocadas pelo HTLV-1, subdivididas em neoplásica e não neoplásicas; b) Lesões indiretamente

causadas pelo HTLV-1, que são as provocadas por imunossupressão, produção de citocínas, alterações neurológicas e outros mecanismos indiretos: c) Lesões inespecíficas.

Nos casos LLcTA podem ser identificados vários tipos de lesões cutâneas: máculas, pápulas, placas, nódulos, eritrodermias, tumorações, dermatofitose, escabiose, que predominam na forma subaguda da doença e podem ser difusas ou localizadas, existindo também uma forma cutânea isolada da LLcTA. Diante de um portador de HTLV-1, deve-se levar em conta que dermatopatias podem ser pródromos da LLcTA.

As lesões predominantes nos casos de PET/MAH são: xerose e ictiose. Mas também são citadas candidíase, eritema palmar e malar, lesões relacionadas à imobilidade (escaras, dermatite perineal), dermatofitoses e foliculite de calvante. Em portadores assintomáticos: xerose, ictiose, dermatite seborréica, vitiligo, escabiose, dermatofitoses. Todas as lesões dermatológicas descritas poderiam motivar a suspeição da infecção pelo HTLV-1 (NOBRE et al., 2005).

3.7.4. Uveíte

Manifestações oculares têm sido descritas em indivíduos infectados pelo HTLV-1, incluindo as infecções oportunísticas e as infiltrações tumorais do olho e órbita em pacientes com LLcTA, alterações microvasculares retinianas, distúrbios inflamatórios intra-oculares, degeneração retinocoroidal e ceratoconjuntivite seca em pacientes com PET/MAH e uveítes associadas aos portadores assintomáticos de HTLV (YAMAMOTO et al., 1999).

Os casos de uveíte associados ao HTLV-1, estudados geralmente em portadores soropositivos, são caracterizados pelo envolvimento de pessoas entre 20 e 49 anos, predominantemente do sexo feminino, com sintomas funcionais moderados, preponderância de uveíte intermediaria com resposta a corticoterapia local ou sistêmica. O prognóstico é bom e o intervalo entre os surtos varia de poucas semanas até vários anos. As afecções oculares mais frequentemente observados, em pesquisa realizada na Martinica com 200 pacientes infectados pelo HTLV-1, foram uveíte, ceratoconjuntivite seca e queratite intersticial, podendo ou não estar associadas com a PET/MAH (MERLE et al., 2002).

3.7.5. Estrongiloidiase

Um estreito relacionamento entre estrongiloidíase e infecção pelo HTLV-1 tem sido relatado em áreas endêmicas das duas doenças. Esta associação se deve ao decréscimo imunológico contra o ***Strongyloides stercoralis*** nos pacientes coinfectados (HIRATA et al., 2006).

Uma reposta imune do tipo Th1 com alta produção de interferon-γ (IFN-γ), resultante da infecção pelo HTLV-1, inibe as defesas contra o ***Strongyloides stercoralis*** diminuindo síntese de IL-4, IL-5, IL-13 e IgE especifica contra o parasita, que fazem parte de uma resposta imune Th2 típica de combate as helmintíases.

Este quadro, que também pode resultar em um decréscimo de eosinófilos, favorece a formas mais severas de estrongiloidíase e a falha terapêutica contra o parasito (PORTO et al., 2002; HIRATA et al., 2006).

Formas clínicas atípicas de estrongiloidiase foram relatadas no Brasil, como um caso de infertilidade masculina devido a infestação do aparelho genito-urinário, com a identificação de larvas e verme adulto fêmea do parasito no esperma do paciente (PORTO et al., 2005) e outro sob a forma de uma gastrite grave, com o encontro de larvas em material da mucosa gástrica, colhido por endoscopia. Ambos não apresentaram eosinofilia, entretanto no segundo caso foi observada a ausência de eosinófilos (LAMBERTUCCI et al., 2003).

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO PRINCIPAL

Caracterizar a transmissão familiar do HTLV-1 a partir de portadores atendidos no Núcleo de Medicina Tropical, Belém - Pará.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar o grau de similaridade genética dos HTLV-1 isolados das relações entre mãe-filho(a) e entre casais;
- Definir o grau de divergência genética entre os isolados de HTLV-1 no presente estudo e aqueles descritos no *Genbank*;
- Caracterizar os tipos e subtipos de HTLV-1 isolados no presente estudo.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. CASUÍSTICA.

Fizeram parte deste estudo amostras de 129 indivíduos portadores de HTLV-1 membros de 38 famílias atendidas no período de junho de 2007 a junho de 2009 no Núcleo de Medicina Tropical (NMT) da Universidade Federal do Pará (UFPA).

Todos os casos com suspeita de transmissão familiar e que tinham pelo menos dois comunicantes reagentes para anticorpos anti-HTLV-1 foram convidados a participar deste trabalho. Neste sentido foi realizado contato com os casos índices e seus comunicantes para retornarem ao laboratório de biologia molecular para coleta de sangue.

O consentimento do participante foi obtido mediante a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (apêndice 1) no momento da coleta de material biológico, obedecendo aos critérios de inclusão e exclusão descritos abaixo.

- Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo todos os indivíduos atendidos no NMT de junho de 2007 a junho de 2011, portadores de HTLV-1 e seus familiares, também portadores, de ambos os sexos e de qualquer idade, que aceitaram participar da pesquisa. No caso de portador de HTLV-1 do sexo feminino, foram incluídos seu cônjuge, mãe e filhos também portadores. No caso de portador do sexo masculino foram incluídos seu cônjuge e mãe, também portadores.

- Critérios de exclusão

Ficaram de fora do estudo os indivíduos cujos materiais biológicos ou DNA foram inadequados para a análise molecular.

5.2. COLETA DE SANGUE

Foram coletadas (4 ml) de sangue em tubo contendo EDTA, com posterior separação de plasma e de camada de leucócitos (células mononucleadas do sangue periférico - PBMC), que foram congelados a -20ºC até o momento do uso.

5.3. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO PARA HTLV

A pesquisa de anticorpos anti-HTLV foi realizada usando-se o ensaio imunoenzimático, ELISA (HTLV 1/2 Abcapture ELISA Test System, Ortho® Diagnostic Systenm Inc., USA), de acordo com instruções do fabricante no Laboratório de Biologia Molecular e Celular do NMT/UFPA.

O teste utiliza uma combinação de quatro antígenos recombinantes: um antígeno do envelope do HTLV-1, um antígeno do envelope do HTLV-2, e dois antígenos do capsídeo viral do HTLV-1 do HTLV-2.

As amostras positivas e aquelas com o valor próximo ao do c*ut off* foram analisadas em duplicata.

*5.*4. EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA total foi extraído a partir de 300 ml de camada de leucócito do sangue de indivíduos com corologia positiva para o HTLV conforme metodologia descrita pelo fabricante do kit Promega–Wizard Genomic DNA Purification – USA, no Laboratório de Biologia Molecular e Celular do NMT/UFPA.

5.5. PESQUISA MOLECULAR

5.5.1. Amplificação do gene da β-globina humana

Todo DNA genômico extraído foi submetido à amplificação do gene da β-globina humana com os primers G73 (5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3') e G74 (5'-CAACTTCATCCACGTTCACC-3') (BELL et al., 1993), gerando um fragmento de 268 pares de base (pb), cujo objetivo foi avaliar a integridade do DNA e excluir a presença de inibidores de PCR.

Neste procedimento foi utilizado 3,5 µL de Go Taq® Green Master Mix, 2.0µL de Água destilada autoclavada, 10 pmol/µL de cada primer e 1µL de DNA, para um volume final de 7µL. O protocolo para amplificação seguiu a temperatura de desnaturação 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos, de 94ºC por 45 segundos, de 55ºC durante 45 segundos e 72ºC por 45 segundos, seguidas da temperatura de

extensão final de 72ºC por 10 minutos e 10ºC por 10 minutos. A amplificação dos segmentos citados anteriormente foi realizada no termo-ciclador da Biocycler MJ96+/MJ96G.

Os produtos da amplificação foram visualizados após eletroforese (100 V/60 minutos) em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio em tampão TAE 1x (TAE 50x estoque – Tris-Base 1,6 M, Acetato de Na 0,8 M e EDTA-Na_2 40 mM/1000 mL de água deionizada), mediante a utilização de um transiluminador com fonte de luz ultravioleta.

5.5.2. Amplificação da região do gene *pX* do HTLV-1

A reação de amplificação gênica para caracterização da infecção por HTLV-1 foi efetuada no Laboratório de Biologia Molecular e Celular do NMT, o qual foi amplificado 265pb da região *pX* do DNA proviral.

Neste procedimento foi utilizado 3,5µL de Go Taq® Green Master Mix, 2.0µL de Água, 20 pmol de cada primer HTLV_px_externo (TR101)F-5'-TTCCCAGGGTTTGGACAGAG-3' correspondendo aos nucleotídeos 7219-7238 e HTLV_px_externo (TR102)R-5'-GGGTAAGGACCTTGAGGGTC-3' correspondendo aos nucleotídeos 7483-7464 da cepa HTLV-2_{Mot} (modificado de GUROFF et al., 1982) e 1µL de DNA, para um volume final de 7µL. O protocolo para amplificação seguiu a temperatura de desnaturação 94°C por 4 minutos, seguida de 30 ciclos, de 94ºC por 40 segundos, de 51.6ºC durante 30 segundos e finalizando a temperatura de extensão à 72ºC por 40 segundos, seguida da temperatura de extensão final de 72ºC por 10 minutos e 10ºC por 10 minutos (TUKE et al., 1992).

Em seguida foi feito uma *nested*-PCR, com 0,5 µL do produto amplificado com os seguintes primes HTLV_px_interno (LTRI03) / F-5'-CGGATACCCAGTCTACGTGTT-3' correspondendo aos nucleotídeos 7248-7268 e HTLV_px_interno (LTRI04) / R-5'-GAGCCGATAACGCGTCCATCG-3' correspondendo aos nucleotídeos 7406-7386 da cepa HTLV-2_{Mot} a 15 pmol/µL (modificado de GUROFF et al., 1982).

O protocolo de amplificação seguiu em 35 ciclos, onde a temperatura de desnaturação foi de 94ºC por 30 segundos, de 51.6ºC por 30 segundos e a temperatura de extensão de 72ºC por 30 segundos, seguido da temperatura de

extensão final à 72ºC por 10 minutos e 10ºC por 10 minutos, gerando amplificado de 159pb. A cada reação de PCR foram utilizados controle positivo (amostra sabidamente positiva para HTLV-2) e controle negativo (água estéril).

Os produtos da amplificação foram visualizados após eletroforese (100 V/60 minutos) em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio em tampão TAE 1x (TAE 50x estoque – Tris-Base 1,6 M, Acetato de Na 0,8 M e EDTA-Na_2 40 mM/1000 mL de água deionizada), mediante a utilização de um transiluminador com fonte de luz ultravioleta.

5.5.3. Digestão enzimática para caracterização do tipo de HTLV

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

A digestão enzimática deste produto do gene *pX* (159pb) foi realizada misturando-se 6,0 µL do produto amplificado, 7 µL de H_2O, 1,5 µL de tampão E (Promega, Madison WI, USA) e 0,5 µL da enzima de restrição *TaqI* (10 U/µL, Promega, Madison WI, USA), com posterior incubação a 65°C por 2horas.

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

Os produtos de digestão enzimática foram visualizados em gel de agarose de 3% a 100 V durante 45 minutos em tampão TAE 1x (TAE 49x estoque-TrisBase 1,6 M, Acetato de Na 0,8 M e EDTA-Na_2 40 Mm/1000 ml de água deionizada), mediante a utilização de transiluminador com fonte de luz ultravioleta.

5.5.4. Amplificação da região *5'LTR* do HTLV-1

Para a amplificação da região 5'*LTR* de HTLV-1 as reações foram executadas em um volume total de 25 µL, contendo 500 ng de DNA extraído, 125 µM de cada dNTP, 10 pmol/µL de cada iniciador, $MgCl_2$ 3,0 µM, KCl 50 mM, Tris-HCl pH 8,3 10 mM e 0,1 U de *Taq* DNA polimerase. O par de iniciadores usado na reação de amplificação para HTLV-1 foi: (LTR-I.01) 5'-TGACAATGACCATGAGCCCCAA-3' e

(LTR-I.02) 5'CGCGGAATAGGGCTAGCGCT-3', correspondendo aos nucleotídeos 1-22 e 823-842, da cepa HTLV-1_{ATK} (SEIKI et al.,1983).

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

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

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

A fim de evitar o risco de contaminação com DNA exógeno e ter uma comprovação precisa dos resultados, em cada conjunto de amostras submetidas à reação de PCR foi utilizado um controle negativo, composto por todos os reagentes da mistura da reação, exceto o DNA e um controle positivo que continha a mistura da reação mais o DNA de uma amostra sabidamente positiva.

Os produtos da amplificação foram visualizados após eletroforese (100 V/60 minutos) em gel de agarose a 2% corado com brometo dietidio em tampão TAE 1x (TAE 50x estoque – Tris-Base 1,6M, Acetato de Na 0,8M e EDTA-Na_2 40 mM/1000 mL de água deionizada), mediante a utilização de um transiluminador com fonte de luz ultravioleta.

5.5.5. Purificação do produto da PCR

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

As amostras que apresentaram o *amplicon* de 744pb foram purificadas do produto da PCR, utilizando o kit comercial *QIAquick* PCR *Purification* (QIAGEN),

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

5.5.6. Reação em cadeia da polimerase pré-sequenciamento

Para a reação de sequenciamento foi utilizado o *Kit Big Dye® terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystem). Foram preparadas misturas de reação com volume final de 16 µL, composta por 2µL de *Big Dye*, 1µL de tampão, 2µL de DNA (50ng) e 5 pmol/µL de cada oligonucleotídeo (os mesmos da PCR) e 10 µL de água deonizada, em reações separadas.

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

5.5.7. Eletroforese do DNA Sequenciado

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

fitas de DNA foram sequenciadas em ambas as direções, usando-se o equipamento de sequenciamento automático *ABI* 377 DNA *Sequencer* (*Applied Biosystems*).

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

5.5.8. Análise, edição das sequências e construção das árvores filogenéticas

O objetivo do alinhamento é fazer com que a posição (sítio) de cada base (ou aminoácido) que esteja sendo comparada entre as sequencias consideradas seja homóloga. Deste modo as sequências obtidas para os gene 5'*LTR* foram primeiramente comparadas entre si, para verificar o grau de similaridade e divergência entre elas, através do alinhamento e edição utilizando-se o programa BioEdit (v. 7.01) e comparadas a outras sequencias registradas e disponíveis no banco de genes - *Genbank*, a partir do site *BLAST* para verificar as relações filogenéticas.

As árvores filogenéticas foram construídas empregando-se o programa MEGA 5 (v.5.0), utilizando algoritmo de *Neighbor-Joining* (NJ), agrupamento de vizinhos (TAMURA, PETERSON, STECHER, NEI, e KUMAR, 2011). O agrupamento de vizinhos é um método que faz referência à distância genética entre as amostras, agrupando-as de acordo com a maior similaridade (SAITOU &NEI, 1987), baseado nos parâmetros de Kimura (1980).

6. RESULTADOS

A investigação sorológica para transmissão intrafamiliar, realizada a partir dos 104 portadores confirmados (casos índices) com HTLV-1, identificou 38 (36,5%) famílias contendo 77 comunicantes reagentes para anticorpos anti-HTLV. A confirmação molecular da infecção, realizada pela análise da região *pX*, foi possibilitada em 38 comunicantes de 27 famílias. Destes, foram analisadas as sequencias da região 5'*LTR* de 17 comunicantes e de 12 casos índices (fig. 10).

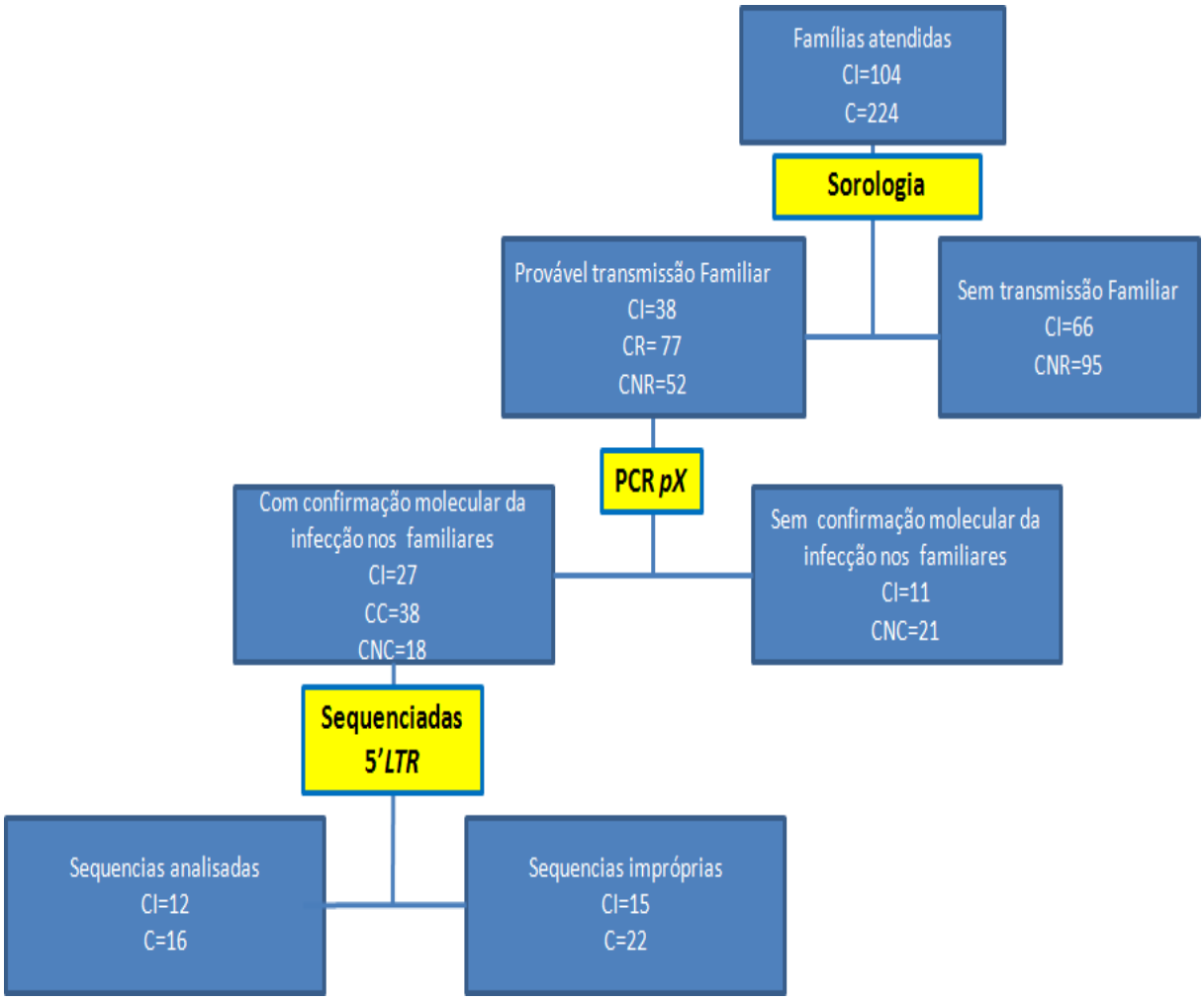

Figura 11: Fluxograma dos casos investigados para transmissão intrafamiliar do HTLV-1. Legenda: CI=Caso índice; C=Comunicantes; CR=Comunicantes reagentes; CNR=Comunicantes não reagentes; CC=Comunicantes confirmados; CNC=Comunicantes não confirmados.

6.1. CONFIRMAÇÃO MOLECULAR DA TRANSMISSÃO INTRAFAMILIAR DO HTLV-1

A confirmação molecular da transmissão intrafamiliar das 12 famílias, baseada na análise de sequências de 656 nucleotídeos da região 5´*LTR* do HTLV-1 (fig. 11), identificou nove famílias [F04 (185, 387, 388), F11 (385, 386), F12 (325, 389, 390), F17 (172, 175), F19 (67, 96, 141), F21 (292, 293), F23 (148, 187), F34 (205, 206) e F37 (107, 248, 685)] evidenciando 100% de similaridade entre dois ou mais membros (Tabela 2).

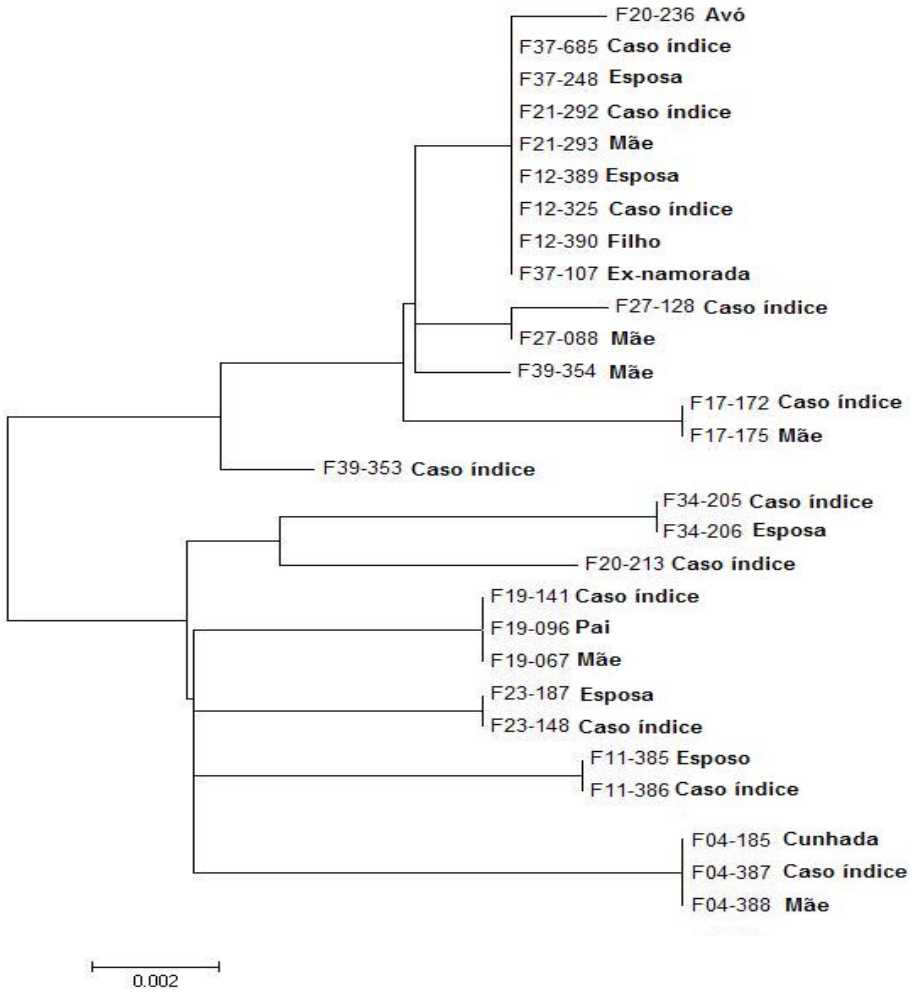

Figura 12: Árvore demonstrando as relações filogenéticas entre as amostras de 12 famílias com suspeita de transmissão intrafamiliar do HTLV-1. A árvore foi construída usando o modelo de Agrupamento de Vizinhos (*Neighbor-Joining*) após o alinhamento de 656 nucleotídeos da região 5'*LTR*. O teste de sustentação estatística (*bootstrap*) foi aplicado usando 1000 réplicas.

Tabela 2: Relações verticais e horizontais das amostras intrafamiliares idênticas de HTLV-1, investigadas por família a partir do caso índice (CI).

Família	Transmissão vertical	Transmissão horizontal
04	Mãe-filha(CI) Mãe-filho	Irmão-cunhada
11		Esposo-esposa(CI)
12	Mãe-filho	Esposo(CI)-esposa
17	Mãe-filha(CI)	
19	Mãe-filha(CI) Mãe-filho	Pai-mãe
21	Mãe-filho(CI)	
23		Esposo(CI)-esposa
34		Esposo(CI)-Esposa
37		Esposo(CI)-esposa Esposo(CI)-ex-namorada

6.1.1. Famílias com sequências idênticas

No total, nove famílias demonstraram 100% de similaridade em suas sequencias nucleotídicas. Na família 04, o caso índice feminino relatou ter sido amamentada durante seis meses, estar casada há cinco anos, não usar preservativos nas relações sexuais com o parceiro (único) e não possuir histórico de câncer na família.

Nesta família foram sorologicamente investigados sete familiares (fig., 13), confirmando resultados positivos na mãe, irmão e cunhada do caso índice. O pai, dois irmão e esposo do caso índice foram negativos para a pesquisa de anticorpos anti-HTLV.

Nesta análise foram confirmadas duas transmissões verticais (mãe – filho e mãe – filha) e uma transmissão horizontal (irmão – cunhada).

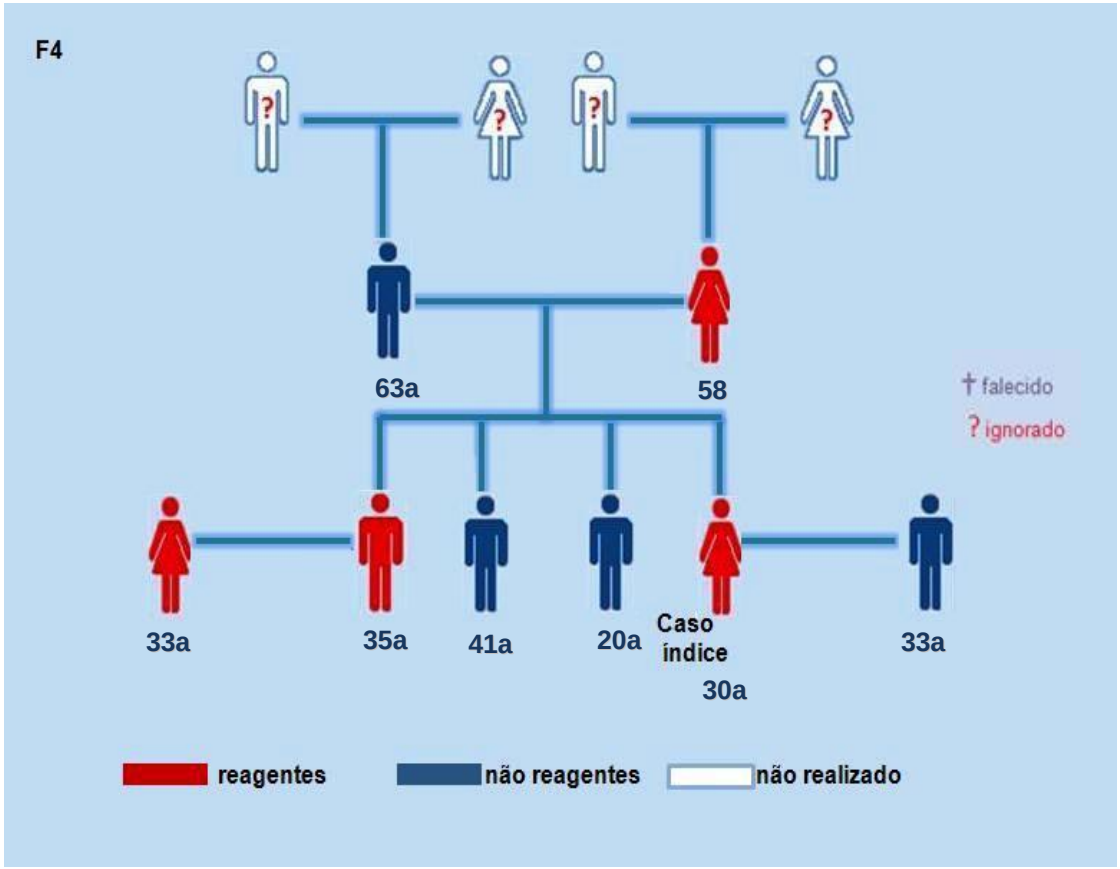

Figura 13: Pictoheredograma representativo da propagação do HTLV-1 no grupo familiar 04.

Na família 11, o caso índice feminino relatou ser casada há 22 anos, ter tido cinco parceiros sexuais na vida, nunca usar preservativo nas relações sexuais, ter sido amamentada por terceiros e ainda relatou ter recebido transfusão sanguínea em 2005.

A partir do caso índice foram sorologicamente investigados quatro comunicantes (fig., 14) a mãe, o esposo, um filho e uma filha. O resultado da sorologia foi reagente no esposo e a análise da do gene 5'*LTR* confirmou a transmissão horizontal.

O esposo relatou que foi amamentado naturalmente, ter recebido transfusão sanguínea, ter se relacionado com mais de dez parceiras sexuais sem uso de preservativo e nunca ter feito uso de drogas injetáveis.

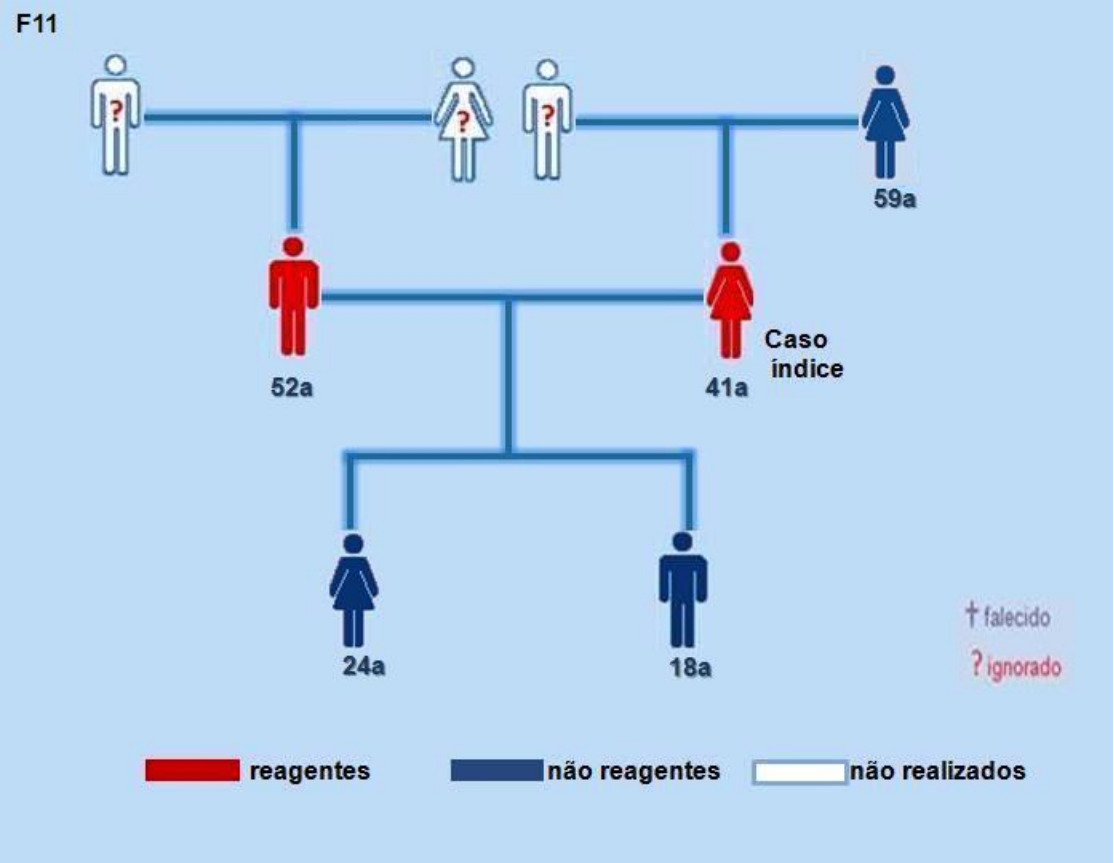

Figura 14: Pictoheredograma representativo da propagação do HTLV-1 no grupo familiar 11.

A ilustração da figura 15 retrata o esquema de transmissão do HTLV-1 na família 12. O caso índice masculino, assintomático, matriculado no ambulatório do NMT, descoberto por triagem sorológica para doação de sangue, relatou que foi amamentado por quatro meses, teve mais de sete mulheres na vida e nunca recebeu transfusão de sangue.

A partir do caso índice foram investigados nove familiares, onde a esposa, dois filhos do casal e uma filha do primeiro casamento dela apresentaram a infecção viral. As filhas do primeiro casamento do caso índice foram negativas, assim como dois filhos do casal e uma das filhas do primeiro casamento da esposa. Não foram investigados os antigos cônjuges, nem os pais do casal.

A análise da região 5'*LTR* confirmou a transmissão horizontal, entre o caso índice e sua esposa, e a transmissão vertical de sua esposa para um filho. Não foi confirmada a transmissão vertical da esposa do caso índice para duas filhas, por não ter amplificado o fragmento da região 5'*LTR* nas amostras destas.

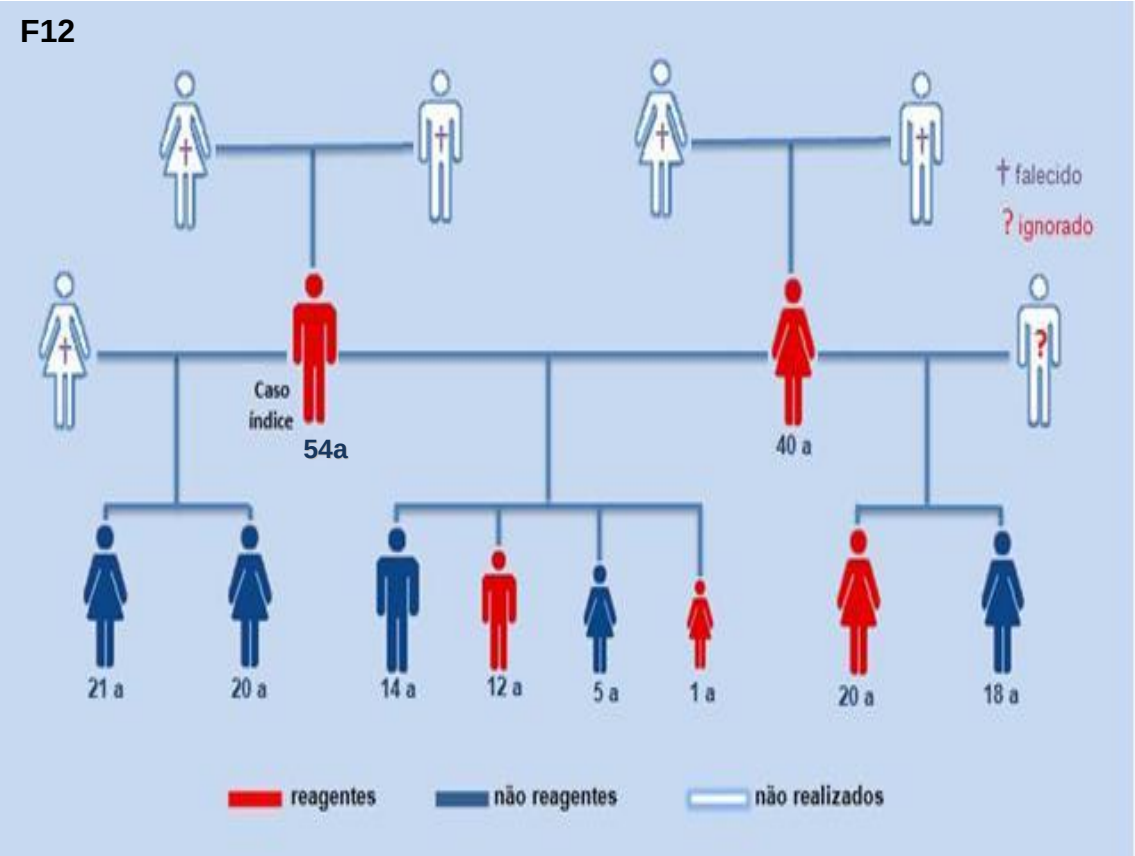

Figura 15: Pictoheredograma representativo da propagação do HTLV-1 no grupo familiar 12

Na família 17, o caso índice do sexo feminino, 36 anos, recebeu transfusão sanguínea duas vezes, aos 20 anos de idade, declarou ter um filho do primeiro relacionamento e uma filha de segundo relacionamento.

A partir do caso índice foram investigados três comunicantes (fig., 16), sendo confirmada transmissão vertical, após a análise da região 5'*LTR*, entre o caso índice e sua mãe.

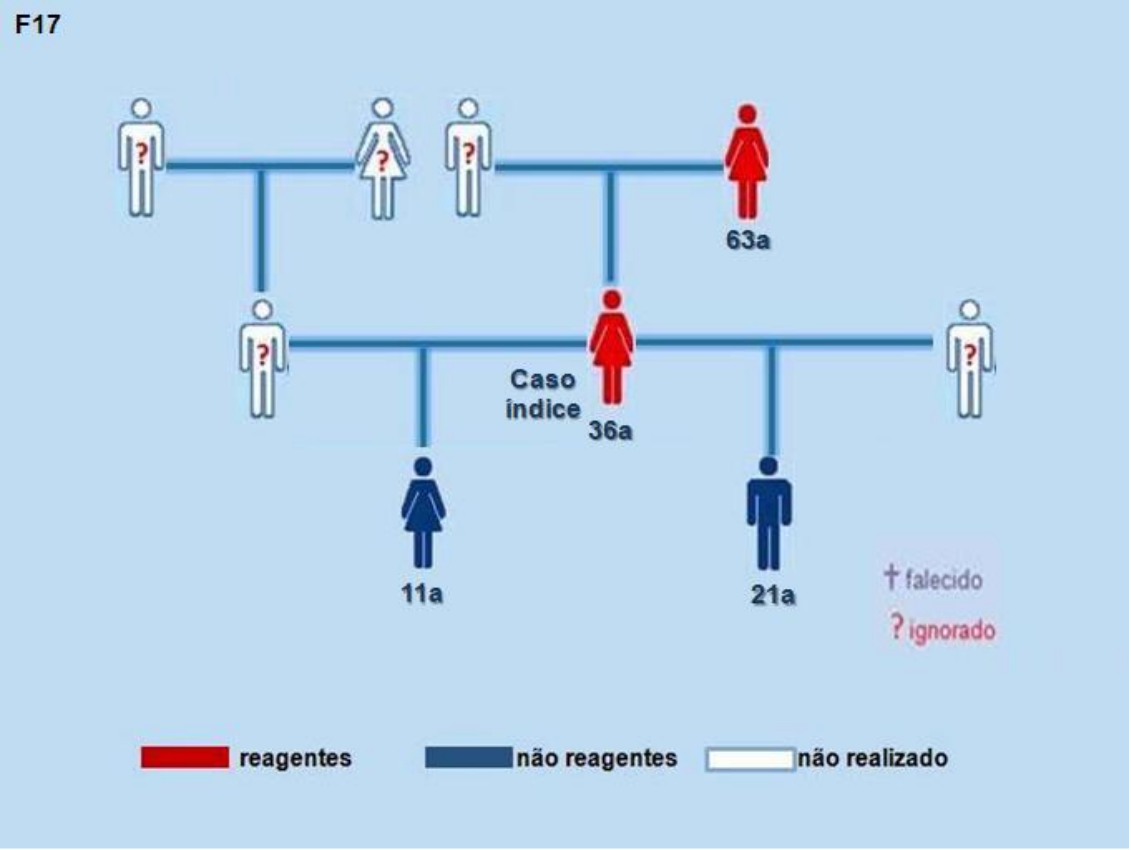

Figura 16: Pictoheredograma representativo da propagação do HTLV-1 no grupo familiar 17.

Na família 19, o esquema (fig., 17) retrata a transmissão do HTLV-1 na família de um caso índice feminino, de 24 anos, assintomática, identificada como portadora após doação de sangue, amamentada naturalmente por mais de 24 meses, com histórico de doenças linfoproliferativas na família (irmão, mãe e tios maternos), sem relato de relação sexual e nem de transfusão sanguínea.

Nesta família, foram investigados oito familiares a partir do caso índice, dos quais quatro confirmaram infecção por HTLV-1: seu irmão já falecido em decorrência das complicações de doença linfoproliferativa, sua mãe que veio a falecer em dezembro de 2011 com quadro de linfoma, seu pai e sua avó paterna.

Seu pai, casado há 33 anos, relatou que foi amamentado por mais de um ano. Sua avó, natural de Vigia, relatou que teve somente um parceiro sexual na vida, que já recebeu sangue há pelo menos 20 anos e que foi naturalmente amamentada por mais de um ano. Não foi investigada a avó materna do caso índice por já ter falecido.

A análise da região 5'*LTR* confirmou a transmissão horizontal do pai para a mãe do caso índice e a transmissão vertical da mãe para o caso índice. Não foi confirmada a transmissão vertical da avó paterna para o pai do caso índice, assim como da mãe para o irmão, por não ter amplificado o fragmento da região 5'*LTR*.

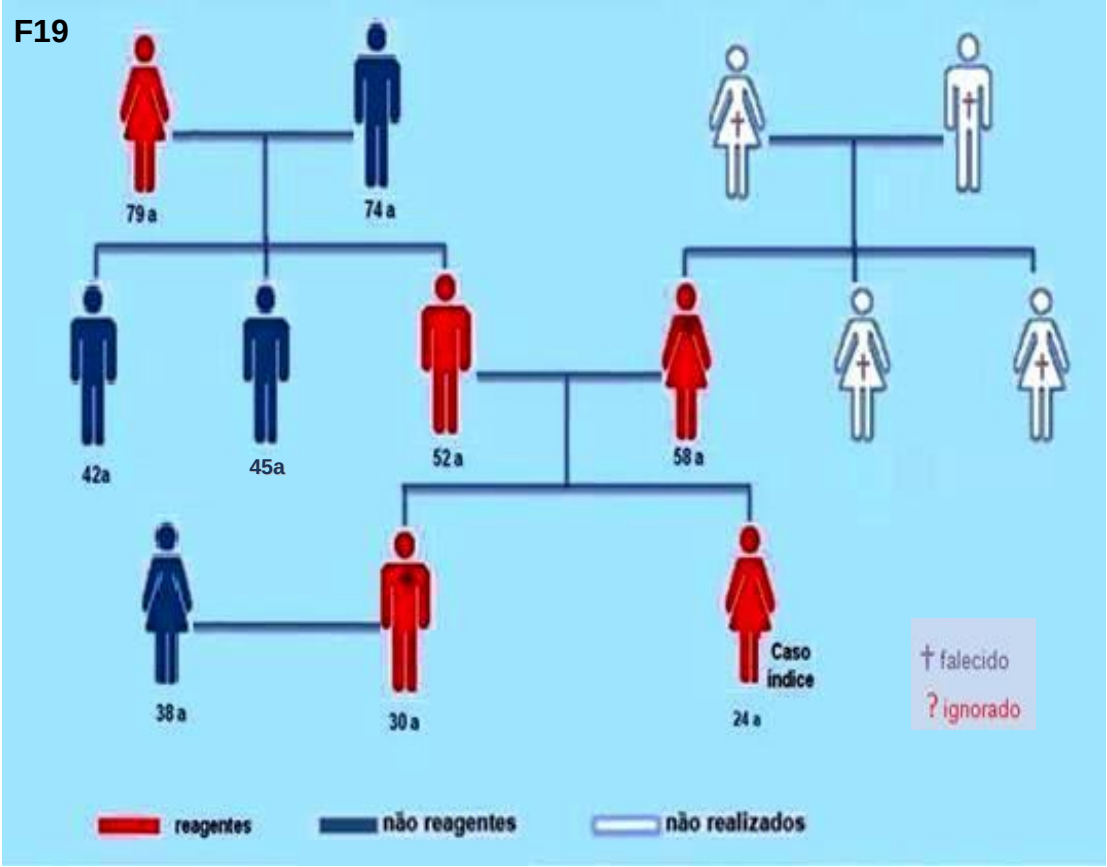

Figura 17: Pictoheredograma representativo da propagação do HTLV-1 no grupo familiar 19.

No grupo familiar 21, o caso índice masculino, natural de São Luís – Maranhão foi encaminhado ao NMT após triagem sorológica realizada na Fundação Centro de Hemoterapia e Hematologia do Pará - HEMOPA. Este relatou ser casado há cinco anos, ter mais de cinco parceiras sexuais na vida, com uso de preservativos, nunca receber transfusão sanguínea e possuir histórico de câncer do colo do útero na família (avó e mãe).

A partir do caso índice foram investigados três comunicantes (fig., 18), confirmando a mãe como portadora de HTLV-1. Sua mãe relatou ser natural de São Luís, ter sido naturalmente amamentada em torno de quatro a cinco meses, ter recebido transfusão sanguínea no ano de 2000, ter amamentado seu filho por mais de seis meses e ter se relacionado com mais de seis homens durante sua vida. A

análise filogenética da região 5'*LTR* das amostras de mãe e filho confirmou a transmissão vertical.

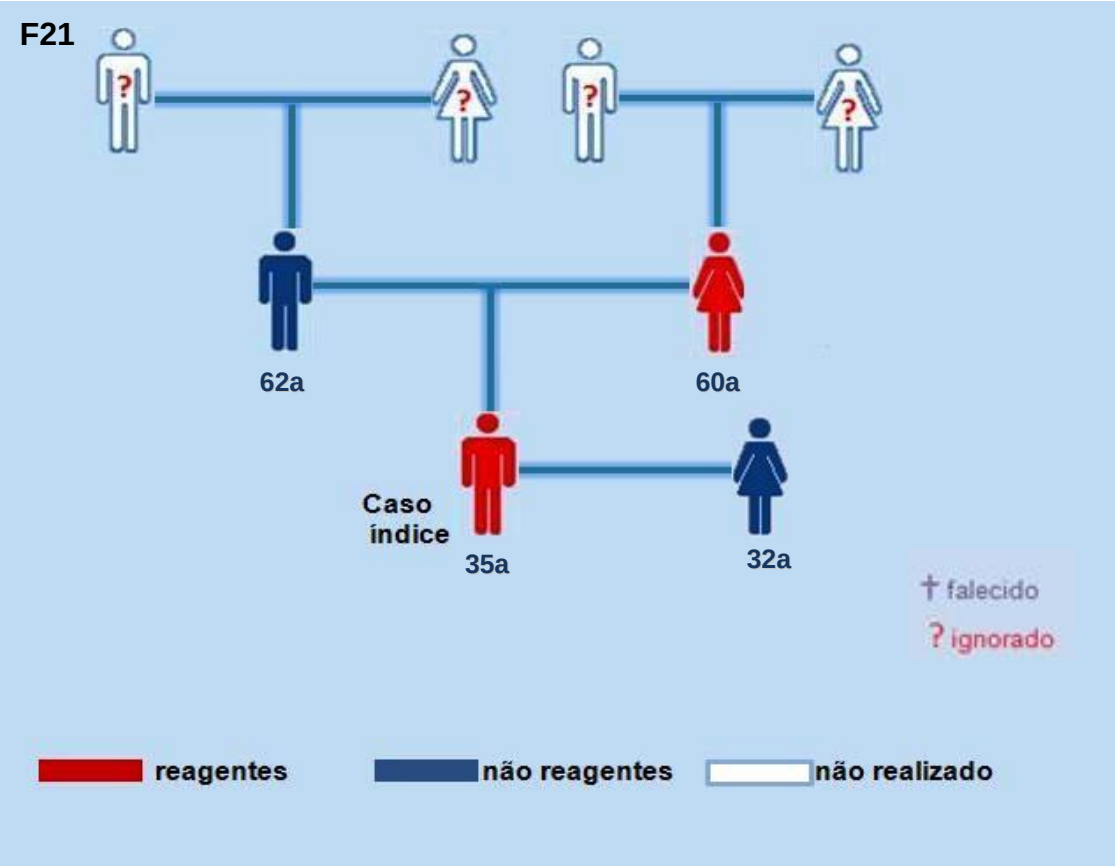

Figura 18: Pictoheredograma representativo da propagação do HTLV-1 no grupo familiar 21.

Na família 23, o caso índice do sexo masculino veio encaminhado do HEMOPA. Este relatou que nunca fez uso de drogas injetáveis e foi naturalmente amamentado, não sabendo com exatidão o tempo.

A partir do caso índice foram investigados oito familiares (fig., 19) tendo sido seu irmão, sua atual e ex-esposa identificados como portadores de HTLV-1. Não confirmaram infecção um irmão, uma filha e três enteados do caso índice. A análise molecular da região 5'*LTR*, realizada na amostra da atual esposa, além do caso índice, confirmou a transmissão horizontal (sexual). Não houve amplificação do fragmento necessário para a confirmação da transmissão nas amostras do irmão e da ex-esposa do caso índice.

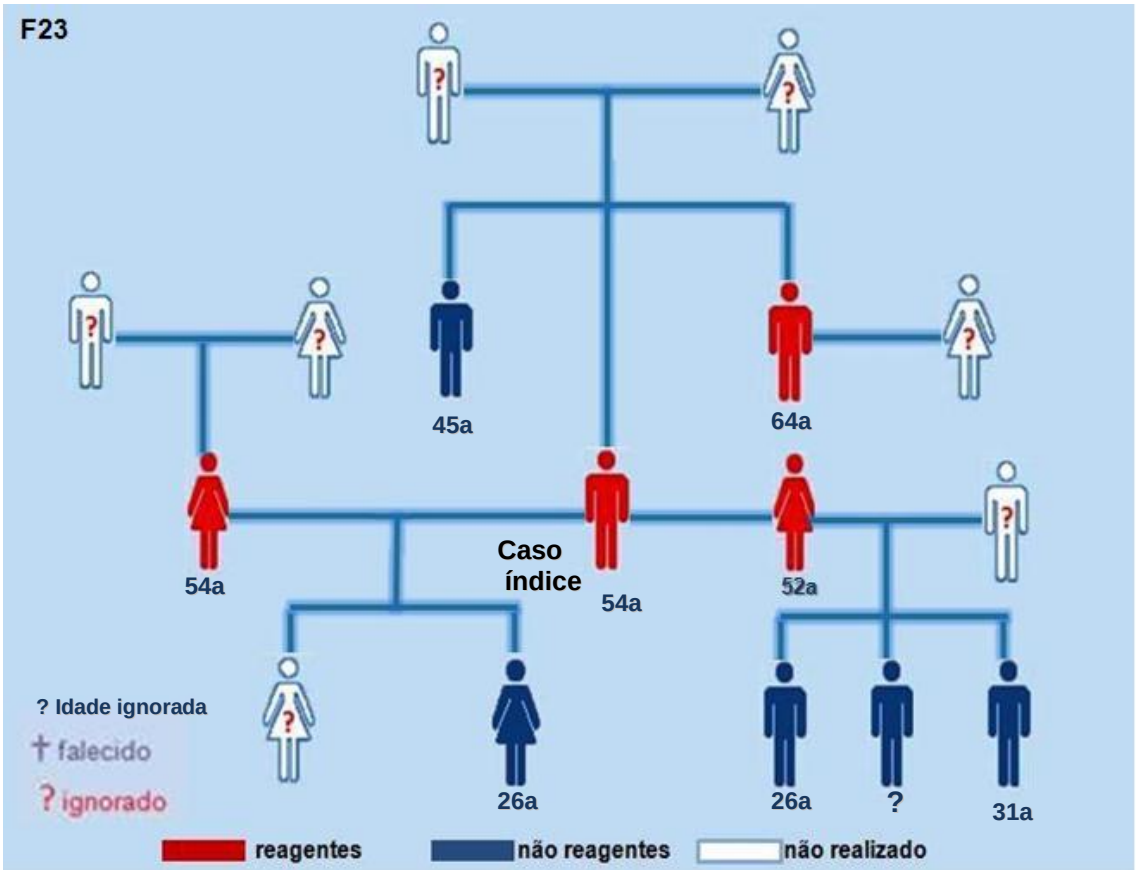

Figura 19: Pictoheredograma representativo da propagação do HTLV-1 no grupo familiar 23.

O caso índice da família 34 (fig., 20) foi encaminhado ao NMT após triagem sorológica, realizada no HEMOPA. O caso índice do sexo masculino, natural de Salvaterra, Iilha do Marajó, declarou que foi naturalmente amamentado por mais de um ano, recebeu transfusão sanguínea em 1984 e nunca usou droga injetável.

Quanto ao relacionamento, declarou união estável por dois anos e não faz uso de preservativo. Sua esposa, nascida na cidade de Belém, sem história de câncer na família ou uso drogas injetáveis, foi amamentada por seis meses e alegou que teve apenas seu esposo como único homem.

Depois de confirmada a infecção por HTLV-1, a análise molecular da região 5'*LTR* da amostra de sua esposa mostrou 100% de homologia à do caso índice, confirmando a transmissão horizontal (sexual). Os demais familiares não compareceram ao laboratório para análise.

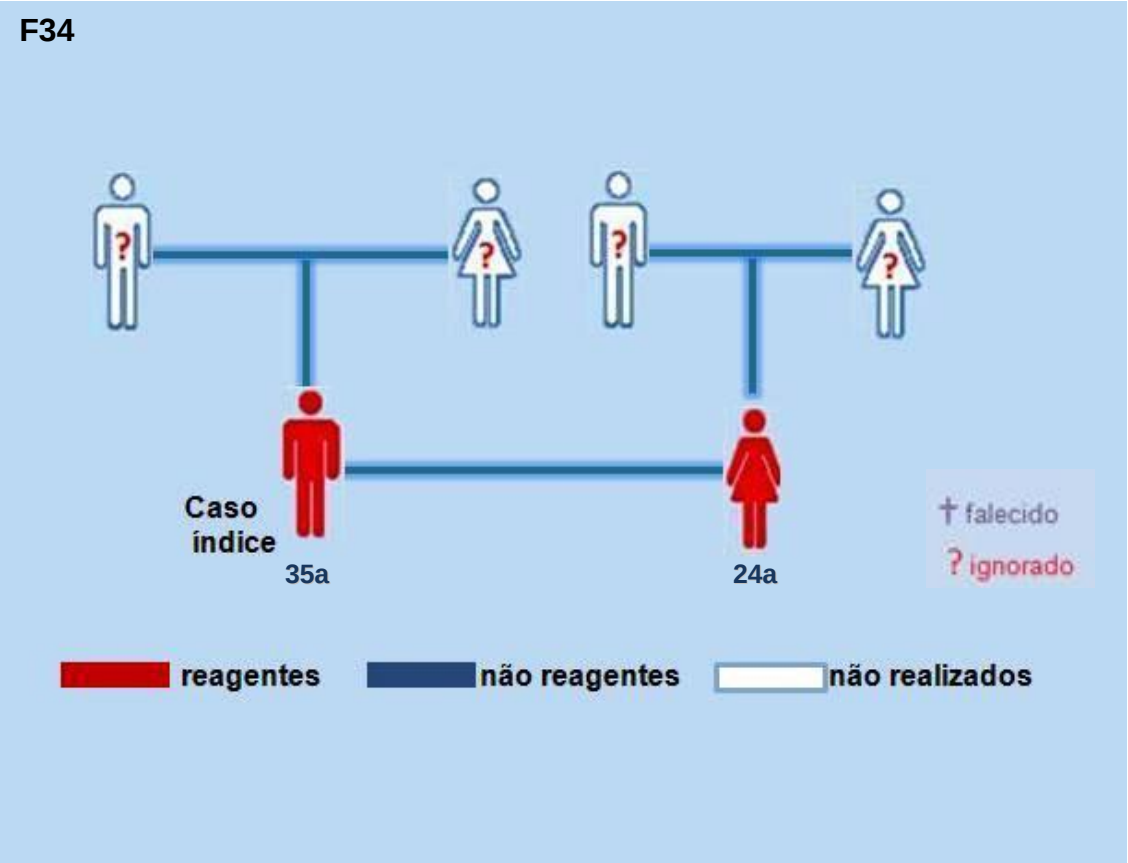

Figura 20: Pictoheredograma representativo da propagação do HTLV-1 no grupo familiar 34.

Na família 37 (fig., 21), o caso índice do sexo masculino, natural de Porto Velho – Rondônia foi naturalmente amamentado por mais de seis meses. Neste grupo familiar foram investigados dois comunicantes a partir do caso índice, sua ex-companheira (relacionamento de três meses) e sua companheira atual (relacionamento de 36 anos). A infecção pelo HTLV-1 foi confirmada em ambas as companheiras e a análise molecular da região 5'*LTR*, evidenciou duas transmissões horizontais (sexuais).

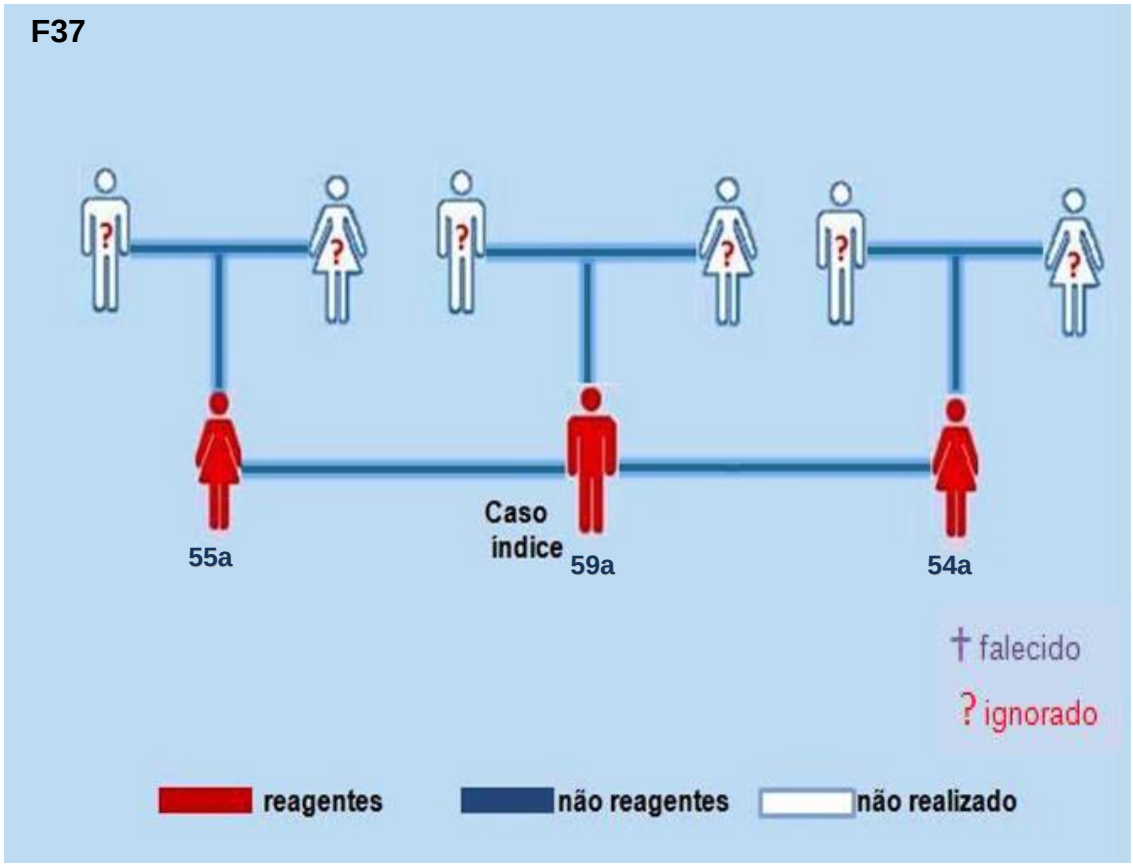

Figura 21: Pictoheredograma representativo da propagação do HTLV-1 no grupo familiar 37.

6.1.2. Famílias em que houve divergência entre as sequências

As sequências das famílias 20 (213, 236), 27 (088, 128) e 39 (353, 354), divergiram entre os casos índices e familiares em 1,83%, 0,2% e 0,6% respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3: Relação vertical e diversidade das amostras intrafamiliares de HTLV-1, investigadas a partir do caso índice (CI).

Família	Transmissão vertical	Grau de divergência %
20	Avó-neto(CI)	1,83
27	Mãe-filha(CI)	0,2
39	Mãe-filha(CI)	0,6

Na família 20, a partir do caso índice masculino, que relatou que foi amamentado por mais de seis meses por outra mulher. Foram investigados seis familiares (fig., 22), confirmando a avó materna como portadora de HTLV-1, que relatou ter recebido transfusão sanguínea há mais de 15 anos não sabendo dizer o ano com exatidão. Os demais parentes, incluindo seus pais, foram negativos para a presença de anticorpos anti-HTLV-1 e do DNA proviral. A análise da região 5'*LTR* identificou 12 divergências (1,83%) nos fragmentos de 656pb do caso índice e da avó.

A transmissão intrafamiliar foi excluída pela ausência de infecção por HTLV-1 na mãe e pela diversidade entre as sequências do caso índice e sua avó materna.

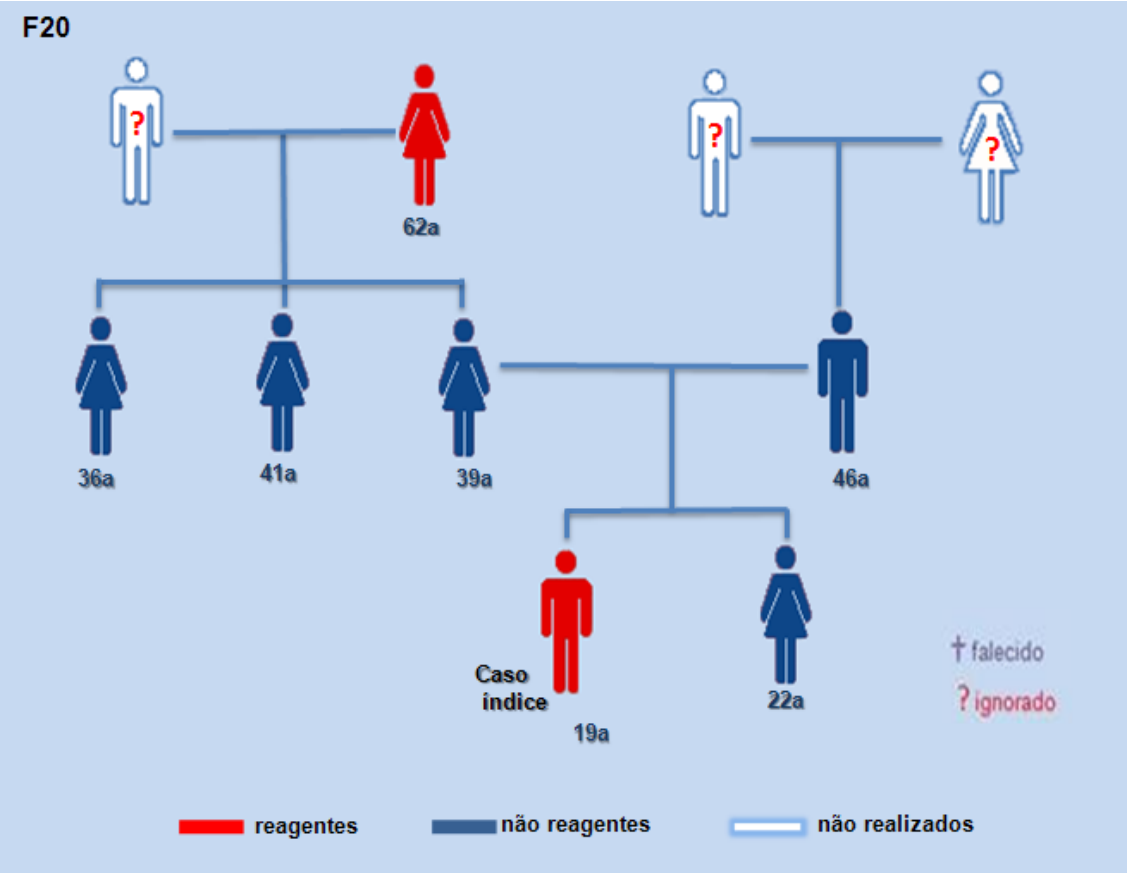

Figura 22: Pictoheredograma representativo da investigação de HTLV-1 na família 20.

No grupo familiar 27 (fig., 23), quatro familiares foram investigados, confirmando a infecção por HTLV-1 na mãe do caso índice feminino. No histórico da família foi verificado que o período de amamentação natural foi superior a 12 meses. A análise da região 5'*LTR* identificou uma divergência de um nucleotídeo (0,2%) entre os fragmentos de 656pb do caso índice e da mãe, sugerindo transmissão vertical.

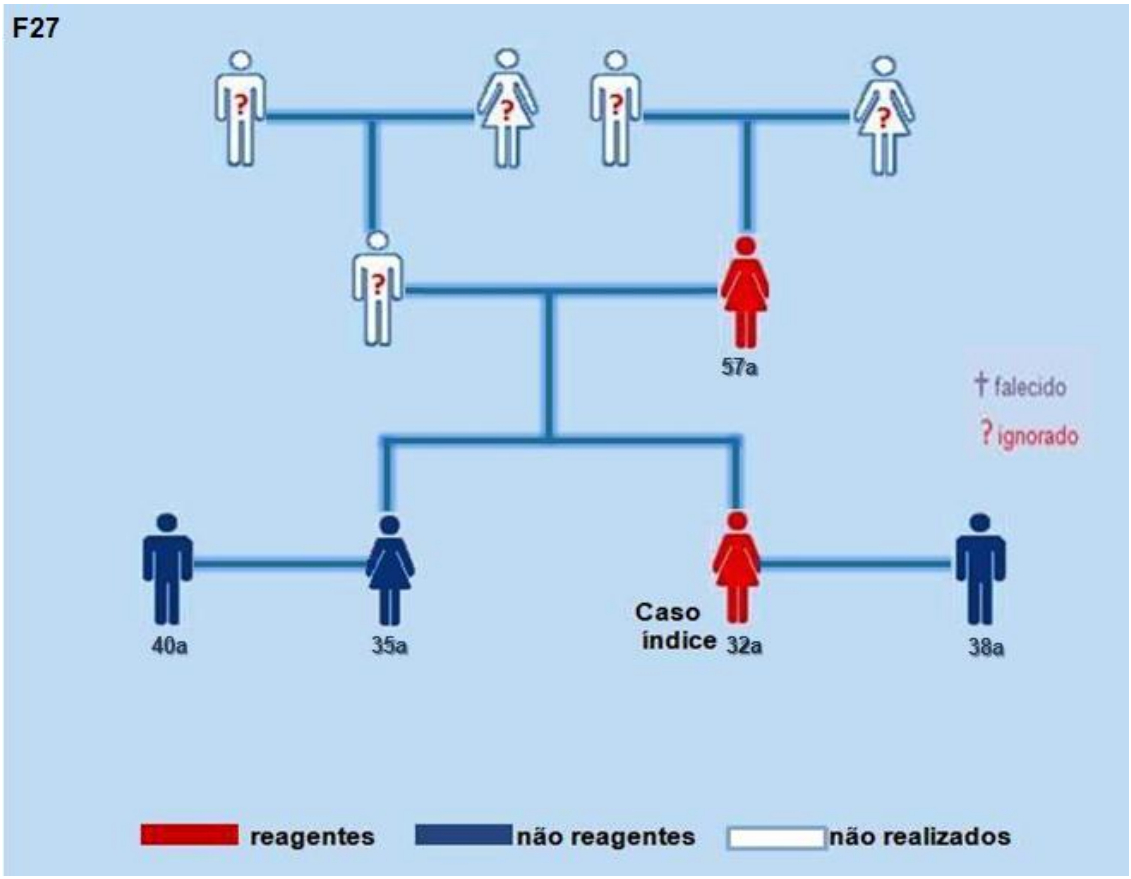

Figura 23: Pictoheredograma representativo da investigação de HTLV-1 na família 27

Na família 39 (fig., 24), três familiares foram investigados, confirmando a infecção por HTLV-1 na mãe do caso índice feminino. A análise da região 5'*LTR* identificou divergência de quatro nucleotídeos (0,6%) entre os fragmentos de 656pb do caso índice e da mãe, sugerindo transmissão vertical.

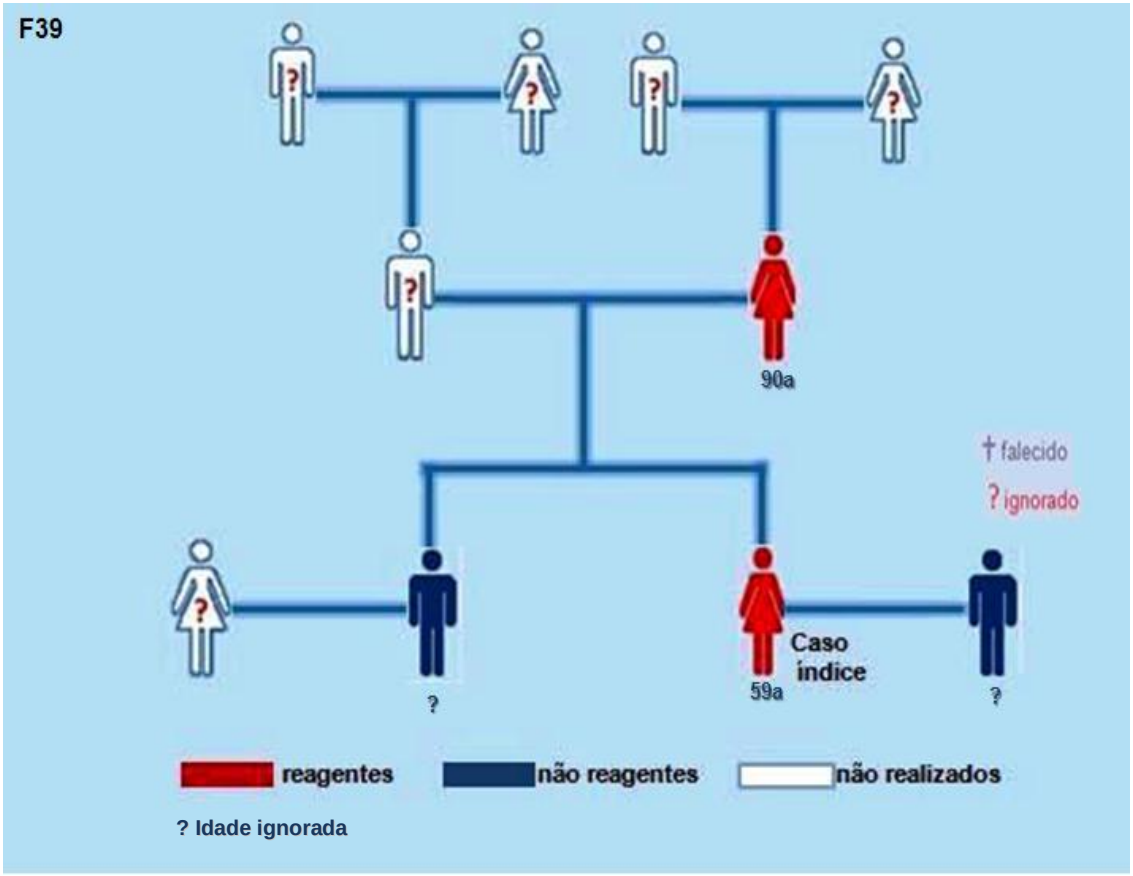

Figura 24: Pictoheredograma representativo da investigação de HTLV-1 na família 39

6.1.3. Aálise filogenética entre as amostras do estudo e do *genbank*

A análise filogenética, realizada com fragmento de 477 pb da região 5'*LTR*, agrupou todas as 28 sequências virais identificadas neste estudo, com sequências de HTLV-1a ou Subtipo Cosmopolita e Subgrupo A ou Transcontinental.

Na análise comparativa das amostras disponibilizadas no *Genbank* com as amostras do presente estudo obteve-se uma variação de similaridade de 95,7% a 99,5% para o Subtipo Cosmopolita e de 96,5% a 99,5% para o Subgrupo A ou Transcontinental. Fora do Transcontinental a variação observada foi de 95,7% a 98,7% para o subgrupo japonês; de 95,9% a 97,7% para o subgrupo C - Oeste africano e de 96,3% a 98% para o subgrupo D – Norte africano.

Quando comparadas com os grupos mais externos obteve-se uma variação de 94% a 95,3% para o subtipo 1e; de 93,3% a 94,4% para o subtipo da África central e o que apresentou maior divergência foi para o subtipo Melanésio com variação de 90,6% a 91,6% (fig. 25).

Foi verificado também a divergência e similaridade das amostras isoladas no presente estudo com as amostras isoladas no Brasil e disponíveis no *Genbank.* Observou-se que a similaridade média ficou em torno de 97,1%, sendo menor com as amostras Bel10564 (variação de similaridade de 95,7% a 96,5%) e Bel10420 (variação de similaridade de 96,5% a 97,4%) e maior com a amostra JpnBr41 (variação de similaridade de 98,5% a 99,3%).

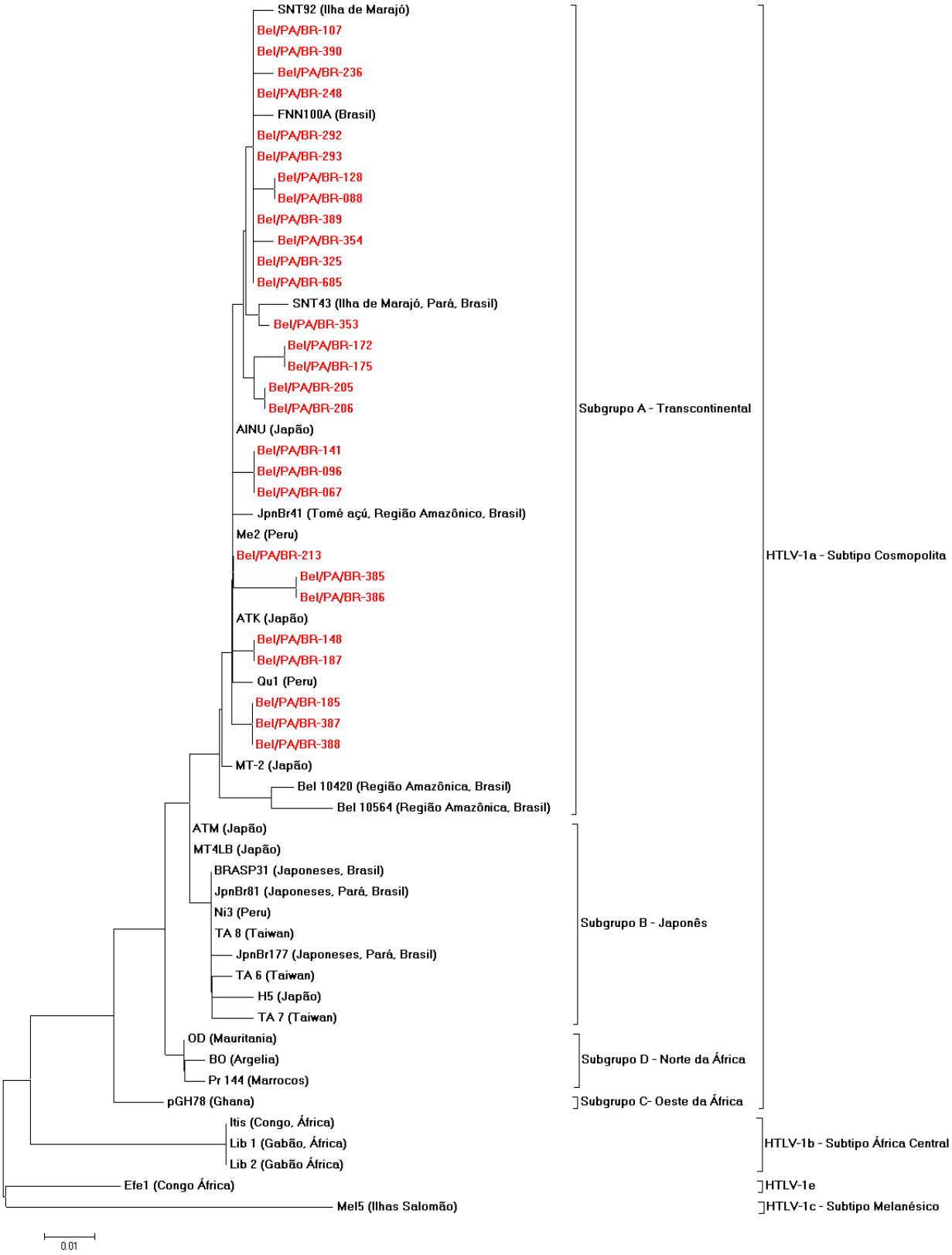

Figura 25: Árvore enraizada, demostrando as relações filogenéticas entre as amostras de HTLV-1 disponíveis no *GenBank* e aquelas descritas no presente estudo (em vermelho). A árvore foi construída usando o modelo de Agrupamento de Vizinhos (*Neighbor-Joining*), após o alinhamento de 477 nucleotídeos da região 5'*LTR*. O teste de sustentação estatística (*bootstrap*) foi aplicado usando 1000 réplicas.

7. DISCUSSÃO

O HTLV-1 foi detectado e isolado pela primeira vez em culturas de células linfoblásticas de um paciente com linfoma cutaneo de células T (POIESZ et al., 1980). Aprimeira detecção de portadores de HTLV-1 no Brasil foi realizada em 1986, entre imigrantes japoneses provenientes de Okinawa, na Cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul (KITAGAWA et al., 1986).

O trabalho pioneiro realizado por Nakauchi e colaboradores (1990) identificou em populações indígenas da Região Amazônica a presença de anticorpos anti-HTLV, encontrando prevalência de 31,4%, confirmada por *western bloting* (NAKAUCHI et al., 1990). Outro trabalho realizado pelo mesmo grupo identificou em 1991 anticorpos anti-HTLV em portador da Síndrome de Guillain-Barré, de 12 anos, proveniente de Bragança, Pará, Brasil (NAKAUCHI et al., 1992).

Considerando a debilidade física e letalidade causadas pelas principais manifestações clínicas associadas ao HTLV-1, um vírus que apresenta infecção lenta e progressiva, o presente trabalho se justifica não só pela busca ativa de novos portadores, mas principalmente pela confirmação das rotas de transmissão viral, disponibilizando dados que podem auxiliar políticas públicas de aconselhamento ao portador e seus familiares, com o objetivo de quebrar a cadeia de transmissão deste vírus.

A forma silenciosa com que o HTLV-1 se propaga no seio das famílias tem sido objeto de pesquisa para a identificação das possíveis rotas de transmissão em familiares de pacientes assintomáticos (TAKE et al., 1993; HISADA et al., 1998; CATALAN-SOARES et al., 2004; FIGEUIRÓ-FILHO et al., 2005, COSTA, 2009) e sintomáticos (FARIAS DE CARVALHO et al., 1997; BITTENCOURT et al., 1998; SHIOIRI et al., 1998; BORDUCCHI et al., 1999; MOXOTO et al., 2007) permitiram identificar a presença de anticorpos anti-HTLV em membros das famílias, mas não confirmaram a transmissão intrafamiliar por bases moleculares.

Análises das sequências genômicas do HTLV demonstraram que as regiões *LTR* e *env* (KOMURIAN, et al., 1992; LIU et al., 1994; TUPPIN et al., 1996; ISHAK et al., 2001; VAN DOOREN et al., 2004) são as mais variáveis e informativas para a classificação taxonômica e evidência de transmissão, porém, a *LTR* apresenta maior variabilidade genética (Komurian et al, 1992; Liu et al, 1994 e Van Dooren, 2004) motivo pelo qual ela foi usada como alvo neste estudo. No presente estudo, tivemos

dificuldades de analisar 26 das 38 famílias com suspeita de transmissão familiar do HTLV-1, uma vez que não houve amplificação de pelo menos dois membros, talvez pela dificuldade no sequenciamento da região *5´LTR* de todas as amostras, devido à presença de mutações em sítios específicos dos iniciadores ou à baixa carga proviral (< 10 cópias/0,7 µg DNA), dificuldades já relatadas por CIMARELLI et al. (1996)

Estudos demonstram que as principais vias de transmissão do HTLV são através do contato sexual, no sentido do homem para mulher, e de mãe para filho, resultante da amamentação natural (HISADA et al., 2002; IGA et al., 2002; ANDO et al., 2004; LI et al., 2004; ROUCOUX et al., 2005). A primeira evidência molecular da transmissão intrafamiliar do HTLV-1 foi relatada por Liu e colaboradores (1994), no Zaire, província da Angola, África Central, que identificaram sequências nucleotídicas idênticas, da região *LTR* do HTLV-1, em dez indivíduos membros de quatro gerações de duas famílias.

Para a confirmação das transmissões intrafamiliares do presente trabalho, levou-se em conta, além da taxa de similaridade das sequências nucleotídica virais, as relações de parentesco e o histórico de cada indivíduo. No presente trabalho, foram confirmadas transmissões intrafamiliares em 11 (92%) das 12 famílias investigadas, sendo evidenciadas nove transmissões verticais e oito transmissões horizontais por contato sexual. No entanto, a partir dessas transmissões confirmadas pela análise das sequências nucleotídicas, pode-se deduzir mais quatro transmissões verticais e mais uma pela relação sexual, quando observadas as relações familiares com portadores que não tiveram suas amostras sequenciadas.

Um grupo familiar chamou atenção por apresentar transmissão vertical do HTLV-1 entre indivíduos de três gerações, com relatos de óbitos por doenças linfoproliferativas malignas. A Leucemia linfoma de céluas T do adulto – LLcTA, ocorre em menos de 5% das pessoas com infecção pelo HTLV-1, com um período de latência média de mais de 30 anos (TAJIMA et al., 1990). Embora não tenham sido confirmadas, é provável que essas doenças linfoproliferativas tenham sido LLcTA, inclusive porque dois casos ocorreram em mãe e filho, ambos portadores de HTLV-1, onde a mãe mostrou a presença de *flower cells* no sangue periférico (dados não publicados).

A transmissão pela relação sexual também é uma via importante na propagação doméstica do HTLV-1 e as evidências genéticas do vírus têm sido demonstradas em áreas endêmicas do Japão, África e América Latina (LIU et al, 1994;. KAKUDA et al, 2002; VAN DOOREN et al, 2004, VALLINOTO et al., 2006; SANTOS 2009).

Outra familia que chamou a atenção, principalmente pela possibilidade da transmissão no sentido da mulher para homem, foi identificada na família de um doador de sangue de longa data (mais de 10 anos), que nunca tivera sido notificado sobre a presença de anticorpos contra o HTLV. A soroconversão ocorreu após 14 anos de convivio com a atual esposa, o que coincide com a idade do filho do casal, que também apresentou vírus idêntico. Outros pontos que corroboram essa acertiva são os fatos de duas filhas de relacionamento anterior do doador não serem reagentes para anticorpos anti-HTLV e de sua enteada, filha de relacionamento anterior da atual esposa, com idade próxima a de suas filhas, ser portadora do vírus. Entretanto a enteada negou-se a ceder material para análise molecular, o que poderia confirmar essa via de transmissão.

Mesmo que a eficiência da transmissão do homem para a mulher seja 15 vezes maior que no sentido da mulher para homem (STUVER et al., 1993; KAPLAN et al., 1996; PROIETTI, et al., 2005), devido maior quantidade de células infectadas no sêmem (MIYOSHI et al., 1982; NAKANO et al., 1984) no presente trabalho as evidências sugerem que nesta família a transmissão sexual tenha ocorrido no sentido da mulher para o homem.

Das três relações com divergências nucleotídeas entre os indivíduos analisados, duas demonstraram alta similaridade (99,8% e 99,4%) entre as amostras de mãe-filha, confirmando a transmissão intrafamiliar e concordando com estudos que evidenciaram a transmissão entre familiares que apresentaram pequena ou até nula variabilidade genética nas sequências genômicas do HTLV (LIU et al., 1994; TUPPIN et al., 1996; VALLINOTO et al., 2001).

Uma família apresentou divergência de 1,83% entre amostras de avó (62 anos) e neto (19 anos), onde a mãe (39 anos) não demonstrou anticorpos anti-HTLV nem pesquisa molecular positiva para HTLV. Algumas hipóteses podem ser consideradas para explicar a origem do vírus no jovem de 19 anos. A primeira e mais provável pode ser explicada pelo relato de transfusão sanguínea em 1999, mesmo que a

triagem sorológica para HTLV tenha sido implantada nos hemocentros do Brasil a partir de 1993 (Ministério da Saúde, Portaria Nº 1.376, de 19 de novembro de 1993; CARRAZZONE et al, 2004). Não se pode descartar a possibilidade de transmissão deste vírus por transfusão de hemoderivados, devido a fatores como a janela imunológica dos doadores (MANNS et al., 1992) e sensibilidade dos testes de sorologia.

Por outro lado, mesmo rara, não se pode descartar uma provável transmissão por relações sexuais sem uso de preservativos (MURPHY et al., 1989; NAKASHIMA et al., 1994). Ainda, apesar de não haver relato de amamentação pela avó, esta possibilidade poderia também ser ponderada. No entanto, considerando que a taxa de evolução entre os vírus varia de acordo com o tempo decorrido da transmissão, a taxa de evolução viral neste caso seria de 0,1% ao ano, acima das transmissões confirmadas que tiveram taxas de evolução dos vírus variando de zero a 0,01% ao ano no presente trabalho (VAN DOOREN et al., 2001).

Dentre as amostras de HTLV-1 analisadas no presente estudo, todas se agruparam ao subtipo Cosmopolita, subgrupo Transcontinental, corroborando com estudos que demonstraram maior frequência desse subtipo viral em portadores assintomáticos no Brasil (KASHIMA et al*.,* 2001; SEGURADO et al*.,* 2002; SOUZA et al*.,* 2006) e em áreas urbanas e rurais do Estado do Pará (PONTES et al*.,* 2003; LAURENTINO et al*.,* 2005) apesar da identificação do subtipo japonês entre imigrantes japoneses, mas que não explica a origem do HTLV-1 no Estado (VALLINOTO et al. 2004).

A origem do HTLV-1, subtipo Cosmopolita, subgrupo Transcontinental, no “Novo Mundo” ainda é controversa. Alguns estudos evolutivos sugerem que a primeira introdução do vírus no continente Americano ocorreu pela migração da população mongol através do Estreito de Bering há cerca de 10.000 a 40.000 anos (MIURA et al. de 1997, YAMASHITA et al. 1998, OHKURA et al. 1999, LI et ai. 1999, RAMIREZ et al. 2002).

Considerando-se que o subtipo Transcontinental foi isolado em vários grupos étnicos, incluindo Africanos e seus descendentes vivendo na América (VAN DOOREN et al. 1998), e que a infecção pelo HTLV-1 é ausente ou tem baixa prevalência na populações indígenas nativa da região amazônica (ISHAK et al. 1995, SHINDO et al. 2002), a presença deste subgrupo em Belém poderia ser

sugerida como uma introdução recente do vírus na região amazônica pelos africanos que foram trazidos como escravos durantes os séculos 17 e 18 (LAURENTINO et al., 2005), apesar de Ishak e colaboradores (1995) que não terem identificado a infecção por HTLV-1 em duas populações afro-brasileiras semi-isoladas, localizadas a leste da Região Amazônica do Brasil.

Estudo desenvolvido por Talarmin e colaboradores (1999) na Guiana Francesa, também demonstrou que todas as amostras de HTLV pertenciam ao subtipo 1a ou Cosmopolita subgrupo Transcontinental, as quais também evidenciaram alta similaridade com as deste estudo, demonstrando um fluxo entre os dois países ou uma origem comum da infecção.

Iniciativas promissoras na Saúde Pública para prevenção de infecção pelo HTLV-1 incluem triagem sorológica para HTLV em bancos de sangue, aconselhamento de mães soropositivas para não amamentarem seus filhos, uso de preservativos nas relações sexuais e não compartilhamento de agulhas e seringas (VRIELINK, 2004). Edgren e colaboradores (2006) propuseram criar mecanismos de monitoramento eficiente de possíveis doenças concordantes entre doadores de sangue e receptores o que se constituiria num importante componente de sistema de hemovigilância. Os autores do presente trabalho sugerem que esta vigilância seja estendida também aos núcleos familiares, uma vez que oito das doze famílias investigadas foram encaminhadas do HEMOPA e todas confirmaram o mesmo vírus circulante entre os familiares.

O presente trabalho confirma a ocorrência de transmissão intrafamiliar do HTLV-1 em mais de 90% das famílias com dois ou mais familiares infectados, inclusive envolvendo portadores que possivelmente faleceram por doenças causadas pelo vírus. No entanto, para controlar a propagação do vírus é imprescindível descobrir os casos que estão espalhados no meio da população. Neste sentido, a realização de triagem sorológica em grupos específicos, como grávidas e portadores de doenças ou infecções associadas ao HTLV-1, além da educação em saúde entre estes e seus familiares poderia impactar na cadeia de transmissão desse vírus.

8. CONCLUSÃO

1 – Foi confirmada a transmissão familiar em 11 das 12 famílias investigadas;

2 – Pode ocorrer divergência de até 0,6% entre as amostras virais das transmissões verticais;

3 – Divergência igual ou superior a 1,83% pode ser considerada para excluir transmissão familiar;

4 – Todas as 28 sequências virais identificadas neste estudo foram classificadas como pertencentes ao HTLV-1a ou Subtipo Cosmopolita e Subgrupo A ou Transcontinental.

REFERENCIAS

ALBEITSKREIS BLUT. Human T-cell Lymphotropic Virus Type 1 and 2 (HTLV-I/II). Untergruppe (Bewertung Blutassoziierter Krankheitserreger). **Infusionsther Transfusionmed, 26:** 321-326, 1999.

ALCANTARA, LC; SHINDO, N; VAN DOOREN,S; SALEMI, M; COSTA,MC; KASHIMA S, et al. Brazilian HTLV type 2a strains from intravenous drug users (IDUs) appear to have originated from two sources: Brazilian Amerindians and European/North American IDUs. **AIDS Res Hum Retroviruses,**; **19:**519-523. 2003.

ANDO Y, EKUNI Y, MATSUMOTO Y, NAKANO S, SAITO K, KAKIMOTO K, TANIGAWA T, KAWA M AND TOYAMA T.. J. **Obstet. Gynaecol. Res., 30**, 436–438, (2004).

ARAÚJO, A.Q.C.; SILVA, M.T.T. The HTLV-1 neurological complex. **Lancet Neurology**. v 5, n. 12, p. 1068-76, Dec. 2006.

BALTIMORE, D. Viral RNA-dependent DNA polymerase. **Nature**. 226: 5252-1209, 1970.

BANGHAM C.R.M. The immune control and cell-to-cell spread of human T-lymphotropic virus type 1. **Journal of General Virology. 84**: 3177–3189, 2003.

BANGHAM CR. The immune response to HTLV-I. **Curr Opin Immunol** 12: 397 -402, 2000.

BARMAK, K., HARHAJ, E., GRANT, C., ALEFANTIS, T., WIGDAHI, B. Human T cell leukemia virus Type I-induced disease: pathways to cancer and neurodegeneration. **Virology, 308 (1):** 1-12, 2003.

BARNARD, A.L.; IGAKURA, T.; TANAKA, Y.; TAYLOR, G.P.; BANGHAM, C.R. Engagement of specific T-cell surface molecules regulates cytoskeletal polarization in HTLV-1-infected lymphocytes. ***Blood*, *106***: 988-995, 2005.

BAZARBACHI, A.; HERMINE O. Treatment of adult T cell leukemia/lymphoma: Current strategy and future perspectives. **Virus Research,** n. 78, p. 79–92, 2001.

BELL, D. A. *et al*. Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. ***J Natl Cancer Inst***. 85, 14: 1159-64, 1993.

BITTENCOURT AL, OLIVEIRA MF. Dermatite infecciosa associada ao HTLV-I – Revisão. ***Anais bras de Dermatol*.** 2001; 76: 723-732. 25.

BITTENCOURT, A L.Transmissão vertical do vírus linfotrópico para a célula T humana tipos I e II (HTLV-I/II). **J. bras. Ginec. 108(6):**187-194,1998.

BITTENCOURT, A. L; PRIMO, J; OLIVEIRA, M. F. P. Manifestações infanto juvenis da infecção pelo vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV). **Jornal de Pediatria**, 82: 6, 2006.

BORDUCCHI DMM, KERBAUY J, OLIVEIRA JSR. Linfoma/Leucemia de células T do adulto. São Paulo. **Rev Assoc Med Bras**. 45:63-70, 1999.

BRAND, HEIKE et al . Leucemia de células T do adulto. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 31:** 5, 2009 .

Brasil. Portaria nº 1376, de 19 de novembro de 1993. Aprova normas técnicas para coleta, processamento e transfusão de sangue, componentes e derivados. Brasília, 1993.

BRASILEIRO FILHO, Geraldo. **Bogliolo patologia.** 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

BURKE DS. Recombination in HIV: An important evolutionary strategy. **Emergent Infectious Diseases,3**: 253-258, 1997.

BUSCH MP, STRAMER SL, KLEINMAN SH. Evolving applications of nucleic acid amplification assays for prevention of viral transmission by blood components and derivatives. In**:** Garratty G (ed) **Applications of molecular biology to blood transfusion medicine**. American Association of Blood Banks, Bethesda, p. 123-176, 1997.

CALATTINI, 2; CHEVALIER, AS; DUPRES, R; BASSOT, S; FROMENT, A; MAHIEUX et al.: Discovery of a new human T-cell linphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. **Retrovirology, 2:** 31-4, 2005.

CARNEIRO-PROIETTI ABF, CATALAN-SOARES, B; PROIETTI, FA: Human T-cell lymphotropic viruses (HTLV I/II) in South America: should it be a public health concern? **J Biomed Sci; 9:** 587-95, 2002.

CARNEIRO-PROIETTI ABF, RIBAS JGR, CATALAN-SOARES BC, MARTINS ML, BRITO-MELO GEA, MARTINS-FILHO OA, et.al. Infecção e doença pelos vírus linfotrópicos humanos de células T (HTLV-I/II) no Brasil. **Rev Soc Bras Med Trop**.;(35):499-508, 2002.

CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F. Cadernos Hemominas: HTLV. **Fundação Hemominas**, BH. v.13, 304 pags. ISBN 85-60055-00-2. 2006.

CASTRO-COSTA, C.M.; ARAÚJO, A.Q.; BARRETO, M.M.; TAKAYANAGUI, O.M.; O.M.; SOHLER, M.P.; SILVA, E.L.; PAULA, S.M.; ISHAK, R.; RIBAS, J.G.; ROVIROSA, L.C.; CARTON, H.; GOTUZZO, E.; HALL, W.W.; MONTANO, S.; MURPHY, E.L.; OGER, J.; REMONDEGUI, C.; TAYLOR, G.P. Proposal for diagnostic criteria of tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM). **AIDS Research and Human Retroviruses. 22**, 10: 931-5, 2006.

CATALAN-SOARES, B.; CARNEIRO-PROIETTI, A.; PROIETTI, F.; Grupo interdisciplinar de pesquisas em HTLV.Vírus-T linfotrópico humano em familiares de candidatos a doação de sangue soropositivos: disseminação silenciosa. **Revista Panamericana de Salud Pública, 16, 6: 387-394**, 2004.

CATALAN-SOARES,B.; CARNEIRO-PROIETTI,A.B.F.; PROIETTI,F.A. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, 21, 3: 926-931, 2005.

CAVROIS, M. *et al*. Persistent oligoclonal expansion of human T-cell leukemia virus type 1-infected circulating cells in patients with Tropical spastic paraparesis/ HTLV-1 associated myelopathy. ***Oncogene* 17**: 77–82, 1998.

COFFIN JM; FIEDLS BN; KNIPE DM; HOWLEY PM; CHANOCK RM; MELNICK JL; MONATH TP; ROIZMAN B; STRAUS SE. Retroviridae: The Viruses and their replication. **Fundamental Virology**. 763-843, 1996.

COFFIN, J.M., Virology, FIELDS, B., KNIPE, D.M., HOWLEY, P.M., (Eds.). **Lippincott raven**, 3, 1768-1848, 1996b.

COSTA, CA. Transmissão intrafamiliar do HTLV: **Investigação sorológica em familiares de pacientes acompanhados no ambulatório do Núcleo de Medicina tropical da UFPA**. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais) – Belém, Universidade Federal do Pará, 125p, 2010.

DOI, K. *et al*. Preferential selection of human T-cell leukemia virus type I provirus integration sites in leukemic versus carrier states. ***Blood* 106**: 1048–1053, 2005.

DUENAS-BARAJAS, E., J. BERNAL, R. YANAGIHARA et al.. Co-existence of HTLV-I and HTLV-II infection among the Wayu Indians of Colombia. **V International Conference on Human Retrovirology, HTLV***,* **Abstract.** 68, 1992.

DUMAS M, HOUINATO D, VERDIER M, ZOHOUN J, JOSSE R, BOMIS J, et al. Seropidemiology of human T-cell lymphotropic virus type I/II in Benin (West Africa). **AIDS Res Hum Retroviruses. 7**: 447–451 1991.

EDLICH RF, HILL LG, WILLIAMS FM. Global epidemic of human T-cell lymphotrophic vírus type-I (HTLV-I): an update. Journal of Long-Term Effects of Medical. **Implants; 13(2):**127-40, 2003.

EIRAKU N, NOVOA P, FERREIRA MC, MONKEN C, ISHAK R, COSTA FERREIRA O, ZHU SW, LORENCO R, ISHAK M, AZVEDO V, GUERREIRO J, OLIVEIRA MP, LOUREIRO P, HAMMERSCHLAK N, IJICHI S, HALL WM. Identification and characterization of a new and distinct molecular subtype of human T-cell lymphotropic virus type 2. **The Journal of Virology 70**: 1481-1492, 1996.

ELLERMAN, C e BANG, O: O Experimentelle Leukemie Bei Huhnern. **Centralbl. Bakteriol.** 46: 595-609, 1908.

ESHIMA, N. *et al*. Age and gender specific prevalence of HTLV-1. ***J Clin Virol*****, 45,** 2: 135-8, 2009.

ETOH, K. *et al*. Persistent clonal proliferation of human T-lymphotropic virus type I-infected cells *in vivo*. ***Cancer Res.*** **57:** 4862–4867 (1997).

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, LSC; COSTA, JHG; COSTA CA; MELO, MFC; ANDRADE ML; MARTINS, LC et al., Soroprevalência do vírus linfotrópico de células T humanas em comunidades ribeirinhas da região nordeste do Estado do Pará, Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude, (**periódico na Internet). 20, 1(3): 103- 108, 2010.

FIGUEIRÓ-FILHO, E. A., et al. Infecção pelo vírus linfotrópico de células T humanas e transmissão vertical em gestantes de estado da região centro oeste do Brasil. **Rev Bras Ginecol Obstet, v. 27**, n. 12, p. 719-725, dez. 2005. Disponível em: < http://www.scielo.br/pdf/rbgo/v27n12/a03v2712.pdf>. Acesso em: 05 mar. 2011.

FRANCHINI, G., AMBINDER, R.F., MICHÈLE, B. Viral Disease in Hematology. **American Society of Hematology,** 409- 412.

FURUKAWA, Y.; KUBOTA, R.; TARA, M.; IZUMO, S.; OSAME, M. Existence of escape mutant in HTLV-I tax during the development of adult T-cell leukemia. **Blood. 97**, 4: 987–993, 2001.

GABBAI, A.A.; BORDIN, J.O.; VIEIRA-FILHO, J.P. et al. - Selectivity of T human lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) and HTLV-2 infection among different populations in Brazil. **Amer. J. trop. Med. Hyg., 49**: 664-671, 1993.

GALLO, R. C.; SLISKI, A.; WONG-TAAL, F. Origin of human T-cell Leukaemia Lynphoma vírus. **Lancet,** London. 2; 8353: 962-963, 1983.

GALLO, R.C. The discovery of the first human retrovirus: HTLV-1 and HTLV-2. **Retrovirology. 2**: 17, 2005.

GALVÃO-CASTRO B, LOURES L, RODRIGUES LGM, SERENO A, FERREIRA JR. OC, FRANCO LGP, MULLER M, SAMPAIO DA, SANTANA A, PASSOS LM, PROIETTI F. Geographic distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide brazilian study. **Transfusion** 37:242-243, 1997.

GALVÃO-CASTRO, B.; LOURES, L.; RODRIGUES, L.G. et al. - Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. **Transfusion, 37**:242, 1999.

GAUDRAY G, GACHON F, BASBOUS J, et al. The complementarystrand of the human T-cell leukemia vírus type 1 RNA genome encodes a bZIP transcriptionfactor that down-regulates viral transcription.**JVirol**. **76**: 12813–12822, 2002.

GESSAIN A, BARIN F, VERNANT JC, GOUT O, MAURS L, CALENDER A, The G. Antibodies to human T-cell lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. **Lancet, 2**: 407-410, 1985.

GESSAIN, A., GALLO, R.C., FRANCHINI, G. Low degree of human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1 genetic drift in vivo as a means of monitoring viral transmission and movement of ancient human populations. **Journal of Virology, 66:** 2288-2295, 1992.

GIRI, A., P. MARKHAM,L.DIGILIO,G.HURTEAU,R.C.GALLO, and G. FRANCHINI. Isolation of a novel simian T-cell lymphotropic virus from Pan paniscus that is distantly related to the human T-cell leukemia/lymphotropic virus types I and II. **J. Virol.68:** 8392–8395, 1994.

GOTUZZO, E.; ARANGO, C.; DE QUEIROZ-CAMPOS, A.; ISTÚRIZ, R.E. Human T-cell lymphotropic virus-I in Latin America. **Infectious Disease Clinics of North America**. 14, 1: 211-39, 2000.

GOUBAU, P., VAN BRUSSEL, M., VANDAMME, A. M., LIU, H. F. & DESMYTER, J. A primate T- lymphot ropi c virus, PTLV-L, different from human T- lymphotropic viruses types 1 and 2, in a wild-caught baboon (Papio hamadryas). **Proceedings of the National Academy of Scienc**es, USA 91, 2848~2852, 1994.

GOUBAU, P; VANDAME, A. M.; DESMYTER, J. Questions on the evolution of primate T-lynphotropic viruses raised by molecular and epidemiological studies of divergente atrains. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovilogy**. 13; 1:242-247, 1996.

H. HIRSCHFELD AND M. JACOBY, *ZEIT F. KLIN. MED.,* I9O9-IO, LXIX, IO7, ELLERMAN AND O. BANG, *CENT. F. BAKT., ORIG.,* I9O8, XLVI, 595; *ZEIT. F. HYGIENE U. INFEKTIONSKRANK.,* 19O9, LXIII, 23I. CARNEIRO-PROIETTI ABF, RIBAS JGR, CATALAN-SOARES BC, MARTINS ML, BRITO-MELO GEA, CARNEIRO-FILHO OA. Infecção e doença pelos vírus linfotrópicos humanos de células T (HTLV-I/II) no **Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 35**: 499-508, 2002.

HAHN BH, SHAW GM, ARYA SK, POPOVIC M, GALLO RC, WONG-STAAL F. Molecular cloning and characterization of the HTLV-III virus associated with AIDS. **Nature. 8-14** 312(5990):166-9.1984

HALL WW, KUBO T, IJICHI S, TAKAHASHI H, ZHU, SW. Human T-cell leukemia/lymphoma virus, type II (HTLV-II): emergence of an important newly recognized pathogen. **Sem Virol,5**: 165-178, 1994.

HALL WW, TAKAHASHI H, LIU C, KAPLAN MH, SHEEWIND O, IJICHI S, NAGASHIMA K, GALLO RC. Multiple isolates and characteristics of human T-cell leukemia virus type II. ***J Virol*** *66*: 2456-2463. 1992.

HALL, TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series 41**: 95-98, 1999.

HALL, W.; ISHAK, R & ZHU, SW. - Human T lymphotropic virus type II (HTLV-II): epidemiology, molecular properties, and clinical features of infection. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. hum. Retrovirol., 13** (Suppl. 1): S204-S214, 1996.

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:**.204-214, 1996.

HENEINE W, WOODS T, GREEN D, et al. Detection of HTLV-II in breast-milk of HTLV-II infected mothers. **Lancet**. **340:**1157-1158, 1992.

HINUMA Y, NAGATA K, HANAOKA M, et al. Adult T-cellleukemia: antigen in an ATL cell line and detection ofantibodies to the antigen in human sera. **Proc Natl Acad Sci USA;78**:6476–80, 1981.

HIRATA, T, UCHIMA N, KISHIMOTO K, ZAHA O, KINJO N, et al. Impairment of host immune response against Strongyloides stercoralis by human T cell lymphotropic virus type 1 infection. **Am J Trop Med Hyg 74(2):** 246–249, 2006.

HISADA,M.;OKAYAMA, A.;SHIOIRI,S.;SPIEGELMAN, D.L.;STUVER,S.O.; MUELLER,N.E. Risk Factors for Adult T-Cell Leukemia Among Carriers of Human T-Lymphotropic Virus Type I.**Blood**.**92,10:** 3557-3561, 1998.

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.; TORREZMARTINEZ, N.; JAHNKE, R.; ROSS, G. Cronic neurodegnerative disease associated with HTLV-II infection. **Lancet, 339**: 645-646, 1992.

HOUINATO, D.;VERDIER, M.; PREUX,P.M.; R JOSSE, R.; LETENNEUR,L.; AYED, Z.;AVOD, G.; MASSIT, B.; BOUTROS-TONI, F.; DENIS, F.; ZOHOUN, T.; SALAMONC, RAND DUMAS, M. Intrafamilial clustering and 4-year follow-upof asymptomatic human T-cell leukaemia virustype I (HTLV-I) infection in Benin (West Africa). **International Journal of Epidemiology**, n. 27, p.146-152, 1998.

IBRAHIM, F., G. DE THE´, and A. GESSAIN. Isolation andcharacterization of a new simian T-cell leukemia virus type I from naturally infected Celebes macaques (Macaca tonkeana): complete nucleotide sequence and phylogenetic relationship

with the Australo-Melanesian human T-cell leucemia virus type I. **J. Virol.69**: 6980–6993, 1995.

ISHAK R, VALLINOTO ACR, AZEVEDO VN, LEWIS M, HALL WW, ISHAK MOG. Molecular evidence of mother-to-child transmission of HTLV-IIc in the Kararao Village (Kayapo) in the Amazon Region of Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. **34(6)**: 519-525, 2001.

ISHAK, R; ISHAK MOG; AZEVEDO VN; SANTOS DEM; VALLINOTO ACR; SARAIVA JCP; HALL WW. Detection of HTLV-IIa in blood donors in an urban area of the Amazon Region of Brazil (Belém, PA). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 31:** 193-197, 1998.

ISHAK, R. et al. Identification of human T-cell lymphotropic virus type IIa infection in the Kayapo, an indigenous population of Brazil. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 11, p. 813-821, 1995.

ISHAK, R.; VALLINOTO, A.C.R.; AZEVEDO, V.N.; LEWIS, M.; HALL, W.W.; AND ISHAK, M.O.G. Evidência molecular da transmissão do HTLV-IIc de mãe para filho, na aldeia Kararao(Kayapó), na região amazônica brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical: 34**, 6: 519-525, 2001.

IWAHARA, Y.; TAKEHARA, N.; KATAOKA, R.; SAWADA, T.; OHTSUKI, Y.; NAKACHI, H.; MAEHAMA, T.; OKAYAMA,T.; MIYOSHI, I. Transmission of HTLV-I to rabbits via semen and breast milk from seropositive healthy persons. **International Journal of Cancer**. v. 45, n. 5, p. 980-3, may 1990.

JACOBSON, S.; SHIDA, H.; MCFARLIN, D.E.; FAUCI, A.S.; KOENIG, S; Circulating CD8_ cytotoxic T lymphocytes specific for HTLV-I pX in patients with HTLV-I associated neurological disease. **Nature,** v. 348, n. 6298, p. 245–248, 1990.

JAVIER RT, BUTEL JS. The history of tumor virology. **Cancer Res. 68**(19). 2008.

JEFFERY, K.J.; USUKU, K.; HALL, S.E.; MATSUMOTO, W.; TAYLOR, G.P.; PROCTER, J., BUNCE, M.; OGG, G.S.; WELSH, K.I.; WEBER, J.N.; LLOYD, A.L.; NOWAK, M.A.; NAGAI, M.; KODAMA, D.; IZUMO, S.; OSAME, M.; BANGHAM, C.R. HLA alleles determine human T- **Proceedings of the National Academy of Sciences. 96**: 7, 3848–3853, 1999.

JIN, J.; SHERER, N.M.; HEIDECKER, G.; DERSE, D. Mothes, W. Assembly of the murine leucemia virus is directed towards sites of cell-cell contact. ***PLoS Biol****. 7:* 1000-1630, 2009.

JOHNSON JM, HARROD R AND FRANCHINI G. Molecular biology and pathogenesis of the human T-cell leukaemia/lymphotropic virus Type-1 (HTLV-1). **International Journal of Experimental Pathology**, **82**: 135-147, 2001.

KAJIYAMA, W.,; KASHIWAGI, S.; IKEMATSU, H.; HAYASHI, J.; NOMURA, H.; OKOCHI, K. Intrafamilial transmission of adult T cell leukemia virus. **Journal of Infectious Diseases**. v.154, n. 5, p. 851-7, Nov 1986.

KAKUDA K, IKEMATSU H, CHONG WLY, HAYASHI J, KASHIWAGI S. Molecular epidemiology of Human T Lymphotropic Virus Type 1 transmission in Okinawa, Japan. **Am J Trop Med Hyg**, **66(4)**:404-408, 2002.

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.

KANNAGI M, OHASHI T, HARASHIMA N, HANABUCHI S, HASEGAWA A. Immunological risks of adult T-cell leukemia at primary HTLV-I infection. **Trends Microbiol. 12:** 346-52, 2004.

KANNAGI, M.; OHASHI, T.; HANABUCHI, S.; KATO; H.; KOYA, Y.; YOSHIKI, T. Induction of HTLV-I-infected T lymphoproliferative disease in animal models and its immunological aspects. **Leukemia,** 14, 551, 2000b.

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.

KAPLAN, J.E.; KHABBAZ, R.F.; MURPHY, E.L.; HERMANSEN, S.; ROBERTS, C.; LAL, R.; HENEINE, W.; WRIGHT, D.; MATIJAS, L.; THOMSON, R.; RUDOLPH, D.; SWITZER, W.M.; KLEINMAN, S.; BUSCH, M.; SCHREIBER, G.B.; Male-to-female transmission of human T-cell lymphotropic virus types I and II: association with viral load. The Retrovirus Epidemiology Donor Study Group. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**. **12. 2:** 193-201, 1996.

KAPLAN, J.E.; KHABBAZ, R.F.; MURPHY, E.L.; HERMANSEN, S.; ROBERTS, C.; LAL, R.; HENEINE, W.; WRIGHT, D.; MATIJAS, L.; THOMSON, R.; RUDOLPH, D.; SWITZER, W.M.; KLEINMAN, S.; BUSCH, M.; SCHREIBER, G.B.; Male-to-female transmission of human T-cell lymphotropic virus types I and II: association with viral load. The Retrovirus Epidemiology Donor Study Group. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology**. 12, 2: 193-201, 1996.

KATHRYN S JONES AND PATRICK L GREEN. Cloaked virus slips between cells. **Nat Med. Author manuscript; available in PMC**, 2012.

KINOSHITA, K.; HINO, S.; AMAGASAKI, T. et al. - Demonstration of adult T cell leukemia virus antigen in milk from three sero-positive mothers. **Gann, 75**: 103-105, 1984.

KIRA, J.; KOYANAGI, Y.; YAMADA, T.; ITOYAMA, Y.; GOTO, I.; YAMAMOTO, N.; SASAKI, H.; SAKAKI, Y. Increased HTLV-I proviral DNA in HTLV-I associated myelopathy: a quantitative polymerase chain reaction study. **Annals of Neurology**. 29, 2: 194–201, 1991.

KITAGAWA, T.; FUJISHITA, M.; TAGUCHI, H. et al. - Antibodies to HTLV-I in Japanese immigrants in Brazil. **J. Amer. med. Ass., 256**: 2342, 1986.

KOMURIAN-PRADEL, F; PELLOQUIN, F; SONDA, S; OSAME, M, de the G: Geographical subtypes demonstrated by RFLP following PCR region of HTLV-1. **AIDS Research and Human Retroviruses 8**:429-434, 1992.

KOMURO, A., HAYAMI, M., FUJI, M., MIYAHARA S., HIRAYAMA, M. Vertical transmission of adult T-cell leukemia virus. **Lancet, 1:** 240, 1983.

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.

LENZI, M.E.R.; ARAUJO, A.Q.C.; MAYA, T.C. et al. - Dermatite infectiva associada ao HTLV-I: relato de caso. **An. bras. Derm. 71**: 115-118, 1996.

LEVIN, M.C.; LEHKY, T.J.; FLERLAGE, A.N.; KATZ, D.; KINGMA, D.W.; JAFFE, E.S.; HEISS, J.D.; PATRONAS, N.; MCFARLAND, H.F.; JACOBSON, S. Immunologic analysis of a spinal cord-biopsy specimen from a patient with human T-cell lymphotropic virus type I associated neurologic disease. **New England Journal Of Medicine**. v. 336, n.12, p. 839–845, 1997.

LEVINE AJ. Viruses. New York: **Scientific American Library,** 1991.

LI HC, BIGGAR RJ, MILEY WJ, MALONEY EM, CRANSTON B, HANCHARD B, HISADA M. ProvirusLoad in breast milk and risk for mother-to-child transmission of Human T Lymphotropic Virus Type I. **Journal Infectious Diseases, 190:** 75-1278, 2004.

LIMA, T. V.R. **Caracterização sorológica e detecção molecular do HTLV em amostras de pacientes com distúrbios neurológicos no Estado do Pará, Brasil (1996 – 2005).** Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais) – Belém, Universidade Federal do Pará, 101p, 2006.

LIMA,T.V.R.; WANZELLER,A.L.M.; MOURA, A.; LINHARES, A.C. Anticorpos para HTLV -I e HTLV -II entre doadores de sangue em Belém, Brasil. **Revista Paraense de Medicina .13:** 3, 1999.

LIU HF, VANDAMME AM, KAZADI K, CARTON H, DESMYTER J, GOUBAU P. Familial Transmission and Minimal Sequence Variability of Human T-Lymphotropic Virus Type I (HTLV-I) in Zaire. AIDS Res Hum Retrovir, 10(9):1135-1142, 1994.

LIU, H. F., A.-M. VANDAMME,M.VAN BRUSSEL,J.DESMYTER, and P. GOUBAU. New retroviruses in human and simian T-lymphotropic viruses. **Lancet. 344:** 265–266, 1994.

LIU, H.F., VANDAMME, A.M., KAZADI, K., KARTON, H., DESMYTER, J., GOUBAU, P. Familial transmission and minimal sequence variability of human Tcell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) in Zaire. **AIDS Research and Human Retroviruses, 10:** 1135-1142, 1994.

LIU,H.F.,P.GOUBAU,M.VAN BRUSSEL,K.VAN LAETHEM, Y. C. CHEN,J.DESMYTER, and A.-M. VANDAMME.. The three human T-lymphotropic virus type I subtypes arose from three geographically distinct simian reservoirs. **J. Gen.Virol. 77:** 359–368, 1996.

LOUREIRO,P. Infecção pelo HTLV-1: Diagnóstico e determinação da carga proviral em indivíduos assintomáticos e com enfermidades associadas em serviço de referência no Nordeste. **Biblioteca Virtual em Saúde (BVS)** Pesquisa em Banco de Dados. Disponível em <HTTP:// bases.bireme.br>. Acessado em 10.03.2010.

LU, S.C.; CHEN, B.H. Seroindeterminate HTLV-1 prevalence and characteristics blood donors in Taiwan**. Int J Hematol**, **77(4):** 412-3, 2003.

MAHEIEUX R, PECON- SLATTERY J, CHEN GM, GESSAIN A. Evolutionary Inference of Novel Simian T Lymphotropic Virus Type I from Wild Caught Chacma (Papio ursinus) and Olive Baboon (Papio anubis). ***Virology,*** **251**:71-84, 1998.

MAHIEUX R, GESSAIN A. The human HTLV-3 and HTLV-4 retroviruses: new members of the HTLV family. **Pathol Biol**, **57**: 161-166, 2009.

MAHIEUX R, IBRAHIM F, MAUCLERE P, HERVE V, MICHEL P, TEKAIA F, CHAPPEY C, GARIN B, VAN DER RYST E, GUILLEMAIN B, LEDRU E, DELAPORTE E, de The G, Gessain A. Molecular epidemiology of 58 new African human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) strains: identification of a new and distinct HTLV-1 molecular subtype in Central Africa and in Pygmies. **The Journal of Virology 71**: 1317-1333, 1997.

MALONEY E, BIGGAR RJ, NEEL JV, TAYLOR ME, HAHN BH, SHAW GM, et al. Endemic human T cell lymphotropic virus type II infection among isolate Brazilian amerindians. **J Infect Dis**. **166**: 100-107.1992;

MALONEY,E.M.; CLEGHORN, F.R.; MORGAN, O.S.; RODGERS-JOHNSON, P.; CRANSTON, B.; JACK, N.; BLATTNER, WA.; BARTHOLOMEW, C.; MANNS, A. Incidence of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in Jamaica and Trinidad. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and huaman Retrovirology**. 17, 2: 67-170, 1998.

MANNS A, MILEY WJ, WILKS RJ, MORGAN OS, HANCHARD B, WHARFE G, et al. Quantitative proviral DNA and antibody levels in the natural history of HTLV-I infection. **J Infect Dis**, **180**: 1487-1493, 1999.

MANNS A, MURPHY EL, WILKS R *et al*. A prospective study of transmission by transfusion of HTLV-I and risk factors associated with seroconversion. Int J **Cancer**. **51(6)**:886-91, 1992.

MATSUOKA M, JEANG KT. Human T-cell leukaemia virustype 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. **Nat Rev Cancer**.**7:**270–80, 2007.

MATSUOKA, M.; GREEN, P.L. The HBZ gene, a key player in HTLV-1 pathogenesis. **Retrovirology**, v. 6, n. 71, p. 1-8, 2009.

MATSUZAKI, T.; NAKAGAWA, M .; NAGAI, M.; USUKU, K.; HIGUCHI, I.; ARIMURA, K.; KUBOTA, H.; IZUMO, S.; AKIBA, S.; OSAME, M. HTLV-I proviral load correlates with progression of motor disability in HAM/ TSP: analysis of 239 HAM/TSP patients including 64 patients up for 10 years. **Journal of Neurovirology. 7, 3 :** 228–234, 2001.

MERLE, H.; CABRE, P.; OLINDO, S.; MERLE, S.; SMADJA, D. Ocular lesions in 200 patients infected by the human T-cell lymphotropic virus type 1 in martinique (French West Indies)**. American Journal of Ophthalmology**. v. 134 , n. 2 , p. 190 – 195, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Infecção pelo vírus t-linfotópico humano (HTLV)**. 2006. http://www.aids.gov.br/assistencia/manualdst/item13.htm. Acesso em 07/07/2010.

MIYOSHI I, YOSHIMOTO S, FUJISHITA M, TAGUSHI H, KUBONISHI I, NIIYA K,MINEZAWA M: Natural adult T-cell leukemia virus infectionin Japanese monkeys. **Lancet** IIb:658, 1982.

MOCHIZUKI M, WATANABE T, YAMAGUCHI K, YOSHIMURA K. HTLV-I uveitis: a distinct clinical entity caused by HTLV-I. **Japanese Journal of Cancer Research, 83**: 236-239, 1992.

MOXOTO, M.; et al. **Perfil sociodemográfico, epidemiológico e comportamental de mulheres infectadas pelo HTLV-1 em Salvador-Bahia, em uma área endêmica para o HTLV. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 40:** 1, 37-41, 2007.
Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v40n1/a07v40n1.pdf>. Acesso em: 13 jul. 2010.

NAGAI, M.; USUKU, K.; MATSUMOTO, W.; KODAMA, D.; TAKENOUCHI, N.; MORITOYO, T.; HASHIGUCHI, S.; ICHINOSE, M.; BANGHAM, C.R.; IZUMO, S.; OSAME, M. Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. **Journal of Neurovirology**. **4, 6:** 586–593, 1998.

NAKANE, S.; SHIRABE, S.; MORIUCHI, R.; MIZOKAMI, A.; FURUYA, T.; NISHIURA, Y.; OKAZAKI, S.; YOSHIZUKA, N.; SUZUKI, Y.; NAKAMURA, T.; KATAMINE, S.; GOJOBORI, T.; EGUCHI, K. Comparative molecular analysis of HTLV-I proviral DNA in HTLV-I infected members o **Journal of Neurovirology**. 6, 4: 275–283, 2000.

NAKANO, S.; ANDO, Y. & SAITO, K. - Primary infection of Japanese infants with adult T-cell leukaemia-associated retrovirus (ATLV): evidence for viral transmission from mothers to children. **J. Infect., 12**: 205-212, 1986.

NAKAUCHI, C. M. et al. Antibody to Human T-Lymphotropic Virus in a Patient with Guillain-Barré Syndrome (Case Report). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.** 33, 4: 329-331, 1991.

NAKAUCHI, C. M. et al. Prevalence of HTLV Antibody Among Two Distinct Ethnic Groups Inhabiting the Amazon Region of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. **34,** 4: 323-328, 1992.

NAKAUCHI, C. M. et al. Prevalence of Human T Cell Leukemia Virus-I (HTLV-I) Antibody Among Populations Living in the Amazon Region of Brazil (Preliminary Report). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 85, 1: 29-33, 1990.

NAKAUCHI, C. M. et al. Prevalência de Anticorpos para o Vírus da Leucemia Humana de Células T (HTLV) em Pacientes Cancerosos na Região Amazônica (Nota Prévia). **Revista Brasileira de Cancerolologia**, 35, 3/4: 34-38, 1989.

NEELY, S.M. Adult T-Cell Leukemia-Lymphoma. **The Western Journal of Medicine**. v. 150, n. 5, p. 557-561; May 1989.

OKOCHI K, SATO H, HINUMA Y. A retrospective study on transmission of adult T-cell leukemia virus by blood transfusion: seroconversion in recipients. **Vox Sang**, **46**: 245-253, 1984.

OKOCHI, K.; SATO, H.Transmission of adult T-cell leukemia virus (HTLV-I) through blood transfusion and its prevention. **AIDS Research**, 2 1, p.157-161, 1986.

OLIVEIRA, M.S.P; HAMERSCHLAK, N; CHIATTONE, C.; LOUREIRO,P. HTLV-I Infection and adult T-cell leukemia in Brasil: Na overview.**São Paulo Medical Journal**. **1403**: 1177-1185, 1996.

OSAME M, USUKU K, IZUMO S, IJICHI N, AMITANI H, IGATA A, MATSUMOTO M, TARA M. HTLV-1 associated myelopathy, a new clinical entity. **Lancet. 1:** 1031-1032, 1986.

POIESZ, B. J. RUSCETTE, F.N.; 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 of the National Academy of Sciences of the United States of American**, 77: 7415-7419, 1980.

PRIYA KANNIAN AND PATRICK L. GREEN. Human T Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1): Molecular Biology and Oncogenesis. **Viruses**: 2, 2037-2077, 2010. www.mdpi.com/journal/viruses.

PROIETTI FA, CARNEIRO-PROIETTI AB, CATALAN-SOARES BC, MURPHY EL. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. **Oncogene,24**: 6058-6068, 2005.

PROIETTI, A.B.F.C. HTLV, 4ª ed. Belo Horizonte: **FundaçãoCentro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais**, (Cadernos Hemominas XIII), 2006.

RIBAS, J. R. G. & MELO, G. C. N. Mielopatia associada ao vírus linfotrópico humano de células T do tipo 1 (HTLV-1). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. **35, 4: 377-384, 2002.**

RIBEIRO-LIMA TV, WANZELLER ALM, MOURA A, LINHARES AC. Anticorpos para HTLV-I e HTLV-II entre doadores de sangue em Belém, Brasil. **Revista Paraense de Medicina** 13:8-13, 1999.

RUSSO-CARBOLANTE EMS, PENTEADO FCL, MEDEIROS L, KASHIMA S, TAKAYANAGUI OM, COVAS DT. Clonagem e expressão da glicoproteína transmembrana do vírus linfotrópico de células T humanas em sistema procarioto. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 40(3): 277-281, 2007.**

SAITO, M.; MATSUZAKI, T.; SATOU, Y.; YASUNAGA, J-I.; SAITO, K.; ARIMURA, K.; MATSUOKA, M. AND OHARA, Y. *In vivo* expression of the HBZ gene of HTLV-1 correlates with proviral load, inflammatory markers and disease severity in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). **Retrovirology, 6, .19:** 1-11, 2009.

SAITOU N. AND NEI M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. ***Molecular Biology and Evolution* 4**: 406-425, 1987.

SALEMI, M., M. LEWIS,J.F.EGAN,W.W.HALL,J.DESMYTER, and A.-M. VANDAMME. Different population dynamics and evolutionary rates of human T-cell lymphotropic virus type II (HTLV-II) in injecting drug users compared to in endemically infected Amerindian and Pygmy tribes. **Proc. Natl. Acad. Sci. 69:** 13253–13258, 1999.

SALEMI, M., S. VAN DOOREN,E.AUDENAERT,E.DELAPORTE, P. GOUBAU,J.DESMYTER, and A.-M. VANDAMME.. Two new human T-lymphotropic virus type I phylogenetic subtypes in seroindeterminates, a Mbuti pygmy and a Gabonese, have closest relatives among African STLV-I strains. **Virology. 246:** 277–287,. 1998b.

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 Tcell lymphotropic virus type II (HTLV-II) using isolates from European injecting drugs users. Journal of Molecular Evolution , 46: 602-611, 1998.

SALEMI, M.; VANDAMME,C; GRADOZZI,K; VAN AETHEM,E.CATTANEO,G.TAYLOR,C.CASOLI,P.GOUBAU, J. DESMYTER, and U. BERTAZZONI.. Evolutionary rate and genetic heterogeneity of human T-cell lymphotropic virus type II (HTLV-II) using new isolates from European injecting drug users. **J. Mol. Evol.46:** 602–611, 1998a.

SANGER F, NICHLEN S, COULSON AR. DNA sequences with chain termination inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 74**: 5463-5468, 1977.

SANTOS, EL; TAMEGÃO-LOPES, B, MACHADO LFA; ISHAK, MOG; ISHAK, R; LEMOS, JAR et al., Caracterização molecular do HTLV-1/2 em doadores de sangue em Belém, Estado do Pará: primeira descrição do subtipo HTLV-2b na região Amazônica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**. **42(3):** 271-276, 2009.

SATTENTAU, Q. Avoiding the void: cell-to-cell spread of human viruses. **Nat. rev. Microbiol**. 6, 815-826, 2008.

SCHREIBER GB, BUSCH MP, KLEINMAN SH, KORELITZ JJ. The risk of transfusion transmitted viral infections. Retrovirus Epidemiology Donor Study. **The New England Journal of Medicine, 334:** 1685-1690, 1996.

SEIKI,M., HATTORI,S., HIRAYAMA,Y. AND YOSHIDA,M. Proc. Natl. **Acad.Sci.**USA, 80, 3618-3622.1983.

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.

SODROSKI, J. et al.. Sequence of the envelope of glycoprotein gene of type II human T-limphotropic vírus. **Science.** Washington. 225:421-424, 1984.

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.

STUVER, S.O.; TACHIBANA, N.; OKAYAMA, A.; SHIOIRI, S.; TSUNETOSHI, Y.; TSUDA, K.; MUELLER, N.E. Heterosexual transmission of human T cell leukemia /lymphoma virus type I among married couples in southwestern Japan: an initial report from the Miyazaki Cohort Study. **Journal of Infectious Diseases**, v. 167, n. 1, p. 57-65, jan 1993.

SWEET, R.D. - A pattern of eczema in Jamaica. **Brit. J. Derm., 78**: 93-100, 1966.

TADAHIKO IGAKURA T.; JANE C. STINCHCOMBE, J.C.; PETER K. C. GOON, P.K.C.; GRAHAM P. TAYLOR, G.P.; GRIFFITHS, J.N.;TANAKA, Y.; OSAME, M.; BANGHAM, C.R.M. Spread of HTLV-I Between Lymphocytes by Virus-Induced Polarization of the Cytoskeleton. **Science**.**299:** 1713-1716, 2003.

TAJIMA, K. The 4th nation-wide study of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) in Japan: estimates of risk of ATL and its geographical and clinical features The T- and B-cell Malignancy Study Group. **International Journal Cancer, 45:** 2, 237−243, 1990.

TAKE H, UMEMOTO M, KUSUHARA K, KURAYA K. Trasmission routes of HTLV-I: an analysis of 66 families. **Jpn J Cancer Res**, **84**: 1265-1267, 1993.

TAKEMOTO, S.; MATSUOKA, M.; YAMAGUCHI, K.; TAKATSUKI, K. A novel diagnostic method of adult T-cell leukemia: monoclonal integration of human T-cell lymphotropic virus type I provirus DNA detected by inverse polymerase chain reaction. **Blood. 84,** 9: 3080-3085, 1994.

TAKEZAKI T, TAJIMA K, ITO M, ITO S, KINOSHITA K, TACHIBANA K, MATSUSHITA Y. Short-termbreast-feeding may reduce the risk of vertical transmission of HTLV-I. The Tsushima ATL Study Group. **Leukemia**; 11 Suppl 3:60-2, 1997.

TAMEGÃO-LOPES B P, REZENDE P R, MARADEI-PEREIRAL M C, LEMOSJ A R. Carga proviral do HTLV-1 e HTLV-2: um método simples através da PCR quantitativa em tempo real. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 39(**6):548-552, 2006.

TANAKA, Y., FUKUDOME, K., HAYASHI, M., TAKAGI, S. & YOSHIE, O. Induction of ICAM-1 and LFA-3 by Tax1 of human T-cell leukemia virus type 1 and mechanism of down-regulation of ICAM-1 or LFA-1 in adult-T-cellleukemia cell lines. ***Int. J. Cancer.*** **60:** 554–561, 1995.

TANGY, F. Molecular Biology of HTLV-I. In: HTLV, truths and questions.Zaninovic, V. (eds). Colombia, Cali, FERIVA EDITORES. 1-13, 1996.

TEMIN, TM; MITZUTANI, S: RNA directed DNA polymerase in virions of Rous Sarcoma vírus. **Nature.** 226: 1211, 1970.

TILLMAN M, WESSNER R, WIGDAHL B. Identification of human T-cell lymphotropic virus type I 21-base pair repeat-specific and glial cell-specific DNA-protein complexes. **J Virol 68:** 4597 ± 4608, (1994).

TOSHINOBU FUJIYOSHI, HONG-CHUAN LI, HONG LOU, SHINJI YASHIKI, SHIGEYUKI KARINO, VLADIMIR ZANINOVIC, SONIA GUILLEN ONEEGLLO, MIRTHA CAMACHO, RONALD ANDRADE, LUISA VALENTINA HURTADO, LUIS HURTADO GOMEZ, ESTHER DAMIANI, LUIS CARTIER, JOSE EDGARDO DIPIERRI, MASANORI HAYAMI, SHUNRO SONODA, KAZUO TAJIMA. Characteristic Distribution of HTLV Type I and HTLV Type II Carriers among Native Ethnic Groups in South America. *AIDS Research and Human Retroviruses* **15**:14, 1235-1239, 1999.

TUKE, PW; LUTON, P; GARSON, JA. Differential diagnosis of HTLV-1 and HTLV-2 infections by restriction enzyme analysis of nested PCR productes. **J Virol Methods, 40** (2):163-74, 1992.

TUPPIN P, GESSAIN A, KAZANJI M, MAHIEUX R, COSNEFROY JY, TEKAIA F, GEORGES-GOURBOT MC, GEORGES A, Thé G. Evidence in Gabon for an intrafamilial clustering with mother-to-child and sexual transmission of a new

molecular variant of Human TLymphotropic virus type-II subtype B. **Journal of Medical Virology, 48**: 22-32, 1993.

UCHIYAMA T, YODOI J, SAGAWA K, TAKATSUKI K, UCHINOH. Adult T-cell leukemia:clinical and hematologicfeatures of 16 cases. **Blood, 50**:481–92, 1977.

URETA-VIDAL, A.; ANGELIN-DUCLOS, C.; TORTEVOYE, P.; MURPHY, E.; LEPÈRE, J.F.; BUIGUES, R.P.; JOLLY, N.; JOUBERT. M.; CARLES, G.; POULIQUEN, J.F.; DE THÉ, G.; MOREAU, J.P.; GESSAIN, A. Mother-to-child transmission of human T-cell-leukemia/lymphoma virus type I: implication of high antiviral antibody titer and high proviral load in carrier mothers. **International Journal of Cancer**. 82: 6, 832-836, 1999.

URETA-VIDAL, A.; GESSAIN, A.; YOSHIDA, M.; TEKAIA, F.; GARIN, B.; GUILLEMAIN, B.; SCHULZ, T.; FARID, R. & DE THE, G. Phylogenetic classification of human T cell leukaemia/lymphoma virus type I genotypes in five major molecular and geographical subtypes. **Journal of General Virology. 75**: 3655-3666, 1994.

VALENTIN, H. *et al*. Transcriptional activation of the vascular cell adhesion molecule-1 gene in T lymphocytes expressing human T-cell leukemia vírus type 1 Tax protein. ***J. Virol.*** **71**: 8522–8530, 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 ÂKCR, 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.

VALLINOTO, A.C.R. et al. Identification of human T-cell lymphotropic virus infection in a semi-isolated Afro-Brazilian quilombo located in the Marajó Island (Pará, Brazil). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 101(1):** 103-105, 2006.

VAN DOOREN S, PYBUS OG, SALEMI M, LIU HF, GOUBAU P, REMONDEGUI C, TALARMIN A, GOTUZZO E, ALCANTARA LCJ, GALVÃO-CASTRO, VANDAMME AM. The Low Evolutionary Rate of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type-1 Confirmed by analysis of Vertical Transmission Chains. **Mol Bio Evol 21(3):** 603-611, 2004.

VAN DOOREN S, SALEMI M, VANDAMME AM: Dating the origin of the African human T-cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I) subtypes.**Mol Biol Evol, 18:**661-671, 2001.

VANDAMME, A.M., M. SALEMI, and J. DESMYTER. The simian origins of the pathogenic human T-cell lymphotropic virus type I. **Trends Microbiol.6:**477–483, 1998.

VRIELINK, H.; REESINK, H.W. HTLV-I/II prevalence in different geographic locations**. Transfusion Medicine Reviews.18**, 1**:** 46-57, 2004.

WATANABE, T., M. SEIKI,Y.HIRAYAMA, and M. YOSHIDA.. Human T-cell leukemia virus type I is a member of the African subtype of simian viruses (STLV). **Virology** 148:385–388, 1986.

WATANABE, T., SEIKI, M., YOSHIDA, M. HTLV type I (US isolate) and ATLV (japanese isolate) are the same species of human retrovirus. Virology, m133:238-241, 1984.

WATTEL, E., VARTANIAN, J.P., PANNETIER, C., WAIN-HOBSON, S. Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type 1-infected cells in asymptomatic and symptomatic carries without malignancy. **Journal of Virology, 69:** 2863-2868, 1995.

WHITE, D.O., FENNER, F.J. Medical Virology. **Academic Press**, 603, 1994.

WOLFE et. al., Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among Central African bushmat hunters. **Proceeding of the National Academy of Science of the United State of America**, **102; 22:**7994-9, 2005.

YASHIKI, S.; FUJIYOSHI, T.; ARIMA, N.; OSAME, M.; YOSHINAGA, M.; NAGATA, Y.; TARA, M.; NOMURA, K.; UTSUNOMIYA, A.; HANADA, S.; TAJIMA, K.; SONODA, S. HLA-A*26 HLA-B*4002, HLA-B*4006, and HLAB* 4801 alleles predispose to adult T cell leukemia: the limited recognition of HTLV type 1 tax peptide anchor motifs and epitopes to generate anti-HTLV type 1 tax CD8(_) cytotoxic T lymphocytes. **AIDS Research and Human Retroviruses. 17, 11:** 1047-1061, 2001.

ZANINOVIC, V. On the etiology of tropical spastic paraparesis and human T-cell lymphotropic virus-I-associated myelopathy. **International Journal of Infectious Diseases.** 3, 3: 168-176, 1999.

ZARRANZ IMIRIZALDU JJ, GOMEZ ESTEBAN JC, ROUCO AXPE I, PEREZ CONCHA T, VELASCO JUANES F, ALLUE SUSAETA I, et al. Post-transplantation HTLV-1 myelopathy in three recipients from a single donor. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, **74**: 1080-1084, 2003.

Apêndice

Matriz de similaridade

Sequencias	F27-128	F27-088	F20-213	F20-236	F04-185	F04-387	F04-388	F11-385	F11-386	F12-390	F12-325	F12-389	F17-172	F17-175	F19-067	F19-141	F19-096	F21-293	F21-292	F23-148	F23-187	F34-205	F34-206	F37-248	F37-107	F37-685	F39-354	F39-353
F27-128	ID	0,998	0,981	0,993	0,978	0,978	0,978	0,981	0,981	0,995	0,995	0,995	0,992	0,992	0,983	0,983	0,983	0,995	0,995	0,981	0,981	0,98	0,98	0,995	0,995	0,995	0,995	0,992
F27-088	0,998	ID	0,983	0,995	0,98	0,98	0,98	0,983	0,983	0,996	0,996	0,996	0,993	0,993	0,984	0,984	0,984	0,996	0,996	0,983	0,983	0,981	0,981	0,996	0,996	0,996	0,996	0,993
F20-213	0,981	0,983	ID	0,981	0,984	0,984	0,984	0,987	0,987	0,983	0,983	0,983	0,98	0,98	0,989	0,989	0,989	0,983	0,983	0,987	0,987	0,989	0,989	0,983	0,983	0,983	0,983	0,986
F20-236	0,993	0,995	0,981	ID	0,978	0,978	0,978	0,981	0,981	0,998	0,998	0,998	0,992	0,992	0,983	0,983	0,983	0,998	0,998	0,981	0,981	0,98	0,98	0,998	0,998	0,998	0,995	0,992
F04-185	0,978	0,98	0,984	0,978	ID	1.000	1.000	0,984	0,984	0,98	0,98	0,98	0,977	0,977	0,986	0,986	0,986	0,98	0,98	0,984	0,984	0,983	0,983	0,98	0,98	0,98	0,98	0,983
F04-387	0,978	0,98	0,984	0,978	1.000	ID	1.000	0,984	0,984	0,98	0,98	0,98	0,977	0,977	0,986	0,986	0,986	0,98	0,98	0,984	0,984	0,983	0,983	0,98	0,98	0,98	0,98	0,983
F04-388	0,978	0,98	0,984	0,978	1.000	1.000	ID	0,984	0,984	0,98	0,98	0,98	0,977	0,977	0,986	0,986	0,986	0,98	0,98	0,984	0,984	0,983	0,983	0,98	0,98	0,98	0,98	0,983
F11-385	0,981	0,983	0,987	0,981	0,984	0,984	0,984	ID	1.000	0,983	0,983	0,983	0,98	0,98	0,989	0,989	0,989	0,983	0,983	0,987	0,987	0,986	0,986	0,983	0,983	0,983	0,983	0,986
F11-386	0,981	0,983	0,987	0,981	0,984	0,984	0,984	1.000	ID	0,983	0,983	0,983	0,98	0,98	0,989	0,989	0,989	0,983	0,983	0,987	0,987	0,986	0,986	0,983	0,983	0,983	0,983	0,986
F12-390	0,995	0,996	0,983	0,998	0,98	0,98	0,98	0,983	0,983	ID	1.000	1.000	0,993	0,993	0,984	0,984	0,984	1.000	1.000	0,983	0,983	0,981	0,981	1.000	1.000	1.000	0,996	0,993
F12-325	0,995	0,996	0,983	0,998	0,98	0,98	0,98	0,983	0,983	1.000	ID	1.000	0,993	0,993	0,984	0,984	0,984	1.000	1.000	0,983	0,983	0,981	0,981	1.000	1.000	1.000	0,996	0,993
F12-389	0,995	0,996	0,983	0,998	0,98	0,98	0,98	0,983	0,983	1.000	1.000	ID	0,993	0,993	0,984	0,984	0,984	1.000	1.000	0,983	0,983	0,981	0,981	1.000	1.000	1.000	0,996	0,993
F17-172	0,992	0,993	0,98	0,992	0,977	0,977	0,977	0,98	0,98	0,993	0,993	0,993	ID	1.000	0,981	0,981	0,981	0,993	0,993	0,98	0,98	0,981	0,981	0,993	0,993	0,993	0,993	0,99
F17-175	0,992	0,993	0,98	0,992	0,977	0,977	0,977	0,98	0,98	0,993	0,993	0,993	1.000	ID	0,981	0,981	0,981	0,993	0,993	0,98	0,98	0,981	0,981	0,993	0,993	0,993	0,993	0,99
F19-067	0,983	0,984	0,989	0,983	0,986	0,986	0,986	0,989	0,989	0,984	0,984	0,984	0,981	0,981	ID	1.000	1.000	0,984	0,984	0,989	0,989	0,987	0,987	0,984	0,984	0,984	0,984	0,987
F19-141	0,983	0,984	0,989	0,983	0,986	0,986	0,986	0,989	0,989	0,984	0,984	0,984	0,981	0,981	1.000	ID	1.000	0,984	0,984	0,989	0,989	0,987	0,987	0,984	0,984	0,984	0,984	0,987
F19-096	0,983	0,984	0,989	0,983	0,986	0,986	0,986	0,989	0,989	0,984	0,984	0,984	0,981	0,981	1.000	1.000	ID	0,984	0,984	0,989	0,989	0,987	0,987	0,984	0,984	0,984	0,984	0,987
F21-293	0,995	0,996	0,983	0,998	0,98	0,98	0,98	0,983	0,983	1.000	1.000	1.000	0,993	0,993	0,984	0,984	0,984	ID	1.000	0,983	0,983	0,981	0,981	1.000	1.000	1.000	0,996	0,993
F21-292	0,995	0,996	0,983	0,998	0,98	0,98	0,98	0,983	0,983	1.000	1.000	1.000	0,993	0,993	0,984	0,984	0,984	1.000	ID	0,983	0,983	0,981	0,981	1.000	1.000	1.000	0,996	0,993
F23-148	0,981	0,983	0,987	0,981	0,984	0,984	0,984	0,987	0,987	0,983	0,983	0,983	0,98	0,98	0,989	0,989	0,989	0,983	0,983	ID	1.000	0,986	0,986	0,983	0,983	0,983	0,983	0,986
F23-187	0,981	0,983	0,987	0,981	0,984	0,984	0,984	0,987	0,987	0,983	0,983	0,983	0,98	0,98	0,989	0,989	0,989	0,983	0,983	1.000	ID	0,986	0,986	0,983	0,983	0,983	0,983	0,986
F34-205	0,98	0,981	0,989	0,98	0,983	0,983	0,983	0,986	0,986	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,987	0,987	0,987	0,981	0,981	0,986	0,986	ID	1.000	0,981	0,981	0,981	0,981	0,984
F34-206	0,98	0,981	0,989	0,98	0,983	0,983	0,983	0,986	0,986	0,981	0,981	0,981	0,981	0,981	0,987	0,987	0,987	0,981	0,981	0,986	0,986	1.000	ID	0,981	0,981	0,981	0,981	0,984
F37-248	0,995	0,996	0,983	0,998	0,98	0,98	0,98	0,983	0,983	1.000	1.000	1.000	0,993	0,993	0,984	0,984	0,984	1.000	1.000	0,983	0,983	0,981	0,981	ID	1.000	1.000	0,996	0,993
F37-107	0,995	0,996	0,983	0,998	0,98	0,98	0,98	0,983	0,983	1.000	1.000	1.000	0,993	0,993	0,984	0,984	0,984	1.000	1.000	0,983	0,983	0,981	0,981	1.000	ID	1.000	0,996	0,993
F37-685	0,995	0,996	0,983	0,998	0,98	0,98	0,98	0,983	0,983	1.000	1.000	1.000	0,993	0,993	0,984	0,984	0,984	1.000	1.000	0,983	0,983	0,981	0,981	1.000	1.000	ID	0,996	0,993
F39-354	0,995	0,996	0,983	0,995	0,98	0,98	0,98	0,983	0,983	0,996	0,996	0,996	0,993	0,993	0,984	0,984	0,984	0,996	0,996	0,983	0,983	0,981	0,981	0,996	0,996	0,996	ID	0,993
F39-353	0,992	0,993	0,986	0,992	0,983	0,983	0,983	0,986	0,986	0,993	0,993	0,993	0,99	0,99	0,987	0,987	0,987	0,993	0,993	0,986	0,986	0,984	0,984	0,993	0,993	0,993	0,993	ID

Anexo

ANEXO I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE

Título: Estudo Molecular da transmissão familiar do HTLV-1 e HTLV-2 em pacientes atendidos no Núcleo de Medicina Tropical, Belém – Pará.

O texto abaixo busca dar esclarecimentos sobre o estudo a ser realizado em casos de transmissão familiar do Vírus Linfotrópico de células T humanas 1 e 2 (HTLV 1 e 2) em pacientes atendidos no Núcleo de Medicina Tropical.

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

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

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

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

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

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

Consentimento:

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

Belém, / / 2010. _____

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável

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

Belém / / 2010

Questionário aplicado as informações específicas.

SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FRDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL

PROJETO DE PESQUISA/EXTENSÃO - HTLV

REGISTRO_____ DATA DA COLETA: _____/_____/_____.
MATERIAIS COLETADOS: _____

INFORMAÇÕES CADASTRAIS

NOME: _____ IDADE:_____ SEXO_____
ESTADO CIVIL: _____ PROFISSÃO/OCUPAÇÃO_____
ENDEREÇO:_____ BAIRRO: _____
CIDADE: _____ ESTADO: _____ TELEFONES: _____
Residência Anterior 1_____ Resid Anterior 2 _____
PARENTESCO: _____ DATA DE NASC.: ____/____/_____

INFORMAÇÕES CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS (Sim e Não)

( ) HISTÓRIA DE **CÂNCER NA FAMÍLIA QUAL TIPO DE CÂNCER, TIPOS:** _____,
( ) **DOENÇAS ASSOCIADAS** QUAIS? _____,
( ) EXAMES DE FEZES RECENTES – Resultado:_____,
( ) TOMOU VERMÍFUGO RECENTE, QUANDO _____,
( ) COSTUMA ANDAR DESCALÇO?
( ) DEIXA EM ÁGUA COM HIPOCLORITO AS VERDURAS E LEGUMES?
( ) TRANSFUSÃO DE SANGUE _____, ( ) CIRURGIA _____,
( ) DROGA INJETÁVEL ( ) USA PRESERVATIVOS,
( ) MÃE VIVA, Nº DE IRMÃOS _____, Nº DE FILHOS _____
( ) FOI AMAMENTADO NO PEITO _____, QUANTO TEMPO _____
RELAÇÃO SEXUAL:
( ) HOMOSSEXUAL ( ) HETEROSSEXUAL ( ) ESTÁVEL- TEMPO_____ ( ) TEVE MAIS DE 1 PARCEIRO SEXUAL NA VIDA – Nº DE PARCEIROS _____
( ) AMAMENTOU OS FILHOS? QTO TEMPO?_____

INFORMAÇÕES SÓCIO-ECONÔMICAS

RENDA FAMILIAR: ( ) < QUE 1 SALÁRIO MÍNIMO ( ) 1 MÍNIMO ( ) DE 2 A 5 MÍNIMOS ( ) DE 5 A 10 MÍNIMOS ( ) > DE 10 MÍNIMOS.
ESCOLARIDADE: ( )NÃO ALFABETIZADO ( )ENSINO FUNDAMENTAL ( )ENSINO MÉDIO( )ENSINO SUPERIOR
TIPO DE MORADIA: ( ) ALVENARIA ( ) MADEIRA ( ) OUTRA _____
NÚMERO DE PESSOAS NA CASA:_____ ADULTOS_____ CRIANÇAS,
NÚMERO DE CÔMODOS DA CASA: _____.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLO DE MEDICINA TROPICAL
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. **Protocolo:** Nº 040/2010-CEP/NMT
2. **Projeto de Pesquisa:** ESTUDO MOLECULAR DA TRANSMISSÃO FAMILIAR DO HTLV-1 E HTLV-2 EM PACIENTES ATENDIDOS NO NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL, BELÉM-PARÁ.
3. **Pesquisador Responsável:** Danilo de Souza Almeida.
4. **Instituição / Unidade**:NMT/UFPA.
5. **Data de Entrada:** 04/08/2010
6. **Data do Parecer:** 25/08/2010

PARECER

O Comitê de Ética em Pesquisa do NMT/UFPA apreciou o protocolo em tela e, verificou que foram atendidas todas as exigências da Resolução 196/96-CNS/MS. Portanto, manifesta-se pela sua aprovação.

Parecer: **APROVADO.**

Belém, 14 de Outubro de 2010.

Profº Teiichi Oikawa
Coordenador do CEP-NMT/UFPA.