



FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PÊSQUISAS GONÇALO MONIZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**MUTAÇÕES NA REGIÃO LTR DO HTLV E SUA
IMPLICAÇÃO NA PRESENÇA DO VÍRUS NA SALIVA
E ORIGEM NA BAHIA.**

Filipe Ferreira de Almeida Rego

**Salvador - Bahia – Brasil
2010**



FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA**

Filipe Ferreira de Almeida Rego

**MUTAÇÕES NA REGIÃO LTR DO HTLV E SUA
IMPLICAÇÃO NA PRESENÇA DO VÍRUS NA SALIVA
E ORIGEM NA BAHIA.**

Dissertação apresentada ao
Curso de Pós-graduação em Biotecnologia
em Saúde e Medicina Investigativa
como requisito parcial para obtenção
do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Júnior Alcântara
Co-orientador: Prof. Dr. Bernardo Galvão Castro Filho

**Salvador - Bahia – Brasil
2010**

"Na vida, não existem soluções.
Existem forças em marcha: é preciso
criá-las e, então, a elas seguem-se
as soluções."
Antoine de Saint-Exupéry

Dedico este a minha mãe,
que me guiou pelos caminhos da
vida e por demonstrar que mesmo
os momentos mais difíceis
podem ser superados com
serenidade e bom humor.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Maria das Graças Ferreira Rego, que mesmo com todas as dificuldades e limitações, não poupou esforços para me educar e oferecer as condições necessárias para que eu concluísse mais uma etapa de minha vida e também por todo o amor e carinho doado a mim durante toda a minha existência.

Ao meu pai, José Fernando de Almeida Rego, pelo exemplo de caráter inigualável, amor e pelo papel fundamental em minha educação.

As minhas avós pelo exemplo de vida e amor que guardarei comigo para todo o sempre.

Ao professor e orientador Dr. Luiz Carlos Junior Alcântara que me transmitiu conhecimentos valiosos, sempre me dando apoio e motivação e por sua disposição em separar um pouco do seu escasso tempo para me transmitir sua experiência, que foi de grande importância para a conclusão deste trabalho.

Ao professor Dr. Bernardo Galvão Castro Filho por seu apoio e inspiração no amadurecimento dos meus conhecimentos e conceitos que me levaram a execução e conclusão desta dissertação, além de seu espírito empreendedor na tarefa de multiplicar os conhecimentos.

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa com os quais tive a oportunidade e o prazer de aprender.

A todos os colegas de trabalho do Centro de HTLV e do LASP pelos agradáveis momentos vividos e pelo conhecimento e experiências a mim transmitidos.

A Victor Uchoa e Edson Santos por fornecer as amostras para a realização deste trabalho e a Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto pelo auxílio com a técnica de clonagem molecular.

A todos os coautores dos trabalhos pela confiança e colaboração.

Aos colegas da pós-graduação pela convivência e amizade durante todo o curso.

A família e amigos que conferem a base da minha existência, rendo-lhes minha homenagem.

A todos que de certa forma contribuíram não somente para este trabalho como para todo o meu conhecimento.

Dissertação desenvolvida na unidade de bioinformática do LASP/CPqGM/Fiocruz-BA com suporte financeiro da FAPESB (Projeto Infraestrutura nº303/03) e do PN-DST/AIDS, Ministério da Saúde (CFA 306/04 e 307/04).

RESUMO

O HTLV-1 é o agente etiológico da ATL, HAM/TSP e outras perturbações inflamatórias. Alguns estudos tentam analisar as variações do HTLV-1 em diferentes fluidos corpóreos e seu impacto sobre a infecção pelo HTLV. A coinfeção HTLV/HIV-1 é associada com graves manifestações clínicas, imunodeficiência marcante e infecções oportunistas, bem como comportamento de risco. Salvador, capital do Estado da Bahia, Brasil, tem a maior prevalência para o HTLV-1 (1,74%) encontrada no país. Poucos estudos descrevem esta coinfeção em Salvador e áreas vizinhas, e muito menos investigam como estes vírus circulam ou avaliam a relação entre eles. Para descrever a epidemiologia molecular do HTLV-1 e as características da coinfeção HTLV/HIV-1 em mulheres, nós realizamos um corte transversal envolvendo 107 mulheres infectadas com HIV-1 do centro de referência da DST/HIV/AIDS, localizado na cidade de Feira de Santana. Amostras das pacientes foram testadas por ELISA e a infecção pelo HTLV confirmada usando o WB e PCR. A análise filogenética foi realizada nas seqüências LTR do HTLV para obter mais informações sobre a epidemiologia molecular e a origem deste vírus na Bahia. Quatro das cinco amostras reativas no ELISA foram confirmadas como HTLV-1 no WB e PCR e uma amostra confirmada como HTLV-2. A soroprevalência da infecção pelo HTLV nestas mulheres foi de 4,7%, menor que o esperado, provavelmente pela baixa prevalência da infecção pelo HTLV esta área ou devido a medidas de controle de DST/AIDS implementadas desde a realização do estudo anterior. A análise filogenética da região LTR das quatro seqüências do HTLV-1 revelou que todos os isolados foram classificados como subgrupo Transcontinental do subtipo Cosmopolita e se agrupam no principal grupo latino-americano, que possui um ancestral comum com isolados da África do Sul, sugerindo uma introdução pós Colombiana deste vírus na Bahia. A seqüência de HTLV-2 foi classificada como subtipo c, a variante brasileira do subtipo 2a. Também foi observado que quatro mulheres coinfectadas HTLV/HIV-1 apresentavam comportamento de risco, sendo duas por exposição parenteral, enquanto que duas eram profissionais do sexo, demonstrando que esta coinfeção é mais freqüente em grupos de risco. Para determinar a carga proviral em PBMC e células do lavado bucal um PCR em tempo real foi realizado e para analisar variações da região *tax*-LTR do HTLV-1 em indivíduos infectados uma *nested*-PCR da região *tax*-LTR do HTLV-1 em PBMC e células do lavado bucal, seguida por clonagem molecular, seqüenciamento de DNA e a análise computacional foram realizadas. A diferença entre as medianas da carga proviral foi significativa, comparando os indivíduos com provírus detectado em células lavado bucal ($n = 8$) e os 18 indivíduos sem provírus detectado em células lavado bucal (101278.5 vs 23290.0 cópias por 10^6 PBMC, $p = 0.0245$). A análise filogenética, comparando clones de lavado bucal e PBMC, não mostrou nenhum perfil clonal entre os indivíduos com carga proviral detectada em células do lavado bucal e também não mostrou significância estatística no teste de Hudson. A diversidade genética, entre os clones de PBMC e lavado bucal variou de 0,003 a 0,008. O perfil de sítios de modificação pós-traducional no fragmento de *tax* analisado foi equivalente entre os grupos analisados. Todas as seqüências analisadas foram classificadas como subgrupo transcontinental do subtipo Cosmopolita.

ABSTRACT

HTLV-1/HIV-1 coinfection is associated with severe clinical manifestations, marked immunodeficiency and opportunistic pathogenic infections, as well as risk behavior. Salvador, the capital of the State of Bahia, Brazil, has the highest HTLV-1 prevalence (1.74%) found in Brazil. Few studies exist which describe this coinfection found in Salvador and its surrounding areas, much less investigate how these viruses circulate or assess the relationship between them. HTLV-1 is the etiological agent of ATL, HAM/TSP and inflammatory disturbs, including salivary disorders. Few studies attempts to analyze the HTLV-1 intrahost variations into different corporeal fluids and their impact on HTLV outcome infection. To investigate the prevalence of HTLV/HIV coinfection in surrounding areas, as well as the molecular epidemiology of HTLV, a cross sectional study was carried out involving 107 women infected with HIV-1 from the DST/HIV/AIDS Reference Center located in the neighboring City of Feira de Santana. Patient samples were submitted to ELISA and HTLV infection was confirmed using Western Blot and Polymerase Chain Reaction (PCR). Phylogenetic analysis using Neighbor-Joining (NJ) and Maximum Likelihood (ML) was performed on HTLV LTR sequences in order to gain further insights about molecular epidemiology and the origins of this virus in Bahia. . Another study was performed to determine the proviral load and HTLV-1 *tax*-LTR intra-host variations from PBMC and mouthwash cells from HTLV-1 infected individuals. To investigate the proviral load a real-time PCR was performed and to analyze the intrahost variations a nested-PCR, followed by molecular cloning, DNA sequencing and computational analysis were performed. Four out of five reactive samples were confirmed to be infected with HTLV-1, and one with HTLV-2. The seroprevalence of HTLV among HIV-1 coinfecting women was found to be 4.7%. Phylogenetic analysis of the LTR region from four HTLV-1 sequences showed that all isolates were clustered into the main Latin American group within the Transcontinental subgroup of the Cosmopolitan subtype. The HTLV-2 sequence was classified as the HTLV-2c subtype. It was also observed that four HTLV/HIV-1 coinfecting women exhibited risk behavior with two having parenteral exposures, while another two were sex workers. Conclusion: This paper describes the characteristics of coinfecting patients. This coinfection is known to be severe and further studies should be conducted to confirm the suggestion that HTLV-1 is spreading from Salvador to surrounding areas. The difference between the proviral load medians was significant, comparing the individuals with provirus detected on mouthwash cells ($n = 8$) and the 18 individuals without provirus detected on mouthwash cells (101278.5 vs 23290.0 copies per 10^6 PBMC, $p=0.0245$). The analysis, comparing mouthwash and PBMC clones, with regard to the HTLV-1 intrahost variation, showed no clonal profile among the individuals with proviral load detected on mouthwash cells, with no statistic significance on Hudson test. The mean diversity within PBMC and mouthwash clones ranged from 0.003 from 0.008. Results of posttranslational modification sites in *tax* fragment were equivalent between the analyzed groups. All analyzed sequences were classified into the Transcontinental subgroup of Cosmopolitan subtype.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura Morfológica do HTLV: desenho esquemático (Adaptado de SALEMI, 1999).....	13
Figura 2	Organização genômica do HTLV-1 (MATSUOKA & JEANG, 2007).....	15
Figura 3	Ciclo de replicação tradicional dos retrovírus (Adaptado de SANTOS & LIMA, 2005).....	16
Figura 4	Representação esquemática dos diferentes resultados no <i>Western Blot</i>	19
Figura 5	Locais endêmicos para o HTLV-1 (Adaptado do Ministério da Saúde, 2003).....	20
Figura 6	Prevalência de HTLV-1/2 entre doadores de sangue em capitais de 26 estados brasileiros e no Distrito Federal (Adaptado de CATALAN-SOARES <i>et al.</i> , 2004).....	21

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3'	Extremidade carboxi-terminal do ácido nucléico
5'	Extremidade amino-terminal do ácido nucléico
AIDS.....	Síndrome da Imunodeficiência adquirida (<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>)
ATF.....	Fator transcricional de ativação (<i>activating transcription factor</i>)
ATL	Leucemia/linfoma de células T do adulto (<i>Adult T cell Leukemia</i>)
CREB.....	Ligante do elemento de resposta ao AMP cíclico (<i>cAMP response element-binding</i>)
CTL	Linfócito T citotóxico (<i>Citotoxic T Lymphocyte</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucléico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DST.....	Doenças sexualmente transmissíveis
EDTA.....	Ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
ELISA.....	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme linked Immuno Sorbent Assay</i>)
GLUT-1.....	Molécula transportadora de glicose
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HTLV-1.....	Vírus Linfotrópico de células T humanas tipo 1 (<i>Human T cell Lymphotropic virus type 1</i>)
HTLV-2	Vírus Linfotrópico de células T humanas tipo 2 (<i>Human T cell Lymphotropic virus type 2</i>)
HTLV-3.....	Vírus Linfotrópico de células T humanas tipo 3 (<i>Human T cell Lymphotropic virus type 3</i>)
HTLV-4	Vírus Linfotrópico de células T humanas tipo 4 (<i>Human T cell Lymphotropic virus type 4</i>)
K55	Peptídeo da gp46 específico do HTLV-2
LRT.....	Razão de Verossimilhança (<i>Likelihood Ratio Test</i>)
LTR.....	Extremidades em repetições longas (<i>Long Terminal Repeat</i>)
ML	Máxima Verossimilhança (<i>Maximum Likelihood</i>)
MTA-1	Peptídeo da gp46 específico do HTLV-1
NJ	Agrupamento de vizinhos (<i>Neighbor Joining</i>)
ORF.....	Fase de Leitura aberta (<i>Open Reading Frame</i>)
pb	Pares de bases
PBMC.....	Células mononucleares do sangue periférico (<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PTLV-1	Vírus linfotrópico de células T em primatas tipo 1 (<i>Primate T cell Lymphotropic virus type 1</i>)
PTLV-2	Vírus linfotrópico de células T em primatas tipo 2 (<i>Primate T cell Lymphotropic virus type 2</i>)
PTLV-3	Vírus linfotrópico de células T em primatas tipo 3 (<i>Primate T cell Lymphotropic virus type 3</i>)
PTLV-4	Vírus linfotrópico de células T em primatas tipo 4 (<i>Primate T cell Lymphotropic virus type 4</i>)
RNA.....	Ácido Ribonucléico (<i>ribonucleic acid</i>)
STLV	Vírus linfotrópico de células T em Símios (<i>Simian T cell Lymphotropic virus</i>)
STLV-1	Vírus linfotrópico de células T em Símios tipo 1

	<i>(Simian T cell Lymphotropic vírus type 1)</i>
STLV-2	Virus linfotrópico de células T em Símios tipo 2 <i>(Simian T cell Lymphotropic vírus type 2)</i>
STLV-3	Virus linfotrópico de células T em Símios tipo 3 <i>(Simian T cell Lymphotropic vírus type 3)</i>
TATA box	Região que antecede o sítio de transcrição
TSP/HAM.....	Paraparesia Espástica Tropical (<i>Tropical Spastic Paraparesis</i>)/ Mielopatia Associada ao HTLV (<i>HTLV Associated Miopathy</i>)
TxRE.....	Elementos responsivos de <i>tax</i> (<i>Tax responsive elements</i>)
WB	Teste sorológico confirmatório para infecção pelo HTLV-1 <i>(Western Blot)</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Descoberta do HTLV	12
1.2 Estrutura do HTLV	12
1.3 Ciclo de replicação do HTLV	15
1.4 Patologias associadas ao HTLV	17
1.5 Diagnóstico da infecção pelo HTLV	18
1.6 Epidemiologia do HTLV	19
1.7 Origem do HTLV	22
1.8 Análise filogenética	23
2. JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo Geral	26
3.2 Objetivos Específicos	26
4. METODOLOGIA	27
4.1 Epidemiologia Molecular do HTLV em mulheres portadoras do HIV-1	27
4.1.1- Desenho experimental	27
4.1.2- Casuística	27
4.1.3- Critérios de seleção	28
4.1.4- Aspectos éticos	28
4.1.5- Metodologia	29
4.2 Análise das variações genéticas do HTLV-1 em diferentes compartimentos do hospedeiro.	31
4.1.1- Desenho experimental	31
4.1.2- Casuística	31
4.1.3- Critérios de seleção	32
4.1.4- Aspectos éticos	32
4.1.5- Metodologia	32
5. RESULTADOS	36
5.1 Seroprevalence and molecular epidemiology of HTLV-1 isolates from HIV-1 coinfecting women in Feira de Santana, Bahia, Brazil	36
5.1.1- Artigo <i>in press</i>	37
5.2 Analysis of the HTLV-1 intra-host variations in peripheral blood and mouthwash cells of infected individuals.	55
5.2.1- Manuscrito em preparação	56
6. DISCUSSÃO	79
7. CONCLUSÃO	82
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

1. INTRODUÇÃO

1.1 Descoberta do HTLV

O HTLV-1 foi o primeiro retrovírus humano descrito, isolado pela primeira vez em células T de um paciente com linfoma cutâneo (POIESZ *et al.*, 1980). Devido as suas características moleculares o HTLV foi incluído na família *retroviridae*, pertencente à subfamília *oncovirinae* e ao gênero *Deltaretrovirus*. O HTLV-2 foi identificado pela primeira vez em 1982, numa linhagem de células T imortalizadas de um paciente com tricoleucemia (KALYANARAMAN *et al.*, 1982). Os HTLV-3 e 4 foram descritos pela primeira vez em indivíduos de Camarões, na África Central, que foram expostos a contato com primatas não humanos (WOLFE *et al.*, 2005).

1.2 Estrutura do HTLV

O HTLV-1 e o HTLV-2 possuem o DNA proviral de 9032 e 8952 pares de bases (pb), respectivamente (SEIKI *et al.*, 1983 e TSUJIMOTO *et al.*, 1988). A principal diferença entre o HTLV-1 e o HTLV-2 encontra-se no gene *pX*, que codifica as proteínas regulatórias e acessórias, com uma similaridade de aproximadamente 60%, tendo ambos tropismo por células T, porém o HTLV-1 preferencialmente por células TCD4⁺, e o HTLV-2 por células TCD8⁺.

A morfologia do vírus é de esfera pleomórfica medindo de 80 a 100nm de diâmetro constituído, basicamente, por um envelope, uma matriz protéica e um nucleocapsídeo. O vírus tem duas fitas no seu capsídeo sendo estas de RNA fita simples positiva (figura 1), possuindo os genes *gag*, *pol*, *env* e *pX*, sendo este último regulador, enquanto que *gag* e *env* estruturais, além da região LTR que não

codifica proteína (figura 2). O envelope constitui o complexo protéico da superfície da partícula viral, contendo a gp46 (proteína de superfície) e a gp21 (proteína transmembrana), além de uma bicamada lipídica (figura 1). A matriz protéica viral é composta pela p19 e o capsídeo, constituindo o cerne da partícula viral, composta pela proteína p24, ambas codificadas pelo gene *gag*.

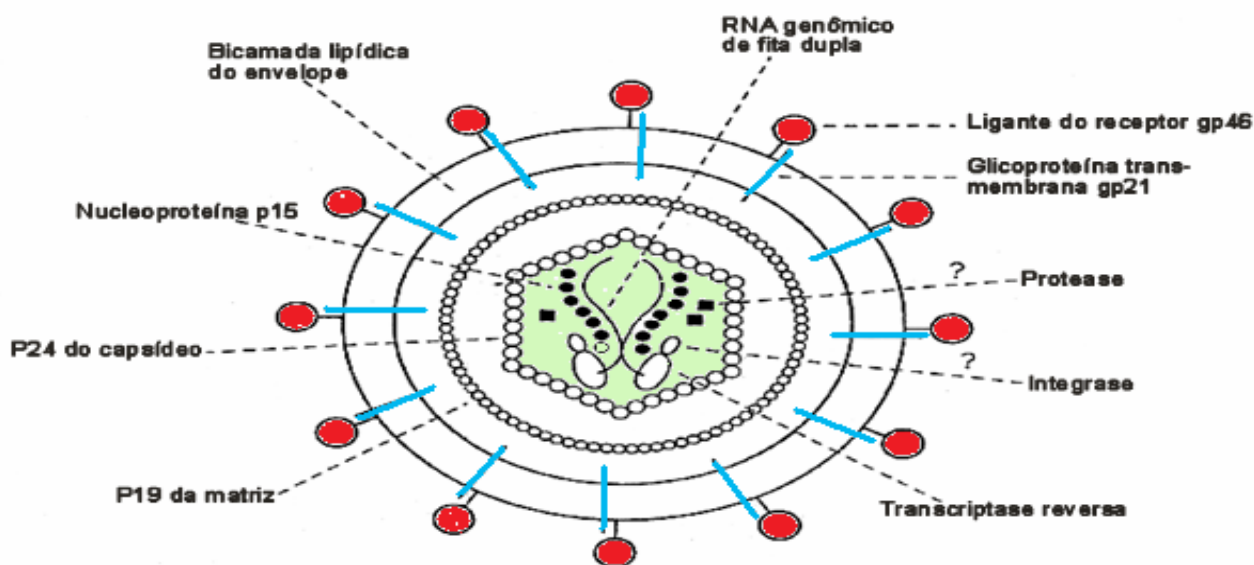


Figura 1. Estrutura Morfológica do HTLV: desenho esquemático (Adaptado de SALEMI, 1999).

As proteínas estruturais do HTLV são codificadas pelos genes *gag* (grupo antigênico) e *env* (envelope). O gene *gag* é inicialmente traduzido em uma proteína precursora (p53) que é clivada em: proteína da matriz (Ma) ou p19, proteína do capsídeo (Ca) ou p24 e proteína do nucleocapsídeo. As proteínas responsáveis pela maturação viral são codificadas pelo gene *env*, a protease é codificada por uma ORF, situada entre a extremidade 3' da região *gag* e a extremidade 5' da região *pol*. A integrase e a transcriptase reversa são codificadas no gene *pol*. O gene *env* produz uma proteína de 68Kd que posteriormente é clivada para dar origem as proteínas do envelope viral, gp21 e gp46.

As regiões flanqueadoras do HTLV-1 são divididas em três regiões: U3, R e U5, que contêm sinais importantes para o controle da expressão dos genes virais, como a região TxRE (elementos responsivos de tax) na LTR5', responsável pela transcrição do genoma proviral através da interação com fatores de transcrição do tipo CREB/ATF, as três repetições de 21 pares de bases, necessárias para a transativação viral, o TATA Box, onde se inicia a transcrição e o sinal de poliadenilação.

Além disto, o HTLV possui uma região particular com cerca de 2 Kb, situada imediatamente antes da região LTR3', denominada inicialmente *pX*, em razão da sua natureza anteriormente desconhecida. Essa região contém pelo menos quatro ORF que codificam diferentes proteínas regulatórias e acessórias, além de codificar uma importante proteína na fita negativa chamada HBZ.

Tax, Rex e HBZ são as principais proteínas regulatórias do HTLV codificadas pelo gene *pX* regulando a replicação viral e a patogênese da infecção. A proteína Tax contém diversas regiões funcionais e domínios de interação, e já foi descrita por interagir com diversas proteínas: fatores transcricionais, proteínas do citoesqueleto e sinalização celular, proteínas do ciclo celular, proteínas PDZ e proteínas de transporte (revisão em BOXUS *et al.*, 2008). Sendo esta então uma das principais proteínas envolvida na patogênese do HTLV-1. A proteína Rex regula a expressão das outras proteínas virais, modulando a transcrição nas fases do ciclo de replicação viral. A proteína HBZ, codificada pela fita complementar do HTLV-1 (3'→5') possui um domínio *leucine zipper*, interagindo diretamente com proteínas que formam fatores transcricionais, aumentando sua degradação e conseqüentemente suprimindo a transcrição viral mediada pela proteína Tax (MATSUOKA, 2005).

Além de Tax, Rex e HBZ a região 3' do gene produz diversas outras proteínas, as proteínas p8 e p12, codificadas pelo orf-I do gene *pX*, (KORALNIK *et al.*, 1992, KORALNIK *et al.*, 1993, CIMINALE *et al.*, 1992, FUKUMOTO *et al.*, 2009) e as proteínas p13 e p30, codificadas pelo orf-II do gene *pX* (KORALNIK *et al.*, 1992, CIMINALE *et al.*, 1992). Estudos do papel funcional destas

proteínas acessórias demonstraram que elas são essenciais para a infectividade e persistência da infecção *in vivo*, além de contribuírem para a manutenção da carga proviral (COLLINS *et al.*, 1998; ALBRECHT & LAIRMORE 2002, MATSUOKA & JEANG, 2007).

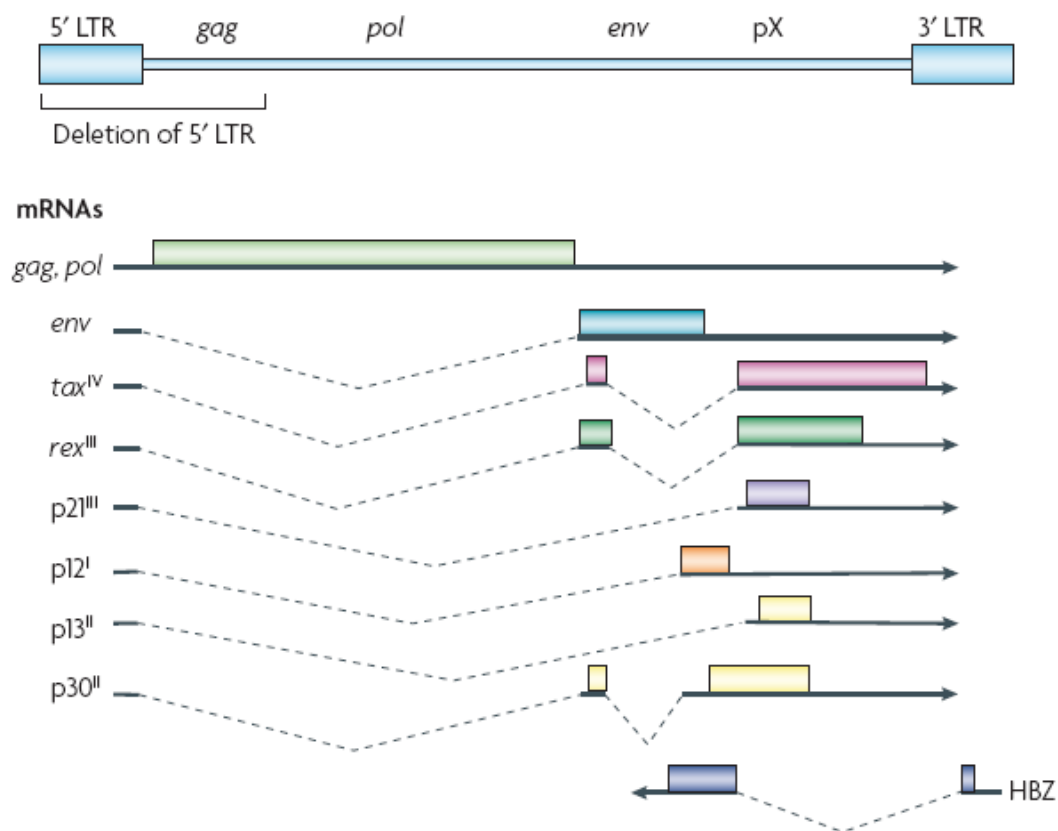


Figura 2. Organização genômica do HTLV-1 (MATSUOKA & JEANG, 2007). Indicação dos genes e principais moléculas de mRNA produzidas durante a transcrição.

1.3 Ciclo de replicação do HTLV

No ciclo de replicação típico dos retrovírus, primeiro o vírus se liga pelo domínio de ligação do amino terminal da proteína de superfície, ao receptor da membrana da célula, o GLUT1 (MANEL *et*

al., 2004). Após isto, ocorre a transcrição do genoma viral de RNA para DNA pela enzima transcriptase reversa ainda dentro do cerne, o DNA viral entra no núcleo e a proteína integrase insere o DNA linear no cromossomo do hospedeiro, formando o provírus. Então, a partir deste ponto, são gerados RNAs a partir do provírus por enzimas do hospedeiro e o novo vírus é formado pela junção destas proteínas, saindo da célula por brotamento, de forma que, os precursores não são clivados até o brotamento, dando origem a novos vírus, conforme a figura 3. No caso do HTLV, sua proliferação no organismo decorre principalmente, pela expansão clonal das células do hospedeiro, em forma de provírus. Além deste, o vírus também se dissemina formando a sinapse virológica, fenômeno no qual as células são polarizadas para facilitar a passagem viral quando entram em contato com uma célula não infectada, permitindo o acúmulo de proteínas de *gag* e de RNA e assim a infecção de uma nova célula (MATSUOKA & JEANG, 2007).

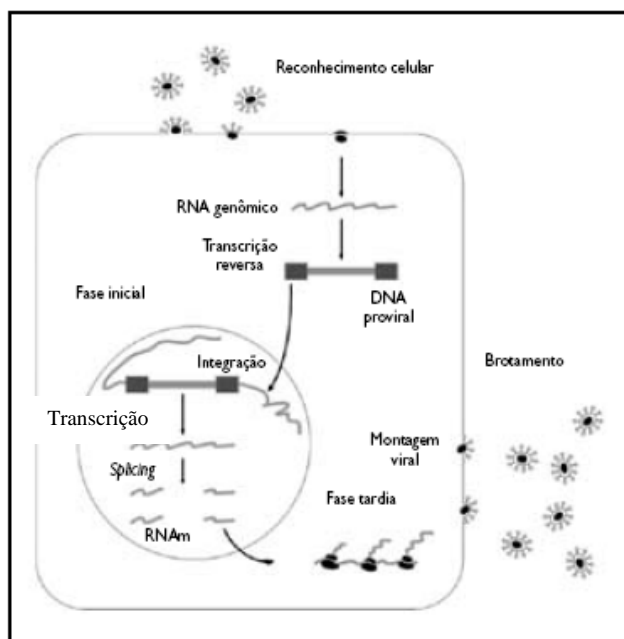


Figura 3. Ciclo de replicação tradicional dos retrovírus. Adaptado de SANTOS & LIMA, 2005

1.4 Patologias associadas ao HTLV

O HTLV-1 é o agente etiológico da paraparesia espática tropical/mielopatia associada ao HTLV (TSP/HAM), sendo esta uma doença neurológica crônico-degenerativa que atinge o sistema nervoso central, causando principalmente, um aumento da espasticidade dos membros inferiores (GESSAIN *et al.*, 1985, OSAME *et al.*, 1986). Diversas hipóteses buscam explicar a patogênese da TSP/HAM (IJICHI *et al.*, 1993; TAYLOR, 1998; JACOBSON, 2002; OSAME, 2002). Uma destas seria por CTL específicos circulantes que atravessariam a barreira hemato-encefálica, destruindo células da glia infectadas pelo HTLV-1. Outra hipótese é que exista um antígeno da célula da glia que seja similar ao do HTLV-1, mimetizando esta célula com uma célula infectada e a destruindo ou ainda pela migração dos linfócitos infectados pelo HTLV-1 (T CD4+), juntamente com CTL específicos anti-HTLV-1 através da barreira hemato-encefálica.

O HTLV-1 também é o agente etiológico da Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto (ATL), que é uma neoplasia de linfócitos T maduros, que ocorre devido a expansão monoclonal dos linfócitos T infectados (YOSHIDA *et al.*, 1982). A ATL é caracterizada pela infiltração de células malignas em alguns tecidos e pela presença de células anormais com núcleo em forma de flor (MATSUOKA, 2005). A ATL é causada principalmente pela inibição de proteínas relacionadas ao reparo do dano ao DNA, além da aceleração de fases do ciclo celular por proteínas virais.

O HTLV-1 também já foi associado a algumas doenças inflamatórias, como dermatite (LA GRENADE, 1996), uveíte (MOCHIZUKI *et al.*, 1996), além de poder estar associado a doenças reumáticas como síndrome de Sjögren e artrite reumatóide (MC COLLUM *et al.*, 1997, NISHIOKA., 1996), manifestações psiquiátricas e aumento da susceptibilidade a infecção por helmintos, com aumento da patogênese destas parasitoses. Apesar de ser associado a diversas patologias, poucos

indivíduos infectados irão apresentar alguma sintomatologia associada ao vírus. Aproximadamente, apenas 2 a 5% dos indivíduos infectados desenvolvem alguma doença que tem como agente etiológico determinado o HTLV-1. Um estudo de associação sugeriram que tanto fatores genéticos virais e do hospedeiro influenciam no desfecho da infecção, no qual o sistema imune possui um papel crítico (BANGHAM *et al.*, 2009).

O HTLV-2 ainda não foi determinado como agente etiológico de nenhuma patologia, porém já foram descritos casos de indivíduos infectados pelo HTLV-2 que apresentam uma síndrome neurológica similar a que acontece nos pacientes com HTLV-1 (TSP/HAM), porém mais estudos de associação de doenças são necessários para esclarecimento deste tópico.

1.5 Diagnóstico da infecção pelo HTLV.

O diagnóstico da infecção pelo HTLV é feito geralmente por meio de exames sorológicos para detecção de anticorpos contra proteínas virais. A técnica de ELISA é a mais comumente utilizada na triagem, e a técnica de WB é a mais utilizada para a confirmação do resultado. O WB permite distinguir a infecção pelo HTLV-1 da infecção pelo HTLV-2, pois este possui uma fita de nitrocelulose com proteínas recombinantes antigênicas para anticorpos específicos tanto para o HTLV-1 (MTA-1) quanto para o HTLV-2 (K-55), além de proteínas recombinantes e lisado viral comum a ambos (Figura 4), sendo as proteínas estruturais codificadas pelos genes *gag* e *env* com a maior importância no reconhecimento laboratorial da infecção. Porém, em casos onde esta distinção não é obtida, a reação em cadeia da polimerase (PCR) é utilizada, particularmente nos casos de sorologia indeterminada, o que ocorre constantemente na sorologia, além dos casos considerados positivos e não tipados ou nos casos que ocorrem reação cruzada dos anticorpos de um tipo de HTLV com os antígenos do outro tipo.

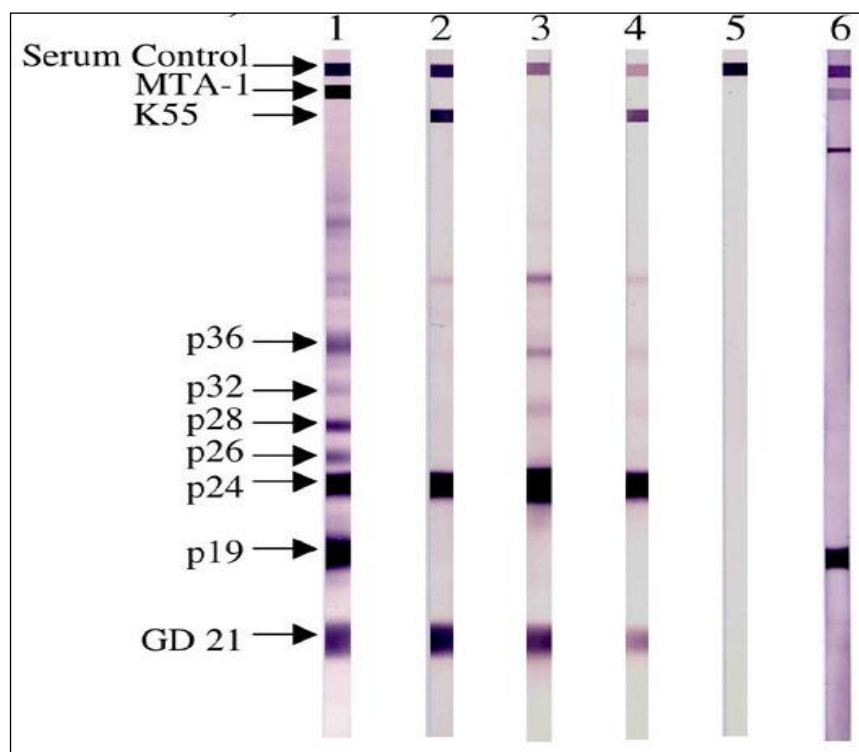


Figura 4- Representação esquemática dos diferentes resultados no *Western Blot*. Fita 1: amostra HTLV-1 positiva. Fitas 2 e 4: amostras HTLV-2 positiva. Fita 3: amostra não tipada. Fita 5: amostra negativa. Fita 6: amostra indeterminada

1.6 Epidemiologia do HTLV

O HTLV pode ser transmitido por via sexual, parenteral e vertical. Esta última, principalmente através da amamentação (MANNNS *et al.*, 1999). O HTLV-1 é endêmico em diversas regiões. As principais áreas endêmicas no mundo para infecção pelo HTLV-1 são Japão, Caribe, América Central e do Sul, África Equatorial, Oriente Médio e Melanésia (figura 5). Estima-se que este vírus infecte aproximadamente 15 a 20 milhões de pessoas em todo o mundo.

A infecção pelo HTLV-2 é endêmica em populações nativas da América do Sul e América do Norte, mas aparece freqüentemente associada a comportamentos de alto risco da Europa e dos Estados Unidos (KHABBAZ *et al.*, 1992; TEDDER *et al.*, 1984; ZELLA *et al.*, 1990; VIGNOLI *et al.*, 1993).

O Brasil é uma área endêmica para este retrovírus, porém com índice baixo de prevalência, variando nas capitais de 0,4% a 1,8% (figura 6), segundo CATALAN-SOARES *et al.*, 2004. A maioria destes dados não demonstra a prevalência real da infecção, podendo estar subestimados, pois muitos foram feitos a partir de amostras provenientes de bancos de sangue, que conhecidamente trata-se de uma população mais jovem e com menos fatores de risco. O único estudo que demonstra dados com base populacional é o estudo de soroprevalência em Salvador (1,8%). Salvador, na Bahia, é a capital com maior prevalência já descrita para este vírus no Brasil, estimando-se que existam cerca de 40 a 50 mil indivíduos infectados na cidade (DOURADO *et al.*, 2003).

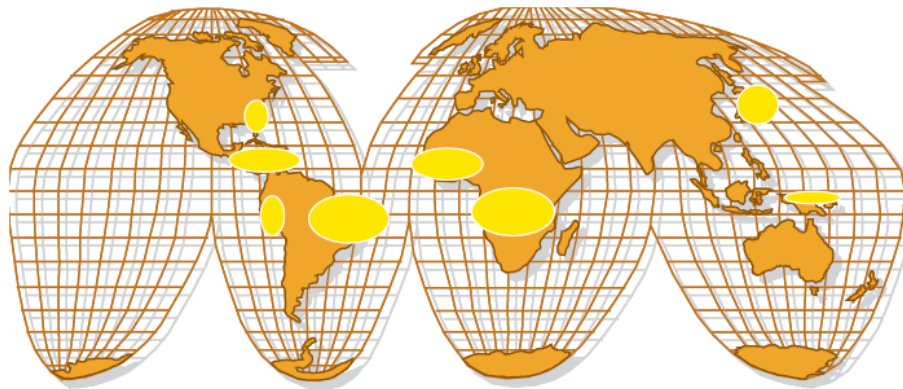


Figura 5. Locais endêmicos para o HTLV-1. Os círculos amarelos demonstram as áreas endêmicas para o HTLV-1. Adaptado do Ministério da Saúde, 2003.



Figura 6. Prevalência de HTLV-1/2 entre doadores de sangue em capitais de 26 estados brasileiros e no Distrito Federal. Adaptado de CATALAN-SOARES *et al.*, 2004.

Já que o HTLV-1 é transmitido pelo contato célula-célula, a fonte da infecção precisa ter um número significativo de células infectadas. A saliva contém diversos tipos de células, incluindo linfócitos, porém a transmissão oral horizontal do HTLV ainda não foi documentada. Controversamente foi demonstrado a presença de DNA proviral na saliva de indivíduos infectados pelo HTLV-1, e assim sugerido que o vírus poderia ser transmitido de pessoa para pessoa através do beijo ou partilha de talheres pela saliva (MIYOSHI *et al.*, 1992). Porém foi demonstrada a presença freqüente de anticorpos anti-HTLV-1 em saliva de portadores saudáveis e pacientes com TSP/HAM, onde estes títulos mostraram correlação significativa com os títulos de anticorpos séricos (TERADA *et*

al., 1994), e que estas moléculas de imunoglobulina G são capazes de inibir a formação de sincício, sugerindo que este fluido corpóreo poderia bloquear a transmissão célula-célula do HTLV impedindo o contágio (YAMAMOTO *et al.*, 1995).

1.7 Origem do HTLV

O gênero *Deltaretrovirus*, da família *Retroviridae* é dividido em 4 subtipos de PTLV (vírus linfotrópico de células T em primatas): PTLV-1, que engloba o HTLV-1 e o STLV-1 (vírus linfotrópico de células T em símios), PTLV-2, que tem como membros o HTLV-2 e o STLV-2, PTLV-3 com seus respectivos HTLV-3 e STLV-3 e o PTLV-4, com apenas o HTLV-4, não sendo ainda encontrado o seu correspondente símio. Estudos recentes vêm demonstrando que o HTLV originou-se a partir de contato de humanos com animais infectados por STLV. Os indivíduos que possuem mais contato com os símios infectados por STLV são os africanos, principalmente os originados de grupos mais isolados. A partir destes dados, da análise filogenética viral, de análises do DNA mitocondrial e de estudos de haplotipagem do gene da globina Beta nos indivíduos infectados, é proposto que o HTLV-1 foi originado na África decorrente de freqüentes transmissões interespecíes, e que a entrada deste no Brasil foi devido à introdução de linhagens virais múltiplas entre os séculos XVI e XIX, pelo tráfico de escravos de diferentes localidades africanas. A trajetória dos negros africanos para o Brasil foi heterogênea, uma vez que o tráfico de escravos se desenvolveu ao longo de 300 anos (entre os séculos XVI e XIX), carreando escravos de quase toda a costa ocidental da África. Acredita-se que nesse período entraram pelos portos da Bahia e Rio de Janeiro, pelo menos 3,6 milhões de negros africanos (VERGER, 1987; VIANA FILHO, 1988; MIURA *et al.*, 1994; VAN DOOREN *et al.*, 1998). Porém, também é discutido que o vírus possa ter entrado no continente americano entre 12.000 e

30.000 anos atrás, por migrações de populações asiáticas pelo Estreito de Bering (LAIRMORE *et al.*, 1993; NEEL *et al.*, 1994; BIGGAR *et al.*, 1996).

A combinação específica de sítios polimórficos que ocorrem num mesmo cromossomo é denominada de haplótipo. A análise dos haplótipos ligados ao gene da globina beta humana tem ajudado nos estudos para traçar origem, evolução e migração da raça humana. Os diferentes haplótipos também têm sido utilizados para analisar a distância genética entre grupos étnicos. Na população baiana, particularmente em Salvador, foi mostrado que existe um predomínio de haplótipos africanos por estudos do gene da globina beta (ALCANTARA *et al.*, 2003).

1.8 Análise filogenética

A análise filogenética de um conjunto de seqüências (DNA, RNA, proteínas) é a determinação de como cada seqüência pode ter sido derivada ao longo do processo de evolução natural. As análises filogenéticas têm como objetivo determinar a árvore da vida, ou seja, a evolução das diferentes espécies auxiliando os métodos tradicionais baseados na morfologia e ajudando na determinação da função de seqüências de DNA/proteínas, na análise de espécies com mutações rápidas, como no caso dos vírus, podendo também ajudar na epidemiologia.

Os estudos filogenéticos da região LTR (*Long Terminal Repeat*) permitiram classificar o HTLV-1 em sete subtipos: a ou Cosmopolita; b ou Central Africano; c ou da Melanésia; d, isolado de pigmeus em Camarões e no Gabão; e, isolado de pigmeus na República Democrática do Congo; f, de um indivíduo do Gabão e g, recentemente descrito como um subtipo novo em Camarões, na África Central. O subtipo Cosmopolita (a) é dividido em 5 subgrupos, a depender de sua localização: A – Transcontinental, B – Japonês, C – Oeste Africano, D – Norte Africano e E – Negro do Peru

(GESSAIN *et al.*, 1991; CHEN *et al.*, 1995; HAHN *et al.*, 1984; MIURA *et al.*, 1994, 1997; GASMI *et al.*, 1994; VAN DOOREN *et al.*, 1998; WOLFE e cols., 2005).

Filogeneticamente o HTLV-2 pode ser classificado em quatro subtipos: a, variante predominante nos Estados Unidos e norte europeu; b, exclusivamente encontrado no sul europeu; c, a variante brasileira do subtipo a; e o subtipo d, encontrado em pigmeus da República Democrática do Congo (VANDAMME *et al.*, 1998).

2. JUSTIFICATIVA

O HTLV é transmitido da mesma forma que o retrovírus pandêmico HIV, e compreender as conseqüências da coinfeção HTLV/HIV, torna-se importante para avaliar políticas de saúde pública e tratamento, uma vez que estes retrovírus estão simultaneamente presente em muitas regiões. Particularmente na Bahia, a soroprevalência para o HTLV atinge 20% entre os indivíduos infectados pelo HIV (BRITES *et al*, 1997). Não existe estudo sobre prevalência para o HTLV em Feira de Santana, Bahia, e sendo este uma região próxima geograficamente, um cruzamento entre importantes rodovias brasileiras, além de possuir características sócio-demográficas similares a Salvador, torna-se necessária a identificação das cepas circulantes para melhor controle epidemiológico. É importante caracterizar genotipicamente os isolados de HTLV-1 de diferentes regiões geográficas do Brasil para obter informações mais detalhadas sobre as possíveis rotas migratórias do vírus para o país e dentro do território nacional e para um controle epidemiológico, ou seja, para saber se novas variantes estão circulando em nosso meio.

Estas variantes são formadas no organismo humano durante o longo período de latência viral e poucos estudos se dedicam a estudar variações virais dentro do hospedeiro que possam estar levando a um aumento da carga proviral e sua presença em diferentes fluidos corpóreos. Foi demonstrado a presença de DNA proviral na saliva de indivíduos infectados pelo HTLV-1, porém a sua variabilidade genética neste compartimento ainda não foi estudada, e entender o provável motivo desta localização viral torna-se importante para o melhor entendimento da relação entre variabilidade viral e fisiopatogenia, tendo em vista que estudos recentes sugerem o HTLV-1 como fator de risco para a ocorrência de doença periodontal (GIOZZA *et al*. 2008, GARLET *et al*. 2010)

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Estudar a epidemiologia molecular e fatores associados a infecção pelo HTLV em mulheres portadoras do HIV-1.

Analisar variações do HTLV-1 em lavado bucal e em células mononucleares do sangue periférico (PBMC).

3.2 Objetivos Específicos

- Estudar a soroprevalência para a infecção pelo HTLV em mulheres infectadas pelo HIV-1;
- Analisar as características moleculares do HTLV em mulheres portadoras de HIV-1;
- Identificar possíveis assinaturas protéicas (ex. sítios de modificação pós-traducional) nos diferentes clones analisados de lavado e PBMC de indivíduos portadores de HTLV que possam estar envolvidos com a presença do provírus no lavado bucal e no PBMC, e correlacionar com a carga proviral;
- Avaliar mutações na região promotora viral (LTR) do HTLV-1, em células do lavado bucal e PBMC, de indivíduos provenientes do CHTLV, que possam estar relacionados ao aumento da carga proviral no lavado bucal.

4. Métodos

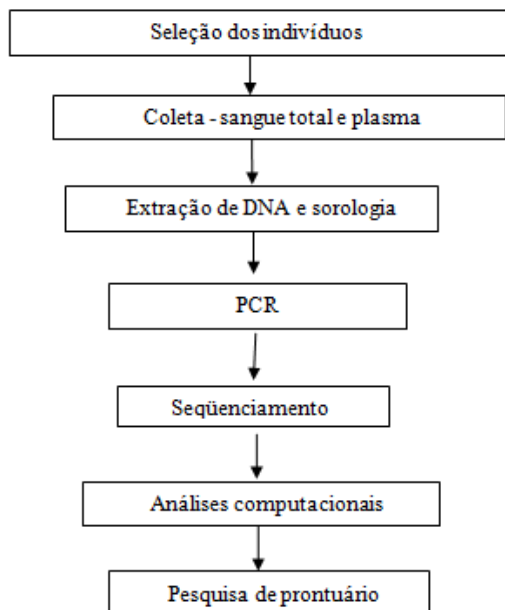
4.1 Epidemiologia Molecular do HTLV em mulheres portadoras do HIV-1

4.1.1 Desenho experimental

-**Tipo de Estudo:** Corte transversal

-**Tipo de amostra:** Conveniência

Desenho esquemático do estudo



4.1.2 Casuística

Este trabalho é composto da avaliação da soroprevalência da infecção pelo HTLV e caracterização genotípica do HTLV em uma amostra de conveniência composta por 107 mulheres portadoras de HIV-1 provenientes do Centro de Referência para DST/HIV/AIDS de Feira de Santana,

atendidas sequencialmente, a fim de obter mais informações sobre a epidemiologia molecular do HTLV em Feira de Santana, no período de 30 de março a 30 de outubro de 2008. As amostras de plasma e DNA foram obtidas do projeto de mestrado de Edson Souza Santos.

A população estudada foi recrutada de uma clientela de pacientes que é rotineiramente acompanhada no referido local do estudo, mediante convite e esclarecimento. Do total de 180 mulheres 107 aceitaram participar do estudo.

4.1.3 Critérios de seleção

Critérios de inclusão:

- Mulheres com sorologia positiva para a infecção pelo HIV-1, provenientes da região de Feira de Santana-BA.

Critérios de exclusão:

Não houve critério de exclusão para os grupos selecionados

4.1.4 Aspectos éticos

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública com protocolo de número 86/2007. Todos os indivíduos participantes da pesquisa assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

4.1.5 Metodologia

Diagnóstico

Todas as amostras provenientes de Feira de Santana foram encaminhadas ao Centro Integrativo e Multidisciplinar para serem submetidas ao ELISA (ORTHO® HTLV-1/ HTLV-II Ab-Capture ELISA Test Systems - Ortho-Clinical Diagnostic, Raritan, EUA) em duplicata para triagem e a confirmação da infecção, assim como a discriminação dos diferentes tipos de HTLV, foi realizada por WB (HTLV BLOT 2.4 - Genelabs Diagnostics®, Singapore) e por *nested*-PCR específicas para as regiões *pol* e LTR.

Análise molecular

Das amostras positivas ou indeterminadas na sorologia, foi extraído o DNA a partir de sangue total utilizando QIAGEN QIAamp® DNA Blood Kit. Foi realizado uma *nested*-PCR com o DNA obtido utilizando iniciadores específicos para a região LTR. Dois fragmentos complementares foram amplificados: o amplicon correspondente a região LTR-*gag* com 473 pb e o amplicon correspondente a região tax-LTR com 479 pb do HTLV-1, como descrito previamente por ALCANTARA *et al.*, 2006 e um fragmento para a região LTR do HTLV-2 (EIRAKU *et al.*, 1996). Os produtos da PCR foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta. Os produtos da segunda etapa da *nested*-PCR foram purificados utilizando QIAGEN QIAquick® PCR Purification Kit e seus produtos seqüenciados por Taq FS Dye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems). A seqüência consenso bem como a avaliação da qualidade do seqüenciamento foram realizadas utilizando o programa SeqScape (Applied Biosystems SeqScape Software v 2.5).

Para a reconstrução filogenética, as seqüências das referências, incluindo isolados de diferentes grupos étnicos e diferentes regiões geográficas, foram coletadas do GenBank/EMBL e adicionadas ao “*data set*” que possuía as seqüências geradas. O alinhamento múltiplo dessas seqüências foi realizado com o programa Dambe (XIA, 2000) e editado manualmente utilizando o programa Genedoc (NICHOLAS *et al.*, 1997). As árvores filogenéticas foram construídas utilizando o método de NJ e de ML, contidos no programa PAUP* versão 4.0b10. A árvore de NJ foi construída com uma matriz de razão de substituição nucleotídica escolhida pelo programa Modeltest 3.7 (POSADA & KRANDALL, 1998). Os modelos evolutivos selecionados foram o Tamura-Nei com distribuição gamma para o HTLV-1, que leva em consideração a freqüência de bases desigual, a freqüência variável de transições, a freqüência igual de transversões e a taxa de substituição nucleotídica entre os sítios desigual e o HKY com distribuição gamma para o HTLV-2, que leva em consideração a freqüência de bases desigual, a freqüência variável de transições e transversões e a taxa de substituição nucleotídica entre os sítios desigual. A confiabilidade da árvore foi feita por análise de *bootstrap* com 1000 pseudoreplicas. Para a árvore de ML, foi realizada uma busca heurística com o algoritmo *subtree-pruning-regrafting branch swapping* utilizando a árvore de NJ para iniciar a busca, incluindo seus parâmetros de otimização. O teste de razão de verossimilhança foi utilizado para calcular o suporte estatístico (expressado nos valores de p para os ramos). As árvores foram visualizadas no programa FigTree version 1.3.1 (disponível no site <http://tree.bio.ed.ac.uk/software>).

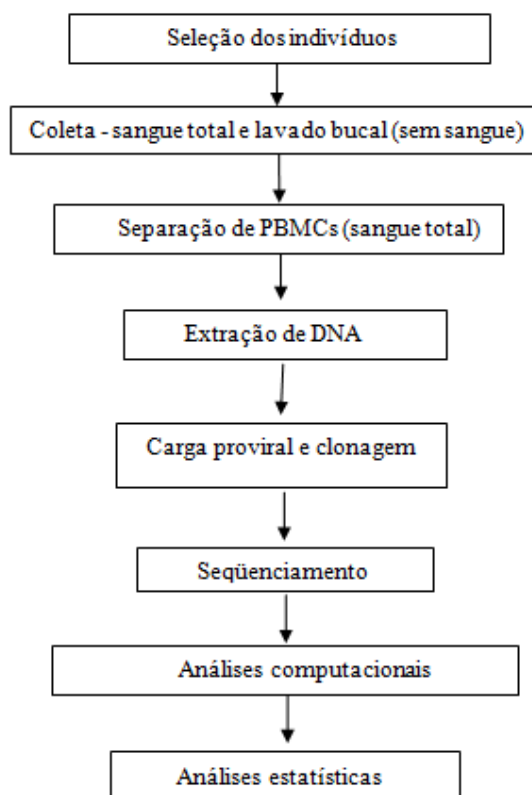
4.2 Análise das variações genéticas do HTLV-1 em diferentes compartimentos do hospedeiro.

4.2.1 Desenho experimental

-**Tipo de Estudo:** Corte transversal

-**Tipo de amostra:** Conveniência

Desenho esquemático da metodologia



4.2.2 Casuística

Esta etapa do trabalho é composta por uma amostra de conveniência com indivíduos infectados pelo HTLV, que foram submetidos a tratamento odontológico durante o projeto de mestrado de Victor

Carvalho Uchoa, no Centro Integrativo e Multidisciplinar de HTLV e Hepatites Virais da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

4.2.3 Critérios de seleção

Critérios de inclusão:

- Portadores de HTLV-1 submetidos a tratamento odontológico no CHTLV.

Critérios de exclusão:

Não houve critério de exclusão para os grupos selecionados

4.2.4 Aspectos éticos

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública com protocolo de número 28/2006. Todos os indivíduos participantes da pesquisa assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

4.2.5 Metodologia

Preparação das amostras

A partir do sangue total em tubos com EDTA, as PBMC foram separadas por gradiente de densidade por centrifugação utilizando Ficoll-Histopaque, no dia da coleta. As PBMC foram contadas, aliquotadas em um milhão de células e estocadas a -20°C . Para a coleta do lavado bucal os pacientes foram instruídos a evitar qualquer tipo de alimentação pelo menos 2 horas antes da coleta, com o objetivo de não alterar o pH salivar e os procedimentos subsequentes.

Análise molecular

Das amostras coletas, foi extraído o DNA a partir de PBMC ou lavado bucal utilizando QIAGEN QIAamp® DNA Blood Kit. Foi realizado uma *nested*-PCR com o DNA obtido utilizando iniciadores específicos para a região LTR. O fragmento *tax*-LTR com 479 pb do HTLV-1 foi amplificado como descrito previamente por ALCANTARA et al, 2006. Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1% corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta. Os produtos do segundo *round* da *nested*-PCR foram purificados utilizando QIAGEN QIAquick® PCR Purification. Os fragmentos purificados da região *tax*-LTR com 479 pb das amostras de lavado bucal e de PBMC foram submetidas à clonagem por Topo® TA Cloning. Pelo menos 5 colônias de cada amostra foram selecionadas para crescimento em meio líquido seguido da extração do DNA plasmidial utilizando Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). A partir do DNA extraído foi realizada uma digestão enzimática com a enzima *EcoRI* para verificar a presença do inserto. O DNA foi seqüenciado dos plasmídeos utilizando Taq FS Dye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems) no seqüenciador automatizado 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA), com os mesmos primers internos.

Carga proviral

A carga proviral do HTLV-1 em PBMC e lavado bucal foi determinada pelo método de PCR quantitativo em tempo real utilizando o ABI Prism 7700 (PE-Applied Biosystems). Para quantificação do DNA proviral é utilizada uma curva padrão com o plasmídeo que contém um inserto de albumina e um inserto do gene *pol* do HTLV-1. Um amplicon do gene da albumina humana foi utilizado como controle interno. A quantidade de provirus foi calculada pelo número de cópias do HTLV-1 (*pol*) por 10^6 células = $[(\text{número de cópias de pol})/(\text{número de cópias de albumina}/2)] \times 10^6$ segundo DEHÉE et al,

1992. Os primers *forward* e *reverse* utilizados para a quantificação do DNA proviral foram SK110 (5'-CCCTACAATCCAACCAGCTCAG-3'), do nucleotídeo 4758 ao 4779 (GenBank número de acesso J02029), e SK111 (5'-GTGGTGAAGCTGCCATCGGGTTTT-3'), do nucleotídeo 4943 ao 4920. A sonda (TaqMan) interna utilizada foi 5'-CTT TACTGACAAACCCGACCTACCCATGGA-3'. A sonda esta localizada entre as posições 4829 e 4858 do genoma do HTLV-I, e carregam o 5' *reporter dye* FAM (6-carboxy fluorescein) e o 3' *quencher dye* TAMRA (6-carboxy tetramethyl rhodamine).

Para quantificação do gene da albumina humana os primers Alb-S (5'-GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT-3') e Alb-AS (5'-AAACTCATGGGAGCTGCT GGTT-3') e a sonda Alb TaqMan (5'-VIC-CCTGTCATGCCACACAAATCTC TCC-TAMRA-3') foram utilizados.

Análise filogenética

A seqüência consenso, gerada a partir dos fragmentos, forward e reverse, gerados no seqüenciamento, bem como a avaliação da qualidade do seqüenciamento foram realizadas utilizando o programa SeqScape (Applied Biosystems SeqScape Software v 2.5).

Para a reconstrução filogenética o alinhamento múltiplo das novas seqüências LTR dos clones foi realizado com o programa Dambe (XIA, 2000) e este editado manualmente utilizando o programa Genedoc (NICHOLAS *et al.*, 1997). As árvores filogenéticas foram construídas utilizando o método de NJ e de ML, contidos no programa PAUP* versão 4.0b10. O modelo evolutivo escolhido pelo programa Modeltest 3.7 (POSADA & KRANDALL, 1998) para as árvores filogenéticas foi o Hasegawa-Kishino-Yano (HKY), que leva em consideração a freqüência variável das bases nucleotídicas e freqüência de transição e transversão variável. A confiabilidade da árvore foi feita por análise de *bootstrap* com 1000 pseudoreplicas. Para a árvore de ML, foi realizada uma busca heurística

com o algoritmo *subtree-pruning-regrafting branch swapping* utilizando a árvore de NJ para iniciar a busca, incluindo seus parâmetros de otimização. O teste de razão de verossimilhança foi utilizado para calcular o suporte estatístico (expressado nos valores de p para os ramos). As árvores foram visualizadas no programa FigTree version 1.3.1 (disponível no site <http://tree.bio.ed.ac.uk/software>).

Para analisar a presença de perfis de sítios de modificação pós traducional nos clones de PBMC e lavado bucal, o fragmento correspondente a tax foi traduzido no programa Genedoc a seqüência protéica submetida a ferramenta Prosite do programa Genedoc. O Teste não paramétrico para Panmixia, conhecido como teste de Hudson, foi realizado para analisar a média da diferença par a par (K_s) e o log da média da diferença par a par (pK^*s) entre cada amostra para verificar o perfil clonal do HTLV-1 entre os clones de PBMC e lavado bucal. Os resultados foram considerados significantes se $p < 0.005$. A média da distância genética entre os clones encontrados foi calculada utilizando o modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros, implementado no software Mega3 (KUMAR *et al.*, 1994).

Análise estatística

Para a comparação da carga proviral entre os indivíduos com provirus detectável no lavado bucal com os indivíduos sem provirus detectável no lavado bucal foi utilizado o teste estatístico de Mann-Whitney.

5. RESULTADOS

5.1 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DO HTLV EM MULHERES PORTADORAS DE HIV-1

Poucos estudos descrevem esta coinfeção em Salvador e áreas vizinhas, e muito menos investigam como estes vírus circulam ou avaliam a relação entre eles. Para descrever a epidemiologia molecular do HTLV-1 e as características da co-infecção HTLV/HIV-1 em mulheres, nós realizamos um corte transversal envolvendo 107 mulheres infectadas com HIV-1 do centro de referência da DST/HIV/AIDS, localizado na cidade de Feira de Santana. Quatro das cinco amostras reativas no ELISA foram confirmadas como HTLV-1 no WB e PCR e uma amostra confirmada como HTLV-2. A soroprevalência da infecção pelo HTLV nestas mulheres foi de 4,7%, menor que o esperado, provavelmente pela baixa prevalência da infecção pelo HTLV nesta área ou devido a medidas de controle de DST/AIDS implementadas desde a realização do estudo anterior. A análise filogenética da região LTR das quatro seqüências do HTLV-1 revelou que todos os isolados foram classificados como subgrupo Transcontinental do subtipo Cosmopolita e se agrupam no principal grupo latino-americano, que possui um ancestral comum com isolados da África do Sul, sugerindo a introdução pós Colombiana deste vírus na Bahia. A seqüência de HTLV-2 foi classificada como subtipo c, a variante brasileira do subtipo 2a. Também foi observado que quatro mulheres coinfectadas HTLV/HIV-1 apresentavam comportamento de risco, sendo duas por exposição parenteral, enquanto que duas eram profissionais do sexo, demonstrando que esta co-infecção é mais freqüente em grupos de risco.

5.1.1 Seroprevalence and molecular epidemiology of HTLV-1 isolates from HIV-1 coinfecting women in Feira de Santana, Bahia, Brazil

Running head: HIV-1/HTLV coinfection in Bahia

Artigo aceito na “*AIDS Research and Human Retroviruses*”, esperando publicação.

Rego, F.F.A.^{1,2}; *Mota-Miranda, A.C.A.*^{1,2}; *Santos, E.S.*¹; *Galvão-Castro, B.*^{1,2} and *Alcantara, L.C.J.*^{1,2,3}

1– HTLV Center/ Bahia School of Medicine and Public Health/Bahia Foundation for Science Development, Salvador, Bahia, Brazil; 2– Advanced Public Health Laboratory, Gonçalo Moniz Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Bahia, Brazil; 3– National Cancer Institute, National Institutes of Health , Bethesda, MD, USA.

Corresponding author:

Luiz Carlos Junior Alcantara, PhD

NIH-NCI, Vaccine Branch

Building 41, Room C303, 41 Library Drive, MSC 5055, Bethesda, MD 20892, USA

Telephone: (301) 402-6158

Fax: (301) 402-0055

email: alcantaralc@mail.nih.gov

Abstract:

Introduction: HTLV-1/HIV-1 coinfection is associated with severe clinical manifestations, marked immunodeficiency and opportunistic pathogenic infections, as well as risk behavior. Salvador, the capital of the State of Bahia, Brazil, has the highest HTLV-1 prevalence (1.74%) found in Brazil. Few studies exist which describe this coinfection found in Salvador and its surrounding areas, much less investigate how these viruses circulate or assess the relationship between them. **Objective:** To describe the epidemiological and molecular features of HTLV in HIV coinfecting women. **Methods:** To investigate the prevalence of HTLV/HIV coinfection in surrounding areas, as well as the molecular epidemiology of HTLV, a cross sectional study was carried out involving 107 women infected with HIV-1 from the STD/HIV/AIDS Reference Center located in the neighboring City of Feira de Santana. Patient samples were submitted to ELISA and HTLV infection was confirmed using Western Blot and Polymerase Chain Reaction (PCR). Phylogenetic analysis using Neighbor-Joining (NJ) and Maximum Likelihood (ML) was performed on HTLV LTR sequences in order to gain further insights about molecular epidemiology and the origins of this virus in Bahia. **Results & Discussion:** Four out of five reactive samples were confirmed to be infected with HTLV-1, and one with HTLV-2. The seroprevalence of HTLV among HIV-1 co-infected women was found to be 4.7%. Phylogenetic analysis of the LTR region from four HTLV-1 sequences showed that all isolates were clustered into the main Latin American group within the Transcontinental subgroup of the Cosmopolitan subtype. The HTLV-2 sequence was classified as the HTLV-2c subtype. It was also observed that four HTLV/HIV-1 coinfecting women exhibited risk behavior with two having parenteral exposure, while another two were sex workers.

Conclusion: This paper describes the characteristics of coinfecting patients. This coinfection is known to be severe and further studies should be conducted to confirm the suggestion that HTLV-1 is spreading from Salvador to surrounding areas.

Human T-cell Lymphotropic Virus Type-1 (HTLV-1) is known to be the etiological agent of Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL), TSP/HAM and other inflammatory diseases. However, the etiology of HTLV-2 remains unclear. While both diseases are endemic worldwide, the rate of seroprevalence differs among regions.¹

HTLV-1 is endemic in Japan,² regions of Central Africa,³ the Caribbean,⁴ and in some areas of Latin America.⁵ Phylogenetic analysis of the most variable DNA region, called a Long Terminal Repeat (LTR) sequence, has classified HTLV-1 into seven subtypes: a, or cosmopolitan⁶; b, or Central African⁷; c, or Melanesian⁸; d, from Cameroon⁹; e, from the Democratic Republic of Congo¹⁰; f, originating from an individual from Gabon¹⁰; g, a recently described new subtype from Cameroon.¹¹ The cosmopolitan subtype can be further divided into five subgroups: A – Transcontinental; B – Japanese; C – West African; D – North African and E – Black Peruvian.^{5,12,13,14}

HTLV-2 infection is endemic in native populations from North and South America, but is also frequently found in high-risk groups in the United States¹⁵ and Europe.^{16,17,18} Phylogenetic analyses have demonstrated that HTLV-2 may be classifiable into four subtypes: a, the predominant variant in the United States and northern Europe, b, found exclusively in southern Europe, c, a Brazilian variant of HTLV-2a, and d, in pygmies from the Democratic Republic of Congo.¹⁹

HTLV is transmitted via sexual contact, breastfeeding, blood transfusion and among intravenous drug users, in a similar fashion to the pandemic retrovirus HIV. To understand the consequences of a severe HTLV/HIV coinfection, it is important to evaluate public health policies and

treatment options, since both retroviruses are simultaneously present in many regions. In the State of Bahia, the prevalence of HTLV coinfection can reach 20% in HIV-infected individuals.²⁰

Previous studies have suggested that HTLV-1 was brought to the Bahian capital, Salvador, during the slave trade.^{14,21,22} Salvador has the highest HTLV prevalence in the country, 1.35% among blood donors and 1.8% in the general population.^{23,24} Previous epidemiological studies have shown that the HTLV-1 strain that is circulating in Bahia appears to be spreading from Salvador to other regions of the state.^{25,26} In an effort to gain further insight into the history of HTLV-1 in Bahia, a molecular epidemiological study was carried out among HIV-1/HTLV coinfecting women in the neighboring City of Feira de Santana. This city is located along the route of some of the busiest highways in the State of Bahia (116 km from Salvador), at the intersection of three main interstate highways, the BR101, BR116 and BR324. Future studies should be considered in order to ascertain whether new HTLV-1 strains are being brought to Bahia along interstate trucking routes.

This study was approved by the Human Research Ethics Committee of the Bahia School of Medicine and Public Health. Express written consent was obtained from all study participants.

To investigate the seroprevalence and molecular epidemiology of HTLV in Salvador and its surrounding regions, a cross-sectional study of 107 HIV-1 infected women from the STD/HIV/AIDS Reference Center located in the City of Feira de Santana was carried out.

All blood samples obtained from patients were submitted to ELISA (ORTHO® HTLV-1/HTLV-II Ab-Capture ELISA Test Systems - Ortho-Clinical Diagnostic, Raritan, USA) to select infected individuals, and reactive samples were then submitted to Western Blot (HTLV BLOT 2.4 - Genelabs Diagnostics®, Singapore) for confirmation. After serological testing, patient medical records were analyzed in order to assess age, viral load, CD4 and CD8 T-cell counts, clinical manifestations in accordance with CDC guidelines, as well as probable transmission route.

Patient DNA was extracted from positive blood samples using a QIAGEN QIAamp® DNA Blood Kit. The DNA was then submitted to HTLV1/2 pol gene nested Polymerase Chain Reaction (PCR) to confirm and distinguish the type of HTLV infection.²⁷ A nested-PCR with specific primers for the long terminal repeat (LTR) region of HTLV was performed in order to investigate molecular epidemiology. Two HTLV-1 overlapping fragments were amplified: a LTR-gag segment consisting of 473 base pairs and a tax-LTR segment with 479 base pairs,²¹ and one additional fragment was also amplified to detect the HTLV-2 LTR proviral sequence.²⁸ All PCR products were purified using the Qiagen PCR Purification Kit. Sequencing was performed using the Taq FS Dye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems) on an automated 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) using identical inner primers.

The new LTR sequences, as well as selected reference strains downloaded from the GenBank/EMBL database, were aligned using ClustalX software²⁹ and manually edited using GeneDoc software³⁰. Phylogenetic analysis was carried out using Neighbor-Joining (NJ) and Maximum-Likelihood (ML) methods in PAUP*, version 4.0b.10.³¹ Tamura-Nei+g (which takes into account unequal base frequencies, variable transition frequencies, equal transversion frequencies and unequal nucleotide substitution rates among sites) and HKY+g (which distinguishes between transitions and transversion rates, unequal base frequencies and unequal nucleotide substitution rates among sites) evolutionary models were selected for HTLV-1 and HTLV-2 phylogenetic analysis respectively, using Modeltest 3.7 software³². NJ tree reliability was assessed by analyzing 1,000 bootstrap replicates. For ML trees, a heuristic search was performed with a subtree-pruning-regrafting branch swapping algorithm using the NJ tree as the starting material, including its optimized parameters. Trees were drawn using TreeView software, version 1.4.³³

The rate of HTLV seroprevalence among HIV-1 infected women was found to be 4.7% (n=5). Considering the few studies performed with similar objectives, our seroprevalence result is in agreement with the result from another study carried out in the Amazon region, that evaluate the co-infection at the same population studied in this report.³⁴ Other study carried out in the city of Salvador, have showed a HIV/HTLV seroprevalence of 16.3% when analyzing the general population. This seroprevalence can not be compared to our result since this rate was estimated in general population, which increase the prevalence of both infection, in separate, and also, this result highlight to the higher prevalence of HIV and HTLV infection in the city of Salvador comparing to Feira de Santana. Out of five reactive samples, four were confirmed to be HTLV-1 and one was confirmed as HTLV-2.

HIV-1 transmission routes were identified as parenteral (n=2) and sexual (n=3). In three of the HTLV-1/HIV-1 coinfecting women, risk behavior was noted: one received a blood transfusion, while two were sex workers. The woman infected with HTLV-2 was an IVDU for a period of five years while living in São Paulo. Coinfection was shown to be a condition that is associated with high-risk groups (Table 1). STD prevention campaigns play an important role in disease prevention since the most prevalent transmission route among HIV-1 coinfecting women in Feira de Santana has been observed to be sexual transmission. With regard to CD4 and CD8 T-cell counts, viral load and clinical manifestations according to CDC guidelines, it was observed that the HTLV/HIV coinfecting group closely resembled the HIV infected patients who were not reactive to HTLV serological screening. The antiretroviral therapy seems to have an impact on outcome in HIV/HTLV coinfection, but the studies conducted yet controversial.^{35,36} Since studied patients were treated to HIV infection, biological impacts on HTLV coinfection need to be investigated.

Phylogenetic analysis of sequences from the entire LTR region classified all HTLV-1 isolates as belonging to the Transcontinental subgroup of the Cosmopolitan subtype, supported by a bootstrap

value of 63% ($p < 0.001$ for ML analyses) (Fig. 1). All of these sequences were grouped in the Latin American cluster A with ML statistical support ($p < 0.001$). Three of the sequences were clustered together with other sequences from Salvador downloaded from GenBank/EMBL database with bootstrap support of 77%. The FS67 isolate was grouped with other Brazilian sequences, and a 10 bp deletion was observed between the first and second 21 base-pair repeat at 3U-LTR at position 130 and 139 of ATK genome (Accession number: J02029).

Phylogenetic analysis of the HTLV-2 LTR region confirmed that the HTLV-2 isolate belongs to subtype IIa (Fig. 1B), supported by a bootstrap value of 75%. This isolate formed a unique cluster inside subtype IIa along with other Brazilian sequences (Brazilian variant HTLV-2c), which was well supported by the ML algorithm. According to another study,³⁷ these data suggest the unique introduction of HTLV-2 into this population, as previously associated with high-risk groups,²⁰ since HTLV-2 is predominantly transmitted parenterally among IVDUs. However, it is necessary to analyze more patients in order to obtain additional information regarding the transmission of HTLV-2.

This study is in agreement with findings from previous studies,^{21,22,25,26,38} reaching the conclusion that the HTLV-1a Transcontinental subgroup is the most prevalent strain found in Brazil. The presence of HTLV-1 LTR sequences from Bahia in several clusters along the phylogenetic tree suggests multiple post-Columbian introductions of HTLV-1 into the Brazilian population. These data, in addition to other studies from regions throughout Bahia^{25,26}, serve to confirm the post-Columbian introduction hypothesis of HTLV-1 into Bahia.

HTLV-1 transcription is regulated by elements in the LTR region, characterized as proviral promoter.³⁹ HTLV-1 transcription is activated by the interaction of the viral Tax protein with other transcription factors, forming a CREB-Tax-CBP complex that binds to the third 21-base pair repeated sequence located within the U3-LTR region named TxRE.⁴⁰ Moreover, previous studies have revealed

that just two direct repeats of the 21-bp sequence are sufficient for efficient activation by Tax³⁹, and that deletions in the TxRE2S sequence significantly decrease HTLV-1 Tax-mediated transcriptional activity.⁴¹ This study identified a new 10 bp deletion between the first and second 21 base-pair repeat at 3U-LTR. However, in order to make any inferences about this deletion effect, further functional studies need to be performed.

Recent publications,^{21,22,25,26} have suggested that the introduction of the Transcontinental subgroup is probably the result of the Bantu population's migration over the last 3,000 years from Central Africa to Southern Africa, giving rise to the Zulu population, or perhaps due to an even more recent migration (fewer than 300 years ago) to the gold mines in South Africa, then eventually to the State of Bahia. This theory appears to be consistent with what has been observed in one sequence from a region in Central Africa and another from Chile, which shares a common ancestor that is segregated within the Latin American cluster B, also containing a sequence from South Africa in its tree topology. Africans from Bantu-speaking areas were the first slaves that were transported in great numbers to Bahia, bringing with them a strong cultural heritage largely preserved in Bahian folklore, religion, language, cuisine and customs. Although most enslaved Africans were brought from West Africa, there is evidence that many were also brought from other regions of southern Africa. Therefore, South Africans who had been infected could have introduced the HTLV-1 Cosmopolitan subtype of the Transcontinental subgroup into Salvador and possibly into other areas on the Latin American continent.

Acknowledgments

Bioinformatics analysis was performed at the LASP/CPqGM/FIOCRUZ Bioinformatics Unit, supported by FAPESB (grants 303/03) and the Brazilian Ministry of Health (306/04 and 307/04). The

authors are grateful to Noilson Lázaro de Souza Gonçalves and Elisabeth Deliege for their technical assistance.

Sequence data

The GenBank accession numbers of the new HTLV-1 fragments included in phylogenetic study were as follows: FJ853491, FS84; FJ853490, FS105; GU225731, FS67; GU225733, FS138; GU225732, FS157.

References

1. Catalan-Soares B, Proietti FA and Carneiro-Proietti AB. Heterogeneous distribution of HTLV-1/II prevalence rates in blood donors from urban areas in Brazil. *Vox Sanguinis* 2004;87(3):105.
2. Kajiyama W, Kashiwagi S, Nomura H, Ikematsu H, Hayashi J and Ikematsu W. Seroepidemiologic study of antibody to adult T-cell leukemia virus in Okinawa, Japan. *Am J Epidemiol* 1986;123(5):41-47.
3. Verdier M, Bonis J and Denis FA. The prevalence and incidence of HTLV in Africa. *AIDS in Africa* 1994;9:173-193.
4. Blattner WA, Saxiger DC, Riedel B *et al.* A study of HTLV-I and its associated risk factors in Trinidad and Tobago. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1990;3:1102-1108.
5. Proietti FA, Carneiro-Proietti ABF, Catalan-Soares BC and Murphy EL. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene* 2005; 24:6058-6068.
6. Miura T, Fukunaga T and Igarashi T. Phylogenetic subtypes of human T-lymphotropic virus type I and their relations to the anthropological background. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:1124-1127.

7. Vandamme, A.-M., H.-F. Liu, P. Goubau and J. Desmyter. Primate T-lymphotropic virus type I LTR sequence variation and its phylogenetic analysis: compatibility with an African origin of PTLV-I. *Virology* 1994;202:212-223.
8. Gessain A, Yanagihara R, Francini G, *et al.* Highly divergent molecular variants of human T-lymphotropic virus type from isolated populations in Papua New Guinea and the Solomon Islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:7694-7698.
9. Chen J, Zekeng L, Yamashita M, *et al.* HTLV isolated from a Pygmy in Cameroon is related but distinct from the known Central African type. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995;11:1529-1531.
10. Salemi M, Van Dooren S, Audenaert E, *et al.* 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* 1998; 246:277-287.
11. Wolfe ND, Heneine W, Carr JK, *et al.* Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(22): 7994-9.
12. Gasmi, M., B. Farouqi, M. d'Incan, C. Desgranges. Long terminal repeat sequence analysis of HTLV type I molecular variants identified in four North African patients. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 1994 10:1313-15.
13. Vidal, A.U., A. Gessain, M. Yoshida, F. Tekaia, B. Garin, B. Guillermain, T. Schuls, R. Farid and G. De The. Phylogenetic classification of human T cell leukaemia/lymphoma virus type I genotypes in five major molecular and geographical subtypes. *Journal of General Virology* 1994 75:3655-66.
14. Van Dooren, S, Gotuzzo E, Salemi M, *et al.* Evidence for a Post-Colombian introduction of human T-cell lymphotropic virus in Latin America. *J Gen Virol* 1998;79:2695-2708

15. Khabbaz RF, Onorato IM, Cannon RO, *et al.* Seroprevalence of HTLV-1 and HTLV-2 among intravenous drug users and persons in clinics for sexually transmitted diseases. *N Engl J Med* 1992;326:375–80.
16. Tedder RS, Shanson DC, Jeffries DJ, *et al.* Low prevalence in the UK of HTLV-I and HTLV-II infection in subjects with AIDS, with extended lymphadenopathy, and at risk of AIDS. *Lancet* 1984 Jul 21;2(8395):125-8.
17. Zella D, Mori L, Sala M, *et al.* HTLV-II infection in Italian drug abusers. *Lancet* 1990 Sep 1;336(8714):575-6.
18. Vignoli C, Zandotti C, De Lamballerie X, *et al.* Prevalence of HTLV-II in HIV-1-infected drug addicts in Marseille. *Eur J Epidemiol* 1993 May;9(3):351-2.
19. Vandamme, A.M., Salemi, M., Van Brussel, M., *et al.* African origin of human T-lymphotropic virus type 2 (HTLV-2) supported by a potential new HTLV-2d subtype in Congolese Bambuti Efe Pygmies. *J Virol* 1998;72(5):4327-4340
20. Brites C, Harrington Jr WJ, Pedroso C, Netto EM, Badaró R. Epidemiological characteristics of HTLV-I and II coinfection in Brazilian subjects infected by HIV-1. *Braz J Infect Dis* 1997, 1: 43-48.
21. Alcantara LCJ, Oliveira T, Gordon M, *et al.* Tracing the Origin of Brazilian HTLV-1 as determined by Analysis of Host and Viral genes. *AIDS* 2006;20:780-782.
22. Mota ACA, Van-Dooren S, Fernandes FM, *et al.* The close relationship between South African and Latin American HTLV-1 strains corroborated in a molecular epidemiological study of the HTLV-1 isolates from a blood donor cohort. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2007;23:503-507.

23. Galvão-Castro B, Loures L, Rodrigues LGM, *et al.* Geographic Distribution of Human-T Lymphotropic Virus Type-I Among Blood Donors: A Brazilian Nationwide Study. *Transfusion* 1997;37:242.
24. Dourado I, Alcantara LCJ, Barreto ML, Teixeira MG and Galvão-Castro B. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2003; 34:527-531.
25. Rego FF, Alcantara LC, Moura Neto JP, *et al* HTLV type 1 molecular study in Brazilian villages with African characteristics giving support to the post-Columbian introduction hypothesis. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2008 May;24(5):673-7
26. Magalhães T, Mota-Miranda AC, Alcantara LC, *et al* Phylogenetic and molecular analysis of HTLV-1 isolates from a medium sized town in northern of Brazil: tracing a common origin of the virus from the most endemic city in the country. *J Med Virol* 2008 Nov;80(11):2040-5.
27. Vallejo A and García-Sáiz, A. Typing human T-cell lymphotropic virus (HTLV-I and HTLV-II) by nested polymerase chain reaction: Application to clinical specimens. *J Virol Methods* 1995;51(1):9-17.
28. Eiraku N, Novoa P, da Costa Ferreira M, *et al.* Identification and characterization of a new and distinct molecular subtype of human T-cell lymphotropic virus type 2. *J Virol* 1996 Mar;70(3):1481-92.
29. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, *et al.* The CLUSTAL_X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997;25(24):4876-4882.

30. Nicholas KB, Nicholas HBJ, Deerfield DW. GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation. *Embnew News* 1997;4:14.
31. Swofford DL, Olsen GJ, Waddell PJ and Hillis D.M. Phylogenetic Inference. *Molecular Systematics* 1996;2:407-514.
32. Posada D and Crandall KA. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 1998;14(9):817-818.
33. Page RDM. TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Cabios Applications Note* 1996;12:357-358.
34. Laurentino RV, Lopes IG, Azevedo VN, *et al.* Molecular characterization of human T-cell lymphotropic virus coinfected human immunodeficiency virus 1 infected patients in the Amazon region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005 Jul;100(4):371-6.
35. Machuca A, Rodés B, Soriano V. The effect of antiretroviral therapy on HTLV infection. *Virus Res* 2001 Oct 30;78(1-2):93-100.
36. Beilke MA, Traina-Dorge VL, Sirois M, *et al.* Relationship between Human T Lymphotropic Virus (HTLV) Type 1/2 Viral Burden and Clinical and Treatment Parameters among Patients with HIV Type 1 and HTLV-1/2 Coinfection. *Clinical Infectious Diseases* 2007;44:1229–34.
37. Alcantara LC, Shindo N, Van Dooren 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* 2003 Jun;19(6):519-23.

38. Kashima S, Alcantara LCJ, Takayanagui OM, *et al.* Distribution of human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) subtypes in Brazil: genetic characterization of LTR and tax region. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006;22:953-959.
39. Dan S, Tanimura A, Yoshida M. Interaction of Gli2 with CREB protein on DNA elements in the long terminal repeat of human T-cell leukemia virus type 1 is responsible for transcriptional activation by tax protein. *J Virol* 1999;73:3258-63.
40. Lemasson I, Polakowski NJ, Laybourn PJ, Nyborg JK. Transcription regulatory complexes bind the human T-cell leukemia virus 5' and 3' long terminal repeats to control gene expression. *Mol Cell Biol* 2004;24(14):6117-6126.
41. Tanimura A, Dan S, Yoshida M. Cloning of novel isoforms of the human Gli2 oncogene and their activities to enhance tax-dependent transcription of the human T-cell leukemia virus type 1 genome. *J Virol* 1998;72:3958-64.

Table 1. Age and probable HIV/HTLV transmission route between HIV-1 infected and HIV/HTLV coinfecting women from Feira de Santana, Bahia, Brazil.

	Age (mean \pm sd)	Sexual (%)	Risk exposure	
			Parenteral (%)	NI (%)
HIV-1+ HTLV- (n=102)	38 (10,9)	83 (81,4%)	5 (4,9%)	14 (13,7%)
HIV-1+ HTLV+ (n=5)	39 (6,6)	3 (60%)	2 (40%)	-

FIG.1. Rooted neighbor-joining tree of 75 HTLV-1 strains based on a 714-bp fragment of the LTR region. The bootstrap values (>60% using 1000 bootstrap samples) on the branches represent the percentage of trees for which the sequences located at the right end of the branch form a monophyletic group. Mel5 was used as an out-group. Geographic origin is shown in parentheses. Newly sequenced LTRs included in this analysis are shown in bold. Double asterisks (**) and single asterisk (*) signify that the ML method was shown to be highly statistically significant ($p<0.001$), or statistically significant ($p<0,005$), respectively.

FIG.2. Rooted neighbor-joining tree of 87 HTLV-2 strains based on a 433-bp fragment of the LTR region. The bootstrap values (>60% using 1000 bootstrap samples) on the branches represent the percentage of trees for which the sequences located at the right end of the branch form a monophyletic group. PP1664 was used as out-group. Geographic origin and risk factor are shown in parentheses. Newly sequenced LTRs included in this analysis are shown in bold. Double asterisks (**) and single asterisk (*) signify that the ML method was shown to be highly statistically significant ($p<0.001$) or statistically significant ($p<0,005$), respectively.

Figure 1

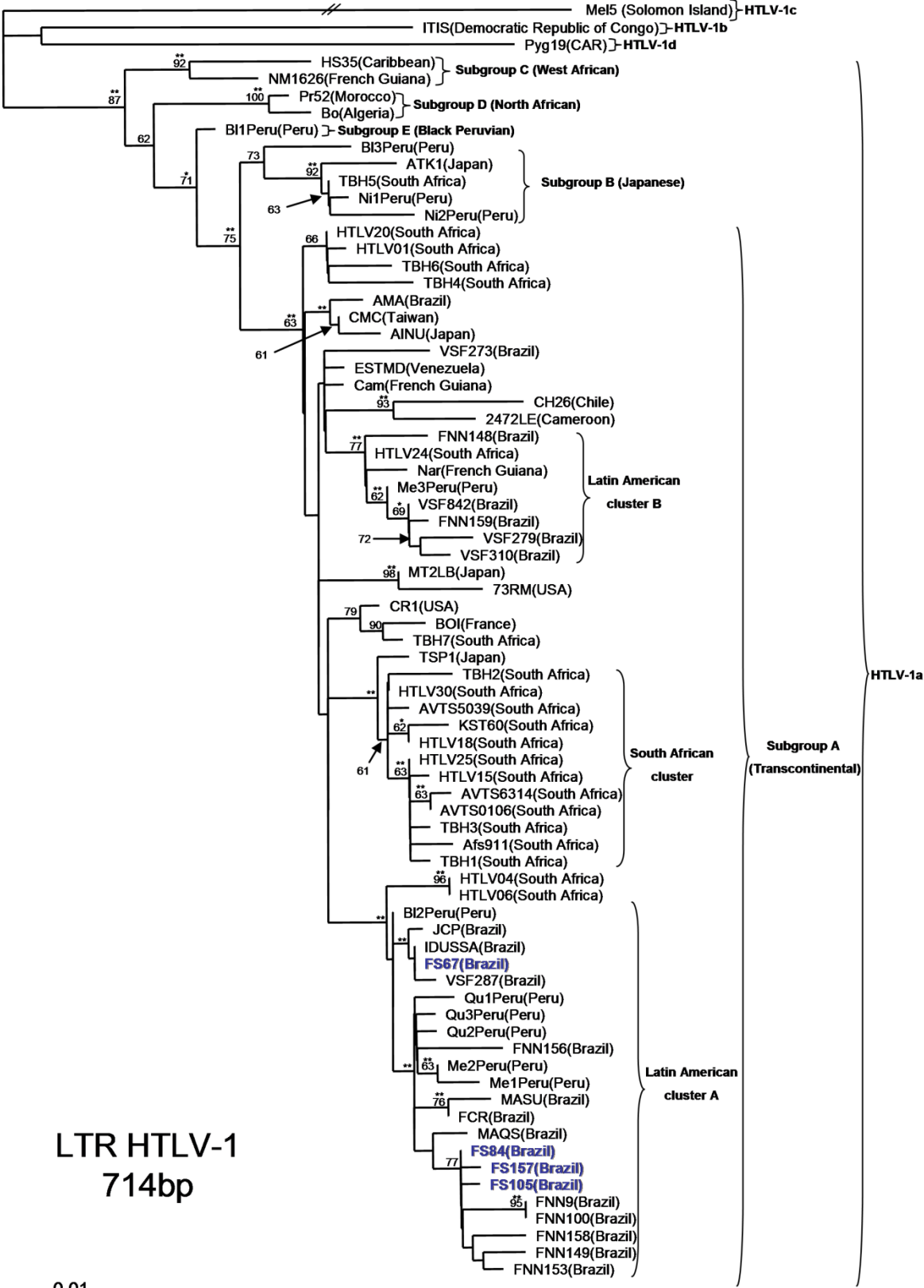
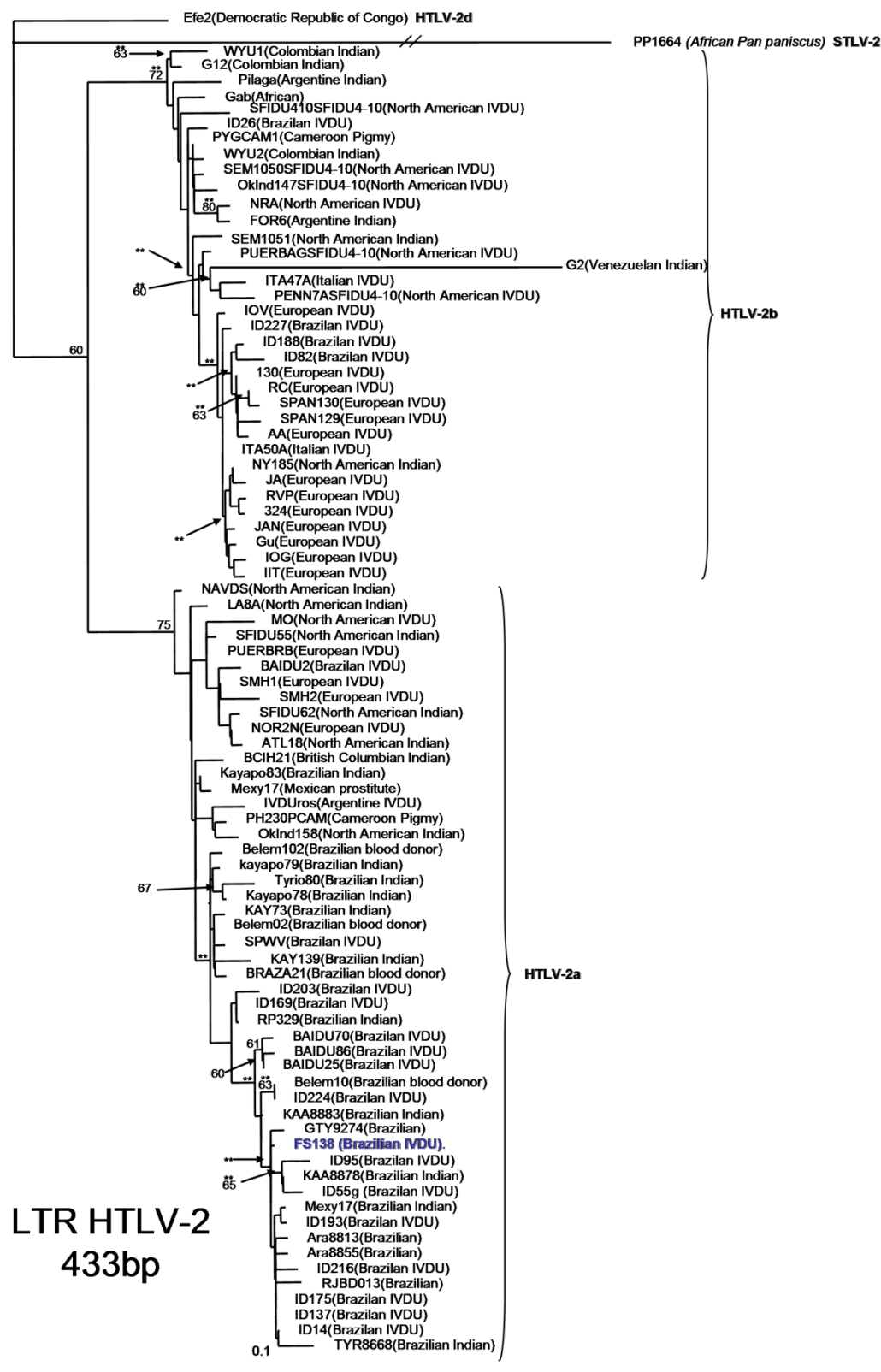


Figure 2



5.2 ANÁLISE DAS VARIAÇÕES GENÉTICAS DO HTLV-1 EM DIFERENTES COMPARTIMENTOS DO HOSPEDEIRO

O HTLV-1 é o agente etiológico da ATL, HAM/TSP e outras perturbações inflamatórias. Alguns estudos tentam analisar as variações do HTLV-1 em diferentes fluidos corpóreos e seu impacto sobre a infecção pelo HTLV. Este estudo foi realizado para determinar a carga proviral e variações da região *tax*-LTR do HTLV-1 em PBMC e células do lavado bucal de indivíduos infectados. Para investigar a carga proviral um PCR em tempo real foi realizado e para analisar as variações da região *tax*-LTR do HTLV-1 em PBMC e células do lavado bucal uma *nested*-PCR, seguida por clonagem molecular, seqüenciamento de DNA e a análise computacional foram realizadas. A diferença entre as medianas da carga proviral foi significativa, comparando os indivíduos com provírus detectado em células lavado bucal ($n = 8$) e os 18 indivíduos sem provírus detectado em células lavado bucal (101278.5 vs 23290.0 cópias por 10^6 PBMC, $p = 0.0245$). A análise filogenética, comparando clones de lavado bucal e PBMC, não mostrou nenhum perfil clonal entre os indivíduos com carga proviral detectada em células do lavado bucal e também não mostrou significância estatística no teste de Hudson. A diversidade genética, entre os clones de PBMC e lavado bucal variou de 0,003 a 0,008. O perfil de sítios de modificação pós-traducional no fragmento de *tax* analisado foi equivalente entre os grupos analisados. Todas as seqüências analisadas foram classificadas como subgrupo transcontinental do subtipo Cosmopolita. A presença de células infectadas em lavado bucal parece ser vinculada diretamente a níveis de carga proviral altos no sangue periférico. O HTLV-1, ao contrário do HIV, mostrou uma média da diversidade genética baixa, provavelmente causada por seu lento ciclo de replicação. Além disso, nenhum perfil mutacional foi detectado quando os clones de lavado bucal e PBMC foram analisados.

5.2.1 Analysis of the HTLV-1 intra-host variations in peripheral blood and mouthwash cells of infected individuals.

Running head: HTLV-1 in PBMC and mouthwash cells

Artigo a ser submetido para o “*Journal of Medical Virology*”

Filipe Ferreira de Almeida Rego^{1,2}; Aline Cristina Andrade Mota-Miranda,^{1,2}; Victor Carvalho Uchoa;¹³ Evandra Straazza³; Viviana Olavarria Nilla Gallazi¹; Liliane Elze Falcão Kusterer; Simone Kashima Haddad³; Dimas Tadeu Covas³; Bernardo Galvão Castro Filho^{1,2} and Luiz Carlos Junior Alcantara^{1,2,4}

1–Bahia School of Medicine and Public Health/Bahia Foundation for Development of Science, Salvador, Bahia, Brazil, 2– Advanced Public Health Laboratory, Gonçalo Moniz Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Bahia, Brazil, 3– Regional Blood Center of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil and 4– National Institute of Health, NCI, Bethesda, MD, USA.

Corresponding author:

Luiz Carlos Junior Alcantara, Ph D

LASP/CPqGM/FIOCRUZ.

Rua Waldemar Falcão 121, Brotas, Salvador, Bahia, Brazil 40295-001.

Telephone # 55 71 3176 2255

Fax # 55 71 3176 2300

E-mail: lalcan@cpqgm.fiocruz.br

Abstract

HTLV-1 is the etiological agent of ATL, HAM/TSP and inflammatory disturbs, including salivary disorders. Few studies attempts to analyze the HTLV-1 intrahost variations into different corporeal fluids and their impact on HTLV outcome infection. This study was performed to determine the proviral load and HTLV-1 *tax*-LTR intra-host variations from PBMC and mouthwash cells from HTLV-1 infected individuals. To investigate the proviral load a real-time PCR was performed and to analyze the intrahost variations a nested-PCR, followed by molecular cloning, DNA sequencing and computational analysis were performed. The difference between the proviral load medians was significant, comparing the individuals with provirus detected on mouthwash cells ($n = 8$) and the 18 individuals without provirus detected on mouthwash cells (101278.5 vs 23290.0 copies per 10^6 PBMC, $p=0.0245$). The analysis, comparing mouthwash and PBMC clones, with regard to the HTLV-1 intrahost variation, showed no clonal profile among the individuals with proviral load detected on mouthwash cells, with no statistic significance on Hudson test. The mean diversity within PBMC and mouthwash clones ranged from 0.003 from 0.008. Results of posttranslational modification sites in *tax* fragment were equivalent between the analyzed groups. All analyzed sequences were classified into the Transcontinental subgroup of Cosmopolitan subtype. The presence of infected cells on mouthwash seems to be linked directly to high levels of proviral load in peripheral blood. The HTLV-1, unlike HIV, showed a low genetic diversity mean, probably caused by a slow replication cycle. In addition, no mutational profile was detected when the mouthwash and PBMC clones were analyzed.

Background

The Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1), member of Retroviridae family, subfamily Orthoretrovirinae and Deltaretrovirus genus, causes the Adult T-cell Leukemia/Lymphoma (Yoshida *et al.* 1982), the HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) (Gessain *et al.* 1985; Osame *et al.* 1986) and it is linked to a great number of inflammatory disturbs, including salivary and lacrymal gland disorders (Giozza *et al.* 2008).

This infection is endemic in Japan (Kajiyama *et al.* 1986), in the Caribbean Basin (Blattner *et al.* 1990), some South American and African regions (Verdier *et al.* 1994), and some areas of Latin America (Proietti *et al.* 2005), while it is estimated that there are 2.5 million HTLV-1 infected people in Brazil (Carneiro-Proietti *et al.* 2002). A populational based study, in Salvador, have demonstrated a prevalence of HTLV-1 infection of 1.76%, besides, it is estimated that about 50.000 individuals are infected by the virus in this city. From the same study, in females older than 51 years-old, the infection rate reaches 9.3%, and lower income and poor education seem to be important factors determining the infection (Dourado *et al.* 2003).

The virus is transmitted through horizontal and vertical pathways. The major routes of horizontal transmission are parenteral and through sexual contact, while, vertical transmission occurs mostly through postnatal breast-feeding. Because HTLV-1 is transmitted only in a cell-to-cell manner, the source would need to contain a significant number of infected cells. Mouthwash contain various types of cellular components, including lymphocytes, that despite of the fact that oral transmission of HTLV-1, other than through breast milk, may thus be presumed to be very rare, Miyoshi *et al.* 1992 have demonstrated the presence of proviral DNA in the saliva of HTLV-1-infected individuals, and so, saliva could be transmitted from person to person by kissing or sharing tableware.

The development of HAM/TSP in HTLV-1-infected individuals is probably a multi-factor event, in which the immune system plays a critical role. As well, previous population studies suggested that both, viral and host genetic factors, influence the outcome of infection (Talledo *et al.* 2010).

The proviral load of HTLV-1 is typically high, often between 0.1 and 15% of PBMCs. In one infected person, the proviral load of HTLV-1 is usually stable over time within a factor of 2–4, but this equilibrium value or “set point” of proviral load can differ by 1000 times between infected subjects. Probably, the high proviral load in infected individuals may potentially induce systemic inflammatory manifestations.

Antibodies against HTLV-1 were frequently detectable in the saliva of carrier mothers and HAM/TSP patients, and titers of these antibodies showed a significant correlation with the titers of serum antibodies (Terada *et al.* 1994). In addition to this natural activity, saliva contain HTLV-1 specific immunoglobulin G molecules that are capable of neutralizing syncytium formation, suggesting that HTLV-1-infected cells in the saliva could inhibit cell-to-cell viral infection (Yamamoto *et al.* 1995).

Considering that the presence of HTLV provirus , in the saliva, and the positive correlation between proviral load and clinical manifestations, it's important to evaluate the proviral load in PBMC and in mouthwash cells of infected individuals .

So that, this study was carried out to determine the proviral load, and virus intra-host variations of HTLV-1 isolates from peripheral blood mononuclear cells and mouthwash cells .

Methods:

To investigate the intra host variations into the *tax*-LTR genomic region, the proviral load and molecular epidemiology of HTLV-1, we have carried out a cross sectional study with 26 HTLV-1 infected individuals submitted to dental care in the “Integrative and Multidisciplinary Center on HTLV and Viral Hepatitis” of Bahian School of Medicine and Public Health. This project was approved by Ethic Committee of Human Research from the Bahian School of Medicine and Public Health and all participant individuals of the project had signed the informed consent.

Sample preparation:

Peripheral blood and mouthwash from subjects were collect to determine the proviral load and intra host variations. From peripheral blood, mononuclear cells were obtained by density gradient using Ficoll-Histopaque. The patients were instructed to avoid any feeding for at least two hours before the mouthwash collection, in order to do not have interference into the salivary pH and into the subsequently procedures.

DNA, from PBMC and mouthwash cells, was extracted using the QIAGEN QIAamp® DNA Blood Mini Kit and it was submitted to a nested-PCR with specific primers for the *tax*-LTR (long terminal repeat) genomic region of HTLV-1. The *tax*-LTR segment of 479 base pair was amplified as previously described (Alcantara *et al.* 2006), and all PCR products were purified using QIAGEN PCR purification Kit.

Molecular cloning

From PCR positive samples, the molecular cloning was performed using TOPO TA Cloning® Kit following manufacture instructions, and at least five colonies of each sample were selected for DNA extraction from plasmids by Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). From extracted DNA, an enzymatic reaction with the Eco RI enzyme was performed to verify the insert presence. DNA was sequenced, from plasmids, using the Taq FS Dye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems) and the automated 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA), with the same inner primers.

Proviral load

The HTLV-1 proviral load was measured, in 10^6 PBMC or 500ng of DNA from mouthwash cells, using Taqman Real-Time PCR, applied at ABI Prism 7700 (*PE-Applied Biosystems*). The albumin gene, as endogenous reference, was calculated to normalize variations between samples (Dehée *et al.* 1992).

Molecular analysis

The new LTR sequences were aligned using the ClustalX software (Thompson *et al.* 1997), and manually edited using the GeneDoc (Nicholas *et al.* 1997) program. Phylogenetic analysis were performed using the Maximum-Likelihood (ML) and Neighbor-Joining (NJ) methods of PAUP*, version 4.0b.10 (Swofford, 1998). The Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) evolutionary model (which takes into account variable base frequencies and variable transition and transversion frequencies) was selected by Modeltest 3.7 software (Posada and Krandall, 1998). The reliability of the NJ trees was assessed by analyzing 1,000 bootstrap replicates. For ML trees, an heuristic search was performed with

a subtree-pruning-regrafting branch swapping algorithm including its optimized parameters. Trees were drawn with FigTree version 1.3.1 (Available at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software>).

To analyze the presence of one posttranslational modification sites profile at viral isolates from PBMC and mouthwash cells, the *tax* fragment, was translated by GeneDoc software and the protein sequences were submitted to Prosite tool into GeneDoc software. The non-parametric test for panmixia, Hudson test, was performed to analyze the mean pairwise difference (Ks) and the mean pairwise log (K*s) within each sample to verify if there is any HTLV-1 clonal profile between PBMC and mouthwash cells. The results were significant if $p < 0.005$. Means of genetic distances within HTLV-1 clones were measured using the Kimura 2-parameter substitution model, implemented in the Mega3 software (Kumar *et al.* 1994).

Statistical analyses

To compare the HTLV-1 PBMC proviral load median values between the two analyzed groups (individuals with proviral load detectable in mouthwash cells and individuals without proviral load detectable in mouthwash cells), the non-parametric Mann-Whitney test was applied.

Results:

It was detected proviral load in eight of 26 analyzed mouthwash samples. The proviral load in mouthwash cells ranged from 320 to 2782 copies per 10^6 cells. The PBMC proviral load median in these eight individuals was significantly higher than the PBMC proviral load median into 18 individuals without HTLV copies in mouthwash cells: median of 101278.5 vs 23290.0 copies per 10^6 cells, $p=0.0245$, Mann-Whitney test (Fig. 1).

It was only possible to perform, successfully, PCR and molecular cloning using the DNA from mouthwash cells in four (S2132, S3518, S3728 and S4192) of eight samples. These PCR products, and the corresponding PCR products in the PBMC were cloned and a total of 79 PBMC colonies and 74 mouthwash colonies were obtained for plasmid DNA extraction (Table 1). It was possible to detect 27 PBMC clones and 28 mouthwash clones into the analyzed colonies. The *tax*-LTR3' fragment (419pb) obtained from these samples were submitted to "LASP HTLV-1 Automated Subtyping Tool" (<http://www.bioafrica.net>) and all isolates were grouped into the Transcontinental subgroup of Cosmopolitan subtype (Fig. 2).

When all virus sequences, from each individual, were analyzed, phylogenetically, using Maximum Likelihood and Neighbor-Joining methods, it was observed that do not exist any molecular profile among LTR sequences obtained from the two distinct compartments: PBMC and saliva. (Fig. 2).

The presence of posttranslational modification sites into sequenced *tax* gene was equivalent among the analyzed clones. The mean diversity within the PBMC and mouthwash clones from each individual was 0.005, 0.003, 0.008 and 0.007 for 2132, 3518, 3728 and 4192 patients, respectively

(Table 1). The panmixia probability, demonstrated by $p(K_s)$ and $p(K^*_s)$, showed no statistic significance when comparing the PBMC and mouthwash clones from individuals: 2132, $p(K_s)=1$ and $p(K^*_s)=0.9257$; 3518, $p(K_s)=1$ and $p(K^*_s)=1$; 3728, $p(K_s)=0.0078$ and $p(K^*_s)=0.0078$; 4192, $p(K_s)=0.4790$ and $p(K^*_s)=0.5355$ (Table 1).

Discussion:

From eight individuals with proviral load detected at mouthwash cells, seven of them had demonstrated higher levels of PBMC proviral load, when comparing with the 18 individuals without proviral load detected at mouthwash cells. This finding may reflect that high proviral load may potentially induce systemic inflammatory manifestations as occurs in the HAM/TSP. This observation highlights the importance of monitoring the proviral load beyond the infection, as well, the importance of investigating possible associations between HTLV-1 and clinical oral manifestations. Studies, evaluating the antibody response in saliva, suggest a weak immune response against HTLV-1 in saliva, what could be an important factor to the increase of proviral load at this compartment (Belec *et al.* 1996). So that, it's possible to infer that the proviral load detected in the saliva could be a result of a immune system balance, into this corporeal fluid. Moreover, this possibility highlight the risk of few infected cells into the saliva, represent an important via of transmission, without any sign of detection through proviral load, when the immune response is able to control the virus spread.

However, the HTLV-1 transmission occurs mainly by cell-to-cell contact or cell-to-cell fusion (also named syncytium formation). The gp46 protein codified by envelop gene is responsible for the main antibody response against the HTLV-1. Antibody IgG anti-gp46 peptides are capable to neutralizing the syncytium formation, so, the HTLV-1 transmission from person to person by kissing or sharing tableware, if occurs, seems to be rare.

About the intrahost variations, the analysis had included clones isolated from cells with three levels of proviral load, and any difference was identified. This result ratifies the necessity of

performing a similar study with a longer virus genomic fragment in order to obtain more information, and probably detect some variation when comparing the individuals. The low genetic diversity suggests, unlike HIV, that the HTLV-1 is a long latency virus, spreading slowly in infected patients due to the slow replication cycle.

The panmixia probability showed that the HTLV-1 clones obtained from PBMC and mouthwash were originated from a common ancestor, suggesting that there are no mutational profile determining the HTLV-1 tropism to different cellular types. Probably, the presence of infected cells at the mouthwash is a result of lymphocytes infiltration by oral mucosa lesions, and high levels of proviral load in peripheral blood.

This study is in agreement with findings from previous studies, reaching the conclusion that the HTLV-1a Transcontinental subgroup is the most prevalent strain found in Brazil and in Bahia.

Conclusion:

The presence of infected cells on mouthwash seems to be linked directly to high levels of proviral load in peripheral blood and its infiltration on different corporeal fluids.

The HTLV-1 clones showed a low genetic diversity mean, probably caused by a slow replication cycle and the recombination absence. In addition, no mutational profile was detected when the viral clones obtained from mouthwash and PBMC were analyzed.

Acknowledges:

The molecular analyses were performed at the Bioinformatics Unit of the LASP/CPqGM/FIOCRUZ, with financial support of FAPESB (grants 303/03) and Brazilian Ministry of Health (306/04 and 307/04). The authors are grateful to Noilson Lázaro de Souza Gonçalves, Elisabeth Deliege and Rochele Azevedo for technical assistance. The authors thank the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS/FIOCRUZ for use of its facilities.

Sequence data

The GenBank accession numbers of the new HTLV-1 *tax*-LTR fragments included in phylogenetic study are as follows:

References:

Alcantara LCJ, Oliveira T, Gordon M, Pybus O, Mascarenhas RE, Seixas MO, Gonçalves M, Hlela C, Cassol S, Galvão-Castro B. 2006. Tracing the Origin of Brazilian HTLV-1 as determined by Analysis of Host and Viral genes. *AIDS* 20(05):780-782.

Belec L, Jean Georges A, Hallouin MC, Si Mohamed A, Morand-Joubert L, Georges-Courbot MC. 1996. Human T cell Lymphotropic virus type I excretion and specific antibody response in paired saliva and servicovaginal secretions. *AIDS Res* 20;12(2):157-167.

Blattner WA, Saxiger DC, Riedel B Hull B, Taylor G, Cleghorn F, Gallo R, Blumberg B, Bartholomew C. 1990. A study of HTLV-I and its associated risk factors in Trinidad and Tobag. *J Acquir Immune Defic Syndr* 3(11):1102-1108.

Dehee A, Cesaire R, Desire N, Lézin A, Bourdonné O, Béra O, Plumelle Y, Smadja D, Nicolas JC. 2002. Quantitation of HTLV-I proviral load by a TaqMan real-time PCR assay. *Journal of Virological Methods* 102:37–51

Dourado I, Alcantara LCJ, Barreto ML, Teixeira MG, Galvão-Castro B. 2003. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. *J Acquir Immune Defic Syndr*; 34:527-531.

Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A, de Thé G. 1985. Antibodies to human T. lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* 2:407-410.

Giozza SP, Santos SB, Martinelli M, Porto MA, Muniz AL, Carvalho EM. 2008. Salivary and lacrymal gland disorders and HTLV-1 infection. *Rev Stomatol Chir Maxillofac* 109(3):153-7

Kajiyama W, Kashiwagi S, Nomura H, Ikematsu H, Hayashi J, Ikematsu W. 1986. Seroepidemiologic study of antibody to adult T-cell leukemia virus in Okinawa, Japan. *Am J Epidemiol* 123 (5):41-47.

Kumar S, Tamura K, Nei M. 1994. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers. *Comput Appl Biosci* 10(2):189-91.

Miyoshi I, Sawada T, Iwahara Y, Ishii K, Kubonishi I, Taguchi H. 1992. Excretion of HTLV-I in saliva. *JAMA* 8;267(2):236.

Nicholas KB, Nicholas HBJ, Deerfield DW. 1997. GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation. *Embnew News* 4:14.

Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Igata A, Matsumoto M, Tara M. 1986. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet* 1:1031-2.

Posada D, Crandall KA. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14(9):817-818.

Proietti FA, Carneiro-Proietti ABF, Catalan-Soares BC, Murphy EL. 2005. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene* 24:6058-6068.

Swofford DL. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Version 4.0b5. Sinauer Associates, Sunderland, mass, 1998.

Talledo M, López G, Huyghe JR, Verdonck K, Adai V, González E, Best I, Clark D, Vanham G, Gotuzzo E, Van Camp G, Van Laer L. 2010. Evaluation of host genetic and viral factors as surrogate markers for HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in Peruvian HTLV-1-infected patients. *J Med Virol* 82(3):460-6.

Terada K, Katamine S, Eguchi K, Moriuchi R, Kita M, Shimada H, Yamashita I, Iwata K, Tsuji Y, Nagataki S, Miyamoto T. 1994. Prevalence of serum and salivary antibodies to HTLV-1 in Sjogren's syndrome. *Lancet* 344:1116–1119.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The CLUSTAL_X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25(24):4876-4882.

Verdier M, Bonis J, Denis FA. 1994. The prevalence and incidence of HTLV in Africa. *AIDS in Africa* 9:173-193.

Yamamoto T, Terada K, Nishida N, Moriuchi R, Shirabe S, Nakamura T, Tsuji Y, Miyamoto T, Katamine S. Inhibitory activity in saliva of cell-to-cell transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1 in vitro: evaluation of saliva as an alternative source of transmission. *J Clin Microbiol* 33(6):1510-5.

Yoshida M, Miyoshi I, Hinuma Y. 1982. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 79:2031-2035.

Figure Legends

FIGURE 1. Differences in PBMC proviral load from the analyzed groups. p value was considered statically significant if >0.05 (Mann-Whitney test) * Group of individuals with proviral load detectable in mouthwash cells. ** Group of individuals without proviral load detectable in mouthwash cells

FIGURE 2. Unrooted neighbor-joining tree of HTLV-1 LTR region The PBMC obtained LTR sequences, included in this analysis, are in blue and the mouthwash obtained sequences, included in this analysis, are in red. **A.** Phylogenetic tree, based on a 414bp LTR fragment, of 8 HTLV-1 clones from 2132 patient. **B.** Phylogenetic tree, based on a 384bp LTR fragment, of 6 HTLV-1 clones from 3518 patient. **C.** Phylogenetic tree, based on a 415bp LTR fragment, of 19 HTLV-1 clones from 3728 patient. **D.** Phylogenetic tree, based on a 413bp LTR fragment, of 22 HTLV-1 clones from 4192 patient.

Table 1. Molecular analysis from four patients with HTLV-V-1 proviral load detectable in mouthwash cells.

Sample ID	HTLV-V-1 proviral load		Number of analyzed clones		Mean genetic diversity			Panmixia probably	
	PBMC (in 10 ⁶ cells)	Mouthwash cells (in 10 ⁶ cells)	PBMC	Mouthwash cells	PBMC	Mouthwash cells	Mouthwash cells X PBMC	pKs	pK*s
2132	96196	210	03	05	0.003	0.007	0.005	1	0.9257
3518	583765	1300	03	03	0.003	0.003	0.003	1	1
3728	92772	600	17	02	0.007	0.002	0.012	0.0078	0.0078
4192	197217	794	04	18	0.007	0.007	0.007	0.4790	0.5355

Figure 1.

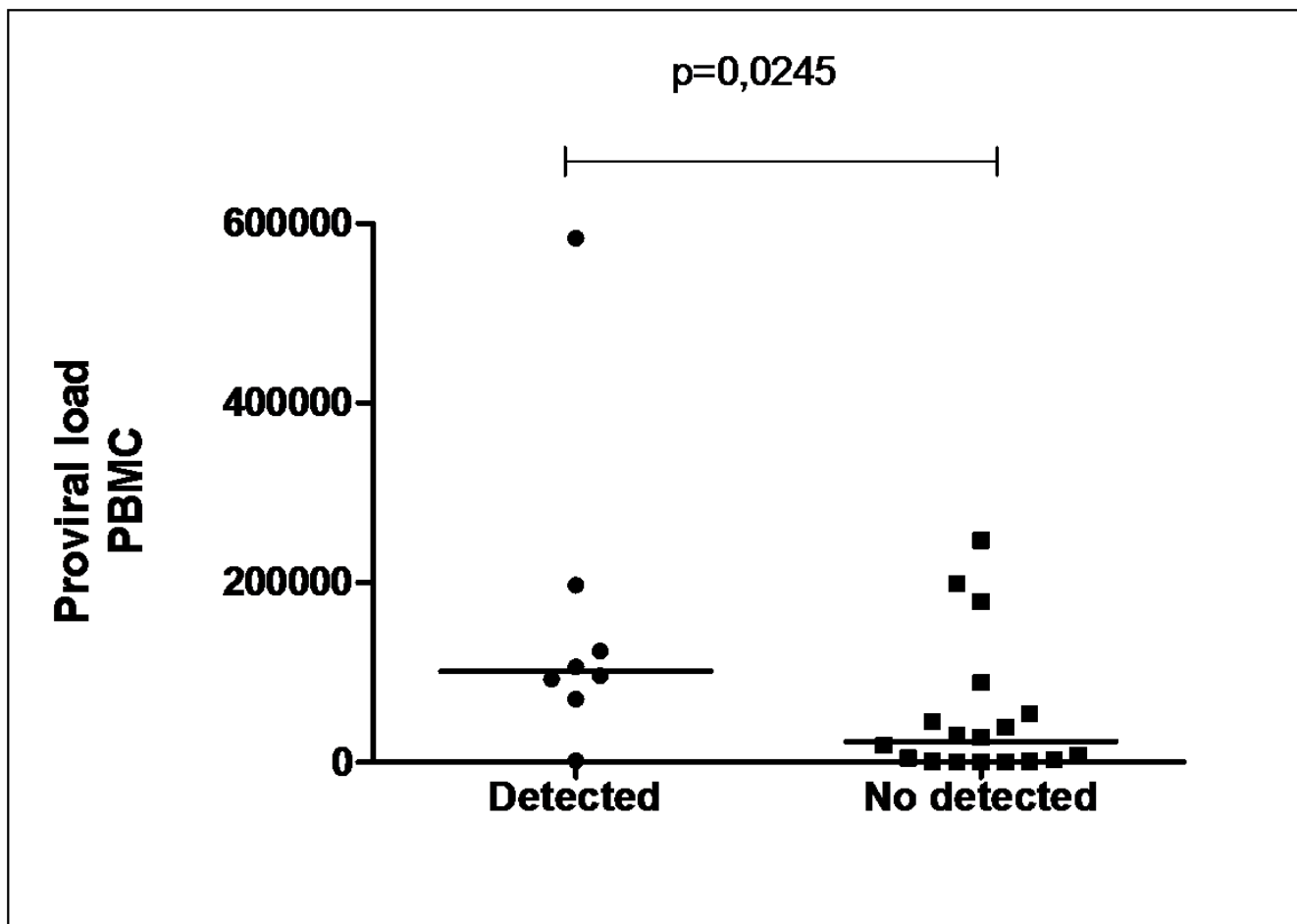
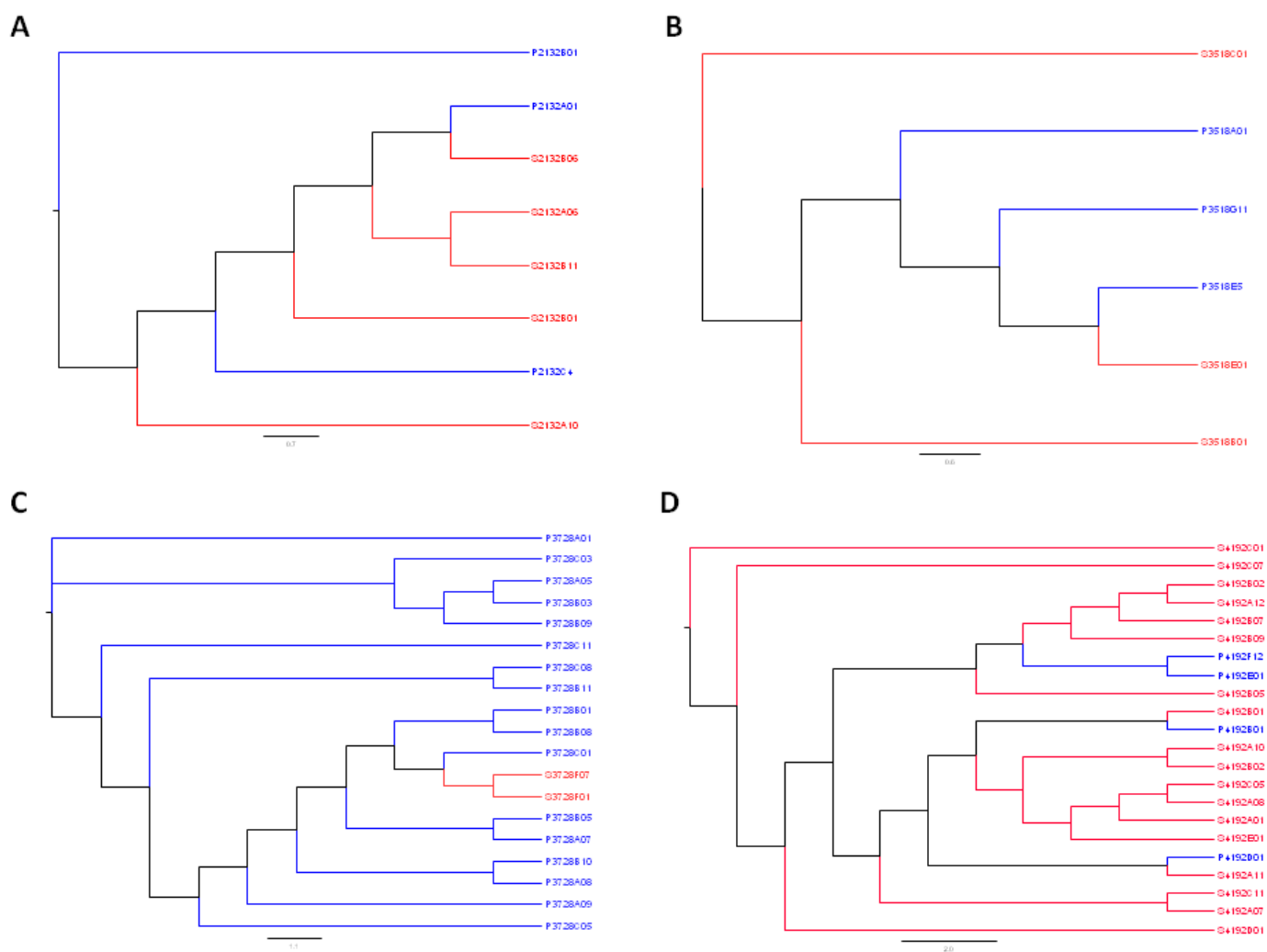


Figura 2.



6. DISCUSSÃO

A taxa de soroprevalência do HTLV entre mulheres infectadas pelo HIV foi similar a outro estudo que buscou objetivos similares, porém realizado na Amazônia, utilizando a mesma população (LAURENTINO *et al.*, 2005). Entretanto outro estudo realizado em Salvador (BRITES *et al.*, 1997), mostrou que esta soroprevalência foi 3 vezes maior que a encontrada, porém realizada em indivíduos de ambos sexos e quando demonstrada apenas em mulheres, esta prevalência aumentava para 4 vezes mais que o presente estudo. Esta diminuição pode ser devida a uma prevenção após esses anos de campanha contra DST/AIDS ou por uma prevalência menor da infecção pelo HTLV na cidade de Feira de Santana, Bahia.

A co-infecção foi relacionada a fatores de risco, como trabalhadoras do sexo e exposição parenteral. A mulher infectada pelo HTLV-2 tinha sido usuária de droga intravenosa em São Paulo, sugerindo que este vírus não seria endêmico na região, porém um controle epidemiológico é necessário para avaliar a sua disseminação nesta população. Por outro lado, uma mulher co-infectada não possuía fatores de risco associados, demonstrando que campanhas de prevenção a DST/AIDS são efetivas, mas nem sempre atingem toda a população.

Não foi encontrada correlação entre a contagem de células TCD4 e TCD8, carga viral e manifestações clínicas comparando as mulheres co-infectadas com as mulheres infectadas apenas pelo HIV-1, provavelmente devido ao número de mulheres co-infectadas do estudo.

A análise filogenética das seqüências LTR classificou todos os isolados do HTLV-1 como subtipo Cosmopolita do subgrupo transcontinental. Nosso estudo reforça, como descrito previamente (ALCANTARA *et al.*, 2006; KASHIMA *et al.*, 2006; MOTA *et al.*, 2007; REGO *et al.*, 2008; MAGALHÃES *et al.*, 2008), que o HTLV-1a, subgrupo transcontinental é a cepa circulante mais

prevalente na Bahia e no Brasil. Além disto, a presença de sequências LTR do HTLV-1 provenientes da Bahia em diferentes grupos na árvore filogenética sugere múltiplas introduções do HTLV-1 na população da Bahia.

Em um isolado, que se agrupou com outras sequências brasileiras, nós identificamos uma deleção de 10 pares de base, entre a primeira e a segunda repetição de 21 pares de base na região U3-LTR nas posições 130 a 139, no genoma de referência ATK (número de acesso: J02029), esta deleção 5'-AGCTCAGCAC-3', causa a perda de um sítio de metilação CpG, porém o seu impacto biológico pode não ser tão significativo tendo em vista que a região LTR do HTLV-1 possui outros 23 sítios de metilação CpG (KOIWA *et al.*, 2002). Além disto, por não se localizar em nenhum dos três TxRE, provavelmente não está envolvido com a ligação de fatores de transcrição, mas para saber o seu real efeito sobre a transcrição do HTLV-1 estudos funcionais adicionais são necessários.

Os resultados confirmam estudos anteriores (ALCANTARA *et al.*, 2006; KASHIMA *et al.*, 2006; MOTA *et al.*, 2007; REGO *et al.*, 2008; MAGALHÃES *et al.*, 2008) que sugerem introduções pós-Colombianas do HTLV-1 no estado da Bahia, através do tráfico de escravos entre os séculos XVI e XIX provenientes de regiões africanas. Diante deste resultado e de alguns fatos históricos, podemos sugerir que o subtipo Cosmopolita, subgrupo Transcontinental pode ter sido introduzido na população baiana por indivíduos infectados provenientes do Sul da África, tendo em vista que ambos os agrupamentos nos quais as sequências de HTLV da Bahia estão presentes, segregam com sequências provenientes da África do Sul. Estes dados mostram que o vírus encontrado na Bahia pode ter sido trazido para o Brasil também pelo tráfico de escravos, no mesmo período, provenientes do sul do continente africano. O agrupamento de isolados de Feira de Santana com outros isolados do Brasil e da África dá suporte a estas hipóteses.

Resultados anteriores sugerem que a infecção pelo HTLV-1, presente na América do Sul, é resultado de múltiplas introduções pós-colombianas, principalmente de linhagens virais da África. Porém torna-se difícil explicar a ausência em Salvador, na nossa análise filogenética e outras previamente publicadas, do subgrupo oeste africano, desde que a maioria dos africanos trazidos para a Bahia como escravos pertencia à região oeste da África, um fato que pode ser devido ao pequeno número de sequências isoladas nesta região.

Salvador, uma cidade próxima e similar a Feira de Santana, é uma cidade com 80% da população constituída por descendentes de africanos. A maioria dos africanos trazidos para a Bahia durante o tráfico de escravos foi proveniente do oeste da África, especificamente de Benin, da Nigéria e do norte de Angola. Entre os anos 1678 a 1810, não existem qualquer informação sobre o movimento de navios da África para a Bahia, pois toda a documentação histórica foi perdida. Entretanto, existem evidências que africanos foram trazidos para Bahia, durante o tráfico ilícito de escravos (entre o final do século XVII e início do século XIX), de outras regiões do continente sul africano, como o sul de Angola, Madagascar e Moçambique.

A análise filogenética da região LTR do HTLV-2, demonstra, como previamente descrito (ALCANTARA *et al.*, 2003), que as seqüências encontradas do HTLV-2 agrupam-se com as seqüências do subtipo 2a, com suporte estatístico por análise de *bootstrap* (75%). Este isolado formou um grupamento monofilético dentro do subtipo 2a com outras seqüências brasileiras, com suporte estatístico pelo algoritmo de ML, porém sem suporte pela análise de *bootstrap*, classificando-se como a variante brasileira do subtipo 2a, o subtipo 2c. De acordo com outro estudo filogenético do HTLV-2 na Bahia (ALCANTARA *et al.*, 2003), nossos dados sugerem uma única introdução do HTLV-2 em nossa população, provavelmente por infecções parenterais decorrentes de cidades do Sudeste, mas para

melhor entender sobre a disseminação do HTLV-2 em nossa população, mais seqüências precisam ser analisadas.

Quando as amostras foram analisadas filogeneticamente, nós não observamos nenhum perfil característico entre os clones de lavado bucal e PBMC pelas árvores de ML e NJ, entre as amostras do mesmo indivíduo, exceto para os clones de um paciente. Estas seqüências de PBMC se agruparam em grupo monofilético diferente quando comparado com as amostras de lavado bucal, porém poucos clones foram analisados, sendo necessário analisar um número maior de clones de lavado bucal deste paciente para confirmar este resultado. Mostrando, assim como as análises de panmixia, que os clones provenientes no lavado bucal são decorrentes de uma infiltração provável de linfócitos para a cavidade oral, porém para confirmar este resultado, a fenotipagem das células infectadas precisa ser realizada. Nós também observamos, como previamente descrito (MORTREUX *et al.*, 2001), uma diversidade genética viral baixa em um mesmo indivíduo, demonstrando de outra forma que a replicação do HTLV-1 ocorre devido a expansão clonal dos linfócitos T infectados, e não por um ciclo de replicação clássico dos retrovírus e que estas mutações estariam decorrendo devido ao efeito de *tax*.

Estudos mostram que a carga proviral é um fator de risco para o desenvolvimento da TSP/HAM, apesar de haverem exceções, ou seja, pacientes com carga proviral baixa puderem manifestar TSP/HAM, e da mesma forma indivíduos com carga proviral alta serem assintomáticos. Nós propomos aqui, que da mesma forma que a TSP/HAM, a presença de provírus em células de lavado bucal é decorrente de uma carga proviral alta em PBMC, porém para confirmar estes dados o número amostral precisa ser aumentado. Como nós observamos, assim como ocorre na TSP/HAM, temos indivíduos com alta e baixa carga proviral em ambos os grupos.

7. CONCLUSÃO

- A soroprevalência da co-infecção HIV/HTLV em Feira de Santana é baixa.
- O subtipo Cosmopolita do subgrupo Transcontinental é a cepa circulante em Feira de Santana, Bahia.
- Novas variantes do subtipo Cosmopolita do subgrupo Transcontinental do HTLV-1 estão emergindo.
- A cepa circulante do HTLV-2 na Bahia é a variante brasileira do subtipo 2a, a variante 2c.
- A carga proviral é estatisticamente maior nos indivíduos que possuem carga proviral para o HTLV-1 detectável no lavado bucal que aquelas onde a carga proviral foi indetectável neste líquido corpóreo.
- Não existem diferenças entre os clones circulantes no sangue periférico quando comparados com os clones presentes no lavado bucal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRECHT, B; LAIRMORE, MD. Critical role of human T-lymphotropic virus type 1 accessory proteins in viral replication and pathogenesis. **Microbiol Mol Biol Rev** 66:396-406, 2002.

ALCANTARA, LCJ; VAN DOOREN, S; GONÇALVES, MS; KASHIMA, S; COSTA, MC; SANTOS, FL; BITTENCOURT, AL; DOURADO, I; FILHO, AA; COVAS, DT; VANDAMME, AM; GALVÃO-CASTRO, B. Globin haplotypes of human T-cell lymphotropic virus type I-infected individuals in Salvador, Bahia, Brazil, suggest a post-Columbian African origin of this virus. **J Acquir Immune Defic Syndr** 33:536-542, 2003.

ALCANTARA, LC; DE OLIVEIRA, T; GORDON, M; PYBUS, O; MASCARENHAS, RE; SEIXAS, MO; GONÇALVES, M; HLELA, C; CASSOL, S; GALVÃO-CASTRO, B. Tracing the Origin of Brazilian HTLV-1 as determined by Analysis of Host and Viral genes. **AIDS** 20:780-782, 2006.

BANGHAM, CR; MEEKINGS, K; TOULZA, F; NEJMEDDINE, M; MAJOROVITS, E; ASQUITH, B; TAYLOR GP. The immune control of HTLV-1 infection: selection forces and dynamics. **Front Biosci** 1:14:2889-903, 2009.

BIGGAR, RJ; TAYLOR, ME; NEEL, JV; HJELLE, B; LEVINE, PH; BLACK, FL; SHAW, GM; SHARP, PM; HAHN, BH. Genetic variants of Human T-lymphotropic virus type II in American Indian groups. **Virology** 216:165-173, 1996.

BOXUS, M; TWIZERE, JC; LEGROS, S; DEWULF, JF; KETTMANN, R; WILLEMS, L. The HTLV-1 Tax interactome. **Retrovirology** 5:76, 2008.

BRITES, C; HARRINGTON, WJ Jr; PEDROSO, C; NETTO EM; BADARÓ, R. Epidemiological characteristics of HTLV-I and II coinfection in Brazilian subjects infected by HIV-1. **Braz J Infect Dis** 1:43-48, 1997.

CATALAN-SOARES, B; CARNEIRO-PROIETTI, AB; PROIETTI FA. Vírus-T linfotrópico humano em familiares de candidatos a doação de sangue soropositivos: disseminação silenciosa. **Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health** 16(6):387-394, 2004.

CHEN, J; ZEKENG, L; YAMASHITA, M; TAKEISHA, J; MIURA, T; IDO, E; MBOUDJEKA, I; TSAGUE, JM; HAYAMI, M; KAPTUE L. HTLV isolated from a Pygmy in Cameroon is related but distinct from the known Central African type. **AIDS Res Hum Retroviruses** 11:1529-1531, 1995.

CIMINALE, V; PAVLAKIS, GN; DERSE, D; CUNNINGHAM, CP; FELBER, BK. Complex splicing in the human T-cell leukemia virus (HTLV) family of retroviruses: novel mRNAs and proteins produced by HTLV type 1. **J Virol** 66:1737-1745, 1992.

COLLINS, ND; NEWBOUND, GC; ALBRECHT, B; BEARD, JL; RATNER, L; LAIRMORE, MD. Selective ablation of human T-cell lymphotropic virus type 1 p12I reduces viral infectivity in vivo. **Blood** 91:4701-4707, 1998.

DEHÉE, A; CÉSAIRE, R; DÉsirÉ, N; LÉZIN, A; BOURDONNÉ, O; BÉRA, O; PLUMELLE, Y; SMADJA, D; NICOLAS, JC. Quantitation of HTLV-I proviral load by a TaqMan real-time PCR assay. **Journal of Virological Methods** 102:37–51, 2002.

DOURADO, I; ALCANTARA, LCJ; BARRETO, ML; DA GLORIA, TM; GALVAO-CASTRO, B. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. **J Acquir Immune Defic Syndr** 34(5):527-531, 2003.

EIRAKU, N; NOVOA, P; DA COSTA FERREIRA, M; MONKEN, C; ISHAK, R; DA COSTA FERREIRA, O; ZHU, SW; LORENCO, R; ISHAK, M; AZVEDO, V; GUERREIRO, J; DE 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. **J Virol** 70(3):1481-92, 1996.

FUKUMOTO, R; ANDRESEN, V; BIALUK, I; CECCHINATO, V; WALSER, JC; VALERI, VW; NAUROTH, JM; GESSAIN, A; NICOT, C; FRANCHINI, G. In vivo genetic mutations define predominant functions of the human T-cell leukemia/lymphoma virus p12I protein. **Blood** 113:3726-3734, 2009.

GASMI, MB; FAROUQI, M; D'INCAN, C. Desgranges. Long terminal repeat sequence analysis of HTLV type I molecular variants identified in four north African patients. **AIDS Res Hum Retroviruses** 10:1313-15, 1994.

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

GESSAIN, A; YANAGIHARA, R; FRANCHINI, G; GARRUTO, RM; JENKINS, CL; AJDUKIEWICZ, AB; GALLO, RC; GAJDUSEK, DC. Highly divergent molecular variants of human T-lymphotropic virus type from isolated populations in Papua New Guinea and the Solomon Islands. **Proc Natl Acad Sci USA** 88:7694-7698, 1991.

GESSAIN, A & DE THE, G. Geographic and molecular epidemiology of primate T lymphotropic retroviruses: HTLV-I, HTLV-II, STLV-I, STLVPP, and PTLV-L. **J Acq Immun Def Synd Hum Retrovirol** 13 Suppl 1:S228–S235, 1996.

HAHN, BH; SHAW, GM; POPOVIC, MLO, MONICO, A; GALLO, RC; WONG-STAAAL, F. Molecular cloning and analysis of a new variant of human T-cell leukemia virus (HTLV-Ib) from an African patient with adult T-cell leukemia-lymphoma. **Int J Cancer** 34:613-618, 1984.

HANCHARD, B; GIBBS, WN; LOFTERS, W; CAMPBELL, M; WILLIAMS, E; WILLIAMS, N; JAFFE, E; CRANSTON, B; PANCHOOSINGH, LD; LAGRENADE, L; WILKS, R; MURPH, E; BLATTNER, W; MANNS, A. Human Retrovirology: HTLV. Blattner WA (ed). **Raven Press: New York** 173–183, 1990.

IJICHI, S; IZUMO, S; EIRAKU, N. An autoagressive process against bystander tissues in HTLV-I-infected individuals: a possible pathomechanism of HAM/TSP. **Medical Hypotheses** 41:542-547, 1993.

ISHAK, R; VALLINOTO, ACR; AZEVEDO, VN; ISHAK, MOG. The epidemiological aspects of retrovirus (HTLV) infections among Indian populations of the Amazon region of Brazil. **Cad Saúde Pública** 19:901-914, 2003.

JACOB, F; SANTOS-FORTUNA, E; AZEVEDO, RS; CATERINO-DE-ARAÚJO, A. Serological patterns and temporal trends of HTLV-1/2 infection in high-risk populations attending Public Health Units in São Paulo, Brazil. **J Clin Virol** 42(2):149-55, 2008.

JACOBSON, S. Immunopathogenesis of human T-cell lymphotropic virus type I-associated neurologic disease. **J Infect Dis** 186(2):187-192, 2002.

KALYANARAMAN, VS; SARNGADHARAN, MG; ROBERT-GUROFF, M; MIYOSHI, I; GOLDE, D; GALLO, RC. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. **Science** 218(4572):571-573, 1982.

KASHIMA, S; ALCANTARA, LC; TAKAYANAGUI, OM; CUNHA, MA; CASTRO, BG; POMBO-DE-OLIVEIRA, MS; ZAGO, MA; COVAS, DT. Distribution of human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) subtypes in Brazil: genetic characterization of LTR and tax region. **AIDS Res Hum Retroviruses** 22:953-959, 2006.

KHABBAZ, RF; ONORATO, IM; CANNON, RO; HARTLEY, TM; ROBERTS, B; HOSEIN, B; KAPLAN JE. Seroprevalence of HTLV-1 and HTLV-2 among intravenous drug users and persons in clinics for sexually transmitted diseases. **N Engl J Med** 326:375–80, 1992.

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

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

KUMAR, S; TAMURA, K; NEI, M. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers. **Cabios** 10:189-191, 1994.

LA GRENADE, L. HTLV-I-associated infective dermatitis: past, present, and future. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol** 13 Suppl 1:S46-49, 1996.

LAIRMORE, MD; JACOBSON, S; GRACIA, F; DE, BK; CASTILLO, L; LARREATEGUI, M; ROBERTS, BD; LEVINE, PH; BLATTNER, WA; KAPLAN, JE. Isolation of human T-cell lymphotropic virus type II from Guaymi Indians in Panama. **Proc Natl Acad Sci USA** 87:8840-8844, 1990.

LAURENTINO, RV; LOPES, IG; AZEVEDO, VN; MACHADO, LF; MOREIRA, MR; LOBATO, L; ISHAK, MO; ISHAK, R; VALLINOTO, AC. Molecular characterization of human T-cell lymphotropic virus coinfecting human immunodeficiency virus 1 infected patients in the Amazon region of Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 100(4):371-6, 2005.

MAGALHÃES, T; MOTA-MIRANDA, AC; ALCANTARA, LC; OLAVARRIA, V; GALVÃO-CASTRO, B; RIOS-GRASSI, MF. Phylogenetic and molecular analysis of HTLV-1 isolates from a medium sized town in northern of Brazil: tracing a common origin of the virus from the most endemic city in the country. **J Med Virol** 80(11):2040-5, 2008.

MANEL, N; KINET, S; JIM, FJ; TAYLOR, N; SITBON, N; BATTINI, JL. GLUT-1 is the receptor of retrovirus HTLV. **Med Sci** 20(3):277-279, 2004.

MANNS, A; HISADA, M; LA GRENADE, L. Human T lymphotropic virus type I infection. **Lancet** 353:1951-8, 1999.

MATSUOKA, M. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) infection and the onset of adult T-cell leukemia (ATL). **Retrovirology** 2:27, 2005.

MATSUOKA, M & JEANG, KT. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. **Nature** 7:2007.

MCCALLUM, RM; PATEL, DD; MOORE, JO; HAYNES, BF. Arthritis syndromes associated with human T cell lymphotropic virus type I infection. **Medical Clinics of North America** 81:261-276, 1997.

MIURA, T; FUKUNAGA, T; IGARASHI, T; YAMASHITA, M; IDO, E; FUNAHASHI, S; ISHIDAC, T; WASHIO, K; UEDAC, S; HASHIMOTO, K; YOSHIDA, M; OSAME, M; SINGHAL, BS; ZANINOVIC, V; CARTIER, L; SONODA, S; TAJIMA, K; INA, Y; GOJOBORI, T; HAYAMI, M. Phylogenetic subtypes of human T-lymphotropic virus type I and their relations to the anthropological background. **Proc Natl Acad Sci USA** 91:1124-1127, 1994.

MIYOSHI, I; SAWADA, T; IWAHARA, Y; ISHII, K; KUBONISHI, I; TAGUCHI, H. Excretion of HTLV-I in saliva. **JAMA** 267(2):236, 1992.

MOCHIZUKI, M; ONO, A; IKEDA, E; HIKITA, N; WATANABE, T; YAMAGUCHI, K; SAGAWA, K; ITO, K. HTLV-I uveitis. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol** 13 Suppl 1:S50-56, 1996.

MOTA, AC; VAN DOOREN, S; FERNANDES, FM; PEREIRA, SA; QUEIROZ, AT; GALAZZI, VO; VANDAMME, AM; GALVÃO-CASTRO, B; ALCANTARA, LC. The close relationship between South African and Latin American HTLV type 1 strains corroborated in a molecular epidemiological study of the HTLV type 1 isolates from a blood donor cohort. **AIDS Res Hum Retroviruses** 23(4):503-507, 2007.

MUELLER, N. The epidemiology of HTLV-I infection. **Cancer Causes Control** 2(1):37-52, 1991.

NAGAI, M; BRENNAN, MB; SAKAI, JA; MORA, CA; JACOBSON, S. CD8+ T-cells are an in vivo reservoir for human T-cell lymphotropic virus type I. **Blood** 98:1858-1861, 2000.

NEEL, JV; BIGGAR, RJ; SUKERNIK, RI. Virologic and genetic studies related Amerindian origins to the indigenous people of the Mongolia/ Manchuria/ southeastern Siberia region. **Proc Natl Acad Sci USA** 91:10737-10741, 1994.

NICHOLAS, KB; NICHOLAS, HBJ, DEERFIELD, DW. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. **Embnew News** 4:14, 1997.

NISHIOKA, K. HTLV-I arthropathy and Sjogren syndrome. **J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol** 13 Suppl 1:S57-62, 1996.

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

OSAME, M. Pathological Mechanisms of human T-cell lymphotropic virus type I associated myelopathy (HAM-TSP). **J Neurovirol** 8 (5):359-364, 2002.

POIESZ, BJ; RUSCETTI, FW; GAZDAR, AF; BUNN, PA; MINNA, JD; GALLO, RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proc Natl Acad Sci USA** 77:7415-7419, 1980.

POSADA, D & CRANDALL KA. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics** 14:817-818, 1998.

REGO, FFA; ALCANTARA, LCJ; MOURA NETO, JP; MOTA-MIRANDA, ACA; PEREIRA, OS; GONÇALVES, MS; GALVÃO-CASTRO, B. HTLV-1 molecular study in Brazilian villages with African characteristics giving support to the post-Columbian introduction hypothesis. **AIDS Res and Huma Retrov** 24(5):673-677, 2008.

SANTOS, FLN & LIMA, FWM. Epidemiologia, fisiopatogenia e diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV-I • **J Bras Patol Med Lab** 41(2):105-16, 2005.

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

TAYLOR, GP. Pathogenesis and treatment of HTLV-1 associated myelopathy. **Sex Transm Inf** 74:316-322, 1998.

TEDDER, RS; SHANSON, DC; JEFFRIES, DJ; CHEINGSONG-POPOV, R; CLAPHAM, P; DALGLEISH, A; NAGY, K; WEISS, RA. Low prevalence in the UK of HTLV-I and HTLV-II infection in subjects with AIDS, with extended lymphadenopathy, and at risk of AIDS. **Lancet** 2(8395):125-8, 1984.

TSUJIMOTO, A; TERUUCHI, T; IMAMURA, J; SHIMOTOHNO, K; MIYOSHI, I; MIWA M. Nucleotide sequence analysis of a provirus derived from HTLV-1 associated myelopathy (HAM). **Mol Biol Med** 5:29-42, 1988.

VAN DOOREN, S; GOTUZZO, E; SALEMI, M; WATTS, D; AUDENAERT, E; DUWE, S; ELLERBROK, H; GRASSMANN, R; HAGELBERG, E; DESMYTER, J; VANDAMME, AM. Evidence for a post-Columbian introduction of HTLV-I in Latin America. **J Gen Virol** 79:2695-2708, 1998.

VANDAMME, AM; SALEMI, M; VAN BRUSSEL, M; LIU, HF; VAN LAETHEM, K; VAN RANST, M; MICHELS, L; DESMYTER, J; GOUBAU, P. African origin of human T-lymphotropic virus type 2 (HTLV-2) supported by a potential new HTLV-2d subtype in Congolese Bambuti Efe Pygmies. **J Virol** 72(5):4327-4340, 1998.

VERGER, P. Flux et reflux de la traite des nègres entre le Golfe de Benin et Bahia de Todos os Santos. Mouton, Paris. 1987.

VIANA FILHO, L. O negro na Bahia. 31-224. Nova Fronteira (3^aed), Rio de Janeiro, Brasil, 1988.

VIGNOLI, C; ZANDOTTI, C; DE LAMBALLERIE, X; TAMALET, C; GASTAUT, JA; DE MICCO, P. Prevalence of HTLV-II in HIV-1-infected drug addicts in Marseille. **Eur J Epidemiol** 9(3):351-2, 1993.

WOLFE, ND; HENEINE, W; CARR, JK; GARCIA, AD; SHANMUGAM, V; TAMOUFE, U; TORIMIRO, JN; PROSSER, AT; LEBRETON, M; MPOUDI-NGOLE, E; MCCUTCHAN, FE; BIRX, DL; FOLKS, TM; BURKE, DS; SWITZER, WM. Emergence of unique primate T-Lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. **Proc Natl Acad Sci USA** 22:7994-7999, 2005.

XIA X. Dambe: Data analysis in molecular biology and evolution. Hong Kong: Department of Ecology and Biodiversity, University of Hong Kong, 2000.

YAMAMOTO, T; TERADA, K; NISHIDA, N; MORIUCHI, R; SHIRABE, S; NAKAMURA, T; TSUJI, Y; MIYAMOTO, T; KATAMINE, S. Inhibitory Activity in Saliva of Cell-to-Cell Transmission of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 In Vitro: Evaluation of Saliva as an Alternative Source of Transmission. **Journal of Clinical Microbiology** 33(6):1510–1515, 1995.

YOSHIDA, M; MIYOSHI, I; HINUMA, Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. **Proc Natl Acad Sci USA** 79(6):2031-5, 1982.

ZELLA, D; MORI, L; SALA, M; FERRANTE, P; CASOLI, C; MAGNANI, G; ACHILLI, G; CATTANEO, E; LORI, F; BERTAZZONI, U. HTLV-II infection in Italian drug abusers. **Lancet** 336(8714):575-6, 1990.