

**FIOCRUZ**  
**MINISTÉRIO DA SAÚDE**  
**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

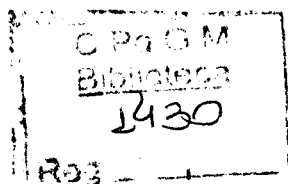
**Doutorado em Biologia Celular e Molecular**

**Estudo do polimorfismo genético dos vírus linfotrópicos de células-T humanas dos tipos I e II (HTLV-I e HTLV-II) em Salvador, Bahia, Brasil e em tribos indígenas brasileiras.**

**Luiz Carlos Júnior Alcântara**

**SALVADOR - BAHIA**

**Março de 2002**



MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR

**ESTUDO DO POLIMORFISMO GENÉTICO DOS VÍRUS  
LINFOTRÓPICOS DE CÉLULAS-T HUMANAS DOS TIPOS I E II  
(HTLV-I E HTLV-II) EM SALVADOR, BAHIA, BRASIL E EM TRIBOS  
INDÍGENAS BRASILEIRAS.**

**LUIZ CARLOS JÚNIOR ALCÂNTARA**

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de Doutor em Ciências na área de Biologia Celular e Molecular. Trabalho realizado no Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP), Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ/BA.

**Professor Orientador: Dr. Bernardo Galvão Castro Filho**

**SALVADOR – BAHIA**

**Março, 2002**

**Ficha catalográfica elaborada na Biblioteca do Centro de  
Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ – Salvador - Bahia**

A347e Alcântara, Luiz Carlos Junior  
Estudo do polimorfismo genético dos vírus linfotrópicos de células-T humanas dos tipos I e II (HTLV-I e HTLV-II) em Salvador, Bahia, Brasil e em tribos indígenas brasileiras / Luiz Carlos Júnior Alcântara. - Salvador : Fundação Oswaldo Cruz / Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / Laboratório Avançado de Saúde Pública, 2002.  
213 f.: il.

Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) -  
Fundação Oswaldo Cruz / Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz,  
2002

1. HTLV-1. 2. HTLV-II. 3. Polimorfismo. 4. Bahia  
(Salvador). Título.

CDU: 616.988.2(813.8)

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Luiz Alcântara Santos e Maria Rosa Alcântara pelos exemplos de força de vontade, honestidade e perseverança, assim como pelo apoio sempre disponível para a realização de cada passo por mim escolhido e ao meu pai científico, **Bernardo Galvão Castro Filho**, que além de dar-me a oportunidade de trabalhar no LASP, em seu laboratório, e ter sido um grande orientador, professor e amigo, despendeu, pacientemente, muitas horas ensinando-me os segredos do estudo epidemiológico dos retrovírus. Suas idéias e discussões sobre o passado, presente e futuro do HTLV-I e do HTLV-II fez-me ficar muitas noites pensando neles.

À Dra. Anne-Mieke Vandamme, minha professora e amiga, deixo o meu especial obrigado. Foi trabalhando no seu laboratório, no Rega Institute, em Leuven, Bélgica, que consegui todo o "background" científico em filogenia e evolução dos retrovírus humanos. O meu agradecimento também à Sonia Van Dooren, minha amiga e pesquisadora deste laboratório, pelas muitas horas gastas, contando-me histórias sobre a evolução do HTLV-I e do STLV-I.

Ao meu melhor amigo, José Geraldo Vasconcelos Teixeira, pela sua paciência, além da sua grande capacidade em transmitir força e determinação, desta forma contribuindo para o meu amadurecimento pessoal e profissional.

Às minhas amigas, Maria Cristina Ramos Costa e Simone Kashima, pesquisadoras da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, que durante todos esses anos, trabalharam comigo em vários projetos, que são agora parte fundamental desta tese. Suas discussões e criticismos foram sempre um grande incentivo para o meu trabalho.

Aos meus alunos Fred Luciano Neves Santos, Eraldo Tavares Madureira, César Augusto Machado e Jamile Leon Rêgo, que contribuíram para a realização deste trabalho, assim como, deram-me a oportunidade de tornar útil os conhecimentos que adquiri, na minha carreira científica.

À amiga e pesquisadora do CPqGM Marilda Gonçalves pela grande colaboração na caracterização genotípica da  $\beta$ -globina dos indivíduos infectados com o HTLV-I, incluídos nesta tese, além da excelente revisão deste trabalho.

Às minhas mães do LASP, Maria Eugênia Góes e Elisabeth Deliége, pela amizade, apoio administrativo e por estarem sempre dispostas a ajudar.

À Noilson Lázaro e Jurema Carrilho, do LASP, e Roberta Carrilho, da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, pela amizade e apoio na sorologia, na separação de PBMCs e sequenciamento de DNA, respectivamente, das amostras aqui estudadas.

Aos Drs. Antônio Andrade Filho, Achileia Bittencourt, Inês Dourado e Tarcísio Andrade pela colaboração firmada com o LASP, permitindo assim obtermos as amostras utilizadas neste trabalho.

Ao Dr. Marco Salemi, pela grande ajuda e conhecimentos filogenéticos dispensados a mim em todos os trabalhos sobre HTLV-II.

À Dra. Glória Teixeira e Dr. Maurício Barreto, que através do projeto Bahia Azul nos forneceu parte das amostras utilizadas neste trabalho.

Ao Sr. Antônio Teva, pelas amostras de sangue colhidas nas tribos indígenas.

Às colegas Angelina Acosta e Elisabeth Mascarenhas aos quais desejo ressaltar minha especial gratidão pelo apoio sempre presente e pela amizade preciosa que conquistei.

À todos os amigos e colegas do LASP, Rega Institute e Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, pela excelente convivência que fazem destes laboratórios ambientes especialmente agradáveis e receptivos, sem perderem o caráter profissional. Agradeço também ao carinho e disponibilidade das funcionárias da secretaria da pós-graduação em Biologia Celular e Molecular/IOC, Cleide e Eliete.

À Fundação para o Desenvolvimento das Ciências/Faculdade Bahiana de Medicina e Saúde Pública por ter me acolhido a partir do momento em que fiquei sem bolsa, propiciando-me continuar o meu curso de doutorado.

À Dra. Nice Shindo, pelas dicas dadas no primeiro ano do meu doutoramento e pela participação na tradução para o inglês dos manuscritos nº 2 e nº 3.

Ao Mário, funcionário do CVDC/CPqGM, pela ajuda na edição desta tese.

Ao pesquisador Antoine Talarmin, por ter cedido os primers LTR, usados no início dos experimentos constantes no manuscrito nº 1 e nº 3.

Ao Diretor do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Dr. Mitermayer Gaivão dos Reis que, através da sua competente administração, propiciou condições de trabalho e estudo no CPqGM.

Aos órgãos financiadores CNPq, CADCT e CN/DST/AIDS-Ministério da Saúde.

A todos aqueles que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	2
<b>INTRODUÇÃO</b>	3
Origem africana do HTLV	8
Morfologia do HTLV	9
O ciclo de vida do HTLV	11
Estrutura genética do HTLV	14
Patologia do HTLV	20
Epidemiologia do HTLV	30
Vias migratórias dos hospedeiros do HTLV e STLV	38
Heterogeneidade genética do HTLV	46
HTLV-I e HTLV-II no Brasil	52
Métodos filogenéticos moleculares	54
<b>RACIONAL</b>	61
<b>OBJETIVOS</b>	66
<b>RESUMO DOS RESULTADOS</b>	68
<b>DISCUSSÃO</b>	73
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	83
<b>MANUSCRITOS</b>	133



## RESUMO

Poucos estudos analisaram a diversidade genética de HTLV em Salvador que têm características sócio-demográficas similares a algumas cidades africanas e apresenta a mais elevada prevalência para o HTLV-I (1,35%) em doadores de sangue do Brasil. Nós investigamos a real prevalência nesta população, 1,76% (23/1385). As taxas de infecção foram 1,2% e 2,0% para homens e mulheres, respectivamente, que aumentou com a idade. Quando nós analisamos uma coorte constituída por gestantes, encontramos uma freqüência de 0,9% (57 de 6754). Através de análise filogenética de parte do gene LTR viral, nós investigamos na população geral, gestantes, indivíduos com HAM/TSP e UDIs os subtipos de HTLV-I circulantes em Salvador. Demonstramos que a maioria das amostras pertence ao grupo da América Latina, subgrupo A (subtipo a). RFLP de fragmentos gênicos da globina  $\beta$  em 34 destes indivíduos demonstrou que 29.4% dos cromossomos são do haplótipo tipo CAR (Banto), sugerindo que Salvador recebeu também africanos do sul da África durante o tráfico de escravos. Assim, nossos resultados corroboram as hipóteses de múltiplas introduções pós-Colombianas do subgrupo A em Salvador. Nós também analisamos o polimorfismo do HTLV-II em UDIs de Salvador e demonstramos que a maioria deles está relacionada à variante molecular Brasileira do subtipo IIa. Assim, demonstramos pela primeira vez no Brasil a presença de um subtipo IIa, de UDIs, relacionado aos isolados IIa da América do Norte/Europa. Para investigar aspectos da epidemiologia molecular das infecções causadas pelos HTLV-I, HTLV- II, e HIV-1 em populações indígenas brasileiras, testamos 683 e 321 soros de índios das tribos Tiriyo e Waiampi, respectivamente. As infecções pelo HIV-1 e HTLV-II foram detectadas com prevalências muito baixas entre os Tiriyo, enquanto somente HTLV-I estava presente, com baixa prevalência, entre o Waiampis. Análise filogenética do gene *env* do HTLV-II isolado dos Tiriyo mostrou que estas seqüências se agrupam mais próximas dos isolados de HTLV-II de UDIs que vivem em áreas urbanas do sul do Brasil, do que aos isolados da tribo Kayapo. Isto confirma que a maioria das cepas brasileiras de HTLV-IIa compreende um grupo filogenético com um considerável grau de diversidade.

## ABSTRACT

Few studies have analyzed the genetic diversity of HTLV in Salvador that have sociodemographic characteristics similar to some African cities and presents the highest HTLV-I prevalence rate (1.35%) of the Brazil. We investigated the real HTLV-I prevalence in the Salvador population and demonstrated the overall prevalence of 1.76% (23/1385). The Infection rates were respectively 1.2% and 2.0% for males and females. Specific seroprevalence shows a trend with increasing age. When we analyzed the pregnant women cohort, we found a frequency relatively high (57 of 6754 women). We also studied in other cohort the circulating HTLV-I strains in Salvador and the phylogenetic analysis from part of the LTR fragments showed that most of the samples belongs to the Latin American cluster of the subgroup A (subtype a). The  $\beta$ -globin RFLP in 34 of these individuals demonstrated that 29,4% of the chromosomes are CAR-haplotype (Bantu) suggesting that Salvador also received slaves from South Africa in the Atlantic slave trade. In addition, our results support the hypotheses of multiple post-Colombian introductions of African HTLV-Ia strains in Salvador. We also analyzed the HTLV-II polymorphism in IDUs from Salvador and demonstrated that the majority of them are related to the subtype IIa Brazilian molecular variant. Interestingly, we demonstrated for the first time in Brazil the presence of a subtype IIa, from IDUs, closely related to the isolates from North America/Europe. To investigate serological, epidemiological and molecular aspects of HTLV-I, HTLV- II, and HIV-1 infections in Amerindian populations in Brazil, we tested 683 and 321 sera from Tiriyo and Waiampi Indians respectively. Both HIV-1 and HTLV-II infections were detected in very low prevalences among the Tiriyo while only HTLV-I was present among the Waiampis, also in low prevalence. Phylogenetic analyze of HTLV-II-*env* gene from Tiriyo Indians showed that these sequences cluster closer to HTLV-II isolates from IDUs living in urban areas of Southern Brazil than the isolates from another Brazilian tribe, the Kayapos. Our results confirm that most of the HTLV-IIa Brazilian strains comprise a phylogenetic group harboring a considerable degree of diversity.

## I. INTRODUÇÃO.

Os retrovírus são patógenos que infectam várias espécies de vertebrados, principalmente aves e mamíferos, incluindo os humanos. Possuem importância na patologia humana e veterinária e constituem agentes etiológicos de diversas doenças que acometem seres humanos e outros animais: neoplasias malignas, doenças neurológicas e hematológicas e imunodeficiências, entre outras (Dulbecco, 1988; Hehlmann e Erfle, 1991).

Pertencendo à família Retroviridae, utilizam a enzima transcriptase reversa para síntese de uma fita de DNA complementar (cDNA) a partir do RNA viral. Baseada nas suas estruturas morfológicas e patologias associadas, a família Retroviridae é composta das subfamílias Oncovirinae, Lentivirinae e Spumavirinae (Teich, 1982).

A subfamília Oncovirinae é formada por oncovírus e também por alguns vírus não-oncogênicos (Andrada-Serpa, 1994). Além do vírus linfotrópico de células humanas do tipo I (HTLV-I) e do tipo II (HTLV-II), pertencem a esta subfamília o vírus do sarcoma de Rous (RSV), o vírus de leucoses aviárias (ALV), o vírus do tumor mamário murino (MMTV), o vírus da leucemia felina (FeLV), o vírus do sarcoma símio (SiSV), o vírus Mason-Pfizer de macacos (MPMV), o vírus da leucemia bovina (BLV), entre outros.

A subfamília Lentivirinae é formada pelos lentivírus (vírus lentos) que causam doenças crônicas, como os vírus das imunodeficiências humanas (HIV-1 e HIV-2) que causam a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), o vírus Visna-Maedi que causa encefalite ou pneumonia em ovelhas, o vírus da artrite-

encefalite caprina (CAEV), o vírus da anemia infecciosa eqüina (EIAV), o vírus da imunodeficiência símia (SIV), e outros.

Finalmente, a subfamília Spumavirinae é formada pelos vírus espumosos, que não estão associados a nenhuma doença conhecida. Estes vírus foram descritos em primatas, felinos, hamsters, bovinos e também em seres humanos.

Recentemente, a classificação taxonômica (Fig. 1) baseada na análise filogenética foi proposta (Coffin, 1992). Esta classificação foi obtida da similaridade das regiões conservadas nas seqüências dos aminoácidos da transcriptase reversa, visto que não existe nenhuma similaridade nas seqüências dos nucleotídeos entre as espécies (Doolittle e colaboradores, 1990).

O primeiro retrovírus a ser descoberto, o RSV, foi descrito em 1911 como o agente que causava sarcomas em galinhas (Rous, 1911). A demonstração em animais, como galinhas e ratos, que certos retrovírus poderiam agir na etiologia do câncer levou à procura de outros vírus relacionados em humanos. A descoberta do primeiro retrovírus humano, o vírus espumoso humano (HFV, "human foamy vírus") (rev. Andrada-Serpa, 1994), não provocou grande interesse científico, por ser aparentemente não-patogênico. Entretanto, uma resposta muito diferente veio com a descoberta em 1980 do vírus da leucemia de célula-T humana do tipo I (HTLV-I) e a demonstração que o HTLV-I era o agente etiológico da leucemia de célula-T do adulto (Poiesz e colaboradores, 1980; Yoshida e colaboradores, 1982).

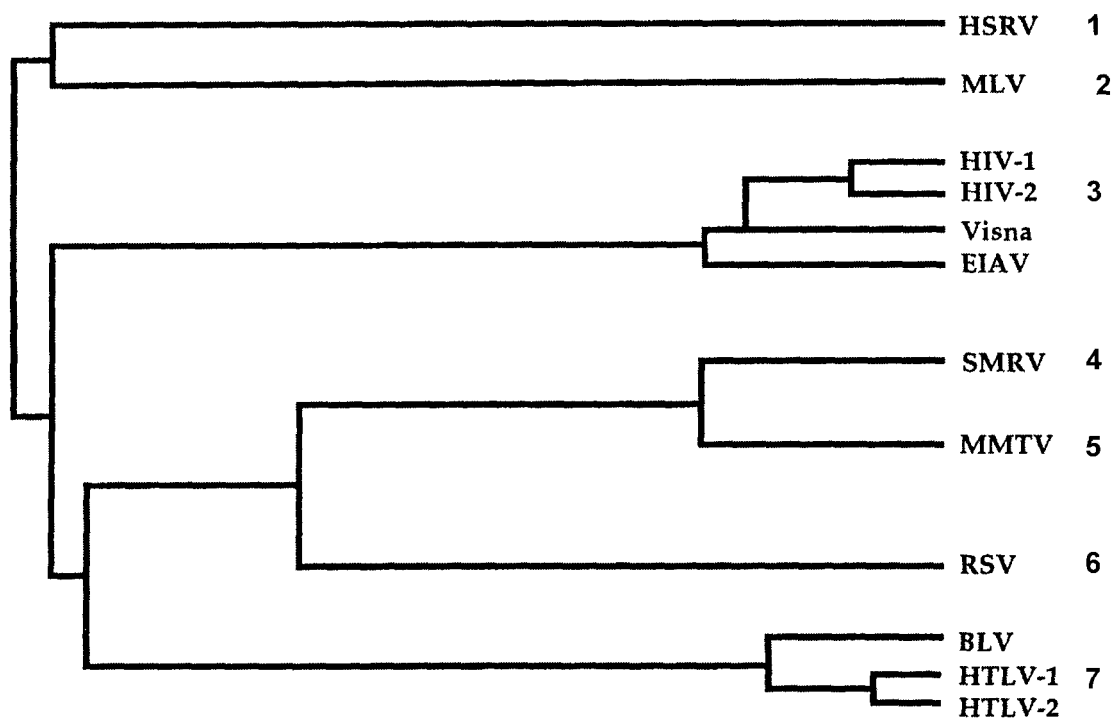
Posteriormente, foi descoberto o vírus linfotrópico de célula-T humana do tipo II (HTLV-II), isolado a partir de células brancas de um portador de leucemia de células pilosas do tipo T (Kalyanaraman e colaboradores, 1982). Entretanto, a associação do vírus com a manifestação clínica não foi demonstrada até o

momento, apesar da existência de alguns casos de doenças neurológicas relacionadas ao HTLV-II.

Em 1981 foram descritos os primeiros casos de imunodeficiências incomuns a partir da ocorrência de doenças anteriormente raras, tais como pneumonia causada por *Pneumocystis carinii* e sarcoma de Kaposi num grupo de homossexuais masculinos previamente saudáveis (Gottlieb e colaboradores, 1981). O padrão epidemiológico desta imunodeficiência sugeria o envolvimento de um agente infeccioso. Em 1983, Barré-Sinoussi e colaboradores isolaram um vírus desconhecido com atividade retro-transcricional a partir do linfonodo de um indivíduo com linfoadenopatia persistente. Este vírus foi denominado vírus associado a linfoadenopatia (LAV). Gallo e colaboradores (1983) caracterizaram um retrovírus humano distinto dos previamente descritos HTLV-I e HTLV-II, que foi denominado HIV. Paralelamente, Levy e colaboradores (1984) isolaram a partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), um retrovírus associado à AIDS. Estes três isolados virais apresentavam características similares e foram posteriormente reconhecidos como pertencentes à subfamília Lentivirinae. Finalmente em 1986, o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus recomendou a designação de vírus da imunodeficiência humana (HIV) para o vírus causador da AIDS (Coffin, 1995; Barre-Sinoussi, 1996).

Retrovírus são vírus de RNA com ciclos de vida diferentes dos outros vírus líticos. Quando eles infectam células-alvo, seus genomas formados de RNA são convertidos em DNA pela enzima viral transcriptase reversa, uma DNA polimerase dependente de RNA. O DNA viral é então integrado ao genoma do hospedeiro, duplicando junto com DNA do hospedeiro durante a divisão celular. Este provírus

integrado é transcrito em RNA viral a partir de uma região promotora localizada na extremidade do genoma proviral, sendo este RNA responsável pela produção das proteínas virais e como RNA genômico para a produção de novas partículas virais. Eles receberam mais atenção que outros vírus nos últimos anos por se comportarem como patógenos humanos importantes. Entretanto o ciclo de replicação dos retrovírus tornou-se de grande interesse científico, em relação à biologia molecular, interação vírus-hospedeiro e evolução molecular. Mais recentemente, a história evolutiva do HTLV-I e do HTLV-II está sendo estudada não somente para compreender a evolução viral, mas também como um princípio de monitoramento da transmissão viral e migrações das populações humanas desde os tempos pré-históricos (Gessain e colaboradores, 1992). Os HTLV-I e HTLV-II são vírus antigos que infectam populações humanas desde milhares de anos atrás e possuem estabilidade genômica alta, fazendo deles ótimos marcadores moleculares para traçar as migrações das populações antigas.



**Figura 1.** Classificação dos retrovírus. O painel acima representa a relação filogenética das proteínas transcriptases reversas de retrovírus representativos (adaptado de Coffin, 1992): (1) vírus espumoso humano e vírus espumoso símio, representando os Espumavírus; (2) vírus da leucemia murina, representando os MLV-relacionados; (3) representando os Lentivírus; (4) vírus do macaco-esquilo; (5) vírus do tumor mamário de Mous; (6) vírus do sarcoma de Rous, representando os vírus ALV-relacionados e (7) representando os vírus BLV-HTLV.

O HTLV-I e o HTLV-II possuem organizações genômicas idênticas e similaridade nucleotídica entre 65 a 70% e se caracterizam pela estabilidade genômica alta. O HTLV-I está associado com a leucemia/linfoma de células-T do adulto (ATLL) (Yoshida e colaboradores, 1982) e paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-I (TSP/HAM) (Gessain e colaboradores, 1985; Osame e colaboradores, 1986). O HTLV-II parece estar associado a desordens neurológicas (Hall e colaboradores, 1994, 1996; Murphy e colaboradores, 1993 e 1997a; Mena-Barreto e colaboradores, 2001).

### **Origem Africana do HTLV.**

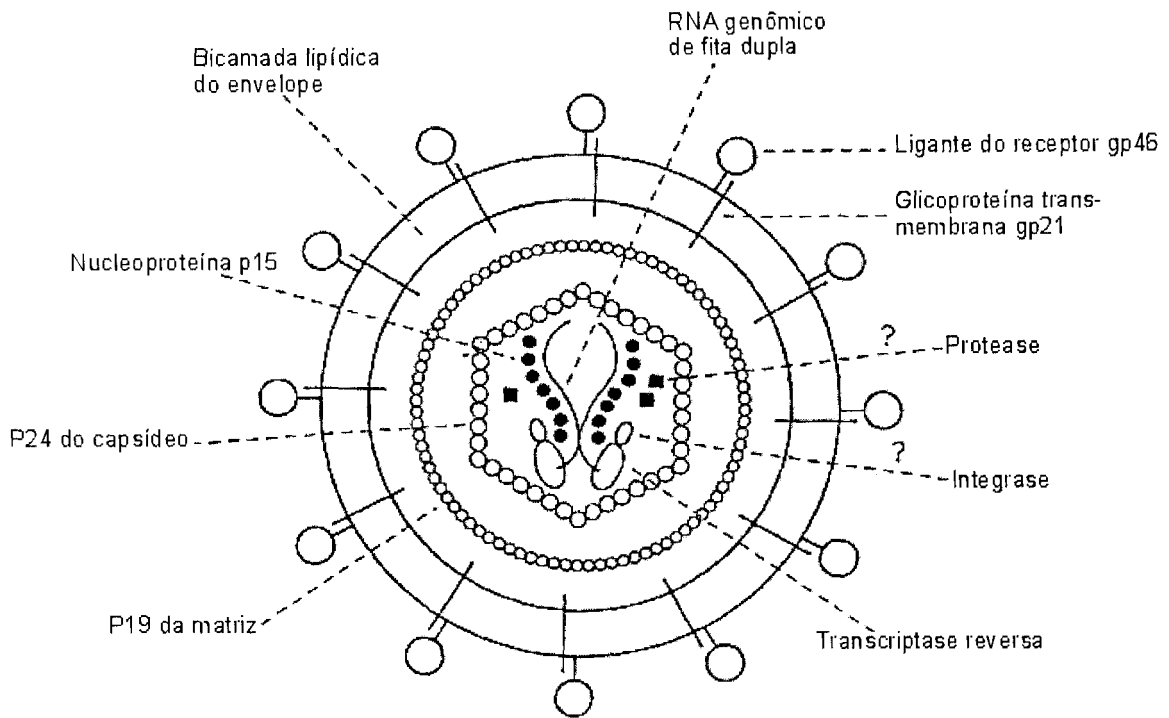
O co-cultivo de linfócitos de um macaco japonês soropositivo para HTLV-I com linfócitos de um doador levou ao isolamento do primeiro vírus símio relacionado ao HTLV-I (Miyoshi e colaboradores, 1982), dois anos após a descoberta do HTLV-I. O vírus linfotrópico de células-T símias do tipo I (STLV-I) infecta a maioria das espécies primatas da África e Ásia (Ibraim e colaboradores, 1995; Song e colaboradores, 1994; Watanabe e colaboradores, 1986) estando associado ao linfoma e leucemia (Goubau e colaboradores, 1994). Mais recentemente, outro STLV foi encontrado na África em primatas não-humanos *Pan paniscus* do Congo: STLV-II, um vírus símio relacionado ao HTLV-II (Liu e colaboradores, 1994b; Giri e colaboradores, 1994; Vandamme e colaboradores, 1998; Digilio e colaboradores, 1997; Van Brussel e colaboradores, 1998). Análises filogenéticas mostraram que o HTLV-I e o STLV-I africanos não podem ser separados em cepas diferentes de acordo com suas espécies de origem, mas de acordo com a origem geográfica de seus hospedeiros (Vandamme e



colaboradores, 1994), sugerindo freqüentes transmissões interespécies (Liu e colaboradores, 1996; Salemi e colaboradores, 1998b; Vandamme e colaboradores, 1998b). Em contraste, STLV-II encontra-se dentro de uma cepa filogenética diferente em relação ao HTLV-II, sugerindo também uma transmissão interespécie na África ou uma co-evolução do STLV-II/HTLV-II com seus hospedeiros (Vandamme e colaboradores, 1998a). Ambos HTLV-I e STLV-I são conhecidos como vírus linfotrópico de células-T de primatas do tipo I (PTLV-I), enquanto por analogia, o do tipo II (PTLV-II) foi proposto para os HTLV-II/STLV-II.

### **Morfologia do HTLV.**

O HTLV tem um nucleocapsídeo icosaédrico central de 80-100 nm de diâmetro circundado por um envelope circular (Fig. 2) e o vírion é visto como uma partícula esférica de cerca de 100-140 nm de diâmetro por microscopia eletrônica. Um único complexo protéico está presente na superfície do vírion, consistindo de duas subunidades protéicas glicosiladas: a proteína de superfície (SU) denominada gp46 e a proteína transmembrana (TM) denominada gp21. O core interno é constituído de três proteínas: proteína do nucleocapsídeo (NC) ou p19, do capsídeo (CA) ou p24 e da matriz (MA) ou p15. Neste core, um RNA dimérico (35S cada fita) de 8-9 kb (kilobases) está empacotado junto com outras proteínas importantes no desenvolvimento do papel catalítico antes do ciclo de replicação viral: a transcriptase reversa, a integrase e a protease ou RNase H. De acordo com o seu aspecto através da microscopia eletrônica, o HTLV têm morfologia do tipo C: possui núcleo eletrodense central, é extracelular e brota da membrana das células do hospedeiro.



**Figura 2.** Representação esquemática de um vírion HTLV (adaptado de Salemi e colaboradores, 1999). Detalhes sobre as proteínas do vírion são dados no texto.

## O ciclo de vida do HTLV.

O ciclo de vida do HTLV é similar ao dos demais retrovírus, dependente da presença da enzima transcriptase reversa. Inicialmente, a partícula viral necessita se ligar à superfície celular (Fig. 3). Esta interação se dá entre as glicoproteínas do seu envelope e um receptor da superfície celular específico, porém este permanece desconhecido. Ambos HTLV-I e HTLV-II têm tropismo por linfócitos T (Ijichi e colaboradores, 1992). Eles são vírus transformantes que imortalizam linfócitos T CD4<sup>+</sup>, no caso do HTLV-I, ou CD8<sup>+</sup>, no caso do HTLV-II (Gallo, 1991; Ijichi e colaboradores, 1992). Em pacientes com carga viral elevada, o HTLV pode infectar outras populações de células não-T, incluindo monócitos e linfócitos B (Richardson e colaboradores, 1990; Koyanagi e colaboradores, 1993; Casoli e colaboradores, 1995). Outras células, incluindo aquelas de origem neurológica, podem ser infectadas *in vitro* (Koyanagi e colaboradores, 1984 e 1993; Koralnik e colaboradores, 1992a; Hoffman e colaboradores, 1992). Partículas virais livres não são muito infectantes *in vitro* (Kuroda e colaboradores, 1992) e o contato célula-célula é necessário para o estabelecimento de uma nova infecção *in vitro* e *in vivo* (Yamade e colaboradores, 1993; Derse e colaboradores, 1996).

Após a ligação da proteína SU ao seu receptor, o vírus é capaz de penetrar na célula liberando todo o seu conteúdo no citoplasma (Fig. 3). Neste, a fita simples de RNA viral é transcrita reversamente a um DNA de fita dupla pela transcriptase reversa. Durante a transcrição reversa o RNA genômico é removido pela atividade RNase H da transcriptase reversa viral. A fita dupla de DNA linear migra para o núcleo e integra-se no genoma do hospedeiro pela ação da integrase viral (Seiki e colaboradores, 1984). O HTLV-I parece preferir sítios flanqueadores

ricos em nucleotídeos A/T (Chou e colaboradores, 1996), enquanto nenhuma evidência foi demonstrada quanto ao sítio de integração do HTLV-II (Cimarelli e colaboradores, 1996). Uma vez integrado, o provírus utiliza a maquinaria celular para a transcrição primária do RNA genômico. Parte do RNA viral sintetizado é processado para gerar o RNAm que será traduzido nas proteínas virais apropriadas no citoplasma. Duas proteínas regulatórias influenciam este passo: Tax, um transativador potente do promotor viral (Sodroski e colaboradores, 1985; Seiki e colaboradores, 1986) e Rex, que aumenta a expressão das proteínas virais estruturais e enzimáticas, promovendo a translocação do RNA não processado e do RNAm processado do núcleo para o citoplasma (Hidaka e colaboradores, 1988). Como último passo, o core viral é montado e o vírus é liberado da superfície celular por um processo mais ou menos simultâneo (Cann e colaboradores, 1996).

Os dados até agora disponíveis sugerem que os HTLVs são vírus pouco replicativos e que a replicação viral *in vivo* ocorre mais devido a expansão clonal das células infectadas, via mitose (Wattel e colaboradores, 1995; Cimarelli e colaboradores, 1996). Infecção das células-T *in vivo*, transformação destas, imortalização e expansão monoclonal posterior das células infectadas são as causas da ATLL em pacientes com HTLV-I (Cann e Chen, 1996).

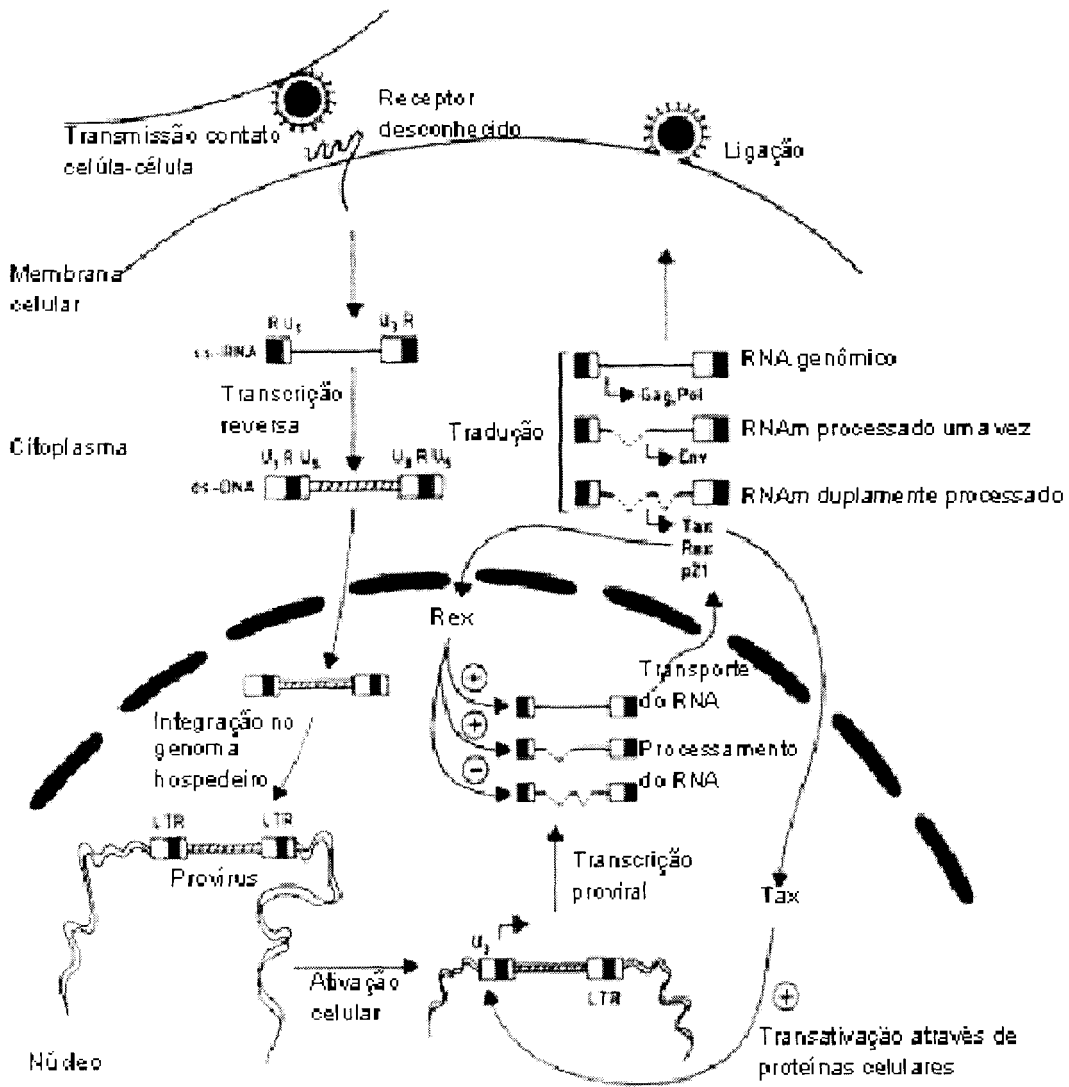


Figura 3. Ciclo de vida do HTLV (Adaptado de Salemi, 1999)

## **Estrutura genética do HTLV.**

O HTLV-I e o HTLV-II têm um genoma de RNA diplóide de fita positiva com cerca de 8,5 kb, consistindo de quatro genes codificantes: *gag* (grupo antigênico), *pol* (polimerase), *env* (envelope) e *tax/rex* (transativador/regulador da expressão). O genoma é flanqueado por seqüências não-codificantes: uma seqüência única nas extremidades 5' e 3', respectivamente, chamada U5 e U3 e uma pequena seqüência repetitiva em ambas extremidades, chamada R (Figs. 3 e 4a). Um tRNA-prolina (pro-tRNA) próximo de cada extremidade 5' do RNA é usado como iniciador para síntese do DNA. Na forma proviral, o genoma viral possui duas repetições denominadas "long terminal repeats" (LTR), que contêm as seqüências U3, R e U5, em ambas as extremidades do DNA proviral (Fig. 4b). Durante a transcrição três RNAm são produzidos: o RNAm genômico de 8,5 kb, transcrito da junção U3-R na extremidade LTR 5' até a junção R-U5 na extremidade LTR 3', que é traduzido nas proteínas Gag e Pol (Fig. 4c); o RNAm subgenômico de 4,2 kb, processado uma única vez, codificante das proteínas Env (Fig. 4c); o RNAm de 2,1 kb, duplamente processado, codificante das proteínas regulatórias Tax e Rex (Fig. 4c) com diferentes fases iniciais de leitura ("open reading frames"-ORFs).

**A região LTR.** As duas regiões LTR idênticas, localizadas nas extremidades 5' e 3' do genoma proviral, contêm seqüências regulatórias que controlam a integração e a expressão proviral. O LTR é a região mais divergente do genoma do HTLV e poucos trechos se mantêm conservados entre o HTLV-I e o HTLV-II, incluindo elementos que são importantes para expressão dos genes

virais. Três desses elementos, localizados na região U3, parecem ser essenciais: as três repetições (“enhancers”) de 21 pb (pares de bases), necessários para a transativação mediada por Tax, de que no mínimo dois são requeridos para níveis elevados de transativação por Tax (Brady e colaboradores, 1987); o TATA Box, que determina o sítio de iniciação transcricional e o sinal de poliadenilação. As funções das regiões R e U5 ainda permanecem desconhecidas. Elas devem desempenhar um papel no controle pós-transcricional da expressão gênica (Ohtani e colaboradores, 1987).

**O gene *gag*.** A região *gag* codifica as três proteínas MA (da matriz), CA (do capsídeo) e NC (do nucleocapsídeo), também denominadas p19, p24 e p15, respectivamente, de acordo com seus pesos moleculares (Oroszlan e colaboradores, 1984). Elas são produzidas como um único precursor polipeptídico. A proteína CA p24 tem uma similaridade alta, quanto à seqüência de aminoácidos, entre o HTLV-I e o HTLV-II, resultando em considerável reatividade cruzada em testes sorológicos. A proteína MA p19 possui similaridade menor na seqüência de aminoácidos e pouca reatividade cruzada entre os dois tipos de HTLV.

A protease viral é codificada por uma região no genoma do HTLV pertencente à parte da região *gag-3'* e parte da região *pol-5'*. Esta protease é responsável pela clivagem das poliproteínas precursoras Gag, Gag-Pro e Gag-Pro-Pol e por gerar a protease madura pela atividade de alto-clivagem (Nam e colaboradores, 1988).

O **gene *pol***. O gene *pol* do HTLV é inicialmente expresso como um precursor poliproteico Gag-Pro-Pol. A região *pol* codifica as proteínas transcriptase reversa, a RNaseH e a integrase, sendo que nenhuma delas foi ainda caracterizada com detalhes.

O **gene *env***. Um RNAm, processado uma vez, codifica um precursor protéico do envelope de cerca de 488 aminoácidos. A proteína precursora pode ser detectada na superfície das células infectadas pelo HTLV e é clivada por uma protease celular presente nas glicoproteínas SU, de 46 kd, e TM, de 21 kd, também conhecidas como gp46 e gp21, respectivamente. A função da proteína precursora é provavelmente se ligar a um ainda não-identificado receptor de superfície celular, iniciando a infecção viral. A glicoproteína do envelope, SU, é a mais imunogênica das proteínas específicas do HTLV e poderá ser utilizada futuramente para o desenvolvimento de vacinas.

**A região *pX* e as proteínas regulatórias Tax e Rex.** A região *pX* inicia-se no final do gene *env*. O *pX* proximal consiste de cerca de 600 nucleotídeos contendo ORFs diferentes, codificando para proteínas auxiliares, cujas funções não são conhecidas (Koralnik e colaboradores, 1992b; CimInale e colaboradores, 1992; Alexandersen e colaboradores, 1993; Ciminale e colaboradores, 1995; Van Brussel e colaboradores, 1996 e 1998). A região *pX* distal codifica para o segundo éxon das duas proteínas regulatórias Tax e Rex. Elas são expressas pelos mesmos dois éxons como ORFs sobrepostos de um RNAm viral bicistrônico. O

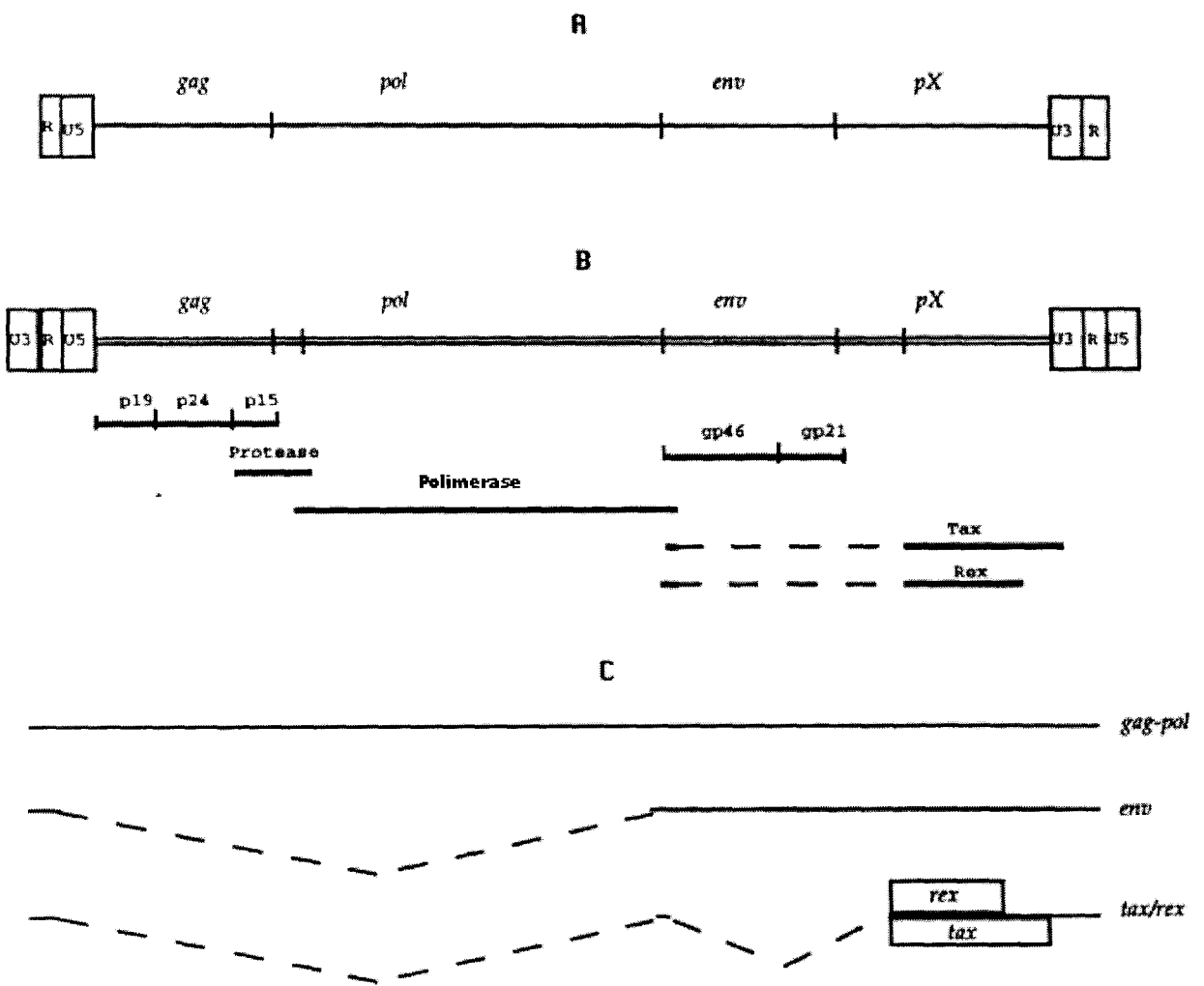


primeiro éxon está localizado imediatamente “upstream” do gene *env* em uma fase de leitura separada na extremidade do gene *pol*.

A proteína Tax do HTLV-I é uma fosfoproteína de 42 kd que funciona como um fator ativador transcricional, que promove a interação de fatores celulares com as seqüências “enhancers” de 21 pb localizadas na região LTR5’ do genoma proviral (Sodroski e colaboradores, 1985; Brady e colaboradores, 1987). Tax ativa a transcrição de vários genes celulares, influenciando a ligação de fatores de transcrição celular ao DNA, incluindo genes codificantes de linfocinas, receptores de linfocinas, moléculas de superfície celular e protooncogenes (Franchini e colaboradores, 1995; Yoshida e colaboradores, 1996; Uchiyama e colaboradores, 1997). Evidências recentes sugerem que Tax também pode facilitar a transcrição em geral por sua interação com componentes do complexo de transcrição da RNA polimerase II, assim como proteínas ligantes da TATA Box (Clemens e colaboradores, 1996; Caron e colaboradores, 1997). Foi identificada a ligação de Tax a vários membros da família das proteínas NF- $\kappa$ B (Yoshida e colaboradores, 1996). Apesar desses estudos, o envolvimento de Tax no mecanismo de apoptose ainda não está claro (Chiichlia e colaboradores, 1997). Tax pode estar relacionada na transformação de células-T, induzida pelo HTLV, e provavelmente na patogênese destes vírus.

A proteína Tax do HTLV-II divide até 80% de similaridade com a proteína Tax do HTLV-I e ela pode transativar tanto o gene LTR do HTLV-II quanto do HTLV-I (Cann e colaboradores, 1989; Semmes e colaboradores, 1996). Entretanto, existe uma grande diferença no Carboxi-terminal da molécula.

O segundo gene regulatório, que é essencial para replicação viral, é *rex*. A proteína Rex possui 27 kd, enquanto outras duas isoformas, de 24 e 26 kd, também existem, diferindo apenas no grau de fosforilação que parece ser necessária para sua atividade (Green e colaboradores, 1991). A proteína Rex induz o processamento dos RNAm virais e regula o balanço dos níveis de expressão das proteínas virais, desenvolvendo um papel importante como modulador da transição da fase regulatória inicial para a fase produtiva do ciclo de replicação do HTLV. O efeito de Rex depende da sua concentração, mas o seu mecanismo não está totalmente claro (Hanly e colaboradores, 1989; Kim e colaboradores, 1991; Black e colaboradores, 1991b)



**Figura 4.** (A): RNA genômico do HTLV. (B): DNA proviral do HTLV e suas proteínas codificadas. (C): Principais RNAs do HTLV produzidos durante a transcrição (Adaptado de Cann e Chen, 1996)

## PATOLOGIA DO HTLV.

O HTLV-I é o agente etiológico da leucemia/linfoma de células-T do adulto (ATLL) (Uchiyama e colaboradores, 1977) e da paraparesia espástica tropical ou mielopatia associada ao HTLV-I (TSP/HAM) (Gessain e colaboradores, 1985; Osame e colaboradores, 1986) e está associado também a outras condições clínicas como artropatias (Nishioka e colaboradores, 1986), polimiosites (Morgan e colaboradores, 1989), uveítes (Mochizuki e colaboradores, 1996) e dermatite infecciosa da infância (La Grenade e colaboradores, 1996). As diversas manifestações clínicas podem depender do tipo e magnitude da resposta imune do hospedeiro para os antígenos do HTLV-I e do local ou órgão no qual a reação inflamatória predominantemente acontece. Contudo, o elemento chave em determinar a expansão policlonal das células-T (doenças não malignas) versus expansão monoclonal dessas células (doenças neoplásicas) ainda não está bem esclarecido (Wattel e colaboradores, 1996). A ATLL ou a TSP/HAM desenvolvem-se em uma pequena proporção de pessoas infectadas. Cerca de 98% dos portadores permanecem assintomáticos (Okoshi e colaboradores, 1984). Estudos têm mostrado que um grande percentual da população japonesa é portador do vírus, porém, o risco estimado para desenvolver ATLL nos portadores é de 2 a 4%, enquanto o risco para desenvolvimento de mielopatia é de 0,25% (Tokudome e colaboradores, 1989; Kaplan e colaboradores, 1990). A incidência anual de ATLL nos portadores de HTLV-I com idade superior a 40 anos no Japão é estimada em 1,5% em 1.000 homens e 0,5% em 1.000 mulheres. Os cinco primeiros casos de ATLL relacionados ao HTLV-I no Brasil foram relatados por

Pombo e colaboradores. (1990) na cidade do Rio de Janeiro. Recentemente, foi demonstrado que cinco casos de ATLL no estado da Bahia apresentam algumas características clínicas e epidemiológicas diferentes daquelas observadas no Japão. Entre estas, a idade média dos pacientes é 10 anos inferior à observada no Japão; houve uma predominância do gênero masculino (2:1). Desses pacientes, somente 27% dos casos estavam associados ao HTLV-I (Barbosa e colaboradores, 1999). De um modo geral pode-se dizer que as características clínicas e epidemiológicas são similares àquelas encontradas no Caribe.

O HTLV-I foi relacionado também a uma síndrome neurológica denominada paraparesia espástica tropical (TSP), na Martinica, por Gessain e colaboradores. (1985) e a uma mielopatia paralisante progressiva com características similares, na ilha de Kiushu, no sudoeste do Japão, chamada mielopatia associada ao HTLV-I (HAM), por Osame e colaboradores (1986). Após a demonstração de anticorpos contra HTLV-I no soro e líquido céfalo-raquidiano (LCR) de pacientes que apresentavam TSP nas regiões do Caribe e Colômbia e HAM no Japão, Ijichi et al. (1989) concluíram que HAM e TSP são enfermidades relacionadas entre si. Foi confirmado também que em Salvador 50% dos pacientes com TSP/HAM apresentam anticorpos anti-HTLV-I (Gomes e colaboradores, 1999). Esses dados são semelhantes aos encontrados em outras regiões geográficas, mas diferem daquelas observadas no Japão, onde 100% dos indivíduos com TSP/HAM estão infectados pelo HTLV-I. Estes fatos podem ser explicados pela ausência de outras causas de mielopatia crônica não relacionadas ao HTLV-I no Japão, tais como deficiência de vitamina A, sífilis, esquistossomose, cisticercose e mielopatia pós-vacinação. Em Salvador, a prevalência em usuários de drogas injetáveis (UDI) foi

de 22% para HTLV-I (Andrade et al., 1998).

Desde que os vírus isolados dos linfócitos na ATLL e na TSP/HAM são idênticos, fatores próprios do hospedeiro, incluindo o sistema HLA, devem ser importantes para determinar as manifestações da infecção. Em contraste com o nível baixo de resposta imune para o HTLV-I nos pacientes com ATLL, os indivíduos com TSP/HAM apresentam vigorosa resposta aos antígenos do HTLV-I. Esta resposta foi demonstrada pela concentração elevada de anticorpos contra o vírus no soro e no fluido cerebrospinal (Sonoda e colaboradores, 1992; Jeffery e colaboradores, 1999). Contudo, pode ser que atividades transativadoras específicas de proteínas virais, em combinação com eventos genéticos secundários específicos, em diferentes tipos de células, determinem se a infecção pelo HTLV-I se manifestará como uma leucemia, como uma doença neurológica ou permaneça assintomática (Schulz e Vile, 1992).

### **Leucemia/Linfoma de células-T do adulto (ATLL).**

A leucemia/linfoma de células-T do adulto é uma manifestação clínico-patológica distinta. A ATLL foi descrita por Takatsuki e colaboradores em 1977, sendo mais tarde reconhecida em sua completa heterogeneidade. A principal distinção da ATLL das demais doenças linfoproliferativas está na sua associação etiológica com o HTLV-I. Evidências para o papel etiológico do HTLV-I vieram da demonstração da integração monoclonal do DNA proviral nas células leucêmicas, confirmando que a ATLL surgiu da transformação maligna de uma célula previamente infectada com o HTLV-I (Bennett e colaboradores, 1989; Yoshida e colaboradores, 1984).

O período de latência viral é geralmente maior que 20 anos (Cann e Chen, 1996) com uma média de idade para desenvolvimento da doença próxima aos 50 anos (Hanchard, 1996). A ATLL é classificada em quatro estágios clínicos, de acordo com o número de células-T anormais no sangue, lesões tumorais em vários órgãos e outros marcadores: linfoma, moderada, crônica e tipo aguda (Kawano e colaboradores, 1985). A ATLL tipo linfoma é caracterizada por crescimento dos linfonodos sem manifestação leucêmica. Os tipos moderada e crônica são considerados estágios transicionais que normalmente evoluem para a ATLL tipo aguda. Suas manifestações clínicas são menos graves que na ATLL tipo aguda. No estágio agudo, os pacientes com ATLL (55% dos casos) mostram um número elevado de células brancas no sangue e células leucêmicas anormais com núcleo lobulado (Shimoyama, 1991). Os sinais clínicos incluem crescimento dos linfonodos e hepatoesplenomegalia. Lesões na pele e nos ossos são observadas com frequência em pacientes com ATLL devido a infiltrações de células leucêmicas e hipercalcemia, respectivamente. Entretanto, a imunossupressão observada naqueles pacientes resulta em um risco aumentado para o desenvolvimento de infecções oportunistas (Shimoyama, 1991).

O tratamento anticâncer quase não tem nenhum efeito em pacientes com ATLL, e a média de sobrevivência é de 24 meses em pacientes com ATLL crônica, 10 meses em pacientes com ATLL tipo linfoma e 6 meses em pacientes com ATLL aguda. Recentemente, têm sido tentadas novas modalidades de tratamento utilizando anti-viral (zidovudine) e interferon alfa e beta, com resultados animadores (Matsushima e colaboradores, 1987; Gill e colaboradores, 1995; Bazarbachi e Hermine, 1996). O papel da replicação do vírus na patogenia da

ATLL ainda não foi esclarecido, mas o zidovudine e o interferon alfa podem bloquear a replicação ou agir como citotóxico ou ambos, levando a remissão da doença e ao prolongamento da sobrevivência do paciente (Hermine e colaboradores, 1995).

Foi sugerido que o desenvolvimento da ATLL compreende várias etapas (Uchiyama, 1997): No início, as células transformadas apresentam um padrão policlonal de integração proviral. Durante os estágios intermediários, o padrão de integração altera-se para monoclonal. A integração monoclonal do provírus, que é um fator típico de células leucêmicas transformadas, e o crescimento descontrolado dessas células-T infectadas com HTLV-I, integrado monoclonalmente, podem ser vistos como causas da ATLL. Entretanto, o mecanismo exato que envolve a transformação celular ainda permanece um mistério (Cann e Chen, 1996).

### **Paraparesia espástica tropical/Mielopatia associada ao HTLV-I (TSP/HAM).**

Uma mielopatia lentamente progressiva que é caracterizada pela paraparesia dos membros inferiores é a principal manifestação da TSP/HAM, que são clinicamente indistinguíveis (Roman e Osame, 1988). Outros sinais clínicos descritos são anormalidades sensoriais periféricas, dor lombar persistente, hiper-reflexia, disfunção da bexiga e do intestino e impotência sexual. Difere da esclerose múltipla, pois os sinais e sintomas dos indivíduos com TSP/HAM não flutuam, não afetam as funções cognitivas nem envolvem os nervos cranianos. A presença de anticorpos para o HTLV-I no líquido céfalo-raquidiano é característica da doença (Gessain e colaboradores, 1988). Esta doença é imunologicamente



mediada e acomete mais freqüentemente as mulheres do que os homens. Este predomínio de acometimento em mulheres em comparação aos homens, obedece à relação de 3:1 (Moreno-Carvalho e colaboradores, 1992) e o risco de desenvolvimento da doença é menor que 1 %, em indivíduos com idade média próxima aos 40 anos (Levine e colaboradores, 1987). O tempo de incubação pode variar bastante, observando-se até o tempo mínimo de poucas semanas, quando a infecção é adquirida durante uma transfusão sangüínea (Gout e colaboradores, 1990).

O início dos sintomas neurológicos da mielopatia associada ao HTLV-I ocorre, habitualmente, na quarta década de vida, sendo incomum seu aparecimento abaixo dos 20 ou acima dos 70 anos. A apresentação clínica é geralmente de paraparesia crural espástica crônica de começo insidioso. O paciente se queixa de dificuldade progressiva à marcha associada freqüentemente à dor lombar. Urgência miccional ou incontinência urinária está quase sempre presente e pode preceder a espasticidade e fraqueza musculares. Parestesia em extremidades, obstipação intestinal, impotência, frigidez e câibras são relatos comuns. Ao exame clínico encontramos síndrome piramidal deficitária e liberação em membros inferiores caracterizada por hiperflexia de patelares, clonos em pés, sincinesia, hipertonia e sinal de Babinski. Em Salvador, 22% dos pacientes apresentam reflexos aquileus diminuídos e atrofia em quadríceps, 44% hiperreflexia em membros superiores e 36% sinal de Hoffman (Melo e colaboradores, 1992). Alterações objetivas das sensibilidades superficiais e profundas são discretas, podendo ocorrer diminuição da sensibilidade vibratória em membros inferiores, nível sensitivo torácico e hipoestusias ou disestesias "em

bota". Pode ocorrer síndrome cerebelar caracterizada por marcha atáxica, dismetria e tremores de movimento e posição em extremidades. Habitualmente não se encontra alteração das funções cognitivas. Os nervos cranianos são usualmente poupados, mas neurite óptica tem sido descrita em alguns casos (Roman e colaboradores, 1987; Roman e Osame, 1988).

A evolução é usualmente crônica, progredindo por vários anos até estabilizar, podendo haver, em alguns casos, progressão subaguda e intervalos de remissão e reativação da doença (Gessain e Gout, 1992). O surgimento de fraqueza muscular aguda é raro. O início dos sintomas em uma idade baixa e história de transfusão sangüínea estão relacionados com uma progressão mais rápida (Kuroda e colaboradores, 1992).

O estudo do líquor mostra pleocitose leve (4-40 células) com predominância de linfócitos e aumento de gamaglobulinas (Melo e colaboradores, 1992). Em 17 pacientes com diagnóstico clínico laboratorial de TSP/HAM, Melo e colaboradores (1993) encontraram 23,5% de atrofia da medula torácica e em 47%, lesões subcorticais e/ou pariventriculares. Said e colaboradores (1988) relataram biópsias de nervos com infiltração linfocitária em nervos periféricos de pacientes com HTLV-I, demonstrando ser o comprometimento do sistema nervoso, em países de ascendência africana, caracterizado por uma leucoencefalomieloneuropatia, diferentemente do que relatam os autores japoneses, os quais não identificaram comprometimento do sistema nervoso periférico.

Os pacientes com TSP/HAM apresentam uma carga proviral elevada com um padrão de integração policlonal, em contraste aos pacientes com ATLL

(Gessain e colaboradores, 1990; Wattel e colaboradores, 1995). Foi sugerido que o vírus pode estar num estado ativo e não latente como nos casos de ATLL, pois foi demonstrado um título elevado de anticorpos em pacientes com TSP/HAM (Furukawa e colaboradores, 1995). A resposta imune elevada para o HTLV-I observada em TSP/HAM deve ser a causa da doença, mas seu mecanismo de patogênese permanece alvo de muitas especulações. Duas hipóteses são postuladas:

1. O HTLV-I infecta células gliais no sistema nervoso central e subsequentemente desencadeia uma resposta imune citotóxica contra células infectadas, resultando em desmielinização (Yamada e colaboradores, 1991; Levin e colaboradores, 1997; Ferreira e colaboradores, 1997). Dados recentes demonstraram que linfócitos T citotóxicos CD8+ circulantes reagem contra proteínas do HTLV-I de modo restrito por antígenos MHC classe I (HLA-A2) em pacientes com TSP/HAM, mas não reagem com as mesmas proteínas em portadores assintomáticos ou com ATLL, favorecendo esta hipótese. Entretanto, um número grande de células T citotóxicas CD8+ estimuladas por células infectadas com HTLV-I, são encontradas no líquido cérebrospinal de pacientes com TSP/HAM (Jacobson e colaboradores, 1992).

A desmielinização mediada por células T citotóxicas pode ocorrer de duas maneiras: i) por morte direta de células gliais infectadas, de modo restrito por antígenos do MHC classe I; ii) por secreção de citocinas pelas células T citotóxicas que reconhecem produtos de proteínas virais ou são diretamente ativadas por infecção pelo HTLV-I (Moore e colaboradores, 1989).

A teoria da desmielinização citotóxica mediada por células T é enfraquecida

pela falta de evidências para infecção das células do sistema nervoso central pelo HTLV-I. A demonstração direta de antígenos do HTLV-I nas células gliais é difícil, por causa da estreita associação com células T potencialmente infectadas. Desde que uma característica patológica encontrada em pacientes com TSP/HAM é um infiltrado inflamatório mononuclear perivascular, é possível, como uma variante da primeira hipótese, que células T citotóxicas CD8+ estejam reconhecendo produtos virais apresentados por células T infectadas. Isto poderia resultar na ativação de células T citotóxicas e a subsequente secreção de citocinas, como o fator de necrose tumoral (TNF), o qual tem sido associado à desmielinização. Adicionalmente, estudos neuropatológicos demonstraram um aumento de células T CD8+ e da expressão de antígenos do MHC classe I em lesões do sistema nervoso central de pacientes com TSP/HAM (Moore e colaboradores, 1989; Greene e colaboradores, 1989).

2. A infecção por HTLV-I provoca danos celulares, que indiretamente podem ser causados pela liberação de citocinas e ativação de células T auto-reativas, induzindo a um processo auto-imune (Hollberg e colaboradores, 1993). Apesar de haver evidência circunstancial de uma desmielinização mediada por células T CD8+ em pacientes com TSP/HAM, um mecanismo autoimune ainda é uma hipótese alternativa. O modelo auto-imune propõe que as células T auto-reativas se tornariam ativadas, resultando numa destruição de mielina mediada por células T. Esta ativação poderia ser iniciada pela infecção do HTLV-I nas células T auto-reativas ou não, especificamente por outras células T imunoregulatórias infectadas (Yodoi e Uchiyama, 1992; Hollberg e Hafler, 1993).

Recentemente, foi demonstrado um dano direto do sistema nervoso, mediado pelas proteínas virais, como Tax (Reddy e colaboradores, 1998).

### **Outras doenças associadas ao HTLV-I.**

As outras doenças associadas ao HTLV-I são: uveíte, uma disordem inflamatória intraocular (Mochizuki e colaboradores, 1996); síndrome de Sjögren, uma doença inflamatória crônica (Green e colaboradores, 1989; Terada e colaboradores, 1994); dermatite infecciosa associada ao HTLV-I (La Grenade e colaboradores, 1996) e artropatia associada ao HTLV-I (Nishioka e colaboradores, 1989).

O HTLV-I foi também isolado de pacientes com linfoma de células-T cutâneo (CTCL) (Hall e colaboradores, 1991), de pacientes com polimiosite, com artrite inflamatória (Leon-Monzon e colaboradores, 1994), e de pacientes com pneumopatia e linfadenite (Ohshima e colaboradores, 1991). Entretanto, a relação entre o HTLV-I e essas doenças não foi ainda explicado. Em relação ao CTCL, é interessante notar que suas características clínicas e histopatológicas são similares àquelas da ATLL, mas a doença está também presente em áreas não-endêmicas para o HTLV-I. O desenvolvimento de critérios eficientes para distinguir a ATLL do CTCL será importante na elucidação do envolvimento do HTLV-I nesta doença (Uchiyama e colaboradores, 1997).

## **As doenças associadas ao HTLV-II.**

Apesar do HTLV-II ter sido isolado de um paciente com leucemia de células pilosas (Kalyanaraman e colaboradores, 1982), uma possível relação do HTLV-II em doenças humanas ainda não está clara. A maioria dos indivíduos infectados com o HTLV-II permanece assintomática durante toda a vida. Recentemente, têm-se aumentado as evidências que a infecção pode estar associada à desordens neurológicas (Hall e colaboradores, 1994 e 1996; Murphy e colaboradores, 1997).

O HTLV-II está presente, em taxas altas, entre os usuários de drogas injetáveis (UDIs) co-infectados com HIV-1 (Lee e colaboradores, 1989; Zella e colaboradores, 1990). Entretanto, o impacto do HTLV-II na progressão da AIDS ainda não foi estabelecido.

## **EPIDEMIOLOGIA DO HTLV.**

O HTLV livre não é muito infeccioso *in vitro*, devido à fragilidade do envelope viral, além de depender do contato célula-célula para estabelecer a infecção de uma nova célula (Kuroda e colaboradores, 1992). A transmissão do HTLV *in vivo* ocorre via contato sexual, contato com sangue contaminado e durante amamentação. Diferente do HIV, a transmissão do HTLV não foi associada com a homossexualidade masculina (Black e colaboradores, 1997).

## Vias de transmissão do HTLV-I

HTLV-I é transmitido através de três maneiras diferentes: verticalmente, da mãe para o filho, principalmente através da amamentação (Kinoshita e colaboradores, 1984; Saji e colaboradores, 1990); a passagem de linfócitos infectados pela placenta pode ocorrer em alguns casos (Hirata e colaboradores, 1992); horizontalmente, via contato sexual, com o risco de transmissão maior do macho para a fêmea que o inverso (Nakano e colaboradores, 1984, Kaplan e colaboradores, 1996); finalmente, uma rota de transmissão horizontal, através do contato de pacientes transfundidos com sangue contaminado de pacientes soropositivos (Manns e colaboradores, 1992) ou em UDIs, onde a transmissão do HTLV-I por via sanguínea ocorre através do uso de seringas contaminadas com sangue infectado (Lee e colaboradores, 1989).

Apesar do modo de transmissão do HTLV-I ser parecida com a transmissão do HIV, ela se mostra menos eficiente. Até 41% dos filhos de mães infectadas com HTLV-I se tornam soropositivos (Monplaisir e colaboradores, 1993). O risco de transmissão parece aumentar com o tempo de amamentação (Lal e colaboradores, 1993). Um período curto de amamentação pode diminuir a incidência de transmissão do HTLV-I devido à presença de anticorpos neutralizantes no leite materno até os seis primeiros meses (Takahashi e colaboradores, 1991). A probabilidade de se tornar infectado, após 10 anos de contato sexual com um parceiro infectado, é de 60% para a mulher e somente 4% para o homem (Kajiyama e colaboradores, 1986). Desde que o contato célula-célula é essencial para a infecção do HTLV-I, a transmissão pode ocorrer somente via fração celular do sangue e não pelo plasma (Manns e colaboradores, 1992).

## Vias de transmissão do HTLV-II

O HTLV-II foi isolado de doadores de sangue e pacientes poli-transfundidos (Shimotohno e colaboradores, 1985; Dube e colaboradores, 1993; Lin e colaboradores, 1997), mas está presente principalmente entre UDIs geralmente co-infectados com HIV, em áreas urbanas (Ehrlich e colaboradores, 1989; Lee e colaboradores, 1989; Hall e colaboradores, 1990; Zella e colaboradores, 1990; Briggs e colaboradores, 1995; Soriano e colaboradores, 1996). A infecção foi também demonstrada com endemicidade elevada em ameríndios e algumas tribos de pigmeus (Lairmore e colaboradores, 1990; Goubau e colaboradores, 1992; Duenas-Barajas, 1993; Hjelle e colaboradores, 1993, Ijichi e colaboradores, 1993, Gessain e colaboradores, 1995; Switzer e colaboradores, 1995a; Biggar e colaboradores, 1996). Entre as tribos infectadas com o HTLV-II, o vírus é transmitido da mãe para o filho através do leite materno, durante a amamentação (Heneine e colaboradores, 1992; Kaplan e colaboradores, 1992) e do marido para a esposa, através do contato sexual (Hjelle e colaboradores, 1992b). Um aumento elevado da prevalência em HTLV-II, na idade de maior atividade sexual, foi demonstrado (Black e colaboradores, 1996). Entretanto, este aumento ocorreu muito mais nas mulheres que nos homens: todas as mulheres neste grupo de estudo finalmente se tornaram infectadas, mas a maioria dos homens permaneceu soronegativos durante toda a vida. Esta diferença deixa a dúvida se o ciclo replicativo do HTLV-II possui a mesma eficiência entre os dois gêneros, sendo capaz de permitir a perpetuação por este mecanismo e foi sugerido que a infecção pelo HTLV-II é mantida em populações endêmicas principalmente pela transmissão da mãe para o filho.(Black e colaboradores, 1994a; Black, 1997). Em



algumas tribos de índios americanos, como os índios Kaiapós do Brasil, onde é comum a amamentação realizada por outras mulheres da tribo além da mãe, a prevalência é muito alta (Tronick e colaboradores, 1987, Black e Martin, 1995). Logo, a transmissão do HTLV-II por via sanguínea não desempenha um papel considerável na endemicidade da infecção. Em contraste, o contato sangue-sangue através do compartilhamento de agulhas é a principal via de transmissão do HTLV-II em UDIs (Lee e colaboradores, 1989). Os fatores de risco independentes para infecção do HTLV-II são: idade avançada (>44 anos), evidência sorológica de infecção pelo vírus da hepatite B, história sorológica de infecção pelo vírus herpes do tipo 2 e uso de heroína como droga primária (Krook e colaboradores, 1997).

### **Distribuição geográfica do HTLV-I.**

As principais áreas endêmicas do HTLV-I são (Fig. 5): Japão, Caribe, Américas do Sul e Central, África Equatorial, Oriente Médio e Melanésia (Levine e Blattner, 1987; Mueller e colaboradores, 1996). A prevalência nessas áreas endêmicas não é uniforme e pode diferir até de uma cidade para outra, como consequência da transmissão horizontal baixa do vírus.

A região sul do Japão (Kyushu, Shikoku e Okinawa) foi a primeira região altamente endêmica (Hinuma e colaboradores, 1982, Kajiyama e colaboradores, 1986), onde a soroprevalência do HTLV-I pode chegar até a 20% (Mueller e colaboradores, 1996). O HTLV-I também foi encontrado em Hokaido (Norte do Japão) na população Ainu, descendentes de uma população aborígine do norte do Japão (Ishida e colaboradores, 1985).

A soroprevalência no Caribe varia de 0 a 10% nas diversas ilhas e grupos étnicos diferentes (Figuroa e colaboradores, 1995), com uma incidência alta entre a população negra descendente dos povos africanos (Blattner e colaboradores, 1990).

Os casos de HTLV-I demonstrados nos Estados Unidos geralmente têm sido associados às áreas endêmicas ou são encontrados entre usuários de drogas injetáveis (Lee e colaboradores, 1991). O HTLV-I foi também isolado em índios da América do Norte (Gessain e colaboradores, 1994), em aborígenes do Alasca (Davidson e colaboradores, 1993) e em índios canadenses que possuem doenças associadas (Dekaban e colaboradores, 1994). Esse vírus é também endêmico em vários países das Américas do Sul e Central, incluindo Honduras (de Rivera e colaboradores, 1995), Panamá (Reeves e colaboradores, 1990), Colômbia (Maloney e colaboradores, 1989; Fujiyama e colaboradores, 1993), Venezuela (Merino e colaboradores, 1984), Bolívia (Tsugane e colaboradores, 1988), Brasil (Maloney e colaboradores, 1992), Peru (Gotuzzo e colaboradores, 1996; Johnson e colaboradores, 1988), Chile (Cartier e colaboradores, 1993) e Argentina (Bouzas e colaboradores, 1990). A maioria dos indivíduos infectados para o HTLV-I é descendente dos povos africanos, imigrantes e/ou descendentes de japoneses e índios americanos nativos.

Baseados na existência de infecções para o HTLV-I na África Equatorial e em descendentes africanos no Caribe e América Latina (Fig. 5), alguns pesquisadores sugeriram que a África é a fonte primária deste vírus (Saxinger e colaboradores, 1984, Fleming e colaboradores, 1986; Delaporte e colaboradores, 1989; Verdier e colaboradores, 1994). Foi demonstrado que a província equatorial

do Congo tem a prevalência mais alta para o HTLV-I na África (Goubau e colaboradores, 1990), até 15%, com uma taxa alta de TSP/HAM. Mais recentemente, infecções pelo HTLV-I foram demonstradas em tribos de pigmeus isoladas que vivem em áreas remotas da República Centro-Africana, Camarões e nordeste do Congo (Goubau e colaboradores, 1996; Mahieux e colaboradores, 1997a, Salemi e colaboradores, 1998b).

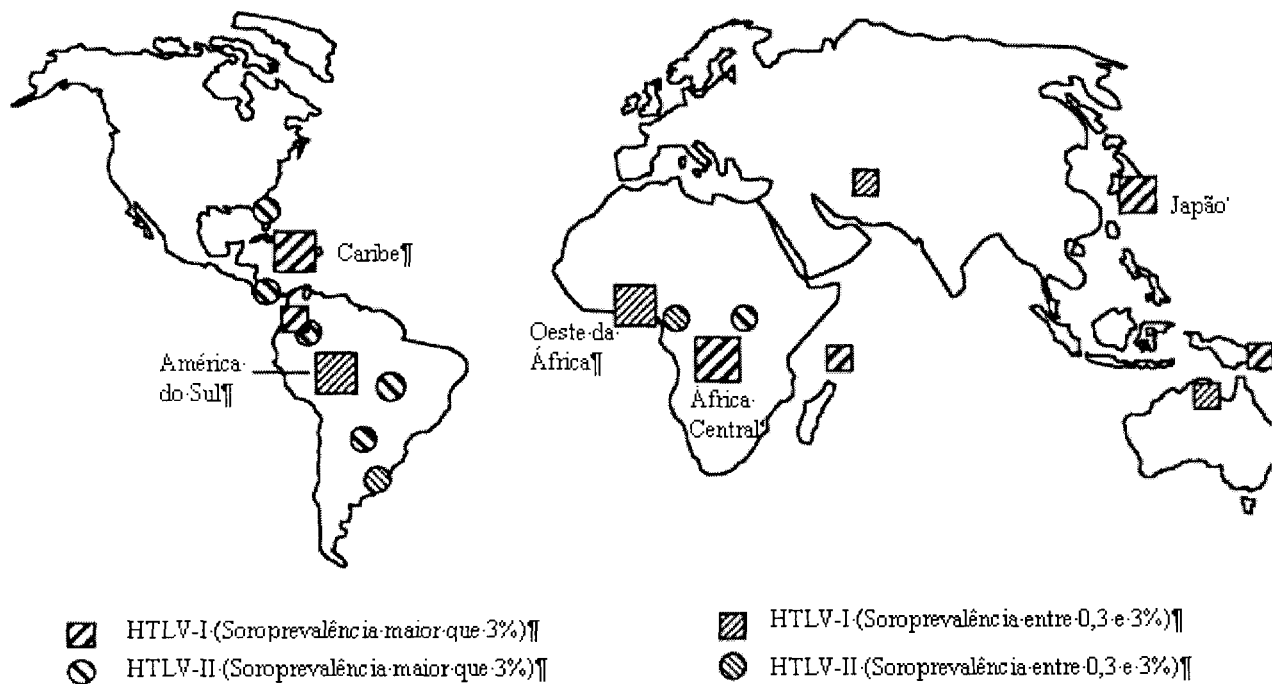
No Oriente Médio, o HTLV-I tem uma soroprevalência de quase 3% na região de Machadi, nordeste do Iran (Yamashita e colaboradores, 1995).

As outras importantes áreas endêmicas para o HTLV-I são a Melanésia e a Austrália (Fig. 1), onde se detectou uma soroprevalência de cerca de 14% numa tribo que vive em Papua Nova Guiné (Yanagihara e colaboradores, 1990). Também se observou uma soroprevalência de 2-10% e 1-7% na Ilha de Páscoa (Yanagihara e colaboradores, 1991) e entre aborígenes australianos (Bastian e colaboradores, 1993), respectivamente.

### **Distribuição geográfica do HTLV-II**

O HTLV-II está presente principalmente em duas populações diferentes: a) usuários de drogas injetáveis (UDIs), estando a maioria deles co-infectados com HIV-1 (Hall e colaboradores, 1990; Briggs e colaboradores, 1995; Soriano e colaboradores, 1996), nos Estados Unidos (Ehrlich e colaboradores, 1989; Lee e colaboradores, 1989; Lee e colaboradores, 1993; Heneine, 1996), Europa (Zella e colaboradores, 1990; Vallejo e Garcia-Saiz, 1994; HERN, 1996) e Vietnam do Sul (Fukushima e colaboradores, 1995 e 1998); b) índios americanos endemicamente infectados (Biggar e colaboradores, 1996) e tribos de pigmeus (Goubau e

colaboradores, 1992). O HTLV-II foi também isolado de doadores de sangue e pacientes poli-transfundidos nos Estados Unidos e sul do Vietnã (Dube e colaboradores, 1993; Lin e colaboradores, 1997). A soroprevalência para o HTLV-II em UDIs europeus não é uniforme, mas foi demonstrada principalmente na Itália, Espanha e Suécia, variando de 2,5% a 7,5% (Henrad e colaboradores, 1995; HERN, 1996). As populações ameríndias, onde o HTLV-II é encontrado, incluem a Navajo e Pueblo no Novo México (Hjelle e colaboradores, 1993), a Seminole na Flórida (Levine e colaboradores, 1993), a Guaymí no Panamá (Lairmore e colaboradores, 1990; Heneine e colaboradores, 1991), a Wayu e Guahibo na Colômbia (Duenas-Barajas, 1993, Switzer e colaboradores, 1995b; Miura e colaboradores, 1997), a Pume na Venezuela (de Perez e colaboradores, 1993), as tribos Kaiapó, Kraho e Kaxuyama no Brasil (Maloney e colaboradores, 1992; Black e colaboradores, 1994a; Switzer e colaboradores, 1996), Tobas e Matacos na Argentina (Biglione e colaboradores, 1993; Ferrer e colaboradores, 1993), índios Gran Chaco no Paraguai (Ferrer e colaboradores, 1996) e a Mapuche no Chile (Miura e colaboradores, 1997) (Fig. 5). Das tribos dos pigmeus incluem os pigmeus Efe-Mbuti do Congo (Froment e colaboradores, 1993; Goubau e colaboradores, 1993a, 1993b e 1996; Vandamme e colaboradores, 1998a) e os pigmeus Bakola dos Camarões (Gessain e colaboradores, 1995). Alguns casos esporádicos de infecções pelo HTLV-II, entre outras populações africanas, foram também demonstrados (Delaporte e colaboradores, 1991; Igarashi e colaboradores, 1993; Dube e colaboradores, 1994; Tuppin e colaboradores, 1996).



**Figura 5.** Epidemiologia mundial do HTLV em populações endêmicas. Grupos de riscos particulares, como os UDIs, não são indicados. Os quadrados maiores representam o HTLV endêmico nas populações gerais, enquanto os quadrados menores e círculos representam a endemia em grupos particulares. As outras áreas no mapa têm soroprevalência menor que 0,3% ou desconhecida (Adaptado de Salemi, 1999)

## **VIAS MIGRATÓRIAS DOS HOSPEDEIROS DO HTLV E STLV.**

### **Dados genéticos e migrações humanas.**

Recentemente, estudos filogenéticos baseados nas seqüências de DNA mitocondrial tornaram-se uma ferramenta importante para a investigação da origem e dos movimentos antigos dos humanos modernos (Vigilant e colaboradores, 1991; Horai e colaboradores, 1995; Watson e colaboradores, 1997). A presença endêmica do HTLV-I em colonos austronesianos e do HTLV-II em tribos americanas e pigmeus africanos sugere que eles têm infectado populações humanas desde milhares de anos atrás. Vários autores concordam que esses vírus foram carregados ao longo das vias migratórias humanas durante a pré-história (Gessain e colaboradores, 1992; Neel e colaboradores, 1994; Biggar e colaboradores, 1996; Miura e colaboradores, 1997; Suzuki e Gojobori, 1998; Vandamme e colaboradores, 1998a e 1998b). Como será visto com mais detalhe, a grande estabilidade do genoma desses vírus faz deles bons marcadores moleculares para traçar a rota de migração das populações antigas (Gessain e colaboradores, 1992; Black e colaboradores, 1997).

Três eventos principais têm sido investigados ativamente, utilizando dados genéticos, arqueológicos e lingüísticos: A origem africana dos humanos modernos e seus sucessivos êxodos da África há cerca de 100.000 anos atrás; a colonização da Melanésia/Austrália há cerca de 60.000 anos atrás, devido às migrações de populações da Ásia, e o povoamento das Américas durante as migrações pelo Estreito de Bering, há cerca de 15.000-35.000 anos atrás.

## **A origem africana do *Homo sapiens sapiens*.**

O debate sobre a origem dos humanos modernos está polarizado entre modelos alternativos. Esses modelos são descritos sobre a data e região geográfica de origem dos humanos modernos e sobre as relações de parentesco entre as diferentes populações. Idealmente, modelos claramente definidos permitiram a formulação de expectativas sobre a variação genética de populações humanas vivas e sobre as características do registro fóssil. A verificação empírica da realidade dessas expectativas pode, portanto, constituir um teste sobre os modelos alternativos.

Os diferentes modelos para a origem dos humanos modernos têm um elemento comum. Todos aceitam ser a África o local onde o nosso gênero biológico surgiu, através do *Homo habilis*. Postula-se que esse homínido teria originado um outro membro do nosso gênero, o *Homo erectus*, primeiro homínido a deixar o continente africano e ocupar outras regiões da terra. Até recentemente as datações do *H. erectus* africano e asiático sugeriam que essa migração teria ocorrido da África para as demais regiões do planeta, há cerca de 1.000.000 de anos, pois os materiais africanos eram consistentemente mais antigos que os asiáticos. Recentemente, Swisher e colaboradores (1994) realizaram novas datações dos materiais do *H. erectus* de Java, com resultados surpreendentes: os fósseis asiáticos são mais antigos do se supunha anteriormente, alcançando idades de até 1.800.000 anos; datas tão antigas quanto as disponíveis para o *H. erectus* africano. É pouco plausível que esse resultado possa sustentar a hipótese de que o *H. erectus* teria se originado na Ásia, pois simplesmente não há homínidos fora da África que possam tê-los originado. A

leitura mais simples dos resultados é de que a saída do *H. erectus* da África para a Ásia teria ocorrido mais cedo do que se supunha anteriormente. É a partir do momento em que o *H. erectus* espalhou-se pelo Velho Mundo que os modelos sobre a origem dos humanos modernos diferem (Meyer, 1994a, 1994b).

Stringer e Andrews (1988) relataram algumas evidências genéticas e paleontológicas para sustentar o modelo da origem africana recente dos humanos modernos (ou modelo da Monogênese Africana, ou ainda “Out of África”). Segundo esse modelo, após a dispersão do *H. erectus* os humanos modernos (hominídeos com características anatômicas iguais às nossas) teriam se originado na África e em nenhum outro local. Teria então ocorrido uma dispersão, a partir da África, para a Europa, a Ásia, a Austrália, e muito mais tarde, para o Novo Mundo. À medida que os humanos modernos ocupavam novas regiões, argumentam Stringer e Andrews, foram substituindo as populações de humanos arcaicos com que se deparavam. Essas populações arcaicas seriam descendentes dos *H. erectus* que previamente haviam colonizado aquelas regiões. Os humanos modernos “invasores”, de origem africana, provavelmente diferiam dos humanos arcaicos do ponto de vista anatômico e comportamental, explicando assim sua capacidade de substituí-los.

Esse modelo para a origem dos humanos apresenta como elemento fundamental à noção de que os humanos modernos originados na África estavam virtualmente isolados, do ponto de vista reprodutivo, das populações de humanos arcaicos espalhados pela Terra. A substituição de populações arcaicas pelos africanos teria sido total: não teriam sobrevivido formas não-africanas e não teria ocorrido troca de genes entre os africanos e os arcaicos locais. Portanto, todas as



populações humanas atuais seriam descendentes exclusivamente de humanos modernos africanos.

Os estudos genéticos foram fundamentais para dar respaldo ao modelo da Monogênese Africana. A hipótese de que não teria ocorrido hibridização entre humanos modernos e formas arcaicas, por exemplo, foi defendida por Stringer e Andrews (1988) quase exclusivamente com base nos resultados de estudos envolvendo DNA mitocondrial. Estudos paleontológicos também contribuíram para o modelo de substituição sem hibridização. Datações de humanos modernos e neandertais nos sítios de Qafzeh e Kebara, no Oriente Médio, mostraram que essas duas formas coexistiram por longos períodos de tempo (cerca de 60 mil anos). Stringer (1990) afirma que, apesar dessa convivência, não há sinais de hibridização entre humanos modernos e neandertais, corroborando a noção de que teria havido um isolamento reprodutivo entre ambas as linhagens, conforme prevê o modelo da Monogênese Africana.

O modelo de Evolução Multiregional propõe um cenário bastante diferente. Segundo esse modelo, as populações humanas começaram a se diferenciar há cerca de um milhão de anos, na época em que o *H. erectus* já ocupava várias regiões fora da África. Supõe-se que em diferentes regiões do mundo a transição entre o *H. erectus* e as formas arcaicas de *sapiens*, e finalmente formas modernas, teria ocorrido de maneira independente (Wolpoff, 1989; Thorne e Wolpoff, 1992). Segundo tal modelo, teria ocorrido uma origem de humanos modernos na Ásia, a partir do *H. erectus* asiático, uma origem na Europa, a partir do *H. erectus* europeus, e assim por diante, para diferentes regiões do planeta. Esse processo de origem independente de humanos modernos em diferentes

localidades deixaria como marca no registro fóssil a continuidade regional. Ela seria constatada pelo fato dos primeiros humanos modernos de determinadas regiões apresentarem características morfológicas que indicam serem descendentes dos arcaicos que habitavam aquelas mesmas áreas, e não dos arcaicos africanos. Evidências genéticas a favor do modelo Multiregional são relativamente raras, em contraste com o modelo da Monogênese Africana, que é corroborado por dados arqueológicos e genéticos (Cavalli-Sforza e colaboradores, 1988; Stringer e Andrews, 1988; Vigilant e colaboradores, 1991; Horai e colaboradores, 1995; Goldstein e colaboradores, 1995; Cavalli-Sforza e colaboradores, 1994).

A primeira divisão na filogenia humana parece ter ocorrido com a separação das populações africanas e não-africanas, estimada entre 75.000 e 287.000 anos atrás, de acordo com análises de dados microsátélites e de DNA mitocondrial (Cavalli-Sforza e colaboradores, 1994; Goldstein e colaboradores, 1995). Dados arqueológicos demonstram a presença de humanos modernos fora da África desde 100.000 anos atrás. Esses resultados corroboram com a data das primeiras migrações humanas fora da África (Cavalli-Sforza e colaboradores, 1994). Foi sugerido que, entre 50.000 e 100.000 anos atrás, ocorreram expansões demográficas na África (Harpending e colaboradores, 1998). Uma dessas expansões provavelmente levou a colonização da Eurásia, há cerca de 80.000 anos atrás (Watson e colaboradores, 1997). As populações europeias se separaram das populações do leste asiático e das ameríndias há cerca de 55.000 anos (Cavalli-Sforza e colaboradores, 1994). Sucessivamente, as populações

asiáticas foram responsáveis pelo povoamento da Melanésia/Austrália e das Américas (Cavalli-Sforza e colaboradores, 1994).

Populações de língua não-austronesianas migraram da Indonésia para Melanésia e Austrália 50.000-60.000 anos atrás (Cavalli-Sforza e colaboradores, 1994). Após este evento, várias outras migrações provavelmente ocorreram, a última há cerca de 3.000 anos atrás (Cavalli-Sforza e colaboradores, 1994). É interessante notar que o HTLV-I é endêmico entre tribos, como os Hagahai, descendentes dos primeiros colonizadores do continente australiano (Yanagihara e colaboradores, 1990; Gessain e colaboradores, 1991; Saksena e colaboradores, 1992; Gessain e colaboradores, 1993).

### **O povoamento das Américas.**

Evidências arqueológicas e genéticas permitiram a Greenberg e colaboradores (1986) proporem um modelo para o povoamento das Américas: O continente foi povoado em três diferentes migrações da Sibéria. Essas populações foram capazes de atravessarem o Estreito de Bering, 10.000-75.000 anos atrás. De acordo com este modelo, a primeira migração, cerca de 35.000 anos atrás, originou os Paleo-índios, e duas migrações subseqüentes, entre 12.000-25.000 anos atrás, originaram os povos Na-dene e Esquimós. Recentemente, um modelo alternativo foi proposto, baseado nas análises filogenéticas detalhadas de seqüências de DNA mitocondrial, que estabelece que os americanos nativos originaram de uma migração única, 30.000-43.000 anos atrás, do centro-leste asiático (Bonatto e Salzano, 1997).

## **Migrações pós-colombianas.**

Um grande número de indivíduos foi trazido da África para a América, entre os séculos XVI e XIX, proveniente do tráfico de escravos, principalmente do oeste e centro da África. Este tráfico de africanos para a América foi compreendido dos seguintes períodos e origens: (1º) Ciclo da Guiné, durante a 2ª metade do século XVI. 2º) Ciclo de Angola e do Congo, no século XVII. 3º) Ciclo da Costa da Mina, durante os três primeiros quartos do século XVIII. 4º) Ciclo da baía de Benin, entre 1770-1850.

Enquanto dados históricos demonstram a região da Costa da Mina como a região comum de onde africanos foram trazidos para o Brasil, há várias evidências que africanos vieram também de outras regiões do continente sul africano, hoje conhecidas como sul de Angola, África do Sul e Moçambique. Este tráfico pode ter sido responsável pela introdução pós-colombiana do HTLV-I no continente americano e no Japão.

Um canal de migração da Ásia para a América foi aberto durante a conquista das Filipinas, especialmente após 1580. Milhares de escravos filipinos, junto com outros da China, Japão e Índia, foram deportados para as Américas durante os séculos XVI e XVII (Sanchez-Albornoz, 1984). No início deste século, imigrantes japoneses vieram para a América Latina, e muitos dos seus descendentes vivendo no Brasil e no Peru, estão infectados pelo HTLV-I (Miura e colaboradores, 1994; Van Dooren e colaboradores, 1998, Yamashita e colaboradores, 1999).

A mobilidade humana aumentou muito no último século, como resultado do crescimento tecnológico e da globalização. Além disso, alguns eventos históricos

poderiam estar ligados com a propagação de um novo vírus em uma população particular (Salemi, 1999). Por exemplo, o contato entre indivíduos dos Estados Unidos e do Vietnã durante a Guerra do Vietnã poderia ser o responsável pela introdução do HTLV-II entre UDIs vietnamitas (Fukushima e colaboradores, 1998).

### **Análise dos haplótipos do gene da globina $\beta$ como marcadores de migrações populacionais.**

Os avanços no estudo do DNA humano nas últimas décadas tornaram possível a investigação das bases moleculares das anormalidades genéticas. A partir do mapeamento genético, foi possível a identificação de várias alterações ocorridas em regiões gênicas variadas. Muitas dessas variações podem ser detectadas através de diferenças de clivagem dos sítios de restrição, quando determinados genes são submetidos à análises por RFLP (Sutton e colaboradores, 1989).

A combinação específica de sítios polimórficos que ocorrem simultaneamente num mesmo cromossomo é denominada de haplótipo (Antonarakis e colaboradores, 1984). Os haplótipos podem ser usados em estudos antropológicos como marcadores de migração, origem e evolução da população humana, podendo assim serem utilizados para detectar distâncias genéticas entre grupos étnicos em estudos de origem populacional.

A descoberta dos diferentes haplótipos do gene da globina  $\beta$  ( $\beta^s$  por exemplo) forneceu resultados importantes para estudos antropológicos, além de

contribuir no conhecimento da variabilidade clínica da anemia falciforme (Nagel e Ranney, 1990).

## **HETEROGENEIDADE GENÉTICA DO HTLV.**

### **Estabilidade do genoma do HTLV.**

Os retrovírus geralmente evoluem numa velocidade de  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  substituições nucleotídicas por sítio por ano (Domingo e Holland, 1994), que é  $10^4$  a  $10^6$  vezes maior que a taxa evolucionária de genes celulares (Britten, 1986). Esta evolução rápida foi explicada como resultado de suas velocidades de replicação rápidas e também pela taxa de erro das RNA polimerases e transcriptases reversas virais. Medidas da fidelidade das transcriptases reversas virais *in vitro* revela que a maioria delas tem um taxa de erro de 10-100 vezes maior que as DNA polimerases celulares (Litvak e colaboradores, 1996). A taxa de replicação elevada e a persistência da infecção são provavelmente as causas principais da extrema variabilidade genética do HIV. Além disso, vários dados indicam que o HTLV-I e o HTLV-II têm uma estabilidade genômica alta. Estudando o HTLV-I isolado do mesmo indivíduo em vários anos, Gessain e colaboradores (1992) não encontraram evidências de alteração genética proviral neste indivíduo. Liu e colaboradores (1994a) investigaram a variabilidade genética do HTLV-I em duas famílias do Zaire, onde o vírus foi transmitido verticalmente da mãe para o filho. Crianças soropositivas tinham uma mãe soropositiva, enquanto crianças com um pai soropositivo, mas uma mãe soronegativa, eram sempre soronegativas. Sequenciamento do gene LTR, considerado a região mais variável do genoma do

HTLV, mostrou seqüências idênticas dentro das famílias, exceto em um membro da família, cujo provírus possuía uma única substituição de base (Liu e colaboradores, 1994a). Análises similares de seqüências do HTLV-II, nas regiões LTR e nos genes codificantes das proteínas do envelope e da transcriptase reversa, demonstraram que a divergência das seqüências entre vírus de regiões geográficas diferentes, incluindo isolados de tribos e populações aborígenes, é também muito baixa, menor que 10% (Gessain e colaboradores, 1992, Wattel e colaboradores, 1996).

### **A história do HTLV nas populações humanas.**

A endemicidade do HTLV-I e HTLV-II, em algumas populações vivendo em áreas remotas do globo, sugerem a possibilidade desses vírus ter infectado populações humanas desde milhares de anos atrás. Pigmeus Efe Mbuti, por exemplo, estão infectados com ambos os vírus; além disso, eles vivem muito isolados e são considerados descendentes dos antigos povos proto-africanos. A separação das populações humanas africanas e não-africanas foi estimada ter ocorrido 75.000-287.000 anos atrás, através de análise de DNA mitocondrial (Cavalli-Sforza e colaboradores, 1994; Reich e Goldstein, 1998) e várias observações mostraram que este fluxo gênico ocorreu normalmente dos pigmeus para as populações vizinhas (Cavalli-Sforza e colaboradores, 1994). De todas essas evidências pode ser inferido que as infecções pelo HTLV-I e HTLV-II entre os pigmeus são as mais antigas ou resultou de transmissões interespecíes, mais recentes, dos STLVs. Transmissões interespecíes freqüentes do STLV-I de símios para humanos foram demonstradas na África (Vandamme e colaboradores, 1994;

Liu e colaboradores, 1996; Mahieux e colaboradores, 1998a, Salemi e colaboradores, 1998b). Algumas das cepas do HTLV-I divergentes encontradas nas populações africanas poderiam ser resultantes principalmente da transmissão interespécies que das infecções antigas dos pigmeus. Até o presente momento, a infecção pelo HTLV-II nos pigmeus é sugerida como uma história antiga nesses pigmeus, desde que nenhum STLV-II próximo foi encontrado ainda. A endemicidade do HTLV-I entre ameríndios e a falta de evidências de infecções pelo SLTV-II em macacos do novo mundo, exceto um único STLV-II isolado de um macaco-aranha (após intensos estudos, não foi confirmado em outros macacos-aranha), levou a conclusão que o HTLV-II também esteve presente no continente americano desde a muito tempo atrás. Este vírus foi trazido, provavelmente, para as Américas há cerca de 15.000-35.000 anos, durante uma ou mais migrações das populações asiáticas, infectadas pelo HTLV-II, pelo Estreito de Bering (Lairmore e colaboradores, 1990; Ijichi e colaboradores, 1993; Pardi e colaboradores, 1993; Neel e colaboradores, 1994; Biggar e colaboradores, 1996). Finalmente, a presença do HTLV-II em Papua Nova Guiné e entre aborígenes australianos, e a ausência de primatas não-humanos na Melanésia e Austrália, sugere que o HTLV-I existiu entre os povos australóides que primeiro povoaram a Melanésia e Austrália, em torno de 60.000 anos atrás. (Yanagihara e colaboradores, 1991; Gessain e colaboradores, 1993).

### **Subtipos do HTLV-I.**

Os primeiros isolados do HTLV-I do Japão e do Caribe mostrou uma variabilidade na seqüência do gene *env* menor que 3% (Seiki e colaboradores,



1983; Malik e colaboradores, 1988; Gray e colaboradores, 1990). O isolamento subsequente, no Congo, de uma cepa do HTLV-I divergente, diferindo da cepa protótipo japonesa ATK1 em torno de 4% na região *env* (Hahn e colaboradores, 1984; Ratner e colaboradores, 1985), indicou que variantes mais distintas existem em regiões geográficas particulares. Isto foi confirmado pela descoberta de variantes do HTLV-I altamente divergentes (divergência em torno de 8,5%) na Melanésia (Gessain e colaboradores, 1993). Nos últimos anos, a utilização de análises filogenéticas das regiões LTR e *env*, com cepas de todo o mundo, levou a identificação de quatro diferentes subtipos: HTLV-Ia, também denominado subtipo Cosmopolita, contendo isolados de diferentes regiões geográficas (Miura e colaboradores, 1994, 1997); HTLV-Ib, também conhecido como subtipo Centro-africano, contendo isolados de populações da África Central (Hahn e colaboradores, 1984; Vandamme e colaboradores, 1994); HTLV-Ic, subtipo da Melanésia, em que se agrupam isolados divergentes de Papua Nova Guiné e de aborígenes australianos (Gessain e colaboradores, 1991; Bastian e colaboradores) e HTLV-Id, descrito como um novo e distinto subtipo molecular isolado de pigmeus de Camarões e de um indivíduo infectado no Gabão (Chen e colaboradores, 1995; Mahieux e colaboradores, 1997a). O subtipo Cosmopolita é dividido em cinco subgrupos, de acordo com suas distribuições geográficas: A ou Transcontinental, B ou Japonês, C ou Oeste-africano, D ou Norte-africano (Gasmi e colaboradores, 1994; Vidal e colaboradores, 1994; Miura e colaboradores, 1994) e E, isolado em negros do Peru (Van Dooren e colaboradores, 1998). Recentemente, Salemi e colaboradores (1998) propuseram mais dois subtipos

altamente divergentes: HTLV-Ie, isolado de um pigmeu Efe Mbuti do Congo, e HTLV-If, proveniente de um indivíduo do Gabão.

### **Subtipos do HTLV-II.**

Através do mapeamento de seqüências provirais, de diferentes indivíduos infectados, com endonucleases de restrição e sequenciamento de parte do gene *env*, codificante da glicoproteína transmembrana gp21, foram descritos dois subtipos para o HTLV-II, HTLV-IIa e HTLV-IIb, descritos por Hall e colaboradores (1992). Na seqüência codificante da gp21 foi encontrada uma divergência de 1% nos isolados do HTLV-IIa ou nos isolados do HTLV-IIb, onde uma divergência de quase 4% foi observada entre os subtipos IIa e IIb. A análise filogenética utilizando o gene LTR, claramente confirmou a existência de dois subtipos moleculares únicos (Eiraku e colaboradores, 1995; Salemi e colaboradores, 1996). Entretanto, o subtipo IIb tem uma ORF (“open read frame”) na proteína Tax com 25 aminoácidos a mais em relação ao subtipo IIa, devido um ponto de mutação no subtipo IIa que adquiriu um códon de parada (Lee e colaboradores, 1993; Salemi e colaboradores, 1995; Eiraku e colaboradores, 1996). A hipótese de que este códon de parada foi adquirido pelo HTLV-IIa, e não perdido pelo HTLV-IIb, torna-se evidente quando cepas pertencentes a uma sub-ramificação do subtipo IIa, isoladas de uma população indígena brasileira, demonstraram a manutenção de uma proteína Tax semelhante no tamanho à proteína Tax do subtipo lib, sendo identificado como um novo subtipo, chamado HTLV-IIc (Eiraku e colaboradores, 1996).

Os subtipos HTLV-IIa e HTLV-IIb estão presentes em UDIs dos Estados Unidos (Dube e colaboradores, 1993; Hjelle e colaboradores, 1993; Takahashi e colaboradores, 1993; Switzer e colaboradores, 1995a; Eiraku e colaboradores, 1995). O HTLV-IIb foi isolado em UDIs vietnamitas (Fukushima e colaboradores, 1998). A caracterização de isolados do HTLV-II, obtidos de UDIs italianos e espanhóis, indicou que o subtipo IIb parece ser o prevalente no sudeste europeu (Zella e colaboradores, 1993; Vallejo e colaboradores, 1996), mas infecções esporádicas de IIa foi identificada entre UDIs da Itália (Salemi e colaboradores, 1995). O subtipo HTLV-IIa é prevalente em UDIs do norte da Europa (Switzer e colaboradores, 1995a; HERN, 1996; Salemi e colaboradores, 1998a).

As tribos nativas americanas Navajo e Pueblo, vivendo no Novo México, são infectadas com ambos subtipos (Hjelle e colaboradores, 1993). O HTLV-IIb foi isolado de índios da tribo Seminole na Florida (Switzer e colaboradores, 1995a; Biggar e colaboradores, 1996), Guaymi no Panamá (Pardi e colaboradores, 1993; Biggar e colaboradores, 1996), Wayu e Guahibo na Colômbia (Switzer e colaboradores, 1995b; Miura e colaboradores, 1997), Tobas na Argentina (Dube e colaboradores, 1993; Ferrer e colaboradores, 1996) e Mapuche no Chile (Miura e colaboradores, 1997). O subtipo IIa foi encontrado também em tribos indígenas brasileiras, como Kaiapós (Ishak e colaboradores, 1995; Eiraku e colaboradores, 1996; Switzer e colaboradores, 1996), Kraho e Kaxuyama (Biggar e colaboradores, 1996) e Tiriyo (Lewis e colaboradores, 2000).

Somente um isolado do HTLV-II de um pigmeu Bakola, vivendo em Camarões, foi seqüenciado e pertence ao subtipo IIb (Gessain e colaboradores, 1995). Vandamme e colaboradores (1998a) isolaram um novo subtipo, chamado

HTLV-II<sub>d</sub>, de pigmeu Efe Mbuti que vive no Congo. Essa cepa é a mais divergente de todos os subtipos já encontrados.

### **HTLV-I e HTLV-II no Brasil.**

A soroprevalência para o HTLV-I foi descrita primeiramente no Brasil em 1986, entre imigrantes japoneses (13%) na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul (Kitagawa e colaboradores, 1986). Pode-se sugerir que esta alta prevalência seja porque no início do século XX, o sul e o sudeste do Brasil foram os principais destinos de importantes migrações da Europa e da Ásia. Nos dias atuais, o sudeste (estado de São Paulo) tem a maior comunidade japonesa fora do Japão.

Após isso, outros estudos demonstraram a presença do HTLV-I e HTLV-II entre grupos populacionais específicos em outros estados, usando critérios de diagnósticos diferentes. Em 1993, utilizando um critério padrão de diagnóstico, entre doadores de sangue de cinco capitais do Brasil, foi demonstrada a soroprevalência de HTLV-I no país (0,45%), sendo Salvador a cidade com a prevalência mais alta (1,35%) (Galvão-Castro e colaboradores, 1997). Posteriormente, UDIs foram investigados em Salvador e taxas de infecção elevadas foram demonstradas em homens e mulheres respectivamente: HTLV-I, 22% e 46,2%; HTLV-II, 11,3% e 10,3%; HIV-1, 44,1% e 74,4% (Andrade e colaboradores, 1998; Dourado e colaboradores, 1998, 1999). Dos Santos e colaboradores (1995) demonstrou pela primeira vez no Brasil uma prevalência de 0,9% em gestantes de baixa renda em Salvador, Bahia.

Durante a colonização portuguesa, entre os séculos XVI e XIX, em torno de 4.000.000 de pessoas foram trazidas da África para o Brasil, como resultado do tráfico de escravos, principalmente para as regiões nordeste e sudeste. A grande maioria destes africanos tinha como destino a cidade de Salvador, na Bahia, onde hoje, em torno de 80% da população são descendentes de africanos. Apesar da maioria dos africanos trazidos para a Bahia, durante o tráfico de escravos tenham vindo do oeste da África, especificamente do Benin e da Nigéria, anteriormente denominado Costa da Mina (Rodrigues, 1977; Viana Filho, 1988; Verger, 1968), Rodrigues (1977) mostra evidências que africanos também foram trazidos de outras regiões do sul do continente africano, atualmente conhecidas como Angola, África do Sul e Moçambique. Além disso, a nação Nagô existente na Bahia teve a sua origem na nação loruba, que povoavam principalmente o sul da África.

As manifestações clínicas do HTLV-I foram também encontradas no Brasil, e desde 1989 vários casos de TSP/HAM, apresentaram-se com frequências de 14,7% a 57% (de Castro-Costa e colaboradores, 1994). O primeiro estudo nacional sobre TSP/HAM concluiu que esta doença neurológica associada ao HTLV-I ocorre principalmente nas regiões nordeste e sudeste e predomina entre mulheres (Araújo e colaboradores, 1998).

Até agora, dos poucos isolados do HTLV-I que foram estudados no Brasil, todos pertencem ao subtipo Cosmopolita. Poucos se agrupam no subgrupo Japonês, enquanto a maioria se agrupa no subgrupo Transcontinental (Yamashita e colaboradores, 1999).

O HTLV-II foi detectado em doadores de sangue e UDIs de áreas urbanas no Brasil, bem como em índios nativos vivendo na floresta Amazônica (Eiraku e

colaboradores, 1996; Ferreira Junior e colaboradores, 1995; Lewis e colaboradores, 2000; Maloney e colaboradores, 1992; Switzer e colaboradores, 1995). Recentemente, foi demonstrado que UDIs, residindo em Salvador, apresentam a maior soroprevalência para o HTLV-II (8,8%) observada na população brasileira (Andrade e colaboradores, 1998). No Brasil, somente o subtipo IIa foi identificado, mas estes isolados de HTLV-II do Brasil se agrupam isoladamente, quando analisados filogeneticamente, formando uma variante do subtipo IIa (Ishak e colaboradores, 1995; Eiraku e colaboradores, 1996; Biggar e colaboradores, 1996; Lewis e colaboradores, 2000).

## **MÉTODOS FILOGENÉTICOS MOLECULARES.**

Desde o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, o número de seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos disponíveis, para os diferentes genes de diferentes organismos, tem aumentado exponencialmente. Hoje, inferência filogenética é preferencialmente empregada nesses dados moleculares, substituindo a análise das características fenotípicas do passado.

O primeiro passo num método filogenético implica no alinhamento das seqüências homólogas. Duas seqüências são tidas como homólogas quando se pode assumir que elas têm um ancestral comum. Algoritmos de alinhamento diferentes foram desenvolvidos com o objetivo de minimizar o número de erros entre todas as seqüências num banco de dados. Procurando obter o melhor alinhamento, "gaps", podem ser inseridos em uma ou mais seqüências para ajustar as diferenças no comprimento interno. O alinhamento é então utilizado para inferir relações filogenéticas (Rev. de Salemi, 1999)

## **Árvores filogenéticas.**

Uma árvore filogenética é uma representação gráfica da relação evolucionária entre organismos ou unidades taxonômicas operacionais (OTUs), também denominados “taxa”. “Taxa” numa árvore filogenética pode ser, por exemplo, um grupo de animais ou cepas virais diferentes. A árvore é composta de nodos conectados por braços. O nodo terminal, ou “tips”, representa o “taxa” contemporâneo, enquanto os nodos internos representam os ancestrais. Uma relação filogenética em uma árvore é definida por um braço conectando dois nodos. Um grupo de “taxa” dividindo um mesmo ancestral comum é denominado de um grupo monofilético ou “clade”. O modelo geral de vários braços numa árvore é referido como a topologia da árvore (Rev. de Salemi, 1999).

Evolução é normalmente considerado um processo onde um ancestral origina dois diferentes descendentes. Uma árvore filogenética representada por três braços conectados por um nodo interno é chamada bifurcação. Uma árvore em que todos os nodos internos apresentam bifurcações é dita ser uma árvore totalmente resolvida ou estritamente bifurcada. Entretanto, um único ancestral pode originar vários descendentes diferentes, resultando em uma árvore com topologia de estrela, onde mais de três braços estão conectados a um nodo interno.

Árvores filogenéticas podem ser denominadas com raiz ou sem raiz. Uma árvore é dita sem raiz quando o ponto mais antigo no tempo, o local de um ancestral comum para todos os “taxa”, não foi identificado. Em árvores com raiz a origem e a direção do caminho evolucionário são conhecidas, enquanto árvores sem raiz dão informação somente sobre a relação entre os “taxa”, mas não

definem uma direção evolucionária. A melhor maneira de transformar uma árvore sem raiz em uma com raiz é incluir um grupo externo (“outgroup”), que é um “taxa” com um longo braço, mais antigo e divergente que todos os outros “taxa” do estudo. O grupo externo deve ser escolhido com cautela. Ele deve ter divergido antes de todos os outros “taxa”, mas não deve ser tão distantemente relacionado dos outros, a fim de obter um alinhamento não ambíguo e evitar dificuldades em estimar a verdadeira distância entre o grupo externo e os “taxa” (Rev. de Salemi, 1999).

### **Modelos de substituição nucleotídica.**

A primeira idéia sobre a relação entre diferentes “taxa” pode ser dada pela sua distância evolucionária. A maneira mais simples de estimar a distância evolucionária entre duas seqüência nucleotídicas é contar o número total de nucleotídeos diferentes entre elas e dividir pelo número total de nucleotídeos disponíveis. As seqüências deverão ter o mesmo comprimento. Esta aproximação assume que as seqüências devem estar alinhadas e “gaps” inseridos para ajustar as mudanças no comprimento interno. Esta distância evolucionária é chamada distância-p. Uma estimativa mais real pode ser encontrada utilizando um modelo particular de evolução, que assume como os nucleotídeos mudam durante o processo evolutivo. Por exemplo, considerando quatro nucleotídeos, A, C, G e T, este modelo poderia estimar a probabilidade que cada nucleotídeo tem quando permanece o mesmo e se altera durante a evolução. Probabilidades podem também ser usadas para distâncias evolucionárias aproximadas.



Os modelos de substituição nucleotídica geralmente assumem que o processo de mudança é um processo Markov homogêneo. A probabilidade de mudança em um modelo Markov não depende da história prévia do sistema. Por exemplo, a probabilidade que a posição de um G numa seqüência mude para T, no futuro, é dependente do fato que um A ou C mudou para G no passado. O processo é também considerado reversível no tempo, assim que a substituição de A por C tem a mesma probabilidade que a substituição de C por A. Finalmente, as freqüências do quatro nucleotídeos assumem serem constantes durante todo o tempo (Rev. de Salemi, 1999).

Os modelos de substituição nucleotídica freqüentemente consideram dois tipos de substituição nucleotídica: transição e transversão. Uma transição ocorre quando uma purina é substituída por outra purina, ou uma pirimidina é substituída por outra pirimidina. Duas transições diferentes são possíveis, entre purinas e entre pirimidinas. Uma transversão ocorre quando uma pirimidina é substituída por uma purina, ou vice-versa. Quatro transversões são possíveis.

Os modelos de substituição nucleotídica mais comuns são os seguintes: O modelo de Jukes e Cantor (JC69), que assume freqüências iguais para cada nucleotídeo em equilíbrio e que todas as mudanças, entre os quatro nucleotídeos, ocorrem com a mesma probabilidade (Jukes e Cantor, 1969); o modelo Kimura-2-parâmetros (K80), que permite transições e transversões ocorrendo com diferentes probabilidades (Kimura, 1980); o modelo Felsenstein (F81), que permite aos quatro nucleotídeos terem freqüências diferentes em equilíbrio (Felsenstein, 1981); o modelo Hasegawa (HKY85), que permite freqüências nucleotídicas diferentes em equilíbrio e parcialidade em transição/transversão (Hasegawa,

Kishino e Yano, 1985); o modelo Tamura e Nei (TN93) é similar ao HKY85, mas também permite que transições entre pirimidina e transições entre purinas ocorram com diferentes probabilidades (Tamura e Nei, 1993).

Geralmente achamos que os modelos mais complexos são melhores para estimarmos a distância evolucionária. Entretanto é importante saber que aumentando a complexidade de um modelo, aumenta-se também o desvio padrão da distância estimada.

### **Modelos de $\gamma$ -Distribuição.**

Todos os modelos descritos anteriormente assumem que cada sítio nas seqüências nucleotídicas alinhadas sofre mutação exatamente na mesma velocidade. Entretanto, pressões seletivas diferentes em posições diferentes do genoma podem ser responsáveis por alguns nucleotídeos evoluírem mais lentamente ou mais rapidamente que outros. Em regiões codificantes, mutações na primeira e segunda posição geralmente levam à mudança no aminoácido, e elas ocorrem normalmente a baixas velocidades devido à seleção purificante. Além disso, regiões não codificantes tendem a mudanças rápidas, porque mutações podem ocorrer com menos restrições que em regiões codificantes. Em uma aproximação clássica, a velocidade da heterogeneidade entre os sítios pode ser aproximada por uma função estatística chamada  $\gamma$ -distribuição, que representa a velocidade de substituição nucleotídica em função da proporção de sítios tendo uma velocidade particular (Yang e colaboradores, 1996). A inclusão de taxas de substituição nucleotídicas  $\gamma$ -distribuídas nos modelos descritos anteriormente é

uma descrição mais realística do processo evolucionário e permite estimar a distância evolucionária (Rev. de Salemi, 1999).

### **Métodos filogenéticos baseados no cálculo da matriz de distâncias.**

Em métodos de distância, a distância evolucionária é computada para todos os pares de “taxa”, levando a uma matriz de distâncias. A árvore é então construída empregando um algoritmo em que a relação topológica local entre “taxa” é identificada em ordem de similaridade. Os principais métodos utilizados são: análise de “cluster” (UPGMA) (Michener e Sokal, 1957), neighbor-joining (NJ) (Saitou e Nei, 1987) e o método de Fitch-Margoliash (Fitch e Margoliash, 1967).

### **Métodos filogenéticos baseados nos cálculos de “maximum likelihood”.**

Métodos de “maximum likelihood” avaliam o grupo de probabilidades que um dado modelo evolucionário produzirá utilizando as seqüências observadas. As filogenias inferidas são aquelas com maior probabilidades. Com esses métodos é possível estimar os diferentes parâmetros envolvidos na computação dos modelos de substituição nucleotídica diferentes (Felsenstein, 1981).

### **Métodos de parcimônia.**

O método da parcimônia define como a melhor hipótese filogenética aquela que apresenta o menor número de passos, cada passo sendo definido como uma mudança de estado de caráter. Trata-se, portanto, de um método de otimização (Henning, 1966).

## O “bootstrap”.

Felsenstein (1985), propôs o uso do “bootstrap” para avaliar a magnitude dos efeitos de erros amostrais sobre inferências. O “bootstrap” é implementado da seguinte forma:

A matriz de dados original é usada para gerar novas matrizes, as matrizes de “bootstrap”. Caracteres da matriz original são amostrados aleatoriamente e transferidos para a matriz de “bootstrap”. Todos os caracteres da matriz original podem ser amostrados com igual probabilidade. Esse processo de amostragem, entretanto, é realizado com reposição. Isto significa que um mesmo caráter pode ser transferido mais de uma vez para a matriz de “bootstrap” a partir da matriz original, enquanto outros caracteres não serão amostrados nenhuma vez. Este processo inteiro é repetido várias vezes, gerando diversas matrizes de “bootstrap”. A seguir, cada uma dessas é usada para inferir uma árvore usando um mesmo método. Uma vez que as matrizes são diferentes umas das outras (em decorrência do processo de amostragem) diferentes árvores podem ser geradas. Os valores de “bootstrap” apresentados em uma árvore indicam em quantas das árvores, geradas a partir das matrizes de “bootstrap”, determinado agrupamento foi obtido.

## II. RACIONAL.

No início da década de 90, o Programa de Controle de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS do Ministério da Saúde, com o objetivo de conhecer a distribuição geográfica do HTLV-I no Brasil, decidiu fazer um levantamento nacional da soroprevalência deste vírus (Galvão-Castro e colaboradores, 1997). Observou-se que a prevalência variou nas diferentes regiões geográficas, sendo 0,08% em Manaus e Florianópolis, 0,33% em Recife e Rio de Janeiro e 1,35% em Salvador. As evidências indicavam a cidade de Salvador como aquela com a prevalência mais elevada; provavelmente o epicentro dessa infecção no país. No entanto, alguns fatos sugeriam que esta prevalência poderia estar subestimada na população geral desta cidade. Primeiro, sabe-se que uma das características dessa infecção é ocorrer com mais frequência em mulheres e aumentar com a idade. Desde que os dados obtidos foram em doadores de sangue e estes geralmente, no Brasil, são dos gêneros masculino e adultos jovens, poder-se ia ter um viés destes dados e a prevalência estaria subestimada na população geral desta cidade. Reforçando esta hipótese observou-se uma prevalência mais elevada em pacientes acometidos de tuberculose (11%) e em portadores de alterações neurológicas aparentemente não associadas ao HTLV (Moreira Jr. e colaboradores, 1993; Gomes e colaboradores, 1999). A maioria dos pacientes com alterações neurológicas era do gênero feminino.

Por outro lado, observou-se que a prevalência em gestantes foi de 0,9% (Dos Santos e colaboradores, 1995). No entanto, a idade da maioria das gestantes (82%) era menor que 30 anos. Sabe-se que a prevalência desta infecção, embora seja mais elevada no gênero feminino, aumenta com a idade.

Com o objetivo de avaliar a real prevalência desta infecção na cidade de Salvador, realizamos um estudo utilizando uma amostra populacional.

Como foi anteriormente referida, a prevalência desta infecção em gestantes foi de 0,9%. Neste trabalho não foi possível avaliar, com profundidade, os fatores de risco, dados clínicos e obstétricos destas mulheres. Com este objetivo, realizamos um estudo com 6.754 gestantes provenientes de uma maternidade pública (IPERBA) no período compreendido entre janeiro de 1996 e setembro de 1998.

Quanto a origem do HTLV-I no continente americano, duas hipóteses têm sido aventadas. A primeira é a Pré-Colombiana, baseada na migração de populações oriundas do norte da Ásia, através do Estreito de Bering, há cerca de 15.000-35.000 anos atrás (Lairmore e colaboradores, 1993; Neel e colaboradores, 1994; Biggar e colaboradores, 1996). A segunda, Pós-Colombiana, especula que o HTLV-I foi disseminado da África para o Novo Mundo e até para o Japão, durante o tráfico de escravos, no período compreendido entre os séculos XVI a XIX (Miura e colaboradores, 1994; Van Dooren e colaboradores, 1998; Yamashita e colaboradores, 1999).

Os vários haplótipos da globina  $\beta$  têm diferentes origens étnicas e geográficas. Como exemplo, os haplótipos africanos podem ser classificados

como: o tipo Benin (BEN), originado no oeste da África, o tipo Banto ou CAR (“Central African Republic”), no leste, centro e sul da África, o tipo Senegal (SEN) no Atlântico-oeste da África, o tipo Arábia Saudita-Índia, no subcontinente indiano e na península do oeste-árabe e o tipo Camarões, em alguns pontos da costa oeste da África (Nagel, 1984; Lapoumeroulie e colaboradores, 1989; Nagel e Ranney, 1990; Hattori e colaboradores, 1986). O grande fluxo migratório para o Brasil, produziu uma população com significativa heterogeneidade cultural, social e étnica. Salvador, capital do estado da Bahia, uma cidade com 2,7 milhões pessoas, possui a população mais bem caracterizada como uma mistura tri-racial de genes africanos, europeus e ameríndios (Azevedo e colaboradores, 1981; Zago e colaboradores, 1992, Gonçalves e colaboradores, 1994, Gonçalves e colaboradores, 2002). Esta infrequente composição étnica desta cidade, que foi um dos pontos principais do tráfico de escravos africano, representa uma excelente localização para o estudo dos haplótipos  $\beta$  e para investigação de possíveis origens antropológicas do gene  $\beta$  nesta população.

No intuito de averiguar a origem do HTLV-I, na cidade de Salvador, e que as migrações pós-colombianas para esta cidade não estavam restritas aos africanos oriundos do oeste da África, realizamos um estudo filogenético dos isolados de HTLV-I de Salvador e analisamos o gene que codifica a globina  $\beta$ , por RFLP, nos indivíduos infectados. Este estudo contemplou amostras da população geral e de grupos específicos, tais como: gestantes, UDIs e pacientes portadores de neuropatias.

Sabe-se que a prevalência do HTLV-II é elevada em UDIs na cidade de Salvador. Além do mais, detectamos uma prevalência muito baixa (0,03%) em gestantes (manuscrito nº 2), mas que sugere a disseminação deste vírus para a população geral desta cidade.

Estudos prévios têm sugerido que tanto o HTLV-I como o HTLV-II infectaram a espécie humana há milhares de anos, desde que se verificou a presença desses dois retrovírus em pigmeus Efe Mbuti que são considerados os descendentes mais antigos da primeira população humana africana (Cavalli-Sforza e colaboradores, 1994). Estes indivíduos vivem ainda isolados em regiões africanas.

Por outro lado, tem sido sugerido que ocorreu uma transmissão interespecie do STLV, de símios para humanos, pois foi demonstrada esta transmissão do STLV-I de símios para humanos, na África, e que os subtipos divergentes, do HTLV-I, encontrados na África devem assim resultar mais desta transmissão interespecie que de infecções antigas nos pigmeus (Vandamme e colaboradores, 1994; Liu e colaboradores, 1996; Mahieux e colaboradores, 1998; Salemi e colaboradores, 1998b). A descoberta de dois isolados do STLV-II na África favorece também a hipótese que pode ter ocorrido uma transmissão interespecie do STLV-II para humanos africanos antigos, originando o HTLV-II (Giri e colaboradores, 1994; Liu e colaboradores, 1994b; Vandamme e colaboradores, 1996).

Apesar dessas duas hipóteses de origem africana do HTLV-II, este vírus não é endêmico na África. Porém, a demonstração de uma endemicidade elevada nos ameríndios, sem confirmação da presença do STLV-II nas Américas, permitiu



concluir que o HTLV-II está presente no continente americano desde muitos anos atrás. Isto sugere que este vírus foi trazido para as Américas durante as migrações dos povos mongolóides pelo Estreito de Bering entre 15.000-35.000 anos atrás.

Estudos de caracterização genotípica de isolados do HTLV-II, provenientes de UDIs no Brasil, têm demonstrado, surpreendentemente, a presença do subtipo a, variante brasileira, o qual foi também detectado em populações indígenas brasileiras, desde que presumia-se que estes povos permanecem isolados.

Em Salvador, embora a prevalência do HTLV-II seja elevada (8%) em UDIs, não se sabe os subtipos do HTLV-II circulantes. Com este objetivo, realizamos um estudo filogenético destes vírus provenientes de UDIs, residentes na cidade de Salvador.

Estudamos também a prevalência de retrovírus humanos (HIV/HTLV), como também a caracterização molecular destes vírus em duas tribos indígenas do norte do Brasil.

### **III. OBJETIVOS.**

#### **Gerais.**

1. Caracterizar o polimorfismo genético do HTLV-I em Salvador, Bahia, verificando a possível origem deste vírus nesta população;
2. Caracterizar o polimorfismo genético do HTLV-II em Salvador, Bahia, e em duas tribos indígenas do norte do Brasil, utilizando os resultados obtidos deste estudo para traçar uma possível origem deste vírus.

#### **Específicos.**

1. Avaliar a prevalência do HTLV-I na população geral e em gestantes na cidade de Salvador;
2. Verificar as características epidemiológicas da infecção causada pelo HTLV-I em Salvador;
3. Avaliar a importância do aleitamento materno na transmissão vertical do HTLV-I em Salvador;
4. Subtipar isolados do HTLV-I através do sequenciamento da região LTR proviral;
5. Inferir sobre a origem do HTLV-I em Salvador, Bahia, através da análise filogenética da região LTR proviral e análise dos polimorfismos, ligados aos haplótipos do grupo de genes da Globina  $\beta$ , nos indivíduos infectados estudados;
6. Analisar os subtipos do HTLV-II prevalentes em UDIs de Salvador, utilizando os resultados para inferir sobre a origem deste vírus nesta cidade;

7. Estudar a prevalência de retrovírus humanos (HIV/HTLV) em duas tribos indígenas do norte do país, bem como a epidemiologia molecular do HTLV-II nessas populações, podendo assim sugerir uma possível origem deste vírus nessas tribos.

#### IV. RESUMO DOS RESULTADOS.

Com o objetivo de se obter uma prevalência mais acurada da infecção causada pelo HTLV-I na população geral de Salvador, realizamos um estudo de corte seccional. A amostragem foi obtida de um projeto mais amplo (Projeto Bahia Azul), coordenado pelo Instituto de Saúde Coletiva da Universidade Federal da Bahia. Este projeto teve como objetivo avaliar os resultados de medidas de saneamento implementadas pelo governo do Estado.

Nas 1.385 amostras provenientes do Projeto Bahia Azul, detectou-se uma prevalência de 1,7% (23) para o HTLV-I, sendo 1,2 e 2% para os gêneros masculino e feminino, respectivamente. A idade da população estudada 1 a 89 anos, sendo 582 (42%) de indivíduos do gênero masculino e 803 (58%) do gênero feminino. Observou-se que a prevalência aumentava com a idade; sendo maior em mulheres e associada a escolaridade renda baixas.

A análise filogenética de 19 isolados de HTLV-I dos 23 indivíduos infectados demonstrou a presença do subtipo Cosmopolita, subgrupo Transcontinental. Detalhes deste estudo podem ser encontrados no **manuscrito nº 1**.

Foi demonstrada anteriormente uma prevalência de 0,9% em gestantes de baixa renda em Salvador, Bahia (Dos Santos e colaboradores, 1995). No entanto, seria de fundamental importância obter dados clínicos e obstétricos dessas gestantes infectadas. Anticorpos anti-HTLV-I/II foram triados no plasma destas mulheres com a mesma metodologia anteriormente referida. Casos

sorologicamente indeterminados foram confirmados através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Encontramos 57 (0,84%) portadores de infecção por HTLV-I e dois (0,03%) pelo HTLV-II.

A idade média das mulheres infectadas foi de 26,2 anos. Todas as mulheres foram negativas para HIV e sífilis, e somente duas relataram história de doenças sexualmente transmissíveis e mais de 10 parceiros sexual. Em relação à amamentação, 52 mulheres infectadas foram analisadas. Observamos que 46 (88,5%) foram amamentadas com leite materno, duas (4,0%) com leite artificial e 4 (7,5%) não souberam informar. Somente seis mulheres relataram ter recebido transfusão de sangue e apenas uma era UDI. Nenhuma estava infectada pelos vírus das hepatites B e C. Destas 52 mulheres, 45 (86,5%) tiveram parto a termo, cinco (9,6%) prematuros e duas (3,9%) abortaram.

Realizamos também um estudo caso controle, comparando dados epidemiológicos, clínicos e obstétricos das 52 mulheres infectadas pelo HTLV-I com 122 gestantes não infectadas pelo HTLV-I. Detalhes destes resultados podem ser observados no **manuscrito nº 2**.

Até o momento, poucos estudos foram realizados no Brasil, sobre o polimorfismo do HTLV-I. Todos os isolados estudados foram classificados como subtipo Cosmopolita. A maioria se agrupou no subgrupo Transcontinental, formando um grupamento filogenético de isolados da América Latina. No entanto, somente poucos isolados de São Paulo se agruparam no subgrupo Japonês (Yamashita e colaboradores, 1999). Neste estudo, apenas três isolados virais de Salvador foram analisados, sendo que todos se agruparam no grupamento da América Latina.

Como já foi dito anteriormente, Salvador tem uma população constituída por 80% de mestiços descendentes de portugueses e de africanos trazidos da África para o trabalho escravo no Brasil. Com o objetivo de analisar o polimorfismo genético dos isolados do HTLV-I em Salvador, estudamos 82 isolados virais provenientes de indivíduos infectados desta cidade, visto ser esta a área com prevalência mais elevada para o HTLV-I no Brasil. Todos os isolados analisados se agruparam no subtipo Cosmopolita. De todos os isolados que se agruparam no subgrupo Transcontinental, observamos sete isolados fora do grupamento da América Latina. Apenas um isolado ficou fora do subgrupo Transcontinental, mas muito próximo ao subgrupo Japonês. Estes resultados demonstraram uma heterogeneidade filogenética grande entre os isolados de HTLV-I de Salvador.

Para melhor interpretar os resultados obtidos na análise filogenética, selecionamos, ao acaso, 34 amostras de DNA genômico (68 cromossomos) entre os 82 indivíduos infectados com HTLV-I, sendo 33 do subgrupo Transcontinental e uma fora desse subgrupo. Amplificamos, por PCR, sete fragmentos do gene da globina  $\beta$  ( $5'G_\gamma$ ,  $G_\gamma$ ,  $A_\gamma$ ,  $\Psi\beta$ ,  $3'\Psi\beta$ ,  $5'\beta$ ,  $3'\beta$ ) e pesquisamos por RFLP, utilizando as enzimas restrição XmnI, HindIII, HindIII, HincII, HincII, HinfI e HpaI, a presença dos haplótipos tipo Benin, Banto e Senegal, que apresentaram a seguinte distribuição: 45,2% do tipo Benin, 28,9% do tipo Banto e 25,9% do tipo Senegal. Detalhes desses resultados podem ser observados **no manuscrito nº 3**.

De acordo com os dados relatados acima, o HTLV-I representa um problema de saúde pública grave em Salvador. Em relação ao HTLV-II, já foi demonstrada uma prevalência elevada em UDIs nesta cidade (Andrade e

colaboradores, 1998; Dourado e colaboradores, 1998, 1999). Nós demonstramos uma prevalência de 0,03% em gestantes (manuscrito nº 2), indicando que o vírus poderia estar se disseminando na população geral de Salvador. Este vírus poderia ter sido introduzido pelos indígenas brasileiros ou através do compartilhamento de seringas ou agulhas contaminadas entre UDIs de Salvador e UDIs provenientes da Europa e/ou América do Norte infectados pelo HTLV-II.

Realizamos um estudo filogenético destes vírus isolados de UDIs residentes em Salvador. Verificamos que todos os isolados do HTLV-II pertencem ao subtipo “a”, estando a maioria deles formando um ramo filogenético único de isolados do Brasil, denominado variante molecular brasileira. Apenas um único isolado manteve o padrão do subtipo “a” isolado de UDIs nos EUA e Europa.

Interessantemente, a demonstração dos isolados do HTLV-II provenientes de UDIs de Salvador, agrupando-se filogeneticamente com outros isolados da variante molecular do subtipo “a”, sugere uma introdução antiga deste vírus, da população indígena para doadores de sangue e UDIs de Salvador. Quanto ao isolado de HTLV-IIa, este agrupou-se fora do ramo da variante molecular brasileira, sugerindo uma introdução recente do subtipo IIa norte-americano ou europeu em Salvador. Detalhes destes resultados podem ser encontrados no **manuscrito nº 4**.

Finalmente tivemos a oportunidade de investigar alguns aspectos epidemiológicos e moleculares das retrovirose humanas (HTLV-I/II e HIV) em duas tribos indígenas, Waiampi e Tiriyo, situadas na região amazônica brasileira. Este trabalho foi realizado por solicitação do Programa de Controle de DST/AIDS do Ministério da Saúde, devido a ocorrência de um caso suspeito de AIDS na tribo

Tiriyo. A tribo Waiampi foi incluída, uma vez que existem contatos entre essas duas tribos. Foram avaliados 1.004 índios, sendo 321 Waiampi e 683 Tiriyo.

O HIV-1 e o HTLV-II foram detectados com prevalências baixas, 0,1% e 0,44% na tribo Tiriyo, enquanto que nenhum caso de HTLV-I foi detectado. Na tribo Waiampi, nós encontramos somente HTLV-I com uma prevalência de 0,19%. Estudos moleculares demonstram tratar-se de um subtipo B do HIV-1 e HTLV-IIa, variante molecular brasileira. Devido ao fato de não dispormos de PBMCs dos Waiampi infectados pelo HTLV-I, não foi possível a realização da avaliação molecular. Detalhes podem ser encontrados no **manuscrito nº 5**.



## V. DISCUSSÃO.

Avaliamos a prevalência da infecção causada pelo HTLV-I em uma amostragem, representada por indivíduos de faixas etárias variadas, em 30 áreas de vigilância sentinela em Salvador. Esta amostragem é bastante representativa da população geral de Salvador (Manuscrito nº 1). A prevalência geral detectada foi de 1,7%, não havendo diferença significativa com aquela previamente detectada em doadores de sangue (1,35%) (Galvão-Castro e colaboradores, 1997).

Verificamos resultados extremamente interessantes, quando avaliamos esta prevalência em relação ao gênero e idade. Em relação à idade observou-se que a prevalência aumenta linearmente, confirmando resultados anteriores (Hino e colaboradores, 1996; Ueda e colaboradores, 1993). Várias hipóteses têm sido formuladas para explicar este fenômeno (Tajima e colaboradores, 1990; Tajima e colaboradores, 1982): 1) este aumento resultaria da maior probabilidade de contatos com indivíduos infectados durante a vida, constituindo o efeito da idade; 2) ou efeito denominado coorte, caracterizado por melhoria das condições sócio-econômicas e/ou sanitárias. Esta melhoria faria com que indivíduos com idade mais elevada apresentassem a infecção, enquanto que aqueles mais beneficiados *das medidas aludidas acima, apresentassem taxa de infecção menor. Esta hipótese foi aventada por pesquisadores japoneses;* 3) a prevalência maior em indivíduos de idade mais elevada resultaria de uma infecção no período perinatal ou infância, mas só ocorreria a soroconversão na idade adulta. Esta hipótese é conhecida como efeito período.

Existem várias evidências epidemiológicas considerando o efeito coorte como a hipótese mais plausível. No entanto, os dados epidemiológicos foram obtidos no Japão, podendo não ser aplicados à nossa realidade. Sabemos que vários índices socioeconômicos foram melhorados em Salvador, bem como medidas de saneamento foram recentemente implantadas nesta cidade através do Projeto Bahia Azul. No entanto, a melhoria destes índices e medidas de saneamento são muito recentes para justificar o efeito coorte. Por outro lado, vale a pena salientar que a única medida de controle, dirigida diretamente à infecção pelo HTLV, foi a obrigatoriedade de triagem nos bancos de sangue; porém, medidas indiretas, como aquelas estabelecidas para a prevenção HIV/AIDS, podem ter contribuído para a diminuição recente da prevalência do HTLV. Por exemplo, verificou-se que a prevalência do HTLV e HIV diminuíram consideravelmente em UDIs em Salvador. De fato, um estudo realizado em UDIs, no Pelourinho, Centro Histórico de Salvador, durante os anos de 1995 e 1996, mostrou prevalências de 49,5% para HIV-1 e 35,2% para HTLV-I/II (Andrade e colaboradores, 1998). Recentemente, um outro inquérito sorológico em UDIs desta cidade detectou prevalências de 7,1% e 5,1% para HTLV-I/II e HIV-1, respectivamente (Andrade e colaboradores, 2001). Este fenômeno foi observado também em outras cidades, como Rio de Janeiro e Santos.

Apesar das evidências mencionadas, que poderiam favorecer a hipótese do efeito coorte, é provável que o efeito idade desempenhe um papel importante para explicar o acúmulo de soropositividade com o aumento da idade. Seria necessário realizar estudos para esclarecer quais dos efeitos, isolados ou em conjunto, explicariam este fenômeno.

Confirmamos uma prevalência de 0,9% de HTLV-I e demonstramos pela primeira vez uma prevalência de 0,03% de HTLV-II em gestantes, na cidade de Salvador (Manuscrito nº 2).

A prevalência diminuída encontrada em gestantes, quando comparada com a prevalência por nós encontrada na população geral de Salvador, poderia ser explicada pela menor faixa etária das gestantes. De fato, todas as gestantes tinham idade igual ou inferior a 42 anos. Como já foi relatado na população geral de Salvador, observamos um aumento significativo da prevalência em mulheres com mais de 40 anos.

Temos evidências bastante sugestivas, que a maioria das gestantes estudadas se infectaram por transmissão perinatal, uma vez que 88,5% das mulheres informaram que foram amamentadas com leite materno. Todavia, é provável que outras vias podem ter contribuído para a infecção destas mulheres. De fato, algumas das mães das gestantes portadoras eram soronegativas. Como estas gestantes não referiram uso de drogas injetáveis, nem transfusão sangüínea, é provável que tenham sido infectadas por transmissão sexual. Além disso, no nosso estudo, uma proporção elevada de mulheres infectadas relataram mais de dois parceiros sexuais do que o grupo controle.

Nós demonstramos também que a maioria dos subtipos do HTLV-I circulantes em Salvador, exceto um isolado, pertencem ao subtipo Cosmopolita, subgrupo Transcontinental (Manuscrito nº 3), resultado estatisticamente corroborado pelo valor de  $p < 0,001$  na árvore gerada pelo método de "maximum-likelihood" (ML). Destes isolados, somente sete não foram classificados no grupo da América Latina, sendo observados em diferentes posições da árvore

filogenética. Provavelmente, estes isolados ficariam no grupo da América Latina se tivéssemos analisado a região LTR total, pois três deles (FNN28, IDU69 e IDU77) mostraram seqüências idênticas ao isolado do Peru, BI2.Peru, previamente relatado por Van Dooren e colaboradores (1998). Este isolado do Peru foi classificado filogeneticamente como pertencente ao grupo da América Latina, quando toda a região LTR foi analisada. Porém, na nossa análise, este isolado se mostrou fora deste grupo, pois analisamos um fragmento de 420 pb. Estes resultados indicam a necessidade da utilização de fragmentos gênicos maiores para obtenção de resultados filogenéticos mais acurados.

Apesar da maioria dos isolados pertencerem ao subgrupo Transcontinental, observamos um isolado, proveniente de uma gestante, fora deste grupo, porém dentro do subtipo Cosmopolita. Este isolado agrupou-se junto ao isolado do Peru BI3.Peru (Van Dooren e colaboradores, 1998), mas fora de todos os subgrupos deste subtipo, com valor de “bootstrap” elevado (70%) e estatisticamente corroborado por ML ( $p < 0,001$ ). Porém, este isolado do Peru foi previamente classificado como pertencente ao subgrupo Japonês, quando a região LTR total foi analisada filogeneticamente. Atualmente, estamos analisando a velocidade de mutações dentro das seqüências totais dos genes LTR e *env* deste isolado de Salvador, bem como dos isolados do HTLV-I desta mesma família. Quando sequenciamos e fizemos a análise filogenética, observamos que todos eles pertenciam ao subgrupo Japonês (manuscrito em preparação). Este isolado representa o primeiro subtipo Cosmopolita, subgrupo Japonês, de um indivíduo com característica étnica negra, e não-descendente de imigrantes japoneses. Yamashita e colaboradores (1999) demonstraram a presença do subgrupo

Japonês no Brasil, porém em indivíduos de São Paulo, descendentes de japoneses. Este resultado sugere uma introdução recente e separada do subgrupo Japonês do HTLV-I em Salvador.

Resultados anteriores sugerem que a infecção pelo HTLV-I, presente na América do Sul, é resultado de múltiplas introduções pós-colombianas, principalmente de linhagens virais da África (Van Dooren e colaboradores, 1998). Mas como explicar a ausência em Salvador, na nossa análise filogenética e outras previamente publicadas (Yamashita e colaboradores, 1999), do subgrupo Oeste Africano, desde que a maioria dos africanos trazidos para Salvador, como escravos, pertencia à região oeste da África? Como explicar também, a presença somente de isolados virais da África do Sul no subtipo Cosmopolita?

Salvador 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, veio do oeste da África, especificamente de Benin, da Nigéria e do norte de Angola (Rodrigues, 1977; Viana Filho, 1988; Verger, 1987). Entre os anos 1678-1810, não existe 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, onde o haplótipo Banto para o gene da globina  $\beta^S$  é prevalente.

A demonstração do haplótipo tipo Banto em 29,4% dos cromossomos por nós analisados, sugere que a presença deste haplótipo, em Salvador, pode

também ser originado de Bantos oriundos do sul da África, incluindo a África do Sul, apesar de não termos feito uma classificação racial que determine o verdadeiro grau de miscigenação da população estudada. Sabemos que, entre o período de 1678-1810, não há nada que indique quais as procedências dos africanos vindos para a Bahia (Verger, 1976), e que, nos séculos XVII e XVIII, durante a colonização da África do Sul pelos ingleses, muitos indivíduos fugiram para outras regiões vizinhas, hoje conhecidas como Angola, Magagascar e Moçambique. Entre 1817-1843, tivemos em torno de 4.100 e 2.300 africanos Bantos trazidos para a Bahia, procedentes de Angola e Madagascar, respectivamente (Curtin, 1969). Sabemos também que, entre 1641-1648, Angola estava sob o domínio dos holandeses, sendo milhares de africanos trazidos para a Bahia com destino ao estado de Pernambuco. Entretanto, no século XVII, a predominância de africanos Bantos é colocada em evidência pelo fato de haver no porto da Bahia, quando os holandeses tomaram a cidade de Salvador em 1624, seis navios de Angola, com 1440 escravos contra um único da Guiné com apenas 28 escravos (Viana Filho, 1988). Logo, os Bantos foram os primeiros africanos exportados em grande escala para a Bahia, e aqui deixaram de modo indelével os marcos de sua cultura, influenciando poderosamente a língua, a religião, o folclore, e os hábitos cotidianos. O seu temperamento permitiu um processo de aculturação tão perfeito que quase desapareceram confundidos pela facilidade de integração. Além disso, é importante saber que, os portos de onde os escravos saíam da África não estavam necessariamente relacionados com a suas origens étnicas, isto é, eles eram freqüentemente capturados de outras regiões, na maioria das vezes distantes dos portos.

Diante desses fatos, podemos sugerir a ocorrência de uma possível introdução do subtipo Cosmopolita, subgrupo Transcontinental, do HTLV-I em Salvador, oriundos de africanos, da África do Sul. Não podemos descartar a hipótese que este subgrupo Transcontinental podia estar presente em Angola, ou mesmo outros países africanos, e foi levado para a África do Sul por indivíduos infectados que migraram em busca do ouro e diamantes presentes nesta região. Porém, nossos resultados não podem explicar a ausência do subgrupo Oeste Africano em Salvador. Para comprovarmos este fato, seria necessário a obtenção de um número maior de seqüências africanas provirais do HTLV-I depositadas no "GenBank", provenientes tanto do sul como do oeste da África. Sabemos que há poucas seqüências LTR dos isolados de HTLV-I da África, não permitindo assim uma análise filogenética com um número maior de seqüências de isolados africanos.

Considerando a extensão continental e a grande variedade de grupos étnicos no Brasil, juntamente com nossos resultados, sugerimos que introduções múltiplas do HTLV-I ocorreram neste país. Nossos dados mostram evidências que em Salvador, uma cidade com características africanas e com prevalência elevada do HTLV-I, uma introdução pós-colombiana é mais evidente. Estudos futuros, considerando isolados do HTLV-I de diferentes regiões e etnicidade, são de extrema importância para esclarecer as origens deste vírus no Brasil.

Quanto à presença do haplótipo tipo Senegal em Salvador (25%), já demonstrada anteriormente (Gonçalves e colaboradores, 2002), concordamos com o que disse Jaime Pinsky (1988): "A afirmação de que os escravos foram trazidos inicialmente da Guiné, não explica muito as coisas. Olhando um mapa

moderno da África Ocidental, podemos pensar que todos os negros de Salvador originaram da região onde hoje fica o estado denominado Guiné. Contudo, na época do tráfico de escravos, o nome era usado de forma muito genérica e devia incluir toda a região que vai da embocadura do rio Senegal, limite da região desértica entre Senegal e Mauritânia, até o do rio Orange, no atual Gabão. Por isso, durante os dois primeiros séculos (XVI e XVII), quase todos os escravos eram da Guiné, mesmo sem sê-lo”.

A prevalência do haplótipo tipo Benin (45,6%) está de acordo com os relatos históricos, pois o oeste da África forneceu a maioria dos escravos que vieram para a Bahia, principalmente no século XVIII (Viana Filho, 1988).

Quanto ao HTLV-II, nós demonstramos o subtipo viral prevalente em UDIs de Salvador. Todos os isolados analisados filogeneticamente foram classificados como subtipo IIa, indicando que este é o único subtipo circulante nesta cidade, como no Brasil, até o momento (Eiraku e colaboradores, 1996; Ishak e colaboradores, 1995; Switzer e colaboradores, 1996; Lewis e colaboradores, 2000). Excetuando um isolado, todos os outros se agruparam no mesmo ramo da árvore, juntamente com outros isolados do Brasil previamente analisados, formando um agrupamento denominado variante molecular brasileira do subtipo IIa, previamente denominado subtipo “c” (Eiraku e colaboradores, 1996; Ishak e colaboradores, 1995). Esta variante brasileira é pouco divergente, sugerindo uma introdução antiga deste vírus no Brasil. Além disso, todas essas seqüências de HTLV-IIa brasileiras são derivadas de vírus isolados de UDIs, doadores de sangue e índios, sugerindo uma introdução local deste vírus dos ameríndios para os UDIs e doadores de sangue (manuscrito nº 5). Esta hipótese entra em contraste com a



infecção do HTLV-II em outros UDIs de outras partes do mundo, que estão infectados com ambos os subtipos “a” e “b”, intimamente relacionados com os vírus encontrados em UDIs da América do Norte.

Interessantemente, um dos isolados do HTLV-II, provenientes de um dos UDIs estudados, agrupou-se fora do agrupamento variante molecular IIa brasileiro, quando analisamos filogeneticamente os genes *env* e LTR. Porém, agrupou-se no mesmo ramo dos subtipos IIa isolados na Europa e EUA. A análise do gene que codifica a proteína Tax demonstrou que este isolado possui o códon de parada na posição 8.203 do gene *pX*, codificando uma proteína com 25 aminoácidos a menos, semelhante ao observado nos isolados do subtipo IIa não-brasileiros. A análise filogenética desta região confirmou que este isolado pertence ao subtipo IIa, porém com características do subtipo IIa observado nos UDIs europeus e norte-americanos. Dos isolados brasileiros do HTLV-IIa previamente descritos, muitos foram seqüenciados na região *pX* e mostraram ausência do códon de parada na posição 8.203. Este isolado representa o primeiro subtipo IIa brasileiro, que está filogeneticamente relacionado ao subtipo IIa norte americano e europeu. É possível que este isolado represente uma introdução recente deste subtipo em Salvador. O fato desta amostra ter sido obtida de um estudo realizado entre UDIs, no Pelourinho, Centro Histórico de Salvador, sendo que este distrito se tornou um centro turístico importante, onde UDIs de Salvador podem manter contatos freqüentes (utilização de drogas injetáveis) com UDIs europeus e norte americanos, corrobora esta hipótese.

Até o momento foi demonstrada na população indígena brasileira uma prevalência muito alta de infecção para o HTLV-II, poucos casos de HTLV-I e

nenhum caso de infecção para o HIV (Ishak e colaboradores, 1995; Galvão-Castro e Pereira, 1986; Andrada-Serpa e colaboradores, 1988). Nós detectamos uma prevalência de 0,44% para o HTLV-II na tribo Tiriyo, a qual foi muito menor que a prevalência de 15,4% previamente demonstrada (Ishak e colaboradores, 1995). Acreditamos que esta diferença seja devido à pequena amostragem anteriormente estudada. Detectamos também na tribo Waiampi, somente a infecção para o HTLV-I (0,56%), estando de acordo com os resultados demonstrados anteriormente (Maloney e colaboradores, 1992). Somente uma amostra dos índios da tribo Tiriyo foi soropositiva para o HIV-1, que foi classificado por HMA como subtipo B, sendo a primeira vez que a infecção pelo HIV-1 foi demonstrada entre índios brasileiros.

Neste trabalho realizamos a primeira caracterização filogenética do gene env, de isolados do HTLV-II, em índios da tribo Tiriyo. Nossos resultados demonstram que estas seqüências analisadas são idênticas e se agrupam junto com a variante molecular do subtipo IIa, incluindo os isolados presentes em UDIs de áreas urbanas do sudeste do Brasil, mas separadamente de isolados virais da tribo Kayapo, estando de acordo com estudos prévios que utilizaram a análise filogenética de um isolado do HTLV-II de um índio Tiriyo (Lewis e colaboradores, 2000). Isto demonstra que há bastante diversidade dentro das seqüências do subtipo IIa brasileiras.

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Alexandersen, S., S. Carpenter, J. Christensen, T. Storgaard, B. Viuff, Y. Wannemuehler, J. Belousov and J.A. Roth. 1993. Identification of alternatively spliced mRNAs encoding potential new regulatory proteins in cattle infected with bovine leukemia virus. *Journal of Virology*. 67:39-52.
- Andrada-Serpa, M.J. 1994. Retroviridae. In Oliveira, L.H.S. (ed), *Virologia Humana*. Cultura Médica, Rio de Janeiro, 315-338p.
- Andrada-Serpa, M.J., J.A. Dobbin, P. Gomes, D. Linhares, J.G. Azevedo, J. Hendricks, S.A. Clayden, V.M. Rumjanek and R.S. Tedder. 1988. Incidence of retroviruses in some Brazilian groups. *Immuno. Letter*. 18:15-18.
- Andrade, T., A. Farias, I. Dourado and B. Galvão-Castro. 2001. Changing patterns of HIV-1 and HTLV-I/II seroprevalence among IDUs from different districts of Salvador: Efficiency of prevention strategies. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 17(1):S35.
- Andrade, T.M., I. Dourado and B. Galvao-Castro. 1998. Associations among HTLV-I, HTLV-II, and HIV in injecting drug users in Salvador, Brazil. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*. 18:186-7.
- Antonarakis, S.E., C.D. Boehm, G.R. Serjeant, C.E. Theisen, G.J. Dover and H.H.Jr. Kazazian. 1984. Origin of the  $\beta$ -globin gene in Blacks. The contribution of recurrent mutations or gene conversion of both. *Proceeding National Academy Sciences USA*. 81:853-856.

- Azevedo, E.S., K.M.C. Silva, M.C.B.O. Silva, A.M.V.M.D. Lima, C.M.M. Fortuna and M.G. Santos. 1981. Genetic anthropological studies in the island of Itaparica, Bahia, Brazil. *Human Heredity*. 31:353-57.
- Baltimore, D. 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses. *Nature*. 226:1209-1211.
- Barbosa, H.S., A.L. Bittencourt, I.B. Araújo, C.S. Pereira Filho, R. Furlan, C. Pedrosa, G. Lessa., W. Herrington Jr. and B. Gaivão-Castro. 1999. Adult T-cell leukemia/lymphoma in Northeastern Brazil: A clinical, histopathologic, and molecular study. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 21:65-71.
- Barré-Sinoussi, F., J.C. Chermann, F. Rey, M.T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum and L. Montagnier. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 220(4599)868-71.
- Barré-Sinoussi, F. 1996. HIV as the cause of AIDS. *The Lancet*. 348:31-35.
- Bastian I., J. Gardner, D. Webb and I. Gardner. 1993. Isolation of a human T-lymphotropic virus type I strain from Australian aboriginals. *Journal of Virology*. 67:843-51.
- Bazabarchi, A. and O. Hermine. 1996. Treatment with a combination of zidovudine and  $\alpha$ -interferon in naïve and pretreated adult T-cell leukemia/lymphoma patients. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retroviruses*. 13(suppl):S186-90.

- Bennett, J.M., D. Catovsky, M-T. Daniel, G. Flandrin, D.A.G. Galton, H.R. Gralnick, C. Sultan and The French-American-British (FAB) Cooperative Group. 1989. Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukaemias. *Journal of Clinical Pathology*. 42:567-584.
- Biggar, R.J., M.E. Taylor, J.V. Neel, B. Hjelle, P.H. Levine, F.L. Black, G.M. Shaw, P.M. Sharp and B.H. Hahn. 1996. Genetic variants of human T-lymphotropic virus type II in American indian groups. *Virology*. 216:165-173.
- Biglione, M., A. Gessain, S. Quiruelas, O. fay, M.A. Taborda, E. Fernandez, S. Lupo, A. Panzita and G. de Thé. 1993. Endemic HTLV-II infection among Tobas and Matacos amerindians from North Argentina (letter). *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 6:631-633.
- Black, A.C., C.T. Ruland, M.T. Yip, J. Luo, B. Tran, A. kalsi, E. Quan, M. Aboud, I.S.Y. Chen and J.D. Roseblatt. 1991. Human T-cell leukemia virus type II Rex binding and activity require an intact splice donor site and a specific RNA secondary structure. *Journal of Virology*. 65:6645-6653.
- Black, F., R.J. Biggar and R.B. Lai. 1996. Twenty-five years of HTLV-II with possible tropical spastic paraparesis in the Kayapo Indians of Brazil. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 12:1623-1627.
- Black, F.L. 1997. Tracing prehistoric migrations by the viruses they carry: Human T-cell lymphotropic viruses as markers of ethnic relationships. *Human Biology*. 69:467-482.
- Black, F.L., R.J. Biggar, J.V. Neel, E.M. Maloney and D.J. Waters. 1994a. Endemic transmission of HTLV type II among Kayapo Indians of Brazil. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 10:1165-1171.

- Black, F.M.M. and Martin. 1995. An alternative to the migration hypothesis: communal breast feeding may explain HTLV distribution. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*. 10:266.
- Blattner, W.A., C. Saxiger, D. Riedel, B. Hull, G. Taylor, F. Cleghorn, R. Gallo, B. Blumberg and C. Bartholemew. 1990. A study of HTLV-I and its associated risk factors in Trinidad and Tobago. *Journal of Acquired Immune deficiency Syndromes and Human Retrovirology*. 3:1102-1108.
- Bonatto, S.L. and F.M. Salzano. 1997. A single and early migration for the peopling of the Americas supported by mitochondrial DNA sequence data. *Proceedings of the national Academy of Sciences of the USA*. 94:1866-1871.
- Bouzas, M.B., G. Picchio, G. Muchnik, R. campestri, P. Cahn, H. Perez, D. Gallo and C.V. Hanson. 1990. HTLV-I in Argentina. *Journal of Acquired Immune deficiency Syndromes and Human Retrovirology*. 3:741-742.
- Brady, J., K.T. Jeang, J. Duvall and G. Khoury. 1987. Identification of p40x-responsive regulatory sequences within the human T-cell leukemia virus type I long terminal repeat. *Journal of virology*. 61:2175-2181.
- Briggs, N.C., R.J. Battjes, K.P. Cantor, W.A. Blattner, F.M. Yellin, S. Wilson, A.L. Ritz, S.H. Weiss and J.J. Goedert. 1995. Seroprevalence of human T-cell lymphotropic virus type II infection, with or without human immunodeficiency virus type I coinfection, among US intravenous drug users. *Journal of Infectious Diseases*. 172:51-58.
- Britten, R.J. 1986. Rates of DNA sequence evolution differ between taxonomic groups. *Science*. 231:1393-1398.

- Cann, A.J. and I.S.Y. Chen. 1996. Human T-cell leukemia virus types I and II, p. 1849-1879. In D.M.K.B.N. Fields, P. M. Howley et al (ed.), *Fields Virology*. Chapter 59. Lippincott-raven Publisher, Philadelphia.
- Cann, A.J., J.D. Roseblatt, W. Wachsman and I.S.Y. Chen. 1989. In vitro mutagenesis of the Human T-cell Leukemia Virus Types I and II tax genes. *Journal of Virology*. 63:1474-1479.
- Caron, C., G. Mengus, V. Dubrowskaya, A. Roisin, I. Davidson and P. Jalinot. 1997. Human taxII 28 interacts with the human T cell leukemia virus type-I Tax transactivator and promotes its transcriptional activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 94:3662-3667.
- Cartier, L., F. Araya, J.L. Castillo, V.Zaninovic, M. Hayami, T. Miura, J.Imai, S. Sonoda, H. Shiraki, K. Miyamoto and K. Tajima. 1993. Southernmost carriers of HTLV-III in the world. *Japanese Journal of Cancer Research*. 84:1-3.
- Casoli, C., A. Cimarelli and U. Bertazzoni. 1995. Cellular tropism of Human T-cell leukemia virus type II is enlarged to B lymphocytes in patients with high proviral load. *Virology*. 206:1126-1128.
- Cavalli-Sforza, L.L., A. Piazza, P. Menozzi and J. Mountain. 1988. Reconstruction of human evolution : bringing together genetic, archaeological and linguistic data. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 85:6002-6006.
- Cavalli-Sforza, L.L., P. Menozzi and A. Piazza. 1994. The history and geography of human genes. *Princeton University Press*, New jersey, USA.

- Chen, J., L. Zekeng, M. Yamashita, J. Takeisha, T. Miura, E. Ido, I. Mboudjeka, J.M. Tsague, M. Hayami and L. Kaptue. 1995. HTLV isolated from a Pygmy in Cameroon is related but distinct from the known Central African type. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 11:1529-1531.
- Chlichlia, K., M. Busslinger, M.E. Peter, H. Walczak, P.H. Krammer, V. Schirmacher and K. Khazale. 1997. ICE-proteases mediate HTLV-I tax-induced apoptotic T-cell death. *Oncogene*. 14:2265-2272.
- Chou, K.S., A. Okayama, I. J. Su, T.-H. Lee and M. Essex. 1996. Preferred nucleotide sequence at the integration target site of Human T-cell Leukemia Virus Type I from patients with adult T-cell leukemia. *Internacional Journal of Cancer*. 65:20-24.
- Cimarelli, A., C.A. Duclos, A. Gessain, C. Casoli and U. Bertazzoni. 1996. Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type II in patients with high proviral load. *Virology*. 223:362-364.
- Ciminale, V., D.M. D'Agostino, L. Zotti, G. Franchini, B.K. Felber and L. Chiecobianchi. 1995. Expression and characterization of proteins produced by mRNAs spliced into the X region of the human T-cell leukemia/lymphotropic virus type II. *Virology*. 209:445-456.
- Ciminale, V., G.N. Pavlakis, D. Derse, C.P. Cunningham and B.K. Felber. 1992. Complex splicing in the human T-cell leukemia virus (HTLV) family of retroviruses: novel mRNAs and proteins produced by HTLV type I. *Journal of Virology*. 66:1737-1745.
- Clemens, K.E., G. Piras, M.F. Radonovich, K.S. Choi, J. F. Duvall, J. De Jong, R. Roeder and J. N. Brady. 1996. Interaction of the human T-cell Lymphotropic



Virus Type I tax transactivator with transcription factor IIA. *Molecular and Cellular Biology*. 16:4656-4664.

Coffin, J.M. 1992. Structure and Classification of Retroviruses, p. 19-49. In J.A. Levy (ed.), *The retroviridae*, vol. 1. Plenum Press, New York.

Coffin, J.M. 1995. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science*. 267(5197):483-9.

Curtin, P.D. 1969. The slave Atlantic trade: a census. Milwaukee: The University of Wisconsin Press.

Davidson, M., R.M. Braziel, M.D. Lairmore, S. Jacobson, J.M. Sprott, S.B. Tucker, P.H. Levine and J.E. Kaplan. 1993. Atypical human T-cell lymphotropic virus type-I-associated T-cell lymphoma in a low prevalence Alaska native population; implications for disease surveillance. *Cancer*. 71:4072-4076.

De Castro-Costa, C.M., H. Carton, P. Goubau, E.G. de Figueiredo and S.D. Giffoni. 1994. Tropical spastic paraparesis in the tropics and Brazil. A historical analysis. *Arq Neuropsiquiatr*. 52:106-9.

De Perez, G.E., M. Leon-Ponte, O. Noya, C. Botto, D. Gallo and N. Bianco. 1993. First description of endemic HTLV-II infection among Venezuelan Amerindians. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*. 6:1368-172.

De Rivera, I., L. Amador, S. Mourra, Z. Li and S. Rasheed. 1995. Geographical clustering of human T-cell lymphotropic virus type I infection in Honduras. *Journal of Clinical Microbiology*. 33-2999-3003.

De The, G. and R. Bomford. 1993. An HTLV-I vaccine: why, how, for whom ? *AIDS Research and Human Retroviruses*. 9:381-386.

- Dekaban, G.A., J.J.F. Oger, D. Foti, E.E. King, D.J.Waters, F.J. Picard, J. Arp, D. Werker and G.P.A. Rice. 1994. HTLV-I infection associated with disease in aboriginal indians from British Columbia : a serological and PCR analysis. *Clinical Diagnostic. Virology*. 2:67-68.
- Delaporte, E., M. Peeters, J.P. Durand, A. Dupont, D. Schrijvers, L. Bedjabaga/ C. Honore, S. Ossari, A. Trebucq and R. Josse. 1989. Seroepidemiological survey of HTLV-I infection among randomized populations of western central African countries. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*. 2:410-413.
- Delaporte, E., N. Monplaisir, J. Louwagie, M. Peeters, Y. Martin-Prével, J.-P. Louis, A. Trebucq, L. Bedjagaba, S. Ossari, C. Honoré, B. Larouzé, L. D'Auriol, G. Van Der Groen and P. Piot. 1991. Prevalence of HTLV-I and HTLV-II infection in Gabon, Africa: comparison of the serological and PCR results. *International Journal of Cancer*. 49:373-376.
- Derse, D., J. Mikovits, D. Waters, S. Brining and F. Ruscetti. 1996. Examining the molecular genetics of HTLV-I with an infectious molecular clone of the virus and permissive cell culture systems. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*. 12:1-5.
- Digilio, L., A. Giri, N. Cho, J. Slattery, P. Markham and G. franchini. 1997. The simian T-lymphotropic/ leukemia virus from Pan paniscus belongs to the type 2 family and infects asian Macaques . *Journal of virology*. 71:3684-3692.

- Domingo, E. and J.J. Hollan. 1994. Mutation Rates and Rapid Evolution of RNA Viruses., p.161-184. In S.S. Morse(ed.), *The Evolutionary Biology of Viruses*. Raven Press, New York.
- Doolittle, R.F., D.F. Feng, M.A. McClure and M.S. Johnson.1990. Retrovirus phylogeny and evolution, p.1-18. In R. Swanstron and P.K. Vogt (ed.),*Retroviruses, Strategies of Replication*. Springer-Verlag, New York.
- Dos Santos, J.I., M.A.A. Lopes, E. Deliége-Vasconcelos, J.C. Couto-Fernandez, B.N. Patel, M.L. Barreto, O.C. Ferreira Jr. and B. Galvão-Castro. 1995. Seroprevalence of HIV, HTLV-I/II and other perinatally-transmitted pathogens in Salvador, Bahia. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 37:343-348.
- Dourado, I. and B. Galvao-Castro. 2001. Human T-cell lymphotropic virus in Brazil: current situation in the area with the highest prevalence. *Aids Research and Human Retroviruses*. 17(Supp1):S-9.
- Dourado, I., T. Andrade and B. Galvao-Castro. 1998. HTLV-I in Northeast Brazil: differences for male and female injecting drug users. *Journal of Acquired ImmuneDeficiency Syndromes and Human Retrovirology*. 19:426-9.
- Dourado, I., T. Andrade, C.L. Carpenter and B. Galvao-Castro. 1999. Risk factors for human T cell lymphotropic virus type I among injecting drug users in northeast Brazil: possibly greater efficiency of male to female transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 94:13-8.
- Dube, D.K., M.P. Sherman, N.K. Salsena, V. Bryz-Gornia, J. Mendelson, J. Love, C.B. Arnold, T. Spicer, S. Dube, J.B. Glasser, A.E. Williams, M. Nishimura, S. Jacobson, J.F. Ferrer, N. Delpino, S. Quiruelas and B.J. Poiesz. 1993.

Genetic heterogeneity in human T-cell leukemia/ lymphoma virus type II.  
*Journal of Virology*. 67:1175-1184.

Dube, D.K., S. Dube, S. Erensoy, B. Jones, V. Bryz-Gornia, T. Spicer, J. Love, N. Saksena, M.F. Lechat, D.I. Shrager, H. Dosik, J. Glaser, W. Leivs, W. Blattner, R. Montagna, B.S. Blumberg and B.J. Poiesz. 1994. Serological and nucleic acid analyses for HIV and HTLV infection on archival human plasma samples from Zaire. *Virology*. 202:379-389.

Duenas-Barajas, E., J.E. Bernal, D.R. Vaught, I. Briceno, C. Duran, R.I. Yanagihara and D.C. Gajdusek. 1993. Coexistence of human T-cell limphotropic virus type I and II among the Wayu Indians from the Guajira region of Colombia. *AIDS Research and Human retroviruses*. 8:1851-1855.

Dulbecco, R. Oncogenic viruses II: RNA-containing viruses (retroviruses). 1988. In Dulbecco, R. and H.S. Ginsberg. (ed.), *Virology*. JB Lippincott, London, 355-382p.

Ehrlich, G.D., S.B. Glaser, K. La Vigne, D. Quan, D. Mildvan, J.J. Sninsky, S. Kwo, L. Papsidero and B.J. Poiesz. 1989. Prevalence of human leukemia/ lymphoma virus (HTLV) type II infection among high risk individuals; type-specific identification of HTLVs by polimerase chain reaction. *Blood*. 74:1658-1664.

Eiraku, N., C. Monken, T. Kubo, S.W. Zhu, M. Rios, C. Bianco, B. Hjelle, K. Nagashima and W.W. Hall. 1995. Nucleotide sequence and restriction fragment length polymorphism analysis of the long terminal repeat of human T cell leukemia virus type II. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 11:625-636.

- Eiraku, N., P. Novoa, M. da Costa Ferreira, C. Monken, R. Ishak, O. da Costa Ferreira, S.W. Zhu, R. Lorenço, M. Ishak, V. Azvedo, J. Guerreiro, M. Pombo de Oliveira, P. Loureiro, N. Hammerschlak, S. Ijichi and W.W. Hall. 1996. Identification and characterization of a new and distinct molecular subtype of human T-cell lymphotropic virus type 2. *Journal of Virology*. 70:1481-1492.
- Elovaara, I., S. Koenig, A.Y. Brewah, R.M. Woods, T. Lehky and S. Jacobson. 1993. High human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)- specific precursor cytotoxic T lymphocyte frequencies in patients with HTLV-1-associated neurological disease. *Journal of experimental medicine*. 177:1567-1573.
- Felseinstein, J.1981. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*. 17:368-376.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39:783-791.
- Ferreira Junior, O.C., R.S. Vaz, M.B. Carvalho, C. Guerra, A.L. Fabron, J. Rosembliit and N. Hamerschlak. 1995. Human T-lymphotropic virus type I and type II infections and correlation with risk factors in blood donors from Sao Paulo, Brazil. *Transfusion*. 35:258-63.
- Ferreira, O.C., V. Planelles and J.D. Roseblatt. 1997. Human T cell leukemia viruses: epidemiology, biology and pathogenesis. *Blood Reviews*. 11:91-104.
- Ferrer, J.F., E. Esteban, S. Dube, M.A. Basombrio, A. Segovia, M. Peralta-Ramos, D.K. Dube, K. Sayre, N. Aguayo, J. Hengst and B.J. Poiesz. 1996. Endemic

infection with human T cell leukemia/ lymphomavirus type IIB in Argentinean and Paraguayan Indians: Epidemiology and molecular characterization. *The Journal of Infectious Diseases*. 174:944-953.

Ferrer, J.F., N.D. Pino, E. Esteban, M.P. Sherman, S. Dube, D.K.Dube, M.A. Basombrio, E. Pimentel, A. Segovia, S. Quirulas and J. Poiesz. 1993. High rate of infection with the human T-cell leukemia retrovirus type II In four Indian populations of Argentina. *Journal of Virology*. 197:576-584.

Figueroa, J.P., J. Morris, A. Brathwaite, E. Ward, A. Peruga, A. Hayes, S.H. Vermund and W. Blattner. 1995. Risk factors for HTLV-I among heterossexual STD clinic attenders. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*. 9:81-88.

Fitch, W. and E. Margoliash. 1967. Construction of phylogenetic trees. *Science*. 155:279-284.

Fleming, A.F., R. Maharajan, M. Abraham, A.G. Kulkarni, S.R. Bhusnurmath, R.A. Okpara, E. Williams, J. Akinsete, J. Schneider and H. Bayer. 1986. Antibodies to HTLV-I in Negerian blood-donors, their relatives and patients with leukemias, lymphomas and other diseases. *International Journal of Cancer*. 38:809-813.

Franchini, G. 1995. Molecular mechanisms of human T-cell leukemia/ lymphotropic virus type I infection. *Blood*. 86:3619-3639.

Froment, A., E. Delaporte, M.-C. Dazza and B. Larouzé. 1993. HTLV-II among Pygmies from cameroon (letter). *AIDS Research and Human Retroviruses*. 9:707.

- Fujiyama, C., T. Fujiyoshi, T. Miura, S. Yashiki, D. Matsumoto, V. Zaninovic, O. Blanco, W. Harrington, J.J. Byrnes and M. Hayami. 1993. A new endemic focus of human T lymphotropic virus type II carriers among Orinoco natives in Colombia (letter). *Journal of Infectious Diseases*. 168:1075-1077.
- Fukushima, Y., H. Takahashi, W.W. Hall, T. Nakasone, S. Nakata, P. Song, D.D. Duc, B. Hien, N.X. Quang, T.N. Trinh, K. Nishioka, K. Kitamura, K. Komuro, A. Vahne and M. Honda. 1995. Extraordinary high rate of HTLV type II seropositivity in intravenous drug abusers in South Vietnam. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 11:637-644.
- Fukushima, Y., M.J. Lewis, C. Monken, K. Komuro, S. Kusagawa, H. Sato, Y. Takebe, S. Yamazaki, N. Tran Hien, H. Anh, H. Thuy Long, M. Honda and W.W. Hall. 1998. Identification and molecular characterization of human T-cell lymphotropic virus type II infections in intravenous drug abusers in the former South Vietnam. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 14:537-540.
- Furukawa, Y., M. Osame, R. Kubota, M. Tara and M. Yoshida. 1995. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) Tax is expressed at the same level in infected cells of HTLV-1-associated myelopathy or tropical spastic paraparesis patients as in asymptomatic carriers but at a lower level in adult T-cell leukemia cells. *Blood*. 85:1865-1870.
- Gallo, D.L. Penning and C.V. Hanson. 1991. Detection and differentiation of antibodies to human T-cell lymphotropic virus types I and II by the immunofluorescence method. *Journal of Clinical Microbiology*. 29:2345-2347.

- Gallo, R.C., A. Sliski and F. Wong-Staal. 1983. Origin of human T-cell leukemia-lymphoma virus. *The Lancet*. 2:962-963.
- Galvão-Castro, B. and M.S. Pereira. 1986. HTLV-III antibody in Brazilian Indians. *The Lancet*. 1:976.
- Galvão-Castro, B., L. Loures, L.G. Rodrigues, A. Sereno, O.C. Ferreira Junior, L.G. Franco, M. Muller, D.A. Sampaio, A. Santana, L.M. Passos and F. Proietti. 1997. Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. *Transfusion*. 37:242-3.
- Gasmi, M., B. Farouqi, M. d'Incan, C. Desgranges. 1994. Long terminal repeat sequence analysis of HTLV type I molecular variants identified in four north African patients. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 10:1313-15.
- Gessain, A. and O. Gout. 1992. Chronic myelopathy associated with human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I). *Annals of Internal Medicine*. 117:933-946.
- Gessain, A., C. Caudie, O. Gout. J.C. Vernant, L. Maurs and C. Giordano. 1992. Intrathecal synthesis of antibodies to human T lymphotropic virus type I and the presence of IgG oligoclonal bands in the cerebrospinal fluid of patients with endemic tropical spastic paraparesis. *Journal of Infectious Diseases*. 157:1226-34.
- Gessain, A., E. Boeri, R. Yanagihara, R.C. Gallo and G. Francini. 1993. Complete nucleotide sequence of a highly divergent human T-cell leukemia (lymphotropic) virus type I (HTLV-I) variant from Melanesia: genetic and phylogenetic relationship to HTLV-I strains from other geographical regions. *Journal of Virology*. 67:1015-1023.



- Gessain, A., F. Barin, J.C. Vernant, O. Gout, L. Maurs, A. Calender and G. de Thé. 1985. Antibodies to human T. lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet*. 2:407-410.
- Gessain, A., F.Saal, O. Gout, M.T. Daniel, G. Flandrin, G. de Thé, J. Peries and F. Sigaux. 1990. High human T-cell lymphotropic virus type I proviral DNA load with polyclonal integration in peripheral blood mononuclear cells of French West Indian, Guianese and African patients with tropical spastic parapareses. *Blood*. 75:428-433.
- Gessain, A., I.J. Koralnik, J. Fullen, E. Boeri, C. Mora, A. Blank, E.F. Salazar-Gruesso, J. Kaplan, W.C. Saxinger and M. Davidson.1994. Phylogenetic study of ten new HTLV-I strains from the Americas. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 10:103-106.
- Gessain, A., P. Maucière, A. Froment, M. Biglione, J.Y.L. Hesran, F. Tekaia, J. Millan and G. de Thé. 1995. Isolation and molecular characterization of a human T-cell lymphotropic virus type II (HTLV-II), subtype B, from a healthy pygmy living in a remote area of Cameroon: An ancient origin for HTLV-II in Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 92:4041-4045.
- Gessain, A., R. Yanagihara, G. Francini, R.M. Garruto, C.L. Jenkins, A.B. Ajdukiewicz, R.C. Gallo and D.C.Gajdusek. 1991. Highly divergent molecular variants of human T-lymphotropic virus type from isolated populations in Papua New Guinea and the Solomon Islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 88:7694-7698.

- Gessain, A., R.C. Gallo and G. Franchini. 1992. Low degree of human T-cell leukemia/ lymphoma virus type I genetic drift in vivo as a means of monitoring viral transmission and movement of ancient human populations. *Journal of Virology*. 66:2288-2295.
- Gill, P., W.Jr. Harrington, M.H. Kaplan, R.C. Ribeiro, J.M. Bennet, H.A. Liebman, M. Bernstein-Singer, B.M. Espina, L. Cabral, S. Allens, S. Kornblau, M.C. Pike, O.N. Gioseffi, E. Nucifora, D. Fautl, C. dufour, J. Milone and H. Di Paolo. 1995. Adult HTLV-I leukemia/lymphoma in Argentina. *Sangre*. 40:421-4.
- Giri, A., P. Markham, L. Digilio, G. Hurteau, R.C. Gallo and G. Franchini. 1994. Isolation of a novel simian T-cell lymphotropic virus from *Pan paniscus* that is distantly related to the human T-cell leukemia/ lymphotropic virus types I and II. *Journal of Virology*. 68:8392-8395.
- Goldstein, D.B., A. Ruiz Linares, L.L. Cavalli-Sforza and M.W. Feldman. 1995. Genetic absolute dating based on microsatellites and the origin of modern humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 92:6723-6727.
- Gomes, I., A. Melo, F.A. Proietti, O. Moreno-Carvalho, L.A.M. Loures, M.C. Daza, G. Said, B. Larouzé and B. Galvão-Castro. 1999. Human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) infection in neurological patients in Salvador, Bahia, Brazil. *Journal of the Neurological Sciences*. 165:84-89.
- Gonçalves, M.S., J.F. Nechtman, M.S. Figueredo, J. Kerbauy, V.R. Arruda, M.F. Sonati, S.T.O. Saad, F.F. Costa and T.A. Stoming. 1994. Sickle cell disease

in a Brazilian population from São Paulo: A study of the  $\beta^S$ -gene haplotypes. *Human Heredity*. 44:322-327.

Gonçalves, M.S., G.C Bomfim, E. Maciel, I. Cerqueira, I.L. Queiroz, G. Bomfim, E. Adorno, A. Albuquerque, A. Pontes, R. Muniz, M.F. Dupuit, G.B. Fernandes and M.G. Reis. 2002.  $\beta^S$ -haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador-Bahia-Brazil. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* In press.

Gottlieb, M.S., R. Schroff, H.M. Schanker, J.D. Weisman, P.T. Fan, R.A. Wolf and A. Saxon. 1981. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *New England Journal of Medicine*. 305(24):1425-31.

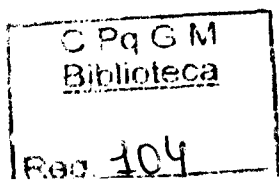
Gotuzzo, E., V. Yamamoto, M. Kanna, G. Chauca and D.M. Watts. 1996. Human T-cell lymphotropic virus type I infection among Japanese immigrants in Peru. *International Journal Infectious Diseases*. 1:75-77.

Goubau, P., A.-M. Vandamme, K. Beuselinck and J. Desmyter. 1996. Proviral HTLV-I and HTLV-II in the Efe pygmies of northeastern Zaire. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*. 12:208-210.

Goubau, P., H. Carton, K. Kazadi, K.W. Muya and J. Desmyter. 1990. HTLV seroepidemiology in a central African population with high incidence of tropical spastic paraparesis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 84:577-579.

- Goubau, P., H.-F. Liu, G.G. De Lange, A.-M. Vandamme and D.J. 1993a. HTLV-II seroprevalence in pygmies across Africa since 1970. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 9:709-713.
- Goubau, P., J. Desmyter, J. Ghesquiere and B. Kasereka. 1992. HTLV-II among pygmies (letter). *Nature*. 359:201.
- Goubau, P., J. Desmyter, P. Swanson, M. Reynders, J. Shih, I. Surmont, K. Kazadi and H. Lee. 1993b. Detection of HTLV-I and HTLV-II infection in Africans using type-specific envelope peptides. *Journal of Medical Virology*. 39:28-32.
- Goubau, P., M. Van Brussel, A.-M. Vandamme, H.F. Liu and J. Desmyter. 1994. A primate T-lymphotropic virus, PTLV-L, different from human T-lymphotropic viruses types I and II, in a wild-caught baboon (*Papio hamadryas*). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 91:2848-2852.
- Gout, O., M. Baulac, A. Gessain, F. Semah, F. Saal, J. Peries, C. Cabrol, C. Foucalt-Fretz, D. Laplane and F. Sigaux. 1990. Rapid Development of myelopathy after HTLV-I infection acquired by tranfusion during cardiac transplantation. *New England Journal of Medicine*. 322:383-388.
- Gray, G.S., M. White, T. Bartman and D. Mann. 1990. Envelope gene sequence of HTLV-1 isolate MT-2 and its comparison with other HTLV-1 isolates. *Virology*. 177:391-395.
- Green, J.E., S.H. Hinrinchs, J. Vogel and G. Jay. 1989. Exocrinopathy resembling Sjogren's syndrome in HTLV-1 tax transgenic mice. *Nature*. 341:72-74.

- Green, P.L., Y. Xie and I.S.Y. Chen. 1991. The rex proteins of the human T-cell leukemia virus type II differ by serine phosphorylation. *Journal of Virology*. 65:546-550.
- Greenberg, J., C. Turner and S. Zegura. 1986. The settlement of the Americas: a comparison of the linguistic, dental and genetical evidence. *Current Anthropology*. 27:477-497.
- Greene, W.C. E. Bohnlein and D.W. Ballard. 1989. HIV, HTLV-I and normal T-cell growth: transcriptional strategies and surprises. *Immunology Today*. 10:272-278.
- Hahn, B.H., G.M. Shaw, M. Popovic, A. Lo-Monico, R.C. Gallo and F. Staal-Wong. 1984. 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. *International Journal of Cancer*. 34(5):613-618.
- Hall, W.W., C.R. Liu, O. Schneewind, H. Takahashi, M. H. Kaplan, G. Roupe and A. Vahne. 1991. Deleted HTLV-I provirus in blood and cutaneous lesions of patients with mycosis fungoides. *Science*. 253(5017):317-320.
- Hall, W.W., H. Takahashi, C. Liu, M.H. Kaplan, O. Scheewind, S. Ijichi, K. Nagashima and R.C. Gallo. 1992. Multiple isolates and characteristics of human T-cell leukemia virus type II. *Journal of Virology*. 66:2456-2463.
- Hall, W.W., K. Takayuki, S. Ijichi, H. Takahashi and S.W. Zhu. 1994. Human T-cell leukemia/ lymphoma virus type II (HTLV-II): emergence of an important newly recognized pathogen. *Seminars in Virology*. 5:165-178.
- Hall, W.W., M.H. Kaplan and S.Z. Salahuddin. 1990. Concomitant infections with human T-cell leukemia viruses (HTLVs) and human immunodeficiency virus



(HIV): Identification of HTLV-II infection in intravenous drug abusers (IVDAs)., p.115-127. In W.A. Blattner(ed.), *Human Retrovirology HTLV*". Raven Press, New York.

- Hall, W.W., R. Ishak, S.W. Zhu, P. Novoa, N. Eiraku, H. Takahashi, C. Ferreira, V. Azevedo, M.O. Ishak, C. Ferreira O. da, C. Monken and T. Kurata. 1996. Human T lymphotropic virus type II (HTLV-II): epidemiology, molecular properties and clinical features of infection. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*. 13:S204-S214.
- Hanchard, B. 1996. Adult T-cell leukemia/ lymphoma in Jamaica. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*. 13:S20-S25.
- Hanly, S.M., L.T. Rimsky, M.H. Malim, J.H.Kim, J. Hauber, M. Duc Dodon, S.Y. Le, J.V. Maizel, B.R. Cullen and W.C. Green. 1989. Comparative analysis of the HTLV-I Rex and HIV-I Rev trans-regulatory proteins and their RNA response elements. *Genes and Development*.3:1534-1544.
- Harpending, H.C., M.A. Batzer, M. Gurven, L.B. Jorde, A.R. Rogers and S.T.Sherry. 1998.Genetic traces of ancient demography. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 95:1961-1967.
- Harrison, L.H., T.C. Quinn and M. Schechter. 1996. Human T-cell Lymphotropic Virus Type I does not increase human immunodeficiency virus viral load in vivo. *The Journal of Infectious Diseases*. 175:438-440.
- Hasegawa, M., Kishino, H. and Yano, T. 1985. Dating the human-apesplitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*. 22, 160-174.

- Hattori, Y., F. Kutiar, A. Kutiar, V.C. Mackie and T.H. Huisman. 1986. Haplotypes of beta S chromosomes among patients with sickle cell anemia from Georgia. *Hemoglobin*. 10:623-42.
- Hehlmann, R and V. Erfle. 1991. Introduction to retroviruses. In Belshe, R.B. (ed.), *Textbook of human virology*. 2.e.d., Mosby, St. Louis, 242-273p.
- Heneine, W. 1996. The phylogeny and molecular epidemiology of human T-cell lymphotropic virus type II. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human retrovirology*. 13:S236-S241.
- Heneine, W., J.E. Kaplan, F. Gracia, R. Lal, P. Levine and W.C. Reeves.1991. HTLV-II endemicity among Guaymi Indians in Panama. *The New England Journal of Medicine*. 324:565.
- Heneine, W., T. Woods, D. Green, K. Fukuda, R. Giusti, L.Castillo, B. Armien, F. Gracia and J.E. Kaplan. 1992. Detection of HTLV-II in breastmilk of HTLV-II infected mothers (letter). *Lancet*. 340:1157-1158.
- Hennig, W. 1966. Phyogenetic systematics. University of Illinois Press, Chicago.
- Henrad, D.R., V.Soriano, E. Robertson, M. Gutierrez, J. Stephens, F. Dronda, F. Milles, E. Pujol, M. Buytendorp and A. Castro. 1995. Prevalence of human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-1) and HTLV-2 infection among Spanish drug users measured by HTLV-1 assay and HTLV-1 and -2 assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 33:1735-1738.
- Hermine O., D. Bouscary, A. Gessain, P. Turlure, V. Leblond, N. Franck, A. Buzyn-Weil, B. Rio, E. Macinture, F. Dreyfus and A. Bazabarchi. 1995. Treatment of adult T-cell leukemia-lymphoma with zidovudine and interferon alfa. *New England Journal of Medicine*. 332:1749-51.

- HERN ( The HTLV European Research Network). 1996. Seroepidemiology of the Human T-cell leukaemia/ lymphoma Viruses in Europe. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*. 13:68-77.
- Hidaka, M., J. Inoue, M. Yoshida and M. Seiki. 1988. Post-transcriptional regulator (rex) of HTLV-1 initiates expression of viral structural proteins but suppresses expression of regulatory proteins. *EMBO Journal*. 7:519-523.
- Hino, S., S. Katamine, H. Miyata, Y. Tsuji, T. Yamabe and T. Miyamoto. 1996. Primary prevention of HTLV-1 in Japan. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 13(Suppl.1):S199-203.
- Hinuma, Y., H. Komoda, T. Chosa, T. Kondo, M. Kohakura, T. Takenaka, M. Kikuchi, M. Ichimaru, K. Yunoki, I. Sato, R. Mitsuo, Y. Takiuchi, H. Uchino and M. Hanaoka. 1982. Antibodies to adult T-cell leukemia-virus-associated antigen (ATLA) in sera from patients with ATL and controls in Japan: a nation-wide sero-epidemiologic study. *International Journal of Cancer*. 29:631-635.
- Hirata, M., J. Hayashi, A. Noguchi, K. Nakashima, W. Kajiyama, S. Kashiwagi and T. Sawada. 1992. The effects of breast feeding and presence of antibody to p40tax protein of human T cell lymphotropic virus type-I on mother to child transmission. *International Journal of Epidemiology*. 21:989-994.
- Hjelle, B., S. Cyrus and S.G. Swenso. 1992b. Evidence for sexual transmission of human T-lymphotropic virus type II. *Annals Internal Medicine*. 116:90-91.
- Hjelle, B., S.W. Zhu, H. Takahashi, S. Ijichi and W.W. Hall. 1993. Endemic human T cell leukemia virus type II infection in southwestern US Indians involves



two prototype variants of virus. *The Journal of Infectious Diseases*.168:737-740.

Hoffman, P.M., S. Dhib-Jalbut, J.A. Mikovits, D.S. Robbins, A.L. Wolf, G.K. Bergey, N.C. Lohrey, O.S. Welslow and F.W.Ruscetti. 1992. Human T-cell leukemia virus type I infection of monocytes and microglial cells in primary human cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 89:11784-11788.

Hollberg, P. and D.A. Hafler. 1993. Pathogenesis of diseases induced by human lymphotropic virus type I infection. *New England Journal of Medicine*. 328:1173-1182.

Horai, S., K. Hayasaka, R. Kondo, K. Tsugane and N. Takahata. 1995. Recent African origin of modern humans revealed by complete sequences of hominoid mitochondrial DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 92:532-536.

Ibrahim, F., G. de Thé and A. Gessain. 1995. Isolation and characterization of a new simian T-cell leukemia virus type I from naturally infected Celebes macaques (*Macaca tonkeana*): complete nucleotide sequence and phylogenetic relationship with the Australo-Melanesian human T-cell leukemia virus type I. *Journal of Virology*. 69:6980-6993.

Igarashi, T., M. Yamashita, T. Miura, M. Oseikwasi, N.K. Aysi, H. Shiraki, T. Kurimura and M. Hayami.1993. Isolation and genomic analysis of Human T-lymphotropic virus type-II from Ghana. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 9:1039-1042.

- Ijichi, S., M.B. Ramundo, H. Takahashi and W.W. Hall. 1992. In vivo cellular tropism of human T cell leukemia virus type II (HTLV-II). *Journal of Experimental Medicine*. 176:293-296.
- Ijichi, S., V. Zaninovic, F.E. Leon, Y. Katahira, S. Sonoda, T. Miura, M. Hayami and W.W. Hall. 1993. Identification of human T-cell leukemia virus type IIb infection in the Wayu, an aboriginal population of Colombia. *Japanese Journal of Cancer Research*. 84:1215-1218.
- Ishak, R., W.J. Harrington Jr., V.N. Azevedo, N. Eiraku, M.O.G. Ishak, J.F. Guerreiro, S.B. Santos, T. Kubo, C. Monken, S. Alexander and W.W. Hall. 1995. Identification of human T cell lymphotropic virus type IIa infection in the Kayapo, an indigenous population of Brazil. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 11:813-821.
- Ishida, T., K. Yamamoto, K. Omoto, M. Iwanaga, T. Osato and Y. Himura. 1985. Prevalence of human retrovirus in native Japanese: evidence for a possible ancient origin. *The Journal of Infection*. 11:153-157.
- Jacobson, S., D.E. McFarlin, S. Robinson, R. Voskuhi, R. Martin, A. Brewah, A.J. Newell and S. Koenig. 1992. HTLV-I-specific cytotoxic T lymphocytes in the cerebrospinal fluid of patients with HTLV-I-associated neurological disease. *Annals of Neurology*. 32:651-657.
- Jeffery K.J.M., K. Usuku, S.E. Hall, W. Matsumoto, G.P. Taylor, J. Procter, M. Bunce, G.S. Ogg, K.I. Welsh, J.N. Weber, A.L. Lloyd, M.A. Nowak, M. Nagai, D. Kodama, S. Izumo, M. Osame and C.R.M. Bangham. 1999. HLA alleles determine human T-lymphotropic virus-I (HTLV-I) proviral load and

the risk of HTLV-I associated myelopath. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:3848-53.

Johnson, R.T., D.. Griffin, A. Arregui, C. Mora, C.J. Gibbs, J.M. Cuba, L. Treiies and A. Vaisberg. 1988. Spastic paraparesis and HTLV-I infection in Peru. *Annals of Neurology.* 23:S151-155.

Jukes, T.H. and C.R. Cantor. 1969. In Mammalian protein methabolism, ed. Munro, H.N. (Academic Press,NY), pp.21-123.

Kajiyama,W., S. Kashiwagi, H. Ikematsu, J. Hayashi, H. Nomura and K. Okochi.1986. Intrafamilial transmission of adult T cell leukemia virus. *Journal of Infectious Diseases.*154:851-857.

Kalyanaraman, V.S., M.G. Sarngadharan, M. Robert-Guroff, I. Myioshi, D. Golde and R.C. Gallo. 1982. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science.* 218:571-573.

Kaplan, J.E., E. Abrams, N. Shaffer, R.O. Cannon, A. Kaul, K. Krasinski, M. Banji, T.M. Hartley, B. Roberts and B. Kilbourne.1992.Low risk of mother-to-child transmission of human T lymphotropic virus type II in non-breast-fed infants. *Journal of Infectious Diseases.* 166:892-895.

Kaplan, J.E., M. Osame and H. Kubota. 1990. The risk of development of HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes.* 3:1096-101.

Kaplan, J.E., R.F. Khabbaz, E.L. Murphy, S. Hermansen, C. Roberts, R. Lal, W. Heneine, D. Wright, L. Matijas and R. Thomson. 1996. Male-to-female

transmission of human T-cell lymphotropic virus types I and II; association with viral load. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*. 12:193-201.

Kawano, F., K. Yamaguchi, H. Nishimura, H. Tsuda and K. Takatsuki. 1985. Variation in the clinical courses of adult T-cell leukemia. *Cancer* . 55:851-856.

Kim, J.H., P.A. Kaufman, S.M. Hanly, L.T. Rimsky and W.C. Greene.1991. Rex transregulation of human T-cell leukemia virus type II gene expression . *Journal of Virology*. 65:405-414.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences.*Journal of Molecular Evolution*. 16:111-120.

Kinoshita, K., S. Hino, T. Amagaski, S. Ikeda, Y. Yamada, J. Suzuyama, S. Momita, K. Toriya, S. Kamihira and M. Ichimaru. 1984. Demonstration of adult T-cell leukemia virus antigen in milk from three seropositive mothers. *Japanese Cancer Association*.75:103-105.

Kitagawa, T., M. Fujishita, H. Tacagushi, I. Miyoshi and H. Tadokoro. 1986. Antibodies to HTLV-I in Japanese immigrants in Brazil. *JAMA*. 256:2342.

Koralnik, I.J., A. Gessain, M.E. Klotman, A. Lo Monaco, Z.N. Berneman and G. Franchini. 1992b. Protein isoforms encoded by the pX region of human T-cell leukemia/ lymphotropic virus type I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 89:8813-8817.

- Koralnik, I.J., J.F.Lemp, R.C.Gallo and G. Franchini.1992a. In vitro infection of human macrophages by human T-cell leukemia/ lymphotropic virus type I (HTLV-I). *AIDS Research and Human Retroviruses*.8:1845-1849.
- Koyanagi, Y., Y. Itoyama, N. Nakamura, K. Takamatsu, J.-I. Kira,T. Iwamasa, I. Goto and N. Yamamoto.1993. In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. *Virology*. 196:25-33.
- Koyanagi,Y., Y. Hinuma, J. Schneider, T. Chosa, G. Hunsmann, N. Kobayashi, M. Hatanaka and N. Yamamoto.1984. Expression of HTLV-specific polypeptides in various human T-cell lines. *Medical Microbiology and Immunology*. 173:127-140.
- Krook, A., S. Albert, S. Andersson, G. Biberfeld, J. Blomberg, I. Ekiund, A. Engstrom, I. Julander, K. Kall, C. Martin, P. Stendahl, J. Struve and A. Sonnerborg. 1997. Prevalence and risk factors for HTLV-II infection in 913 injecting drug users in Stockholm, 1994. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*.15:381-386.
- Kuroda, M.J., M. Kannagi, T. Masuda and S. Harada.1992. Inefficient transmission of HTLV-I in Mot-4 cells by cell free virus and cocultivation. *Intervirology*. 34:202-212.
- Kuroda, Y., H. Takashima, M. Yuritake and T. Sakemi. 1992. Development of HTLV-I myelopathy after blood transfusion in a patient with aplastic anemia and a recipient of a renal transplant. *Journal of Neurology Sciences*. 109(2)196-199.

- La Grenade, L. 1996. HTLV-1 associated infective dermatitis; past, present and future. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*. 13:846-849.
- Lairmore, M.D., S. Jacobson, F. Gracia, L. De, B. K. Castillo, M. Larreategui, B.D. Roberts, P.H. Levine, W.A. Blattner and J.E. Kaplan. 1990. Isolation of human T-cell lymphotropic virus type II from Guaymi Indians in Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 87:8840-8844.
- Lal, R.B., R.A. Gongora-Biachi, D. Pardi, W.M. Switzer, I. Goldman and A.F. Lal. 1993. Evidence for mother-to-child transmission of T lymphotropic virus type II. *Journal of Infectious Diseases*. 168:586-591.
- Lapoumeroulie, C., O. Dunda, G. Trabuchet, M. Mony-Lobe, D. Labie, J. Elison and R. Krishnamoorthy. 1989. A novel sickle cell gene of yet another origin in Africa: The Cameroon type. *Blood*. 74:255A.
- Lee, H., K. Idler, P. Swanson, J.J. Aparicio, K.K. Chin, J.P. Lax, M. Nguyen, T. Mann, G. Leckie, A. Zanetti, G. Marinucci, I. Chen and J.D. Roseblatt. 1993. Complete nucleotide sequence of HTLV-II isolate RNA. Comparison of envelope sequence variation of HTLV-II isolates from U.S. Blood donors and A.S. and Italian IV drug users. *Virology*. 196:57-69.
- Lee, H.H., P. Swanson, J.D. Roseblatt, I.S.Y. Chen, W.C. Sherwood, D.E. Smith, G.E. Tegtmeier, L.P. Fernando, C.T. Fang, M. Osame and S.H. Kleinman. 1991. Relative prevalence and risk factors of HTLV-I and HTLV-II infection in U.S. blood donors. *Lancet*. 337:1435-1439.

- Lee, H., P. Swanson, J.D. Roseblatt and I.S.Y. Chen. 1989. High rate of HTLV-II infection in seropositive IV drug abusers in New Orleans. *Science*. 244:471-475.
- Leon-Monzon, M., I. Illa and M.C. Dalakas. 1994. Polymyositis in patients infected with human T-cell leukemia virus type I: the role of the virus in the cause of the disease. *Annals of Neurology*. 36:643-9.
- Levin, M.C. and S. Jacobson. 1997. HTLV-I associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis (HAM/TSP): a chronic progressive neurologic disease associated with immunologically mediated damage to the central nervous system. *Journal of Neurovirology*. 3:126-140.
- Levine, P.H. and W.A. Blattner. 1987. The epidemiology of diseases associated with HTLV-I and HTLV-II. *Infectious Disease Clinics of North America*. 1:501-510.
- Levine, P.H., S. Jacobson, R. Elliott, A. Cavallero, G. Colglough, C. Dorry, C. Stephenson, R.M. Knigge, J. Drummond, M. Nishimura, M.E. Taylor, S. Wiktor and G.M. Shaw. 1993. HTLV-II infection in Florida Indians. *Aids Research and Human Retroviruses*. 9:123-127.
- Levy, J.A., A.D. Hoffman, S.M. Kramer, J.A. Landis, J.M. Shimabukuro and L.S. Oshiro. 1984. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science*. 225(4664):840-2.
- Lewis, M.J., P. Novoa, R. Ishak, M. Ishak, M. Salemi, A.-M. Vandamme, M.H. Kaplan and W.W. Hall. 2000. Isolation, cloning, and complete nucleotide sequence of a phenotypically distinct Brazilian isolate of human T-lymphotropic virus type II (HTLV-II). *Virology*. 271:142-54.

- Lin, M.T., B.T. Nguyen, T.V. Binh, T.V.Be, T.Y. Chyang, L.H. Tseng, Y.C.Yang, K.H. Lin and Y.C. Chen. 1997. Human T-lymphotropic virus type II infection in Vietnamese thalassemic patients. *Archives of Virology*. 142:1429-1440.
- Litvak, S. 1996. Retroviral reverse transcriptases. Springer Verlag, Heidelberg.
- Liu, H.F., A.-M. Vandamme, K. Kazadi, H. Carton, J. Desmyter and P. Goubau.1994a. Familial transmission and minimal sequence variability of human T-lymphotropic virus type-I (HTLV-I) in Zaire. *Aids Research and Human Retroviruses*. 10:1135-1142.
- Liu, H.F., P.Goubau, M. Van Brussel, K. Van Laethem, Y.C. Chen, J. Desmyter and A.-M. Vandamme. 1996. The three human T-lymphotropic virus type I subtypes arose from three geographically distinct simian reservoirs. *Journal General Virology*. 77:359-368.
- Liu,H.-F., A.-M. Vandamme, M.Van Brussel, J. Desmyter and P. Goubau.1994b. New retroviruses in human and simian T-limphotropic viruses. *Lancet*. 344:265-266.
- Mahieux, R., C. VChappey, M.C. Georges-Courbot, G. Dubreuil, P. Mauciere, A. Georges and A. Gessain. 1998. Simian T-cell lymphotropic virus type I from *Mandrillus sphinx* as a simian counterpart of human T-cell lymphotropic virus type I subtype D. *Journal of Virology*. 72:10316-10322.
- Mahieux, R., F. Ibrahim, P. Mauciere, V. Herve, P. Michel, F. Telaoa, C. Chappey, B.Garin, E. Van Der Ryst, B. Guillemain, E. Ledru, E. Delaporte, G. de Thé and A. Gessain.1997. Molecular epidemiology of 58 new African Human T-cell Leukemia Virus Type I (HTLV-I) strains : identification of a new and



- distinct HTLV-1 molecular subtype in Central Africa in Pygmies . *Journal of Virology*. 71:1317-1333.
- Malik, K.T.A., J. Even and A. karpas. 1988. Molecular cloning and complete nucleotide sequence of an adult T-cell leukemia virus/ human T-cell leukemia virus type I (ATLV/ HTLV-I) isolate of Caribbean origin: Relationship to other members of the ATLVI/ HTLV-I subgroup. *Journal of General Virology*. 69:1695-1710.
- Maloney, E.M, H. Ramirez, A. Levin and W.A. Blattner. 1989. A survey of the human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) in south-western Colombia. *International Journal of Cancer*. 44:419-23.
- Maloney, E.M., R.J. Biggar, J.V. Neel, M. Taylor, B.H. Hahn, G.M. Shaw and W.A. Blattner. 1992. Endemic human T cell lymphotropic virus type II infection among isolated Brazilian Amerindians. *Journal of Infectious Diseases*. 166:100-107.
- Manns, A., R.J. Wilks, E.L. Murphy, G. Haynes, J.P. Figuerpa, M. Barnett, B.Hanchard and W.A. Blattner. 1992. A prospective study of transmission by transfusion of HTLV-1 and risk factors associated with seroconversion. *International Journal of Cancer*.51:886-891.
- Matsushima, M., A. Yoneyama, M. Nakamura, Y. Higashihara, A. Yatomi, A. Tanabe, T. Ohashi, H. Oka and K. Nakahara. 1987. A first case of complete remission of  $\beta$ -interferon sensitive adult T-cell leukemia. *Eur. J. Haematol*. 39:282-7.

- Melo, A., L. Moura, A. Meireles and G. Costa. 1992. Danazol: a new perspective in the treatment of HTLV-I associated myelopathy (preliminary report). *Arq. Neuropsiquiatr.* 50:402-403.
- Melo, A., L. Moura, S. Rios, G. Machado and G. Costa. 1993. Magnetic resonance imaging in HTLV-I associated myelopathy. *Arq. Neuropsiquiatr.* 51:329-332.
- Menna-Barreto, M., G. Rabolini, O. Bianchini and C. Jardim. 2001. Neurosyphilis and HTLV-II-associated myelopathy. *AIDS Research and Human Retroviruses.* 17(1):S67.
- Merino, F., M. Robert-Guroff, J. Clark, M. Biondo-Bracho, W.A. Blattner and R.C. Gallo. 1984. Natural antibodies to human T-cell leukemia/ lymphoma virus in healthy Venezuelan populations. *International Journal of Cancer.* 34:501-506.
- Meyer, D. 1994a. Árvores evolutivas para populações humanas a partir de dados genéticos: desafios e perspectivas, pp.76. In *Resumos do II encontro da Associação Latino-Americana de Antropologia Biológica*, Rio de Janeiro, Brasil (Novembro de 1994 ).
- Meyer, D. 1994b. Desafios e perspectivas para a inferência de fologias de populações humanas, pp. 47-52. In *Anais do XIX simpósio anual da academia de ciências de São Paulo*, ACIESP, São Paulo.
- Michener, C.D. and R.R. Sokal. 1957. A quantitative approach to a problem in classification. *Evolution.* 11:130-162.
- Miura, T., M. Yamashita, V. Zaninovic, L. Cartier, J. Takehisa, T. Igarashi, E. Ido, T. Fujiyoshi, S. Sonoda, K. Tajima and M. Hayami. 1997. Molecular phylogeny

- of human T-cell leukemia virus type I and II of Amerindians in Colombia and Chile. *Journal of Molecular Evolution*.44:S76-S82.
- Miura, T., T.Fukunaga and T. Igarashi. 1994. Phylogenetic subtypes of human T-lymphotropic virus type I and their relations to the anthropological background. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*. 91:1124-1127.
- Miyoshi, I., S. Yoshimoto, M. Fujishita, H. Taguchi, I. Kubonishi, K.Niiya and M. Minezawa. 1982. Natural adult T-cell leukaemia virus infection in Japanese monkeys. *Lancet*. II:658.
- Mochizuki, M., A. Ono, E. Ikeda, N. Hikita, T. Watanabe, K. Yamaguchi, K. Sagawa and K. Ito. 1996. HTLV-I uveitis. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*. 13:S50-S56.
- Monplaisir, N., C. Neisson-Vernant, M. Bouillot, M. Duc-Dodon, E. Ugarte, I. Valette, Y. Dezaphy, M. Ouka, M.G. Eudarc, L. Gazzolo, B. Larouze and L. D'Auriol.1993. HTLV-I maternal transmission in Martinique, using serology and polymerase chain reaction. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 9:869-874.
- Moore, G.R.H., U. Traugott, L.C. Scheinberg and D.W. Ballard. 1989. Tropical spastic paraparesis: a model of virus-induced, cytotoxic T-cell-mediated demyelination? *Am. Neurol*. 26:523-530.
- Moreira Jr., E.D., T.T. Ribeiro, P. Swanson, C. Sampaio-Filho, A. Melo, C. Brites, R. Badaró, G. Toedter, H. Lee and W. Harrington Jr. 1993. Seroepidemiology of human T-cell lymphotropic virus type I/II in

- Northeastern Brazil. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 6:959-963.
- Moreno-Carvalho, O.A., J.I. Santos, G. Di Credico and B. Galvão-Castro. 1992. Evidence of preferential female prevalence of HTLV-I associated tropical spastic paraparesis in Bahia-Brazil. *Arq. Neuropsiquiatr.* 50:183-8.
- Morgan, O.S., P. Rodgers-Johnson, C. Mora and G. Char. 1989. HTLV-I and polymyositis in Jamaica. *The Lancet*. ii:1184-87.
- Mueller, N., A. Okayama, S. Stuver and N. Tachibana. 1996. Findings from the Miyazaki Cohort Study. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*. 13:S2-S7.
- Murphy, E.L., J. Frider, J.W. Smith, J. Engstrom, R.A. Sacher, K. Miller, J. Gible, J. Stevens, R. Thomson, D. Hansma, J. Kaplan, R. Kabbhaz and G. Nemo. 1997. HTLV-associated myelopathy in a cohort of HTLV-I and HTLV-II-infected blood donors. The REDS investigators. *Neurology*. 48:315-20.
- Murphy, E.L., J.W. Engstrom, K. Miller, R.A. Sacher, M.P. Busch, C.G. Hollingsworth and R. Investigators. 1993. HTLV-II associated myelopathy in 43-years-old woman. *Lancet*. 341:757-758.
- Nagel, R.L. 1984. The origin of the hemoglobin S gene: clinical, genetic and anthropological consequences. *Einstein Quarter Journal of Biology Medicine*. 2:53-62.
- Nagel, R.L. and H.M. Ranney. 1990. Genetic epidemiology of structural mutations of the  $\beta$ -globin gene. *Seminar. in Hematology*. 27:342-359.

- Nakano, S., Y. Ando, M. Ichijo, O. Moriyama, S. Saito, K. Sugamura and Y. Hinuma. 1984. Search for possible routes of vertical and horizontal transmission of adult T-cell leukemia virus. *Japanese Cancer Association*. 75:1044-1045.
- Nam, S.H., M. Kidokoro, H. Shida and M. Hatanaka. 1988. Processing of gag precursor polyprotein of human T-cell leukemia virus type I by virus-encoded pretease. *Jornal of Virology*. 62:3718-28.
- Neel. J.V., R.J. Biggar and R.I. Sukernik. 1994. Virologic and genetic studies related Amerindian origins to the indigenous people of the Mongolia/ Manchuria/ southeastern Siberia region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 91:10737-10741.
- Nishioka, K., I. Maruyama, K. Sato, I. Kitajima, Y. Nakajima and M. Osame. 1989. Chronic inflammatory arthropathy associated with HTLV-1 (letter). *Lancet*. 1:441.
- Ohshima, K., M. Kikuchi, Y. Masuda, S. Kobari, Y. Sumiyoshi, F. Eguchi, H. Mohtai, T. Yoshida, M. Takeshita and N. Kimura. 1991. Defective provirus form of human T-cell leukemia virus type I in adult T-cell leukemia/ limphoma; clinicopathological features. *Cancer Research*. 51:4639-4642.
- Ohtani, K., N. Nakamura, S. Saito, T. Noda, Y. Ito, K. Sugamura and Y. Hinuma. 1987. Identification of two distinct elements in the long terminal repeat of HTLV-I responsible for maximum gene expression. *EMBO Journal*. 6:389.

- Okochi, K., H. Sato and Y. Hinuma. A retrospective study on transmission of adult T-cell leukemia virus by blood transfusion: seroconversion in recipients. *Vox Sang.* 46:245-253.
- Orozlan, S., T.D. Copeland, V.S. Kalianaraman, M.G. Sarngadharan, A.M. Schultz and R.C. Gallo. 1984. Chemical analysis of human T-cell leukemia virus structural protein. In: Gallo RC, Essex ME, Gross L; eds. *Human T-cell leukemia/ lymphoma viruses*, pp.101-110. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Osame, M., K. Usuku, S. Izumo, N. Ijichi, H. Amitani, A. Igata, M. Matsumoto and M. Tara. 1986. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet.* 1:1031-2.
- Osame, M., M. Matsumoto, K. Usuku, S. Izumo, N. Ijichi, H. Amitani, M. Tara and A. Igata. 1987. Chronic progressive myelopathy associated with elevated antibodies to human T-lymphotropic virus type I and adult T-cell leukemia like cells. *Annales of Neurology.* 21:117-122.
- Pardi, D., W.M. Switzer, K.G. Hadlock, J.E. Kaplan, R.B. Lal and T.M. Folks. 1993. Complete Nucleotide sequence of an Amerindian human T-cell lymphotropic virus type II (HTLV-II) isolate: identification of a variant HTLV-II subtype b from Guayami Indian. *Journal of Virology.* 67:4659-4664.
- Pinsky, J. 1988. O escravo negro. In Pinsky, J., *A escravidão no Brasil*. Ed Contexto, São Paulo. pp.24.
- Poiesz, B.J., F.W. Ruscetti, A.F. Gazdar, P.A. Bunn, J.A. Minna and R.C. Gallo. 1980. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma.

*Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* 77:7415-7419.

Pombo de Oliveira, M.S., E. Matutes, L.C. Famadas, T.F. Schltz, M.L. Calabro, M. Nucci, M.J. Andrada-Serpa, R.S. Tedder, R.A. Weirs and D. Catovsky. 1990. Adult T-cell leukemia/lymphoma in Brazil and its relation to HTLV-I. *The Lancet.* 336:987-990.

Ratner, L., S.F. Josephs, B. Starcich, B. Hahn, G.M. Shaw, R.C. Gallo and F. Wong-Staal. 1985. Nucleotide sequence analysis of a variant human T-cell leukemia virus (HTLV-Ib) provirus with a deletion in pX-I. *Journal of Virology.* 54:781-790.

Reddy, T.R., X. Li, Y. Jones, H. Ellisman, G.Y. Ching, R.K.H. Liem and F. Wong-Staal. 1998. Specific interaction of HTLV-I Tax protein and a human type IV neuronal intermediate filament protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* 95:702-7.

Reeves, W.C., P. Levine, M. Cuevas, E. Queiroz, E. Maloney and W.C. Saxinger. 1990. Seroepidemiology of human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) in the Republic of Panama. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 42:374-379.

Reich, D.E. and D.B. Goldstein. 1998. Genetic evidence for a paleolithic human population expansion in Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* 95:8119-8123.

Richardson, J.H., A.J. Edwards, J.K. Cruickshank, P. Rudge and A.G. Dalgleish. 1990. In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. *Journal of Virology.* 64:5682-5687.

- Rodrigues, N. 1977. Os africanos no Brasil. 9:13-70. Companhia Editora Nacional (5<sup>a</sup> ed), São Paulo, Brasil.
- Roman, C.G., B.S. Schoenberg, D.L. Madden, J.L. Server, J. Hugon, A. Ludolph and P.C. Spencer. 1987. Human T-lymphotropic virus tipe I antibodies in the serum of patients with tropical spastic paraparesis in the Seychelles. *Archives of Neurology*. 44:605-607.
- Roman, C.G., M. and Osame. 1988. Identify of HTLV-I-associated tropical spastic paraparesis and HTLV-I-associated myelopathy. *Lancet*. i:651.
- Roman, G.C. and M. Osame. 1988. Identity of HTLV-I-associated tropical spastic paraparesis and HTLV-I-associated myelopathy. *The Lancet*. 1:651
- Rous, P.1911. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *Journal of Experimental Medicine*.13:397.
- Said, G., C. Goulon-Groean, C. Lacroix, A. Feve, H. Descamps and M. Fouchard. 1988. Inflammatory lesions of peripheral nerve in a patient with human T-lymphotropic virus type I associated myelopathy. *Ann. Neurol*. 24:275-277.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol*. 4:406-425.
- Saji, F., K. Ohashi, Y. Tokugawa, S. Kamiura, C. Azuma and O. Tanizawa. 1990. Perinatal infection of human T-lymphotropic virus type I, the etiologic virus of adult T-cell leukemia/ lymphoma. DNA amplification of specific human T-lymphotropic virus type I sequences. *Cancer*. 66:1933-1937.
- Saksena, N.K., M.P. Sherman, R. Yanagihara, D.P.Dube and B.J. Poiesz. 1992. LTR sequence and phylogenetic analyses of a newly discovered variant of HTLV-I isolated from Hagahai of Papua New Guinea. *Virology*. 189,1-9.



- Salemi, M. 1999. Molecular investigations of the origin and genetic stability of the human T-cell lymphotropic viruses. PHD tesis in Katholieke Universiteit Leuven. Rega Instituut.
- Salemi, M., A.-M. Vandamme, C. Gradozzi, K. Van Laethem, E. Cattaneo, G. Taylor, C. Casoli, P. Goubau, J. Desmyter and U. Bertazzoni. 1998a. Evolutionary rate and genetic heterogeneity of human T-cell lymphotropic virus type II (HTLV-II) using new isolates from European injecting drug users. *Journal of Molecular Evolution*. 46:602-611.
- Salemi, M., A.-M. Vandamme, F. Guano, C. Gradozzi, E. Cattaneo, C. Casoli and U. Bertazzoni. 1996. Complete nucleotide sequence of the Italian human T-cell lymphotropic virus type I isolate Gu and phylogenetic identification of a possible origin of South European epidemics. *Journal of general Virology*. 77:1193-1201.
- Salemi, M., E. Cattaneo, C. Casoli and U. Bertazzoni. 1995. Identification of IIa and IIb molecular subtypes of human T-cell lymphotropic virus type II among Italian injection drug users. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*. 8:516-520.
- Salemi, M., S. Van Dooren, E. Audenaert, E. Delaporte, P. Goubau, J. Desmyter and A.-M. Vandamme. 1998b. Two new human T-lymphotropic virus type I phylogenetic subtypes in seroindeterminates, a Mbuti pygmy and a Gabonese, have closes relatives among African STLV-I strains. *Virology*. 246:277-287.
- Sanchez-Albornoz, N., R. Morse, P. Bakewell, E. Florescano, M. Morner, M.J. Macleod, J. Lockhart and A. Lavrin. 1984. Colonial Latin America in The

Cambridge History of Latin America volume 2, pp.15-335. Cambridge University Press, Cambridge.

Saxinger, W., W.A. Blattner, P.H. Levine, J. Clark, R. Biggar, M. Hoh, J. Moghissi, P. Jacobs, L. Wilson and R. Jacobson. 1984. Human T-cell leukemia virus (HTLV-I) antibodies in Africa. *Science*.225:1473-1476.

Schultz, T.F and R.G. Vile. 1992. Viruses in human cancer. In Vile R.G. *Introduction to the molecular genetics of cancer*. Ed. John Wiley and Sons Ltd. Oxford:137-175.

Seiki, M., J. Inoue, T. Takeda and M. Yoshida. 1986. Direct evidence that p40x of human T-cell Leukemia Virus Type 1 is a trans-acting transcriptional activator. *EMBO Journal*. 5:561-565.

Seiki, M., R. Eddy, T.B. Shows and M.Yoshida. 1984. Nonspecific integration of the HTLV provirus genome into Adult t-cell leukemia cells. *Nature*. 309:640-642.

Seiki, M., S. Hattory, Y. Hyraiama and M. Yoshida. 1983. Human adult T-cell leukemia virus: completed nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 80:3618-3622.

Semmes, O.J., F. Majone, C. Cantemir, L. Turchetto, B. Hjelle and K.-T. Jeang. 1996. HTLV-I and HTLV-II Tax; differences in induction of micronuclei in cells and transcriptional activation of viral LTRs. *Virology*. 217:373-379.

Shimotohno, K., D.W. Golde, M. Miwa, T. Sugimura and I.S.Y. Chen. 1984. Nucleotide sequence analysis of the long terminal repeat of human T-cell leukemia virus type II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 81:1079-1083.

- Shimoyama, M. 1991. Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the lymphoma study group. *British Journal of Haematology*. 79:428-437.
- Sodroski, J., C. Rosen, W.C. Goh and W. Haseltine. 1985. A transcriptional activator protein encoded by the X-*lor* region of the human T-cell leukemia virus. *Science*. 228:1430-1434.
- Song, K.J., V.R. Verurkar, N. Saitou, A. Lazo, J.R. Blakeslee, I. Miyoshi and R. Yanagihara. 1994. Genetic analysis and molecular phylogeny of simian T-cell lymphotropic virus type I: evidence for independent virus evolution in Asia and Africa. *Virology*. 199:56-66.
- Sonoda, S., S. Yashiki and T. Fujiyoshi. 1992. Immunogenetics factors involved in the pathogenesis of adult T-cell leukemia and HTLV-I associated myelopathy. 1992. In Takatsuki, K., Y. Hinuma and M. Yoshida (ed), *Advances in adult T-cell leukemia and HTLV-I research. Gann Monograph Cancer Research*. 39:81-93.
- Soriano, V., A. Vallejo, M. Gutierrez, C. Tunset, G. Cilla, R. Martinez-Zapico, F. Drona, E. Caballero, E. Calderon, A. Aguilera, A.M. Martin, J. Libre, J. Del Romero, R. Ortiz de Lejarazu, F. Ulloa, J. Eiros and J. Gonzales-Lahoz. 1996. Epidemiology of human T-cell lymphotropic virus type II (HTLV-II) infection in Spain. HTLV Spanish Study Group. *European Journal of Epidemiology*. 12:625-629.
- Stringer, C.B. 1990. The emergence of modern humans. *Scientific American*. 98:104.

- Stringer, C.B. and P. Andrews. 1988. Genetic and fossil evidence for the origin of modern humans. *Science*. 239:1263-1268.
- Sutton, M., E.E. Bouhassira and R.L. Nagel. 1989. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of  $\beta$ -like globin gene cluster haplotypes. *American Journal of Hematology*. 32:66-69.
- Suzuki, Y. and T. Gojobori. 1998. The origin and evolution of the human T-cell lymphotropic virus type I and II. *Virus Genes*. 16:69-84.
- Swisher, C.C., G.H. Curtis, T. Jacob, A.G. Getty, A. Sprijo and Widiasmoro. 1994. Age of the earliest known hominids in Java, Indonesia. *Science*. 263:1118-1121.
- Switzer, W.M., F.L. Black, D. Pieniazek, R.J. Biggar, R.B. Lal and W. Heneine. 1996. Endemicity and phylogeny of the human T-cell lymphotropic virus type II subtype A from the Kayapo indians of Brazil: evidence for limited regional dissemination. *AIDS research and Human Retroviruses*. 12:635-640.
- Switzer, W.M., S.M. Owen, D.A. Pieniazek, V.R. Nerurkar, E. Duenas-Barajas, W. Heneine and R.B. Lal. 1995b. Molecular analysis of human T-cell lymphotropic virus type II from Wayuu indians of Colombia demonstrates two subtypes of HTLV-IIb. *Virus genes*. 10:153-162.
- Switzer, W.M., D. Pieniazek, P. Swanson, H.H. Samdal, V. Soriano, R.F. Khabbaz, J.E. Kaplan, R.B. Lal and W. Heneine. 1995a. Phylogenetic relationship and geographic distribution of multiple human T-cell lymphotropic virus type II subtypes. *Journal of Virology*. 69:621-632.

- Tajima, K., S. Tominaga, T. Suchi, T. Kawagoe, H. Cómoda, Y. Inhuma, T. Oda and K. Fujita. 1982. Epidemiological análisis of the distribution of antibody to adult T-cells leukemia virus-associated antigen: posible horizontal transmisión of adult T-cell leukemia virus. *Japanese Journal Cancer Research*. 73:893-901.
- Tajima, K., The T and B-Cell Malignancy Study Group and Co-authors. 1990. The 4<sup>th</sup> nation-wide study of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) in Japan: eatimates of risk of ATL and its geographical and clinical features. *International Journal of Cancer*. 45:237-243.
- Takahashi, H., S.W. Zhu, S. Ijichi, A. Vahlne, H. Suzuki and W.W. Hall. 1993. Nucleotide sequence analysis of human T-cell leukemia virus type II (HTLV-II) isolates. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 9:721-732.
- Takahashi, K., T. Takezaki, T. Oki, K. Kawakami, S. Yashiki, T. Fujiyoshi, K. Usuku, N. Mueller, M. Osame and K. Miyata. 1991. Inhibitory effect of maternal antibody on mother-to-child transmission of human T-lymphotropic virus type I. The Mother-to-Child Transmission Study Group. *International Journal of Cancer*. 49:673-677.
- Takatsuki, K., T. Uchiyama, K. Sagawa and J. Yodoi. 1977. In Seno, S., F. Takaku and S. Irino (ed). *Topics in Hematology*. Amsterdam. Excerpta Medica:73-77.
- Tamura, K., M. Nei. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitution in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*. 10:512-526.

- Teich, N. 1982. Taxonomy of Retroviruses, p. 25-207. In R. Weiss and N. Teich and H. Varmus and J. Coffin (ed.), *RNA Tumor Viruses*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Teich, N. 1982. Taxonomy of retroviruses. In Weiss, R., N. Teich, H. Varmus and J. Coffin (ed), *RNA tumor viruses*, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 25-207.
- Temin, H. and S. Mizutami.1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*. 226:1211-1213.
- Terada, K., S. Katamine, K. Eguchi, R. Moriuchi, M. Kita, H. Shimada, I. Yamashita, K. Iwata, Y. Tsuji, S. Nagataki, et al.1994. Prevalence of serum and salivary antibodies to HTLV-I in Sjogren's syndrome. *Lancet*. 344:1116-1119.
- Thorne, A.G. and M.H. Wolpoff. 1992. The multiregional evolution of humans. *Scientific American* 266:76-83.
- Tokudome, S., O. Tokunaga and Y. Shimamoto. 1989. Incidence of adult T-cell leukemia/lymphoma among human T-lymphotropic virus type I carries in Saga, Japan. *Cancer Res*. 49:226-228.
- Tronick, E.Z., G.A. Morelli and S. Winn.1987. Multiple caretaking of Efe (pygmy) infants. *American Anthropology*. 89:96-106.
- Tsugane, S., S. Watanabe, H. Sugimura, T. Otsu, K. Tobinai, M. Shimoyama, S. Nanri and H. Ishii.1988. Infectious state of human T-cell lymphotropic virus type I and hepatitis B virus among Japanese immigrants in the Republic of Bolivia. *American Journal of Epidemiology*. 128:1153-1161.

- Uchiyama, T., J. Yodoi, K. Sagawa, K. Takatsuki and H. Uchino. 1977. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood*. 50:481-92.
- Uchiyama, T. 1997. Human T Cell Leukemia Virus Type I (HTLV-I) and human diseases. *Annual Review of Immunology*. 15:15-37.
- Ueda, K., K. Kusuhashi, K. Tokugawa et al. 1993. Mother-to-child transmission of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I): an extended follow-up study on children between 18 and 22-24 years old in Okinawa, Japan. *Int. J. Cancer*. 53:597-600.
- Vallejo, A. and A. Garcia-Saiz. 1994. Isolation and nucleotide sequence analysis of human T-cell lymphotropic virus type II in Spain. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 7:517-519.
- Van Brussel, M., M. Salemi, H.-F. Liu, P. Goubau, J. Desmyter and A.-M. Vandamme. 1998. The simian T-lymphotropic virus STLV-PP1664 from *Pan paniscus* is distinctly related to HTLV-2 but differs in genomic organization. *Virology*. 243:366-379.
- Van Brussel, M., P. Goubau, R. Rousseau, J. Desmyter and A.-M. Vandamme. 1996. The genomic structure of a new primate T-lymphotropic virus, STLV-PH969, differs from that of simian T-lymphotropic virus type I and human T-lymphotropic virus type I and II. *Journal of General Virology*. 77:347-358.
- Van Dooren, S., E. Gotuzzo, M. Salemi, D. Watts, E. Audenaert, S. Duwe, H. Ellerbrok, R. Grassmann, J. Desmyter and A.-M. Vandamme. 1998. Evidence for a Post-Colombian introduction of human T-cell lymphotropic virus in Latin America. *Journal of General Virology*. 79:2695-2708.

- Vandamme, A.-M. , M.Salemi, M. Van Brussel, H.-F. Liu, K. Van Laethem, M. Van Ranst, L. Michels, J. Desmyter and P. Goubau.1998a. African origin of human T-lymphotropic virus type II (HTLV-II) supported by a new subtype HTLV-II<sub>d</sub> in Zairean Bambuti Efe pygmies. *Journal of Virology*. 72:4327-4340.
- Vandamme, A.M., H.F. Liu, M.Van Brussel, W. De Meurichy, J. Desmyter and T. Gouban. 1996. The presence of a divergent T-lymphotropic virus in a wild-caught pigmy chimpanzee (*Pan paniscus*) supports an African origen for the human T-lymphotropic/simian t-lymphotropic group of viruses. *Journal of General Virology*. 77(5):1089-99.
- Vandamme, A.-M., H.-F. Liu, P. Goubau and J. Desmyter. 1994. Primate T-lymphotropic virus type I LTR sequence variation and its phylogenetic analysis: compatibility with an African origin of PTLV-I. *Virology*. 202:212-223.
- Vandamme, A.M., M. Salemi, S. Van Dooren, P. Goubau, M. Van Brussel and J. Desmyter.1998b. The simian origins of the pathogenic human T-cell lymphotropic virus type I. *Trends in Microbiology*. 6:477-483.
- Verdier, M., J. Bonis and F.A. Denis. 1994. The prevalence and incidence of HTLVs in Africa,p. 173-193.*In M. Essex(ed.),AIDS in Africa*, vol. 9. Raven Press, New York.
- Verger, P. 1968. Flux et reflux de la traite des nègres entre le Golfe de Benin et Bahia de Todos os Santos. Mouton, Paris.



- Verger, P. 1976. Mouvement des navires. P.12. In Verger, P., *Trade relations between the Bight of Benin and Bahia, 17<sup>th</sup> to 19<sup>th</sup> century*, trans. Evelyn Crawford, Ibadan, Ibadan University Press. pp.24-26.
- Viana Filho, L. 1988. O negro na Bahia. 31-224. Nova Fronteira (3<sup>a</sup> ed), Rio de Janeiro, Brasil.
- Vidal, A.U., A. Gessain, M. Yoshida, F. Tekaiia, B. Garin, B. Guillermain, T. Schuls, R. Farid and G. De The. 1994. Phylogenetic classification of human T cell leukaemia/lymphoma virus type I genotypes in five major molecular and geographical subtypes. *Journal of General Virology*. 75:3655-66.
- Vigilant, L., M. Stoneking, H. Harpending, K. Hawkes and A.C. Wilson. 1991. African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science*. 253:1503-1507.
- Vigilant, L., M. Stoneking, H. Harpending, K. Hawkes and A.C. Wilson. 1991. African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science*. 253:1503-1507.
- Watanabe, T., M. Seiki, Y. Hirayama and M. Yoshida. 1986. Human T-cell leukemia virus type I is a member of the African subtype of simian retrovirus genome with human T-cell leukemia virus type I. *Virology*. 148:385-388.
- Watson, E., P. Foster, M. Richards and H.-J. Bandel. 1997. Mitochondrial footprints of human expansions in Africa. *American Journal of Human Genetics*. 61:691-704.
- Wattel, E., J.-P. Vartanian, C. Pannetier and S. Wain-Hobson. 1995. Clonal Expansion of Human T-Cell Leukemia Virus Type I- Infected cells in

asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. *Journal of Virology*. 69:2863-2868.

Wattel, E., M. Cavrois, A. Gessain and S. Wain-Hobson. 1996. Clonal expansion of infected cells: a way of life for HTLV-I. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*. 13:S92-S99.

Wolpoff, M.H. 1989. Multiregional evolution: the fossil alternative to Eden. In P. Mellars and C.B. Stringer (eds.). *The origins of modern humans: behavioural and biological perspectives*, Edinburgh University Press, Edinburgh.

Yamada, M., K. Watanabe, T. Saida and S.U. Kim. 1991. Increased susceptibility of human fetal astrocytes to human T-lymphotropic virus type I in culture. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 50:97-107.

Yamada, I., T. Isono, T. Ishiguro and Y. Yoshida. 1993. Comparative study of human and rabbit cell infection with cell-free HTLV-I. *Journal of Medical Virology*. 39:75-79.

Yamashita, M., B. kitze, T. Miura, T. Weber, T. Fujiyoshi, J. Takehisa, J.L. Chen, S. Sonoda and M. Hayami. 1995. The phylogenetic relationship of HTLV type I from non-Mashhadi Iranians to that from Mashhadi Jews. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 11:1533-1535.

Yamashita, M., R. Veronesi, M. Menna-Barreto, W.J.Jr. Harrington, C. Sampio, C. Brites, R. Badaro, A. S. Andrade-Filho, S. Okhura, T. Igarashi, T. Miura, D. Chamone, O. Bianchini, C. Jardim, S. Sonoda and M. Hayami. 1999. Molecular epidemiology of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) Brazil: the predominant HTLV-1s in South America differ from HTLV-1s of

- Japan and Africa, as well as those of Japanese immigrants and their relatives in Brazil. *Virology*, 261:59-69.
- Yanagihara, R., C.L. Jenkins, A.B. Ajdukiewicz and R.B. Lal. 1991. Serological discrimination of HTLV I and II infection in Melanesia (letter). *Lancet*. 337:617-618.
- Yanagihara, R., C.L. Jenkins, S.S. Alexander, K.A. Mora and R.M. Garruto. 1990. Human T-lymphotropic virus type I infection in Papua New Guinea: high prevalence among the Hagahai confirmed by western analysis. *Journal of Infectious Diseases*. 162:649-654.
- Yang, Z. 1996. Among-site rate variation and its impact on phylogenetic analyses. *Tree*. 11 367-372.
- Yodoi, J. and T. Uchiyama. 1992. Diseases associated with HTLV-I: virus, IL-2 receptor deregulation and redox regulation. *Immunology Today*. 13(10):405-410.
- Yoshida, M. 1996. Molecular biology of HTLV-I recent progress. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*. 13:S63-S68.
- Yoshida, M., I. Miyoshi and Y. Hinuma. 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.
- Yoshida, M., M. Seiki, K. Yamagushi and K. Takatsuki. 1984. Monoclonal integration of human T-cell leukemia provirus in all primary tumors of adult

T-cell leukemia suggests causative role of the human T-cell virus in the disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81:2534-37.

Zago, A., M.S. Figueiredo and S.H. Ogo. 1992. Bantu  $\beta^S$ -cluster haplotype predominates among Brazilian black. *American Journal of Physiology and Anthropology.* 88:295-98.

Zella, D., A. Cavicchini, M. Salemi, C. Casoli, F. Lori, G. Achilli, E. Cattaneo, V. Landini and U. Bertazzoni.1993. Molecular characterization of two isolates of human T cell leukaemia virus type II from Italian drug abusers and comparison of genome structure with other isolates. *Journal of General Virology.*74:437-444.

Zella, D., L. Mori, M. Sala, P. Ferrante, C. Casoli, G. Magnani, G. Achilli, E. Cattaneo, F. Lori and U. Bertazzoni.1990. HTLV-II infection in Italian drug abusers. *Lancet.* ii:575-576.

## VII. Manuscritos.

**Manuscrito nº 1:** I. Dourado, L.C.J. Alcantara, M.L. Barreto, M.G. Teixeira and B. Galvao-Castro. HTLV-I in the general population of a Brazilian city with the highest seroprevalence. Submitted.

**Manuscrito nº 2:** A.L. Bittencourt, I. Dourado, P.B. Filho, M. Santos, E. Valadão, L.C.J. Alcantara and B. Galvao-Castro (2001). Human T-cell lymphotropic virus type 1 infection among pregnant women in Northeastern Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndrom Hum Retrov* 26:490-494.

**Manuscrito nº 3:** L.C.J. Alcantara, F.L.N. Santos, S. Van Dooren, M. Gonçalves, S. Kashima, M.C.R. Costa, N. Shindo, A. Bittencourt, D.T. Covas, I. Dourado, A.A. Filho, A.-M. Vandamme and B. Galvao-Castro. Polymorphism study of the human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) in Salvador-Bahia, the city with the highest prevalence in Brazil. Submitted.

**Manuscrito nº 4:** L.C.J. Alcantara, N. Shindo, M.C.R. Costa, S. Kashima, S. Van Dooren, M. Salemi, D.T. Covas, A.-M. Vandamme and B. Galvao-Castro. Brazilian HTLV-IIa strains from IDUs originated from two sources: Brazilian Amerindians and European/North American IDUs. Submitted.

**Manuscrito nº 5:** N. Shindo, L.C. Alcantara, S. Van Dooren, M. Salemi, M.C.R. Costa, S. Kashima, D.T. Covas, A. Teva, M. Pellegrini, I. Brito, A.-M. Vandamme and B. Galvao-Castro (2002). Human retroviruses (HIV and HTLV) in Brazilian Indians: seroepidemiological study and molecular epidemiology of HTLV type 2 isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses*: 18(1):71-77.

## **Manuscrito nº 1**

**Title:** HTLV- I in the general population of a Brazilian city with the highest seroprevalence

Inês Dourado<sup>1</sup>, Luiz C.J. Alcantara<sup>2,3</sup>, Maurício L. Barreto<sup>1</sup>, Maria da Gloria Teixeira<sup>1</sup>, Bernardo Galvão-Castro<sup>2,3</sup>

### **Institutional affiliation:**

<sup>1</sup>Instituto de Saúde Coletiva/Universidade Federal da Bahia (UFBA)- Rua Padre Feijó, 29 – 4º andar, Canela, Salvador, Bahia, Brazil – 40.110.170

<sup>2</sup> Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM) Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Salvador, Bahia, Brazil

<sup>3</sup> Fundação para o Desenvolvimento das Ciências/Faculdade Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Bahia, Brazil

### **ABSTRACT**

*Background.* The city of Salvador in Northeast Brazil has the highest prevalence of HTLV- I. *Methods.* Thirty "sentinel surveillance areas" of Salvador were selected for the investigation of various infectious diseases. Among these areas, 1385 individuals were surveyed according to a simple random sample procedure. Blood samples were collected for serological assays. Sera were screened for HTLV-I antibodies by ELISA and confirmed by Western blot, and phylogenetic analysis of the 19 samples was done. *Results.* Overall prevalence of HTLV-I was 1.76% (23/1385). Infection rates were respectively 1.2% and 2.0% for males and females. Specific seroprevalence demonstrated a linear trend with increasing age. Multivariate analysis estimated adjusted ORs for those of 40 years or older of 15.0 (3.3; 67.9) and 4.7 (0.6; 34.3) for females and males respectively. Less education and income might be associated with HTLV-I infection among females. Phylogenetic analysis of the LTR fragments showed that most of the samples under this study belong to the Latin American cluster of the Transcontinental subgroup (Cosmopolitan subtype). *Conclusions:* If we extrapolate our estimated prevalence to the whole city of Salvador, we would expect approximately 40,000 infected individuals. In agreement to previous studies, our results support the

hypotheses of multiple post-Colombian introductions of African HTLV-Ia strains in Salvador. Future studies are necessary to further explain the observed cumulative pattern with a sharp increase after 40 years old. Furthermore, the potential impact of our results should pass through an overall discussion among health professionals in order to implement control measures for this infection.

## INTRODUCTION

Human T-Lymphotropic viruses (HTLV-I/II) and Human Immunodeficiency Virus (HIV) were identified during the years 1979-1985<sup>1</sup>. It can be transmitted through sexual contact, blood transfusion, sharing of injecting equipment, and from mother to child primarily through breast feeding<sup>2,3</sup>

HTLV-I infection is endemic in different geographic regions of the world such as Japan, Australia, Central and West African countries and in South America.<sup>19</sup> So far six genetic subtypes have been proposed in the phylogenetic classification of this virus: Ia, Cosmopolitan, spread into different geographic regions of the world;<sup>20</sup> Ib, Central African;<sup>21</sup> Ic, Melanesian, a divergent strain isolated in Papua New Guinea and Australia;<sup>22</sup> Id, isolated from Central African Republic pygmy and from two patients from Cameroon and Gabon;<sup>23,24</sup> Ie and If, recently proposed as the more divergent isolates representing new subtypes identified in samples from one Efe pygmy from Congo and one individual from Gabon.<sup>25</sup> The Cosmopolitan subtype is divided in four subgroups according to their geographical distribution: Transcontinental (A), Japanese (B), North African (C) and West African (D).<sup>26,27,28</sup>

It has been suggested that HTLV- I was introduced in Brazil with the slave trade from West Africa during the Portuguese colonization (XV-XVIII Centuries)<sup>4</sup>. Since Salvador was the first capital (1549), a large number of Africans was brought to this city. The seroprevalence of HTLV was first described in Brazil in 1986 among

Japanese immigrants (13%) in the city of Campo Grande, Central-West Region<sup>5</sup>. After that, other studies demonstrated the presence of HTLV-I/II among specific population groups in other states using different diagnostic criteria. In 1993, a nationwide survey among blood donors from 5 state capitals using a standardized criteria demonstrated a mean seroprevalence of HTLV-I of 0.45% with the highest rate of 1.35% in Salvador<sup>6</sup>. Furthermore, specific groups from this city have been investigated and high rates of infection among 216 IDUs was found: HTLV-I, HTLV-II and HIV-1 was for males 22%, 11.3% and 44.1% and for females 46.2%, 10.3% and 74.4% respectively<sup>7,8,9</sup>. Among a group of 6.754 pregnant women, 53 (0.78%) were seropositive for HTLV-I and 2 (0.03%) for HTLV-II<sup>10</sup>.

Clinical disease has also been found in Brazil and since 1989 several series of HAM/TSP patients with HTLV-I infection ranging from 14.7 to 57% have been described<sup>11</sup>. The first nation-wide study on the disease concluded that TSP/HAM is occurring in Brazil, mainly in the Northeast and Southeast regions and predominates among women<sup>12</sup>. Pombo de Oliveira et al reported a seroprevalence of 26% among patients with T-cell malignancies (ATLL) in Rio de Janeiro<sup>13</sup>. In Salvador, Schaer-Barbosa et al described the clinical, histopathological and molecular characteristics of 28 HTLV-I+ lymphoma/leukemia cases<sup>14</sup>.

Most of the HTLV-I seroprevalence data in Brazil are from specific groups such as blood donors, UDI, HAM/TSP patients and ATLL patients. In this paper, we report data from a sample of the general population of Salvador, Brazil, a city with the highest reported rate of infection in the nationwide blood donor survey.

So far of the few isolates studied in this country all belong to the Cosmopolitan subtype. Few cluster inside the Japanese subgroup while the majority belong to the Transcontinental subgroup.<sup>29</sup> In order to get more insight on towards the circulating



subtype of this virus in Brazil we have studied HTLV-I isolates obtained from 19 individuals living in Salvador city, Northeast region, the area with the highest prevalence and with sociodemographic characteristics similar to some African cities.

## **METHODS**

This investigation is part of a large ongoing project to investigate the health impact of major sanitation improvements in the city of Salvador (*Projeto Bahia Azul*)<sup>15</sup>. In short, census tracts of Salvador were classified according to 3 levels of basic sanitation and 3 levels of income, then combined into 7 different strata. Then, 10 hydrographic basins (with and without sanitation) were randomly selected and three areas randomly selected in each of the basins, yielding thirty "sentinel surveillance areas" for the investigation of various infectious diseases. A census was carried out in the selected areas.

Salvador, the capital of Bahia State in Northeast Brazil, is a city with approximately 2.5 million inhabitants. Its population, is roughly 80% black or racially mixed. A cross sectional study was design within the major project in order to investigate the seroprevalence of HTLV-I among the population of the selected areas. From an estimated 68,749 residents of the sentinel surveillance areas (Figure 1), 1385 individuals were surveyed according to a simple random sample procedure without replacement and with post-stratification procedure<sup>16</sup>. Data on income, sanitation and population density were supplied by the National Geography and Statistics Institute<sup>17</sup>. Data on area of residency, sex, age income and educational levels were collected through a questionnaire between May and July 1998. After informed consent was obtained, blood samples were collected in sterilized vacuum tubes of 10ml, the serum

was separated through centrifugation and stored at  $-20^{\circ}$  at the Advanced Public Health Laboratory of the CPqGM/Fiocruz Foundation.

*Laboratory methods* - Sera were screened for HTLV-I/II antibodies by ELISA (HTLV-I (rp<sub>21c</sub> enhanced), EIA, Cambridge Biotech Corporation, Worcester, MA, USA respectively) and confirmed by HTLV Blot 2.4 Genelabs Diagnostics (GLD), Science Park Drive, Singapore respectively). The GLD HTLV Blot 2.4 also discriminates the seroreactivity to HTLV-I and HTLV-II and consequently differentiates the type of infection.

*Data analysis* - Frequency distributions were determined for each variable. Age was categorized first in 4 different strata to analyze trends in prevalence rates. Then the best cut point for two age groups for the multivariate analysis was found to be 39 years old. Crude odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) that measured the association of selected variables and HTLV-I infection were calculated from 2x2 tables<sup>18</sup>. Multiple logistic regression models computed adjusted estimates of potential risk behavior to HTLV-I infection. The statistical package STATA was used to perform the different steps of the analysis.

*DNA extraction and PCR amplification.* Genomic DNA was extracted from all sample's PBMCs by SDS/Proteinase K treatment followed by phenol/chloroform extraction or using GFX genomic blood DNA purification kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). In order to confirm the serological results all DNA samples were submitted to nested PCR of the *pol* gene using the primers 12P1/SK111 and 12P5/1P1/2P3 and cycling conditions according described previously.<sup>30</sup> For amplification of the HTLV-I-LTR gene all samples were submitted to nested PCR using in the first round PCR the primers LTR1 (5'CATTCTACTCTCACACGGCCT CATA CAGTACTCTT3') and LTR2 (5'CGCAGTTCAGGAGGCACCAC3'), amplify

a fragment of the 574 bp corresponding to nt 8164-8727 in the HTLV-I ATK1 isolate, followed by a second round PCR using the primers LTRN1 (5'TTGAAGAATACACCAACATCCC3') and LTRN2 (5'GAACGCGACTCAACCGGCGTGGAT3'), amplify a fragment of the 479 bp corresponding to nt 8255-8686 of the HTLV-II ATK1 isolate. The first round reactions were performed in 50 µl reaction mixtures containing 1.5 µg of DNA, 1.75 U of Taq DNA polymerase (Perkin Elmer-Cetus, Norwalk, CT), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM each deoxynucleotide triphosphate and 30 pmol of each primer. PCR cycling conditions consisted of: one cycle at 94°C for 5 min, 25 cycles at 94°C for 1 min, 50°C for 1 min and 72°C for 1 min and one cycle at 72°C for 10 min. Five microliters of the initial amplified product was used in the nested reaction that were performed in 100 µl reaction mixtures. All amplified products were analyzed in a 2% agarose gel electrophoresis followed by ethidium bromide staining.

*Nucleotide sequencing and phylogenetic analysis.* PCR products amplified from the LTR partial region were purified using the Promega (Madison, WI) Wizard PCR prep system and sequenced in a Perkin-Elmer/ABI Prism 377 DNA Stretch Sequencer using Taq FS Dye terminator cycle sequencing. The same PCR inner primers were used in the sequencing reactions. A multiple sequence alignment from the region of the studied samples together with related sequences in the GenBank/EMBL database were done in Dambe program using the Clustal algorithm and further edited in GeneDoc program. The empirical transition:transversion ratio were determined in Puzzle 4.0.2 program. Aligned sequences were used in Phylip v. 3.572<sup>31</sup> to construct neighbor-joining (NJ) and maximum-likelihood (ML) trees using the F84 substitution model. The reliability of the NJ trees were evaluated by analyzing 1,000 bootstrap replicates. The trees were drawn with the TreeView 1.4 program.

*Accession numbers.* The GenBank accession numbers of the HTLV-I fragments sequenced in our laboratory and included in the phylogenetic study are as follows: The sequences were submitted to GenBank. We are waiting for the accession numbers.

The other HTLV-I strains were those described by Mahieux et al. (1997) (pyg19, L76310; Afs911, L72212), Vandamme et al. (1994) (ITIS, Z32527; MT4LB, Z31661), Gessain et al. (1993) (MEL5, L02534), Malik et al. (1988) (HS35, D00294), Miura et al. (1994) (GH78, D23693; CH26, D23690), Gasmi et al. (1994) (Bo, U12804; OD, U12805; Pr52, U12806; Pr144, U12807), Van Dooren et al. (1998) (Ni1.Peru, Y16484; B11.Peru, Y16481; Me1.Peru, Y16478; B13.Peru, Y16483; B12.Peru, Y16482; Qu1.Peru, Y16475; Me3.Peru, Y16480; Qu3.Peru, Y16477; Me2.Peru, Y16479; Ni2.Peru, Y16487; Qu2.Peru, Y16488 and Ni3.Peru, Y16497), Serki et al. (1983) (ATM, J02030), Shirabe et al. (1990) (HCT), Seiki et al. (1993) (ATK1, J02029), Chou et al. (1995), (ATL-YS, U19949), Picard et al. (1995) (BCI2.1, U32557; BCI1.2, U32552), Tsujimoto et al. (1988) (H5, M37299), Dasgupta et al. (1992) (73RM, M81248), Zhao et al. (1993) (MT2, L03562), Josephs et al. (1984) (CR1, K02722), Engelbrecht et al. (TBH1 to -4, L76026, L76025, L76034 and L76028; TBH6 to -7, L76030 and L76029), Bazarbachi et al. (1995) (BOI, L36905), Evangelista et al. (1990) (TSP1, M86840), Ellerbrok et al. (1997) (RKI2-Rum, AF3012; RKI1-Iran, AF3010), Liu et al. (1996) (AMA, X88871; CMC, X88872; MASU, X88877 and MAQS, X88876), Voevodin et al. (1995) (KUW-1, L42253), Voevodin et al. (1997) (Abl.A, U87264).

## RESULTS

The age range of the population was between 1 to 89 years old. Forty two percent (582) of the study sample were males and 58% (803) were females. Overall prevalence of HTLV-I was 1.7% (23/1385) 95% CI: 1.1%-2.5%. Infection rates were

respectively 1.2% and 2.0% for males and females. The prevalence increased substantially after 50 years old and it seemed to be associated with education and income (Table 1). In terms of age/sex specific seroprevalence of HTLV-1, no one was infected between 1-13 years old and no males up to 15 years old were infected. Infection rates ranged from 0 to 1.6% for the ages groups up to 50 years old when it jumped to 6.3% and 9.3% for males and females respectively (Figures 2a, 2b).

Since the prevalence was 2 times greater among females than males, we analyze the data separately and estimated an association of HTLV-I infection with age for both sexes but stronger among females (OR=12.7; 3.8-41.9). Also we estimated an statistically significant odds ratio of 10.7 for the association of infection with years of education less or equal to seven only among females. In terms of income, we estimated an odds ratio of 2.2 for women with a monthly wage up to 2.5 (approximately US\$ 209,7) but the 95% confidence interval was imprecise. No association of infection and income was found among males (Table 2). Multivariate analysis confirmed the stratified data demonstrating an strong association of older ages (40 or older) and HTLV-I specially among females and possible associations of lower social economic status and infection only among females (Table 3).

The phylogenetic analysis showed that 18 isolates from the general population cohort belong to the Transcontinental subgroup American Latin cluster of the Cosmopolitan subtype (Figure. 4) with a low bootstrap value in the Neighbor Joining method but were highly significant when analyzed by Maximum-Likelihood ( $p < 0.01$ ). Furthermore, only one sequence (BA1978) formed a unique cluster inside Cosmopolitan subtype Transcontinental subgroup but outside the Latin American cluster with reasonable bootstrap (66%) and statistically well supported by Maximum-Likelihood ( $p < 0.01$ ).

## DISCUSSION

Most studies of HTLV-I seroprevalence have been carried out in specific population groups in Brazil and elsewhere and extrapolation of results to the general population is of limited ability. In this investigation, we were able to estimate the prevalence of a large sample of individual of all ages from thirty sentinel surveillance areas of Salvador, a much closer representation of the general population of this city. Nevertheless, our estimated prevalence (1.7%) was not much different from the one estimated by the blood bank survey (1.4%) in 1997 but higher.

The age specific seroprevalence of HTLV-I infection presented here confirmed other findings of a linear increase of seroprevalence with increasing age. This association probably reflects the accumulation of exposure to HTLV-I throughout time. In fact, we did not find an infected individual until 13 years old and no males until 15 years old. However, the observed cumulative pattern of a sharp increase after 39 years old suggesting a combination of age, cohort, and period effect.

As in other studies, we found a greater infection rate among females than males. The estimated odds ratio for females as compared to males was in the direction of a positive association but did not reach a level of statistical significance. Nevertheless, we decide to further explore the role of sex in the association of age, education and income with HTLV-I infection. As expected, these associations were much stronger among females. Education and income are generally proxy variables for social economic status and we found adjusted odds ratios of 6.4 for women of less or equal to 7 years of education and 1.9 for women earning up to US\$ 209,7 dollars monthly.

One of the observed patterns of the HIV epidemic in Brazil as well in Bahia is a greater proportion of AIDS cases among those with less education (Figure 3) and is assumed by most that the epidemic is going towards the groups with lower socio

economic status (ref). Our findings might suggest the same patterns for the HTLV-I endemicity specially among women. But this issue needs further research.

If we extrapolate our estimated prevalence to the whole city, we would expected approximately 40,000 infected individuals specially among those of 40 years or older.

With these findings, it is important to discuss population prevention measures. Should routine antenatal screening for pregnant women be implemented ? For HTLV-I+ women can we offer anti-retroviral therapy as for HIV+ ones ? Or we would just create an extra anxiety. Should we implement outpatient clinics for HTLV+ individuals and implement pre and post HTLV-I counseling?

Future studies are necessary to further explain the observed cumulative pattern with a sharp increase after 40 years old. Furthermore, the potential impact of our results should pass through an overall discussion among health professionals in order to implement control measures for this infection.

We have demonstrated that most of the HTLV-I subtypes circulating in Salvador belong to the Cosmopolitan subtype, Transcontinental subgroup, Latin American cluster, when the LTR 420 bp fragments were analyzed as previously demonstrated in Brazilian and Peruvian isolates.<sup>29,32</sup>

Considering the continental extension and the large variety of ethnic groups in Brazil together with our present results, we suggest that multiple HTLV-I introductions took place in this country. Our data shows evidences that in Salvador, a city with a population of Africa background and with the highest HTLV-I prevalence in Brazil, a post-Colombian introduction is highly evident. Further studies considering HTLV-I isolates from different regions and ethnicity are of paramount important to shed more light in the complex issue of origins of this virus in Brazil.

## TABLES AND FIGURES

Table 1: Univariate analysis for HTLV-I<sup>a</sup> infection. Salvador, Brasil 1998

Variables	N	% pos	OR <sup>b</sup>	95% CI <sup>c</sup>
<b>Age</b>				
0-15	408	0.3	1.00	
16-30	453	1.1	4.5	0.7-38.4
31-50	369	1.1	4.4	0.6-39.4
51+	155	8.4	37.3	6.2-259.3
<b>Sex</b>				
Males	582	1.2		
Females	803	2.0	1.7	0.7-4.0
<b>Education</b>				
Greater than 7 years	470	0.64		
Less or equal 7 years	798	2.13	3.4	1.1-11.0
<b>Income</b>				
Greater than 2.5 MW <sup>d</sup>	613	1.1		
Up to 2.5 MW	690	2.0	1.8	0.7-4.3

*a*: Human T Cell Lymphotropic Virus Type I; *b*: odds ratio;  
*c*: confidence interval; *d*: minimum wage: US\$ 209.7



Table 2. Stratified analysis for HTLV-I among males and females. Salvador, Brazil, 1998

Variables	Males		Females		ORadj	95% CI
	OR	95% CI	OR	95% CI		
<b>Age</b>						
1-39	1.0		1.0		1.0	
40+	7.2	1.8-29.2	12.7	3.8-41.9	10.6	4.0-27.9
<b>Education</b>						
Greater than 7 years	1.0		1.0		1.0	
Less or equal 7 years	0.5	0.8-2.6	10.7	1.8-78.4	3.5	1.1-11.6
<b>Income</b>						
Greater than 2.5 MW	1.0		1.0		1.0	
Up to 2.5 MW	1.2	0.2-4.9	2.2	0.7-6.7	1.8	0.7-4.5

Table 3. Logistic regression analysis for the association of HTLV-1 infection with selected variables among males and females. Salvador, Brazil 1998

Variables	Males		Females	
	OR	95% CI	OR	95% CI
<b>Age</b>	4.7	0.6-34.3	15.0	3.3-67.9
<b>Education</b>	0.5	0.1-3.9	6.4	0.8-51.4
<b>Income</b>	1.3	0.2-10.2	1.9	0.5-6.4

Figure 1: Distribution the population in the sentinel surveillance areas of Salvador, 1998

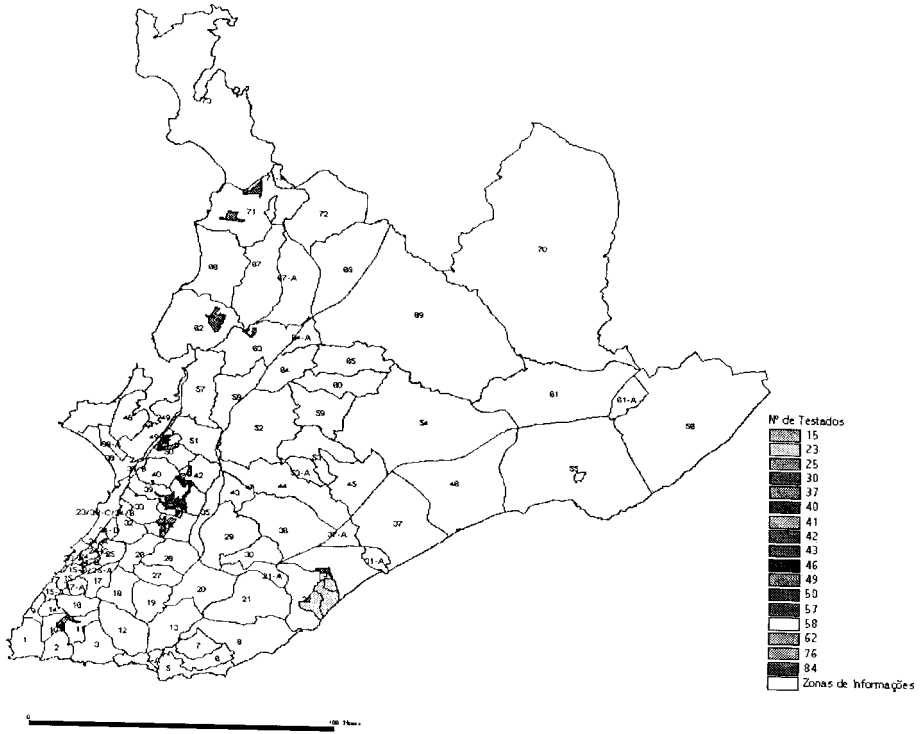


Figure 2a. Seroprevalence of HTLV-I infection among 583 males. Salvador, Bahia, 1998

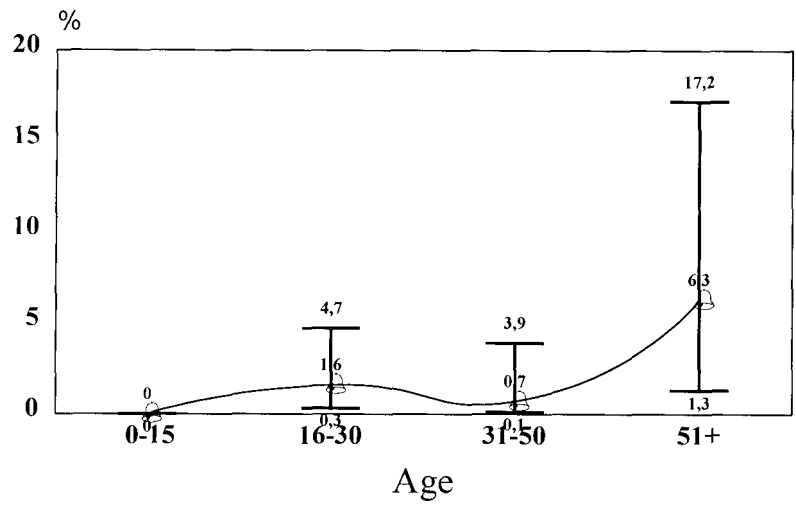


Figure 2b. Seroprevalence of HTLV-I infection among 803 females. Salvador, Bahia, 1998

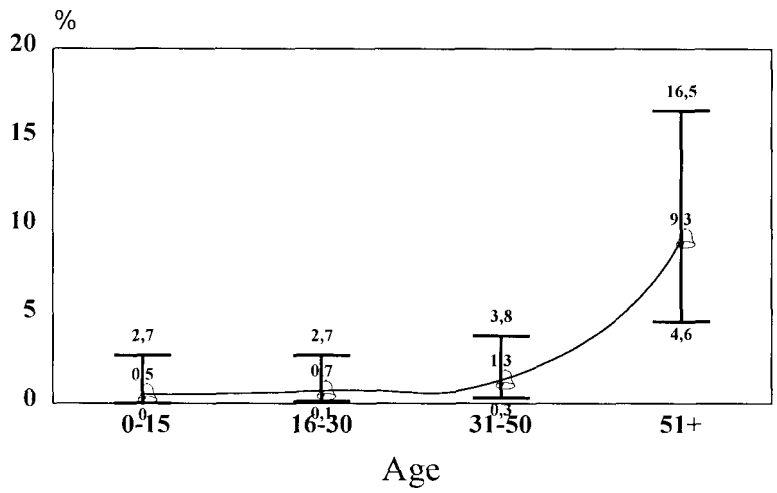
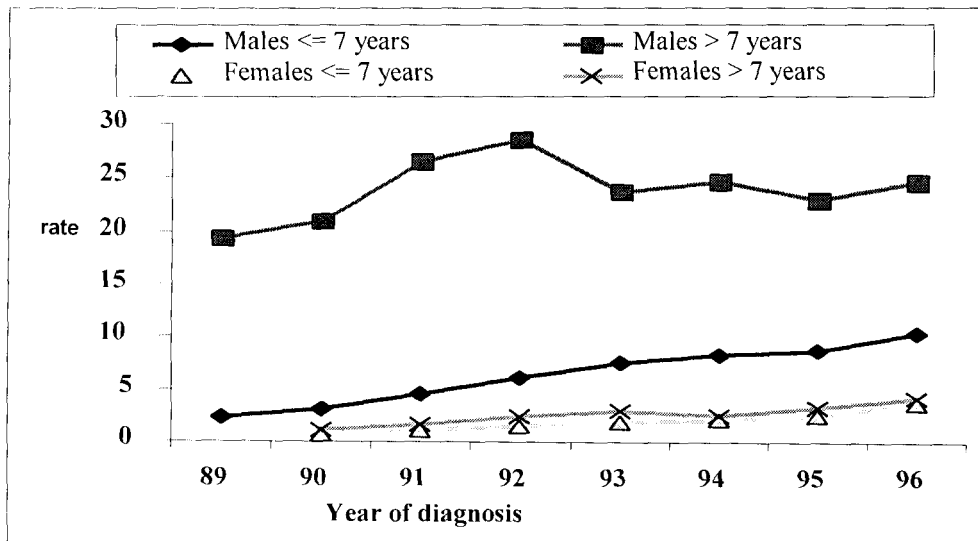
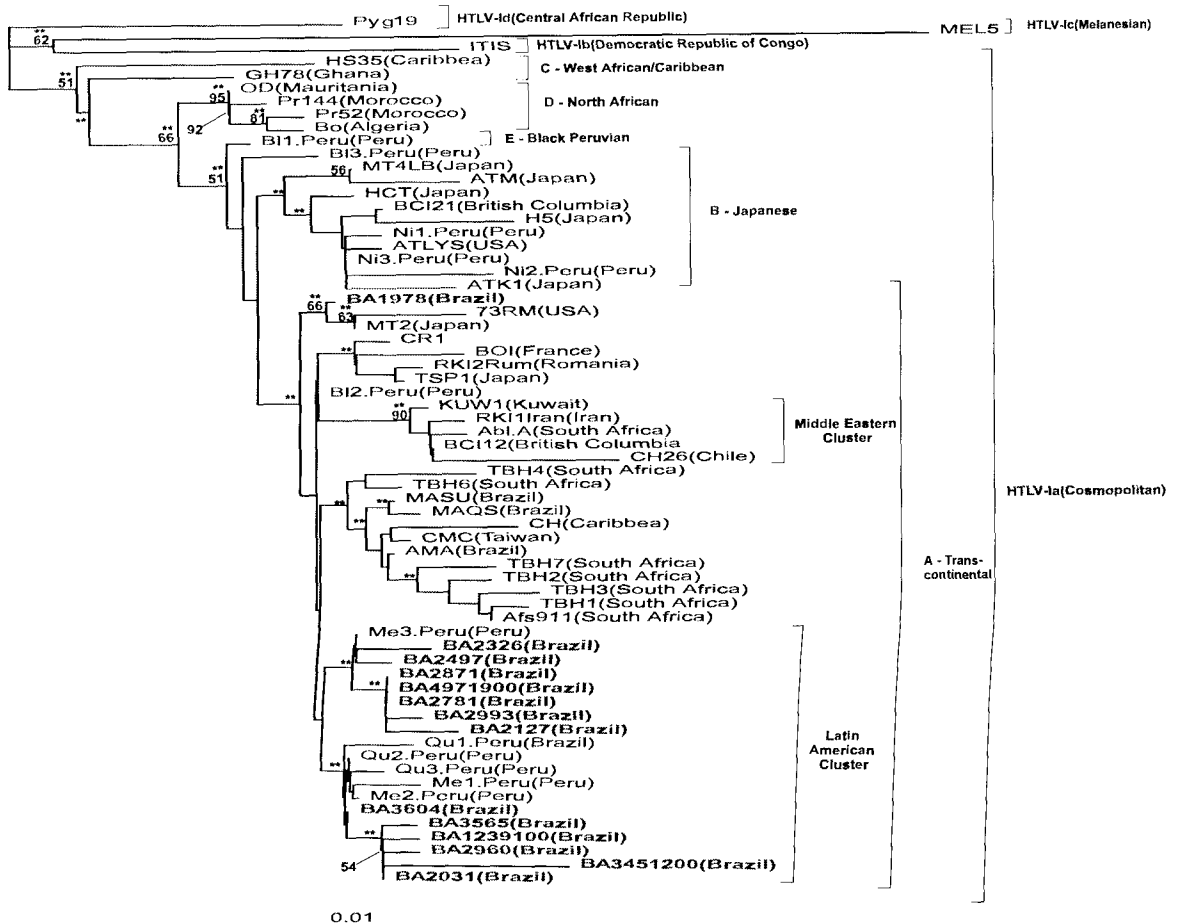


Figure 3: Incidence rate of AIDS ( $\times 10^{-5}$  hab.) among those of 20-69 years old by year of diagnosis Sex and years of education. Northeast Brazil 1989-1996



Adapted from Fonseca MGP et al. AIDS e grau de escolaridade no Brasil: evolução temporal de 1986 a 1996 (AIDS and years of schooling in Brazil: temporal trend 1986-1996). In Brasil: Sobre a epidemia da aids no Brasil: distintas abordagens. MS, 1999



**Figure 4.** Rooted NJ tree of 19 HTLV-I strains based upon a 420 bp fragment of the LTR region. The bootstrap values (above 50% and using 1000 bootstrap samples) on the branches represent the percentage of trees for which the sequences at one end of the branch form a monophyletic group. Mel5, ITIS and *pyg19* are used as outgroups. Geographical origin and ethnic origin are given in italics between parentheses. Newly sequenced LTRs included in this analysis are the following Salvador population isolates. Only 14 isolates were included in this tree. The other ones with identical sequences are demonstrated in italics below: **BA2031** = *BA3229*, *BA3525*, *BA2746* and *BA2567*; **BA2497** = *BA3076200*. The \*\* means that the ML method was highly significant with a P value < 0.01.

## REFERENCES

---

- <sup>1</sup> Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC 1980. Detection and isolation of type-C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Nat Acad Sci* 77: 7415-7419.
- <sup>2</sup> HTLV European Research Network 1996. The sero-epidemiology of human T-cell leukaemia/lymphoma viruses in Europe. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrov* 12: 1-10.
- <sup>3</sup> Edlich R, Arnette JÁ, Williams FM. Global epidemic of Human T Cell Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1). *The Journal of Emergency Medicine* 2000;18(1):109-119.
- <sup>4</sup> Andrade-Serpa et al. Seroepidemiological survey for antibodies to human retroviruses in human and non-human primates in Brazil. *Int J Cancer* 1984;44:389-393.
- <sup>5</sup> Kitagawa et al. Antibodies to HTLV-I in Japanese immigrants in Brazil. *JAMA* 1986;256:2342.
- <sup>6</sup> Galvão-Castro B, Loures L, Rodrigues L, Sereno A, Ferreira Jr OC, Franco LGP, Muller M, Sampaio DA, Santana A, Passos LM, Proietti F. Distribution of Human T-cell Lymphotropic Virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. *Transfusion* 1997;37: 42.

- 
- <sup>7</sup> Andrade TM, Dourado I, Galvão-Castro B 1998. Associations among HTLV-I, HTLV-II and HIV in injecting drug users in Salvador, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrov* 18: 186-187.
- <sup>8</sup> Dourado I, Andrade T, Galvão-Castro B 1998. Human T cell Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV- I) in Northeast Brazil: Differences for male and female injecting drug users. *J Acquir Immune Defic Syndr and Hum Retrov* 1998;19(4):426-429.
- <sup>9</sup> Dourado I, Andrade T, Carpenter CL, Galvão-Castro B. Risk factors for Human T cell Lymphotropic Virus Type 1 among injecting drug users in Northeast Brazil: Possibly greater efficiency of male to female transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94(1):13-18.
- <sup>10</sup> HTLV-I infection among pregnant women in Salvador, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr and Hum Retrov* (in press).
- <sup>11</sup> Castro-Costa et al. Brazilian studies on tropical spastic paraparesis: a meta-analysis. *Arq Neuropsiquiatr* 1994;52:585-591.
- <sup>12</sup> Araújo et al. HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in Brazil: a nationwide survey. *J Acquir Immune Defic Syndr and Hum Retrov* 1998; 19:536-541.
- <sup>13</sup> Pombo de Oliveira et al. T-cell malignancies in Brazil: clinical-pathological and molecular studies of HTLV-I positive and negative cases. *Int J Cancer* 1995;60:823-827.

---

<sup>14</sup> Schaer-Barbosa et al. Adult T-cell leukemia/lymphoma in Northeastern Brazil: a clinical, histopathological and molecular study

<sup>15</sup> Barreto et al. Health Impact Evaluation of the Sanitation Program in Salvador, Bahia, Brazil. 1996

<sup>16</sup> Cochran, 1977

<sup>17</sup> Censo Demográfico. Fundação IBGE. Rio de Janeiro, Brazil: Censo demográfico, 1996.

<sup>18</sup> Kleinbaum DG, Kupper LL and Morgenstern H. Epidemiologic research: principles and quantitative methods. New York: Van Nostrand Reinhold Company, 1982

<sup>19</sup> Mueller N., Okayama A, Stuver S and Tachibana N. Findings from the Miyazaki Cohort Study. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*. 13:S2-S7. 1996.

<sup>20</sup> Miura T., Fukunaga T and Igarashi T. Phylogenetic subtypes of human T-lymphotropic virus type I and their relations to the anthropological background. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*. 91:1124-1127. 1994.

<sup>21</sup> Hahn BH, Shaw GM, Popovic M, Lo-Monico A, Gallo RC and Staal-Wong 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. *International Journal of Cancer*.34(5):613-618. 1984.

<sup>22</sup> Gessain A, Boeri E, Yanagihara R, Gallo RC and Francini G. Complete nucleotide sequence of a highly divergent human T-cell leukemia (lymphotropic) virus type I (HTLV-I) variant from Melanesia: genetic and phylogenetic relationship to HTLV-I strains from other geographical regions. *Journal of Virology*. 67:1015-1023. 1993.

<sup>23</sup> Chen J, Zekeng L, Yamashita M, Takeisha J, Miura T, Ido E, Mboudjeka I, Tsague JM, Hayami M and Kaptue L. HTLV isolated from a Pygmy in Cameroon is related but distinct from the known Central African type. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 11:1529-1531. 1995.

<sup>24</sup> Mboudjeka I, Zekeng L, Yamashita M, Takehisa J, Ido E, Miura T, Ohkura S, Ikeda M, Kaptue L and Hayami M. Prevalence and phylogenetic analysis of HTLV-I isolates in Cameroon, including those of the Baka Pygmy. *Jpn J Cancer Res*. 88, 619-624. 1997.

<sup>25</sup> Salemi M., Van Dooren S, Audenaert E, Delaporte E, Goubau P, Desmyter J and Vandamme A-M. Two new human T-lymphotropic virus type I phylogenetic subtypes in seroindeterminates, a Mbuti pygmy and a Gabonese, have closes relatives among African STLV-I strains. *Virology*. 246:277-287. 1998.

<sup>26</sup> Gasmi M., Farouqi B, d'Incan M, Desgranges C. Long terminal repeat sequence analysis of HTLV type 1 molecular variants identified in four north African patients. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 10:1313-15. 1994.

- 
- <sup>27</sup> Vidal AU, Gessain A, Yoshida M, Tekaiia F, Garin B, Guillermain B, Schuls T, Farid R and De The G. Phylogenetic classification of human T cell leukaemia/lymphoma virus type I genotypes in five major molecular and geographical subtypes. *Journal of General Virology*. 75:3655-66. 1994.
- <sup>28</sup> Yamashita M, Veronesi R, Menna-Barreto M, Harrington WJ Jr, Sampio C, Brites C, Badaro R, Andrade-Filho AS, Okhura S, Igarashi T, Miura T, Chamone D, Bianchini O, Jardim C, Sonoda S and Hayami M. Molecular epidemiology of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) Brazil: the predominant HTLV-1s in South America differ from HTLV-1s of Japan and Africa, as well as those of Japanese immigrants and their relatives in Brazil. *Virology*, 261:59-69. 1999.
- <sup>29</sup> Vallejo A and Garcia-Saiz A. Isolation and nucleotide sequence analysis of human T-cell lymphotropic virus type II in Spain. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 7:517-519. 1994.
- <sup>30</sup> Felsenstein J. PHYLIP (Phylogeny Inference Package), V.3.572. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle. 1989.
- <sup>31</sup> Van Dooren S, Gotuzzo E, Salemi M, Watts D, Audenaert E, Duwe S, Ellerbrok H, Grassmann R, Desmyter J and Vandamme A-M. Evidence for a Post-Colombian introduction of human T-cell lymphotropic virus in Latin America. *Journal of General Virology*. 79:2695-2708. 1998.

## Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Infection Among Pregnant Women in Northeastern Brazil

\*Achiléa L. Bittencourt, †Inês Dourado, ‡Pedro Bastos Filho, ‡Magnólia Santos,  
§Eliane Valadão, ¶Luis Carlos Junior Alcantara, and ¶Bernardo Galvão-Castro

*\*Department of Pathology and †Instituto de Saúde Coletiva, School of Medicine, Federal University of Bahia, ‡Institute of Perinatology of Bahia (IPERBA), §State Public Health Laboratory of Bahia (LACEN), and ¶Oswaldo Cruz Foundation, Gonçalo Moniz Research Center (LASP), Bahia, Brazil*

---

**Summary:** An evaluation of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) infection among 6754 pregnant women in Salvador, Bahia, Brazil using enzyme-linked immunosorbent assay, Western blot analysis, and polymerase chain reaction assay found a rate of infection of 0.84% (57 of 6754 women). Epidemiologic and obstetric data on the HTLV-1-positive pregnant women were analyzed and compared with data on a control group of HTLV-1-negative pregnant women. The mean age of the HTLV-1-positive women was 26.2 years. All were seronegative for HIV and syphilis, and only 2 reported a past history of sexually transmitted infection and more than 10 sexual partners. Of the HTLV-1-positive women, 88.5% were breast-fed, 4% were bottle fed, and 7.5% did not know. Six women had received blood transfusions, and only 1 reported intravenous drug use. Fifty-two HTLV-1-positive women could be followed: 45 had full-term deliveries, 5 had premature deliveries, and 2 had abortions. Our results indicate that (1) the frequency of HTLV-1 infection among pregnant women is relatively high in Salvador, Bahia, Brazil; (2) maternal infection was probably acquired more frequently through breast-feeding, but the sexual route was certainly the second most important means of transmission; (3) HTLV-1-positive women had a history of eczema-like infections in childhood more frequently than the control group; (4) HTLV-1 infection did not interfere in the course of pregnancy; and (5) no associated congenital infections were observed in the HTLV-1-positive women. **Key Words:** Clinical epidemiologic findings of HTLV-1—HTLV-1-associated infective dermatitis—HTLV-1 transmission—Obstetric aspects of HTLV-1 infection.

---

Surveys performed in several Brazilian cities among blood donors showed the highest prevalence rates of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) infection in Salvador, Bahia (1.35%) (1). The occurrence of diseases associated with the vertical transmission of HTLV-1 in Salvador such as adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) and infective dermatitis associated with HTLV-1 infection suggests that this route of transmis-

sion may be important in this city (2,3). A recent study that included exclusively lymphoma cases from Bahia demonstrated that 33.3% of the T-cell lymphomas were associated with HTLV-1 infection (4). Furthermore, since September 1997, 18 cases of infective dermatitis associated with HTLV-1 have already been observed in Salvador (Bittencourt A.L., unpublished data).

Considering the importance of vertical transmission as a main route of HTLV-1 infection (5), we decided to evaluate the frequency of this infection among pregnant women in a prenatal care unit in Salvador at which women of low social class are attended. In addition, the clinical, epidemiologic, and obstetric data of the carrier mothers were analyzed, and the epidemiologic data were

---

Address correspondence and reprint requests to Achiléa Lisboa Bittencourt, Serviço de Anatomia Patológica, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Rua João da Botas s/n, CEP 40110-060, Salvador, Bahia, Brazil; e-mail: achilea@uof.com.br

Manuscript received June 6, 2000; accepted February 2, 2001.

compared with data on a control group of HTLV-1-seronegative pregnant women.

## METHODS

### Study Population

A total of 6754 pregnant women who attended the prenatal care unit of a state maternity hospital (IPERBA) in the city of Salvador (the capital of Bahia) were selected between January 1996 and September 1998 for the HTLV-1/II seroprevalence study. All women who attended the maternity hospital for their first prenatal care visit were invited to participate in the study. During the data collection years 10,809 women attended the prenatal care unit, and 62.5% of them were included in the study. IPERBA attends women of low social economic status. Salvador has a population of 2,274,150 inhabitants, of whom roughly 80% are black or racially mixed. A control group was selected between July and September 1998 for a case-control analysis. Among the daily-screened patients, 2 controls were randomly selected for each HTLV-1-positive mother. Clinical, obstetric, and epidemiologic data were collected for 53 HTLV-1-positive women and 122 HTLV-1/II-negative pregnant controls. Mothers and partners of the HTLV-1 carrier pregnant women who were present at the visit were asked to be screened serologically for this virus. The newborns were classified by gestational age and weight according to Battaglia and Lubchenco (6). Informed consent was obtained from the participants.

### Serologic Testing

All sera were screened for the presence of antibodies against HTLV-1/II by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (rp21e-enhanced enzyme immunoassay; Cambridge Biotech Corporation, Worcester, MA, U.S.A.). Repeated reactive samples were then submitted for serologic confirmation and discrimination between HTLV-1 and HTLV-II using Western blot analysis (HTLV Blot 2.4; Genelabs, Singapore). Western blot results were interpreted according to the manufacturer's instructions as follows: (1) HTLV-1-positive reactivity to GAG p19 with or without p24 and two ENV (GD21 and rgp 46-I); (2) HTLV-II-positive reactivity to GAG p24 with or without p19 and two ENV (GD21 and rgp46-II0); (3) HTLV-positive reactivity to GAG p19 and p24 and ENV GD21; (4) indeterminate reactivity to HTLV specific bands detected but did not meet the criteria for HTLV-1, HTLV-II, or HTLV seropositivity; and (5) HTLV-negative reactivity to HTLV specific bands. In all seropositive women, the tests were repeated in a second sample obtained on another day. Serologic screening for HTLV-1 was also performed in 10 mothers of the HTLV-1-positive pregnant women. Sera were also screened for *Treponema pallidum* antibodies and evaluated by serum reactivity to nontreponemal cardiolipin antigen by the Venereal Disease Research Laboratory (test) (Laborclin, Paraná, Brazil), and *Trypanosoma cruzi* antibodies were evaluated by a passive hemagglutination test (Biolab, Rio de Janeiro, Brazil). *Toxoplasma gondii* antibodies (IgG and IgM), HIV-1/HIV-2 antibodies, rubella virus antibodies (IgG and IgM), cytomegalovirus (CMV) antibodies (IgG and IgM), hepatitis C virus antibodies, hepatitis B core antibodies, and hepatitis B surface antigen were detected by ELISA (Roche, Basel, Switzerland).

### Polymerase Chain Reaction in Peripheral Blood Mononuclear Cells

Polymerase chain reaction (PCR) analyses were performed in the serologically indeterminate pregnant women and in 35 serologically

HTLV-1-positive pregnant women. Genomic DNA was extracted from samples of peripheral mononuclear cells by sodium dodecyl sulfate/proteinase K treatment followed by phenol/chloroform extraction. Nested PCR was performed targeting the pol region of the HTLV. One microgram of genomic DNA was used to amplify a fragment of 398 base pairs (bp) in the pol gene with the following primers: 12P1 (5'GCCTTCATGTATGGGTAGAACACTT3') and SK111 (5'GTG-GTGGATTGCCATCGGGTTT3') corresponding to nt 4525-4549 and nt 4899-4922, respectively. A second round was carried out using the nested primers 12P5 (5'TGGTTGATGTCCATAGGGCT3'), 1P1 (5'AGCCATCTCAGCTACCCAAAAGAGA3'), and 2P3 (5'CGCAT-CAAGCATTCTACCCA3') corresponding to nt 4853-4873 for HTLV-1/II, nt 4556-4580 for HTLV-1, and nt 4711-4730 for HTLV-II, respectively. The inner primers amplify a fragment of 318 bp for HTLV-1 and 161 bp for HTLV-II. Reactions were performed in reaction mixtures containing 1.5 µg of DNA, 2.5 U of Taq DNA polymerase (Perkin Elmer-Cetus, Norwalk, CT, U.S.A.), 50 mmol of KCl, 10 mmol of Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mmol of MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mmol of each deoxynucleotide triphosphate, and 10 pmol of each primer. PCR cycling conditions used were the same described previously (7). The amplified products were analyzed by 3% agarose gel electrophoresis followed by ethidium bromide staining.

### Histopathologic Findings

The placentas and adnexa of the seropositive mothers were fixed in buffered formal. Sections of paraffin-embedded tissue were stained by hematoxylin-eosin. Autopsy was performed on the aborted fetuses.

### Data Analysis

Frequency distributions were determined for each variable, including the mean and SD for continuous variables. Crude odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CI) measuring the association of selected variables and HTLV-1 infection were calculated from 2 × 2 tables (8).

## RESULTS

Sixty-one samples were repeatedly reactive by ELISA. When analyzed by Western blot, these samples yielded the following results: 53 (0.78%) were seropositive for HTLV-1, 2 (0.03%) were seropositive for HTLV-II, and 6 (0.08%) were indeterminate. The PCR analysis of these samples showed that 4 were positive and 2 were negative. Thus, the overall prevalence of HTLV-1 carrier mothers was 0.84%. Thirty-five (67.3%) serologically positive women for HTLV-1 were also positive by PCR.

From the 57 HTLV-1 carrier women, 5 (8.4%) could not be contacted and were excluded from the case-control analysis. All the HTLV-1 carrier mothers except 2 were from the State of Bahia, and 59% were from Salvador. Of the HTLV-1-positive women, 71.7% were black or mulatto, and the mean age was 26.2 years. Only 2 reported a past history of sexually transmitted infections. Forty-six (88.5%) reported being breast-fed as a baby, 2 (4.0%) were not breast-fed, and 4 (7.5%) did not

TABLE 1. Univariate analysis for HTLV-1-positive and HTLV-1-negative pregnant women in Salvador, Bahia, Brazil

Variable	HTLV-positive (%)	HTLV-negative (%)	Odds ratio	95% confidence interval
Age (years)*				
14-20	13.4	22.9	1.00	—
21-30	59.6	54.9	1.85	0.68-5.24
31-42	26.9	22.1	2.07	0.65-6.78
Total (N)	52	122		
Literacy				
Illiterate	69.2	56.7	1.72	0.86-3.43
Literate	30.8	43.3	—	—
Total (N)	52	120		
Marital status				
Married	49.0	31.9	2.21	1.14-4.32
Single	51.0	68.0	—	—
Total (N)	51	122		
Income**				
<1 mw-1 mw	41.2	24.6	3.27	1.04-10.64
2 mw-5 mw	47.1	52.5	1.75	0.59-5.39
+5 mw	11.8	23.0	1.00	—
Total (N)	51	122		
Age at first sexual encounter (years)				
11-15	30.8	24.2	1.39	0.64-3.05
16-20+	69.2	75.8	—	—
Total (N)	52	120		
Number of lifetime sexual partners				
>2	50.0	27.8	2.58	1.32-5.07
1-2	50.0	72.1	—	—
Total (N)	52	122		
Reported eczema-like lesion				
Yes	15.6	0.85	21.4	2.54-179.3
No	84.4	99.2	—	—
Total (N)	45	117		
History of blood transfusion				
Yes	11.5	3.3	3.85	1.03-14.3
No	88.5	96.7	—	—
Total (N)	52	122		

\*  $p = .19$  ( $\chi^2$  for linear trend).\*\*  $p = .016$  ( $\chi^2$  for linear trend).

HTLV, human T-cell lymphotropic virus; mw, minimum wage (=R\$60).

know. Six had received blood transfusions, and 1 was an intravenous drug user (IDU). Ninety percent of the women had 1 to 4 sexual partners, and only 2 had more than 10 sexual partners. Only 10 mothers and 5 partners of the HTLV-1-positive pregnant women agreed to serologic screening for this virus. Six mothers (60%) were seropositive, and all the partners were seronegative. The pregnant women whose mothers were seronegative (4) had no history of blood transfusions or use of intravenous drugs. Aside from 1 patient with ATL, none of the other pregnant women had symptoms of HTLV-1-associated diseases. Two women presented with symptoms of sickle-cell anemia, and 1 had hypertension during gestation.

All the 57 HTLV-1-positive women were serologically negative for syphilis and HIV. Only 1 demonstrated antibodies against *T. cruzi* (1.7%). Aside from 1 woman, all the others were screened for toxoplasmosis, rubella,

CMV infection and hepatitis B and C. IgG antibodies against toxoplasma, CMV, and rubella were found, respectively, in 62.5%, 84%, and 71.4% of the screened women, but no IgM antibodies against these agents were observed. There was no serologic evidence of hepatitis B or hepatitis C.

Fifty-two HTLV-1-positive women were followed: 45 had full-term deliveries, 5 experienced preterm deliveries, and 2 had abortions. Of the 45 full-term newborns, 42 were adequate to gestational age and 3 were small for date. Three of the preterm births were stillbirths beyond 30 weeks of gestation. The fetal deaths were caused by complications of sickle-cell anemia and hypertension. The 2 preterm newborns had attained 35 and 36 weeks of intrauterine age. One abortion at 6 weeks of gestation was spontaneous, and the other, at 12 weeks of gestation, was therapeutic. The mother had ATL and had to be treated with chemotherapy and interferon- $\gamma$ .

The histopathologic study of 42 placentas of the carrier women showed mild and focal chronic villitis in 12%. Furthermore, ascending infection was not seen in any of these placentas. Autopsy performed in the 2 aborted fetuses showed no evidence of infection.

### Case-Control Analysis

The mean age at enrollment and age at first intercourse were 27.4 years (SD:  $\pm 6.11$ ) and 17.8 years (SD:  $\pm 3.60$ ), respectively, for the seropositive women and 25.6 years (SD:  $\pm 5.77$ ) and 18.1 years (SD  $\pm 3.58$ ), respectively, for the controls. These differences were not statistically significant. Most (70%) seropositive women and controls were black or mulatto. Table 1 presents a univariate analysis for the association of HTLV-1 infection with demographic, social, and biologic variables. A greater proportion of seropositive women than controls were married, had less income ( $<1$  minimum wage–1 minimum wage), had more than 2 lifetime sexual partners, and had a history of blood transfusion (OR = 2.21; CI: 1.14–4.32), (OR = 3.27; CI: 1.04–10.64), (OR = 2.58; CI: 1.32–5.07), (OR = 3.85; CI: 1.03–14.34), respectively. The risk of infection did not vary much as age increased. The OR for the association of HTLV and age was 2-fold greater for those women 21 to 30 years old and 31 to 42 years old compared with the younger group (14–20 years old). This association was not statistically significant, however. There was a statistically significant positive trend in the ORs as income decreased ( $p = .016$ ). The ORs for all the other variables in the tables were in the direction of a positive association with HTLV-1 infection, but the CIs were wide and not precise.

### DISCUSSION

The prevalence of HTLV-1 carriers among pregnant women in the current study was relatively high (0.84%), and only 2 cases of HTLV-II infection were found (0.03%). The prevalence of HTLV-1 infection is similar to that found by Santos et al. (9), who evaluated 1024 pregnant women in Salvador (0.88%). It was lower than the prevalence of HTLV-1 found among blood donors in that city (1.34%) (1), however, which can possibly be explained by the lower age of our study population. It is known that the prevalence of HTLV-1 infection increases with age (5,10). The OR for the association between HTLV and age was greater for older women compared with the younger age group. Even though it is not statistically significant, this association probably reflects the accumulation of exposure to HTLV-1 through time (11).

The epidemiologic data of the carrier mothers suggest that the vertical route was certainly the most frequent mode of HTLV-1 transmission. A total of 88.5% of the women gave information that they were breast-fed, and few women had received blood transfusions or had more than 10 partners during their lives. Half of the carrier women referred to only 1 or 2 partners. In addition, serologic screening of these women did not demonstrate sexually acquired infections such as HIV infection, syphilis, and hepatitis B. Nevertheless, sexual transmission may have occurred in some of the carrier women. Four mothers of 10 pregnant women who were submitted to serologic screening for HTLV-1 were seronegative, demonstrating that HTLV-1 transmission had also occurred by the sexual route (these pregnant women had received no blood transfusions and were not IDUs). Furthermore, it was observed that a higher proportion of the seropositive women than the controls reported having more than 2 partners and a sexual life initiated at an age ranging from 11 to 15 years old. We cannot rule out blood as a possible source of infection among a few patients with a history of transfusion.

The only IDU observed in this study was HTLV-1–positive. Unlike findings in the United States and Europe, in Bahia as well as in São Paulo, HTLV-1 infection is more prevalent than HTLV-II infection among IDUs (12,13).

It is interesting to point out that 15% of the seropositive women had a past history of eczema-like lesions in childhood, which was probably HTLV-1–associated infective dermatitis, a condition associated with vertically acquired infection (3). Contrasting with these data, only 0.8% of the seronegative pregnant women inferred the same past history. This observation indicates that HTLV-1 is certainly an important cause of childhood dermatitis in Salvador.

With the exception of the case of ATL, no clinical manifestations associated with HTLV infection were observed in the carrier pregnant women. HTLV-1 infection did not interfere with the course of pregnancy. The three perinatal deaths observed were caused by hypertension and sickle cell anemia, which are conditions not associated with HTLV-1 infection. Six percent of the full-term births resulted in small-for-date babies without other abnormalities, but this frequency is not higher than that observed in the literature (14).

There is a great deal of evidence that HTLV-1 carriers present a significant alteration of the immune function, with an increased risk for acute and chronic infections by several pathogens. An increased prevalence of strongyloidiasis, leprosy, mycosis, and tuberculosis has been referred to in the literature (15). For this reason and

through serologic testing, we evaluated in the carrier pregnant women the occurrence of infections that may be transmitted transplacentally, but the results were negative for syphilis, hepatitis B and C, and HIV infection. In addition, none of the mothers screened presented serologic evidence of acute rubella, acute toxoplasmosis, or acute CMV infection. The frequency of positivity for IgG antibodies against rubella virus, CMV, toxoplasma, and Chagas' disease (1.7%) was similar to or lower than the frequency referred to in other serologic investigations among pregnant women in Brazil (9,16). A mild and focal villitis of unknown origin was observed in 12% of the placentas studied, but the frequency of villitis of unknown origin in normal-term placentas varies from 6% to 34% (17). No case of ascending infection was observed in the placentas studied. These data suggest that HTLV-1-positive pregnant women are no more susceptible to infections than other pregnant women.

The prevalence of 0.84% of HTLV-1 infection among pregnant women indicates the necessity of serologic screening for this infection as part of the prenatal care services offered in Salvador so as to advise the carrier mothers to refrain from breast-feeding. Considering that most of these carrier mothers are of low social status, it is necessary to provide an alternative nutritional supply to their offspring.

**Acknowledgments:** The authors thank Dr. Rosalvo Paradella for operational support, Dr. James Cadidé for obstetric assistance, Drs. Geruza Moraes, Maria Alice Zariffe, and Yara Viana Santana of the Laboratório Central de Referência do Estado da Bahia (LACEN) for laboratory assistance, and the Director of the Bahia Department of Health, Dr. José Maria Magalhães Netto, for supplying the kits for the serologic tests.

This work was partially supported by a grant of Superintendência de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Bahia (CADCT) and by the Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq).

## REFERENCES

- Galvão-Castro B, Loures L, Rodrigues LG, et al. Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. *Transfusion* 1997;37:242.
- Sugiyama H, Doi H, Yamaguchi K, Tsuji Y, Hino S. Significance of postnatal mother-to-child transmission of human T-lymphotropic virus type-I on the development of adult T-cell leukemia/lymphoma. *J Med Virol* 1986;20:253-60.
- La Grenade L. HTLV-1-associated infective dermatitis: past, present, and future. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1996;13 (Suppl 1): S42-9.
- Barbosa HS, Bittencourt AL, Pereira Filho C, et al. Adult T-cell leukemia/lymphoma in Northeastern Brazil: a clinical, histopathologic, and molecular study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999; 21:65-71.
- Hino S, Katamine S, Miyata H, Tsuji Y, Yamabe T, Miyamoto T. Primary prevention of HTLV-1 in Japan. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1996;13(Suppl 1):S199-203.
- Battaglia FC, Lubchenco LO. A practical classification of newborn infants by weight and gestational age. *J Pediatr* 1967;71:159-63.
- Vallejo A, Garcia-Saiz 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;51:9-18.
- Fleiss JL. *Statistical methods for rates and proportions*. John Wiley and Sons, New York, 1981.
- Santos II, Lopes MAA, Delêge-Vasconcelos E, et al. Seroprevalence of HIV, HTLV-1/II and other perinatally transmitted pathogens in Salvador, Bahia. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1995;37: 149-51.
- Ueda K, Kusuhara K, Tokugawa K, et al. Mother-to-child transmission of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-1): an extended follow-up study on children between 18 and 22-24 years old in Okinawa, Japan. *Int J Cancer* 1993;53:597-600.
- Tortevoye P, Tuppin P, Peneau C, et al. Decrease of human T-cell lymphotropic virus type I prevalence and low incidence among pregnant women from a high endemic ethnic group in French Guiana. *Int J Cancer* 2000;87:534-8.
- Araujo AC, Casseb JS, Neitzert E, et al. HTLV-1 and HTLV-II infections among HIV-1 seropositive patients in São Paulo, Brazil. *Eur J Epidemiol* 1994;10:165-71.
- Dourado I, Andrade TM, Carpenter CL, et al. Risk factors for human T cell lymphotropic virus type I among injecting drug users in Northeast Brazil: possible greater efficiency of male to female transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94:13-8.
- Manning FA, Hohler C. Intrauterine growth retardation: diagnosis, prognostication, and management based on ultrasound methods. In Fleischer AC, Romero R, Manning FA, et al., eds. *The principles and practice of ultrasonography in obstetrics and gynecology*. Philadelphia: Appleton and Lange, 1991:331-47.
- Marsh BJ. Infectious complications of human T cell leukemia/lymphoma virus type I infection. *Clin Infect Dis* 1996;23: 138-45.
- Pannuti CS, Vilas-Boas LS, Angelo MJ, et al. Congenital cytomegalovirus infection. Occurrence in two socioeconomically distinct populations of a developing country. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1985;27:105-7.
- Benirschke K, Kaufmann P. *Pathology of the human placenta*. New York: Springer-Verlag, 1995.

## Manuscrito n° 3

### **Polymorphism study of the human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) in Salvador-Bahia, the city with the highest prevalence in Brazil.**

Authors: Luiz Carlos Jr. Alcantara,<sup>1,2</sup> Fred Luciano Neves Santos,<sup>1</sup> Sonia Van Dooren,<sup>3</sup> Marilda Souza Gonçalves,<sup>4</sup> Simone Kashima,<sup>5</sup> Maria Cristina Ramos Costa,<sup>5</sup> Nice Shindo,<sup>1</sup> Achilea Bittencourt,<sup>6</sup> Dimas Tadeu Covas,<sup>5</sup> I. Dourado,<sup>6</sup> A.A. Filho,<sup>6</sup> Anne-Mieke Vandamme<sup>3</sup> and Bernardo Galvão-Castro<sup>1,2,\*</sup>

*Author's affiliation:* <sup>1</sup>Advanced Public Health Laboratory, Gonçalves Moniz Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Bahia, Brazil; <sup>2</sup>Bahia School of Medicine and Public Health/Foundation for Development of Science, Salvador, Bahia, Brazil; <sup>3</sup>Rega Institute, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium; <sup>4</sup>Pathology and Molecular Biology Laboratory, Gonçalves Moniz Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Bahia, <sup>5</sup>Brazil Blood Center of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil; <sup>6</sup>Federal University from Bahia, Salvador, Bahia, Brazil.

Few studies have analyzed the genetic diversity of HTLV-I in Brazil and so far all the studied isolates have been identified as belonging to the Cosmopolitan subtype. Salvador in Bahia State shows sociodemographic characteristics similar to some African cities and presents the highest HTLV-I prevalence rate (1.35%) of the country. To investigate the circulating HTLV-I strains in Salvador, we have studied 82 isolates (asymptomatic: 15 HAM/TSP patients' relatives, 21 pregnant women, 16 IDUs and 19 samples from the general population and symptomatic: 11 HAM/TSP patients). Phylogenetic analysis from part of the LTR fragments showed that most of the samples under this study belong to the Latin American cluster of the Transcontinental subgroup. However, one of them clusters outside of this subgroup with reasonable bootstrap support (neighbor joining) and statistical significance (maximum likelihood), but the total LTR sequence of this isolate demonstrated the it belongs to the Japanese subgroup. We also characterized the  $\beta$ -globin haplotype in 34 of these infected individuals and all haplotype were atypical. A total of 20



chromosomes were characterized as Central African Republic (CAR) haplotype (29.4%), 31 (45.6%) Benin (BEN) and 17 (25%) Senegal (SEN). Five patients were determined to be genotype CAR/CAR (14.7%), ten BEN/BEN (29,4%), nine CAR/BEN (26.5%), two BEN/SEN (5.9%), seven SEN/SEN (20.6%) and one CAR/SEN/ (2.9%). In summary, the  $\beta$ -globin haplotype distribution of these individuals is unusual in comparison with those described in the other Brazilian states. The occurrence of the CAR haplotype in these patients suggests that Bahia also received slaves from the South Africa in the Atlantic slave trade. In addition, in agreement to previous studies, our results support the hypothesis of multiple post-Colombian introductions of African HTLV-Ia strains in South America. Therefore the identification of a sample closely related to Japanese strains suggests a separate and rather recent transmission of a Japanese HTLV-I lineage into Salvador.

## **Introduction**

HTLV-I infection is endemic in different geographic regions of the world such as Japan, Australia, Central and West African countries and in South America (Mueller, 1996). So far six genetic subtypes have been proposed in the phylogenetic classification of this virus: Ia, Cosmopolitan, spread into different geographic regions of the world (Miura *et al.*, 1994); Ib, Central African (Hahn *et al.*, 1984); Ic, Melanesian, a divergent strain isolated in Papua New Guinea and Australia (Gessain *et al.*, 1993); Id, isolated from Central African Republic pygmy and from two patients from Cameroon and Gabon (Chen *et al.*, 1995; Mboudjeka *et al.*, 1997); Ie and If, recently proposed as the more divergent isolates representing new subtypes identified in samples from one Efe pygmy from Congo and one individual from Gabon (Salemi *et al.*, 1998). The Cosmopolitan subtype is divided in four subgroups

according to their geographical distribution: Transcontinental (A), Japanese (B), North African (C) and West African (D) (Gasmi *et al.*, 1994; Vidal *et al.*, 1994; Miura *et al.*, 1994).

Two main hypotheses have been proposed to explain the origin of this retrovirus in the American Continent. One is based on the ancient migration of infected populations from North Asia to American continent through Bering Strait (Miura *et al.*, 1997). Another hypothesis suggests that Africans could introduce this virus in the American continent during the slave trade in XVI, XVII, XVIII and XIX centuries (Gessain *et al.*, 1994, Vandamme *et al.*, 1998).

Brazil is a continental country located in South America, divided in five geographic regions (North, Northeast, Central West, South and Southeast) with marked social and demographic differences. During the Portuguese colonization, between the XVI to XIX centuries, around four million people were brought from Africa, as a result of the slave trade, mainly to Northeast and Southeast regions of this country. In the beginning of the XX century the South and Southeast were the destination of important European and Asian migrations. Nowadays, the Southeast (São Paulo state) has the largest Japanese community outside Japan.

In Brazil the HTLV-I was first reported in 1986 in this Japanese immigrant population from an endemic region (Okinawa) to Central West region of Brazil (Kitagawa *et al.*, 1986). Presently, the prevalence of HTLV-I infection among blood donors in Brazil varies from 0.08% (South and North regions); 0.33% (Southeast region) and 1.35% in Salvador, a city located in the Northeast region of the country (Gaivão-Castro *et al.*, 1997). So far, few isolates were studied in this country, and all belong to the Cosmopolitan subtype. Few cluster inside the Japanese subgroup while the majority belongs to the Transcontinental subgroup (Yamashita *et al.*, 1999).

The discovery of different haplotypes in the  $\beta$ -globin gene cluster has presented great importance in anthropologic studies as markers of migration, origin and evolution of the race human. They can be used also to detect genetic distance between ethnical groups in studies of population origin. The  $\beta$ -globin gene cluster comprehends a fragment around 50 kb located in the short arm of the chromosome 11. Five genes are responsible for the synthesis of the globin chains, and is organized of extremity 5' to 3', obeying the following order:  $\epsilon$ ,  $\gamma^G$ ,  $\gamma^A$ ,  $\delta$  and  $\beta$ , beyond a pseudo- $\beta$ -gene ( $\psi\beta$ ) included in the complex. These genes are located in the same order where its expressions occur during the ontogenic development (Antonarakis et al., 1984; Lanclos et al., 1991). The various  $\beta$ -globin haplotypes have different ethnic and geographic origins: the Benin type (BEN) originated in Midwestern Africa, the Bantu (CAR) type in South-Central and Eastern Africa, the Senegal (SEN) type in Atlantic West Africa, the Saudi Arabia-India type in the Indian subcontinent and the Eastern Arabian peninsula, and the Cameroon type along the West Coast of Africa (Nagel, 1984; Lapoumeroulie et al., 1989; Nagel and Ranney, 1990; Hattori et al., 1986). The  $\beta$ -globin haplotype distribution in Salvador-Bahia is unusual in comparison with those described in other Brazilian states (Azevedo et al., 1981; Zago et al., 1981; Gonçalves et al., 1994, Gonçalves et al., 2002).

We have studied HTLV-I isolates obtained from 82 individuals living in Salvador city. We established the  $\beta$ -globin polymorphisms (34 of 82) and the correlation of the similarity among  $\beta$ s-gene haplotypes in order to get more insight on towards the origin of this virus in Salvador.

## Methods

**Study population.** We studied 82 HTLV-I isolates from previous studies comprehending different groups: a) general population (BA): 19 (Dourado *et al.*, 2001); b) pregnant women (TP): 21 (Bittencourt *et al.*, 2001); c) intravenous drug users (IDU): 16 (Andrade *et al.*, 1998) and d) patients attending a neurological clinic (FNN): TSP/HAM = 11, asymptomatic = 15. These samples were collected from 1996 to 1998.

**DNA extraction and PCR amplification.** Genomic DNA was extracted from all sample's PBMCs by SDS/Proteinase K treatment followed by phenol/chloroform extraction or using GFX genomic blood DNA purification kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). In order to confirm the serological results all DNA samples were submitted to nested PCR of the *pol* gene using the primers 12P1/SK111 and 12P5/1P1/2P3 and cycling conditions according described previously (Vallejo *et al.*, 1995). For amplification of the HTLV-I-*tax*LTR gene all samples were submitted to nested PCR using in the first round the primers LTR1 (5'CATTTCTACTCTCACACGGCCTCATACAGTACTCTT3') and LTR2 (5'CGCA GTTCAGGAGGCACCAC3'), amplify a fragment of the 574 bp corresponding to nt 8164-8727 in the HTLV-I ATK1 isolate, followed by a second round PCR using the primers LTRN1 (5'TTGAAGAATACACCAACATCCC3') and LTRN2 (5'GAACGCGACTCAACCGGCGTGGAT3'), amplifying a fragment of the 479 bp corresponding to nt 8255-8686 of the HTLV-II ATK1 isolate. The first round reactions were performed in 50 µl reaction mixtures containing 1.5 µg of DNA, 1.75 U of Taq DNA polymerase (Perkin Elmer-Cetus, Norwalk, CT), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM of each deoxynucleotide triphosphate and 30 µmol

of each primer. PCR cycling conditions consisted of: one cycle at 94°C for 1 min, 25 cycles at 94°C for 30 seg, 50°C for 30 seg and 72°C for 45 seg and one cycle at 72°C for 10 min. Two microliters of the initial amplified product was used in the nested reaction that were performed in 50 µl of reaction mixtures. All amplified products were analyzed in a 1% agarose gel electrophoresis followed by ethidium bromide staining.

**β-globin PCR and RFLP.** β-globin haplotype DNA fragments from 34 individuals HTLV-I infected were amplified using the primers and conditions previously described (Sutton et al., 1989, Gonçalves et al., 2002). Seven fragments of the β-globin gene cluster were generated (5'<sup>G</sup>γ, <sup>G</sup>γ, <sup>A</sup>γ, Ψβ, 3'Ψβ, 5'β e 3'β). These fragments were purified using the Promega (Madison, WI) Wizard PCR prep system and a 5 µl aliquot was removed and digested with the appropriate restriction endonuclease (XmnI, HindIII, HindIII, HincII, HincII, HinfI e HpaI), respectively (Sutton et al., 1989). The fragments were separated by electrophoresis on a 3% agarose gel containing ethidium bromide and visualized under ultraviolet light.

**Nucleotide sequencing and phylogenetic analysis.** PCR products amplified from the LTR partial region were purified using the Promega (Madison, WI) Wizard PCR prep system and sequenced in a Perkin-Elmer/ABI Prism 377 DNA Stretch Sequencer using Taq FS Dye terminator cycle sequencing. The same PCR inner primers were used in the sequencing reactions. All reactions were done two times. A multiple sequence alignment from the region of the studied samples together with related sequences in the GenBank/EMBL database were done in Dambé program (Xia, 2000) using the Clustal algorithm and further edited in GeneDoc program (Nicholas et al., 1997). The phylogenetic analysis was done using neighbor-joining

(NJ), maximum-parsimony (mpars) and maximum-likelihood (ML) methods with PAUP\* 4.0.2b (Swofford, 1996). The NJ tree was calculated by optimizing parameters 3X using NJ with Tamura-Nei substitution model with rate matrix (gamma parameter of the 0.861493). The transition:transversion ratio (4.53) was determined in Puzzle 4.0.2 program (Strimmer and von Haeseler, 1997). The reliability of the NJ trees were evaluated by analyzing 1,000 bootstrap replicates. The trees were drawn with the TreeView 1.4 program.

**Accession numbers.** The GenBank accession numbers of the HTLV-I fragments sequenced in our laboratory and included in the phylogenetic study are as follows: We have submitted the sequences to GenBank and we are waiting for the accession numbers.

The other HTLV-I strains were those described by Mahieux et al. (1997) (pyg19, L76310; Afs911, L72212), Vandamme et al. (1994) (ITIS, Z32527; MT4LB, Z31661), Gessain et al. (1993) (MEL5, L02534), Malik et al. (1988) (HS35, D00294), Miura et al. (1994) (GH78, D23693; CH26, D23690), Gasmi et al. (1994) (Bo, U12804; OD, U12805; Pr52, U12806; Pr144, U12807), Van Dooren et al. (1998) (Ni1.Peru, Y16484; BI1.Peru, Y16481; Me1.Peru, Y16478; BI3.Peru, Y16483; BI2.Peru, Y16482; Qu1.Peru, Y16475; Me3.Peru, Y16480; Qu3.Peru, Y16477; Me2.Peru, Y16479 and Ni2.Peru, Y16487), Ellerbrok and Duwe (1998) (RK14.Peru, AF054627), Serki et al. (1983) (ATM, J02030), Shirabe et al. (1990) (HCT), Seiki et al. (1993) (ATK1, J02029), Chou et al. (1995), (ATL-YS, U19949), Picard et al. (1995) (BCI2.1, U32557; BCI1.2, U32552), Tsujimoto et al. (1988) (H5, M37299), Dasgupta et al. (1992) (73RM, M81248), Zhao et al. (1993) (MT2, L03562), Josephs et al. (1984) (CR1, K02722), Engelbrecht et al. (TBH1 to -4, L76026, L76025, L76034 and L76028; TBH6 to -7, L76030 and L76029), Bazarbachi et al. (1995)

(BOI, L36905), Evangelista et al. (1990) (TSP1, M86840), Ellerbrok et al. (1997) (RKI2-Rum, AF3012; RKI1-Iran, AF3010), Liu et al. (1996) (AMA, CMC, FCR and MAQS, X88871-X88873 and X88876), Voevodin et al. (1995) (KUW-1, L42253), Voevodin et al. (1997) (Abl.A, U87264), Ratner et al. (1991) (CH, M69044).

## Results

### Nucleotide sequencing and phylogenetic analysis

The analysis of the phylogenetic tree showed that 81 isolates from the infected population cohort belong to the Transcontinental subgroup of the Cosmopolitan subtype (Fig. 1), with a low bootstrap value in NJ method but were highly significant when analyzed by ML ( $p < 0.001$ ). Seventy-four of these ones have grouped in the American Latin cluster. This cluster has divided in two clades with a low bootstrap value in NJ method but was highly statistical significant when analyzed by ML ( $p < 0.001$ ).

Only one isolate (Tp58) has grouped outside the Transcontinental subgroup, but inside the Cosmopolitan subtype, together the isolate one (BI3.Peru) previously classified as pertaining to the Japanese subgroup, when the total LTR gene was analyzed (Van Dooren et al., 1998). This result is corroborated for bootstrap support of 70% and statistically significant ML ( $p < 0.001$ ).

Of the 68  $\beta$ -globin chromosomes that were studied; 31 (45.6%) were BEN haplotype, 20 (29.4%) CAR, 17 SEN (25%), and none were designated atypical (Atp) because they were not found to belong to any of the known  $\beta$ -globin haplotypes (Table 1A). Ten patients were genotype BEN/BEN (29.4%); nine BEN/CAR (26.5 %);

seven SEN/SEN (20.6%); five CAR/CAR (14.7%); two BEN/SEN (5.9%), and one CAR/SEN (2.9%) (Table 1B).

The identities of haplotypes are indicated by combinations of the plus sign and minus sign, representing, respectively, the presence or absence of restriction sites (Table 2). The 68 chromosomes revealed 24 possible haplotypes. When we analyzed the  $\beta^S$  Benin haplotype, the most common Salvador haplotype was the XIII (-/-, -/-, -/-, -/-, -/-, +/+, +/-), in the  $\beta^S$  CAR haplotypes was III (+/-, -/-, -/-, +/-, +/+, +/-) IV (+/-, -/-, -/-, -/-, +/-, +/-) and in the  $\beta^S$  Senegal haplotype was IV (+/-, +/-, -/-, -/-, +/-, +/+, +/-).

## Discussion

We demonstrate that the majority of the HTLV-I subtypes circulating in Salvador, except one isolate, belongs to the Cosmopolita subtype, Transcontinental subgroup. This result is statistically corroborated for the value of  $p < 0,001$  in the ML tree. Of these isolates, seven had not only been classified in the group of Latin America, being observed in different positions of the phylogenetic tree. Probably, these isolates would be in the group of Latin America if we had analyzed total region LTR, therefore three of them (FNN28, IDU69 and IDU77) had shown identical sequences to the isolate from Peru, BI2.Peru. Previously, this isolate was classified inside the Latin America clade, when total LTR gene was analyzed (Van Dooren et al., 1998). However, in our analysis, this isolate is showed outside of this clade, therefore we have just analyzed a fragment of the 420 bp. These results indicate the necessity of the use of bigger gene fragments for attainment of trustworthy phylogenetic results.



Despite the majority of the isolates belonging to the Transcontinental subgroup, we have observed an isolate, proceeding from a pregnant woman, outside this subgroup, however inside of the Cosmopolita subtype. This isolate was grouped together to the isolate from Peru, BI3.Peru, but outside all the subgroups of this subtype, with consistent of bootstrap (70%) and corroborated by ML tree ( $p < 0,001$ ). However, this isolate from Peru previously was classified inside the Japanese subgroup, when total LTR gene was analyzed. Currently, we analyzed the total LTR and *env* sequences of this isolate one as well as the HTLV-I of the other members of her family (mother and daughter). When we sequenced and make the phylogenetic analyze, we observed that all they belong to the Japanese (data not publish yet). This isolate represents the first Cosmopolita subtype, Japanese subgroup, of an individual with black ethnic feature, and not descendant of Japanese immigrants. Yamashita et al. (1999) had demonstrated the presence of the Japanese subgroup in Brazil, but, however in individuals from São Paulo, Japanese descendants. This result suggests a recent and separate introduction of this HTLV-I sub-group in Salvador.

Previous results suggest that the infection for the HTLV-I, in South America, is a result of multiple introductions pos-Colombian, mainly from Africa (Van Dooren et al., 1998). But as do it explain the absence in Salvador, in our phylogenetic analyze and others previously published (Yamashita et al., 1999), of the West African subgroup, since that the majority of the Africans brought to Salvador as slaves was from West of Africa region? And the presence of the HTLV-I isolates from South Africa in the Cosmopolita subtype?

Salvador is a city with 80% of the population descending of Africans. The majority of the Africans also brought to Bahia, during the slave trade, came from West Africa, specifically from Benin, Nigeria and the North of Angola (Rodrigues,

1977; Viana Filho, 1988; Verger, 1987)., Any information does not exist about the movement of ships from Africa for Bahia, between 1678-1810, therefore all the historical documentation was lost. However, there are evidences that African people had been brought to Bahia, during the illicit slave trade, in the end of the XVII century and beginning of century XIX, from other regions of the African South Continent, as the South of Angola, Madagascar and Mozambique, where the CAR (Bantu)  $\beta$ -haplotype are prevalent.

The demonstration of CAR haplotype in 29.4% of the chromosomes for us analyzed, suggests that the presence of this haplotype in Salvador can also be originated from Bantus that came from South of Africa, including South Africa, although we did not do a racial study that determines the race admixture of the studied population. We know that it does not have nothing that indicates which the origins of the Africans that come to Bahia, between 1678-1810, and in the XVII and XVIII centuries, during the settling of South Africa for the English, many individuals had run away for other neighboring regions, as today known Angola, Madagascar and Mozambique (Verger, 1976). Around 4,100 and 2,300 Bantus were brought to Bahia, between 1817-1843, from Angola and Madagascar, respectively (Curtin, 1969). We also know that, between 1641-1648, Angola was under the domain of the Holland, being thousand of Africans brought to Bahia with destination to Pernambuco State. However, in the XVII century, the predominance of Bantus is placed in evidence for the fact to have in the port of Salvador, when the Dutch's had taken this city in 1624, six ships of Angola, with 1,440 slaves against only one of the Guinea with only 28 slaves (Viana Filho, 1988). Soon, the Bantus had been the first Africans exported in large-scale to Bahia, and here the landmarks of its culture are present yet. In the language, in the religion, folklore, in the habits, they had influenced powerfully. It is important to know that the port from where the Africans were

originated was not necessarily related with their ethnical origin, because they were frequently captured far way from the port (Rodrigues, 1977).

Ahead of these facts, we can suggest that it can have occurred a possible introduction of the HTLV-I Cosmopolita subtype, Transcontinental subgroup, in Salvador, from infected South Africans. We cannot discard the hypothesis that this subgroup could be present in Angola, or even in other African countries, and was brought to South Africa for infected individuals that migrated in fetching of the gold and diamonds in this region. Unfortunately there are few LTR sequences available from African isolates which does not allows a deeper phylogenetic analysis.

Considering the continental extension and the large variety of ethnic groups in Brazil together with our present results, we suggest that multiple HTLV-I introductions took place in this country. Our data shows evidences that in Salvador, a city with a population of Africa background and with the highest HTLV-I prevalence in Brazil, a post-Colombian introduction is highly evident. Further studies considering HTLV-I isolates from different regions and ethnicity are of paramount important to shed more light in the complex issue of origins of this virus in Brazil.

The presence in Salvador of the SEN atypical haplotype (25.9%) could be explained by previous descriptions (Pinsky, 1988; Gonçalves et al., 2002) and BEN haplotype in Salvador (45.2%) is in accordance with the historical data, therefore Western Africa supplied the majority of the slaves who had come to Bahia, mainly in XVIII century (Viana Filho, 1988).

## References

- Andrade, T.M., I. Dourado and B. Galvao-Castro. 1998. Associations among HTLV-I, HTLV-II, and HIV in injecting drug users in Salvador, Brazil. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*. 18:186-7.
- Antonarakis, S.E., C.D. Boehm, G.R. Serjeant, C.E. Theisen, G.J. Dover and H.H.Jr. Kazazian. 1984. Origin of the  $\beta$ -globin gene in Blacks. The contribution of recurrent mutations or gene conversion of both. *Proceeding National Academy Sciences USA*. 81:853-856.
- Azevedo, E.S., K.M.C. Silva, M.C.B.O. Silva, A.M.V.M.D. Lima, C.M.M. Fortuna and M.G. Santos. 1981. Genetic anthropological studies in the island of Itaparica, Bahia, Brazil. *Human Hereditary*. 31:353-57.
- Bittencourt A.L., I. Dourado, P.B. Filho, M. Santos, E. Valadao, L.C. Alcantara and B. Galvao-Castro. 2001. Human T-cell lymphotropic virus type 1 infection among pregnant women in northeastern Brazil. ). *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 26:490-4.
- Chen, J., L. Zekeng, M. Yamashita, J. Takeisha, T. Miura, E. Ido, I. Mboudjeka, J.M. Tsague, M. Hayami and L. Kaptue. 1995. HTLV isolated from a Pygmy in Cameroon is related but distinct from the known Central African type. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 11:1529-1531.
- Curtin, P.D. 1969. The slave Atlantic trade: a census. Milwaukee: The University of Wisconsin Press.
- Dourado, I. and B. Galvao-Castro. 2001. Human T-cell lymphotropic virus in Brazil: current situation in the area with the highest prevalence. *Aids Research and Human Retroviruses*. 17(Supp1):S-9.
- Gaivão-Castro, B., L. Loures, L.G. Rodrigues, A. Sereno, O.C. Ferreira Junior, L.G. Franco, M. Muller, D.A. Sampaio, A. Santana, L.M. Passos and F. Proietti.

1997. Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. *Transfusion*. 37:242-3.
- Gasmi, M., B. Farouqi, M. d'Incan, C. Desgranges. 1994. Long terminal repeat sequence analysis of HTLV type I molecular variants identified in four north African patients. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 10:1313-15.
- Gessain, A., E. Boeri, R. Yanagihara, R.C. Gallo and G. Francini. 1993. Complete nucleotide sequence of a highly divergent human T-cell leukemia (lymphotropic) virus type I (HTLV-I) variant from Melanesia: genetic and phylogenetic relationship to HTLV-I strains from other geographical regions. *Journal of Virology*. 67:1015-1023.
- Gessain, A., I.J. Koralnik, J. Fullen, E. Boeri, C. Mora, A. Blank, E.F. Salazar-Gruesso, J. Kaplan, W.C. Saxinger and M. Davidson. 1994. Phylogenetic study of ten new HTLV-I strains from the Americas. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 10:103-106.
- Gonçalves, M.S., J.F. Nechtman, M.S. Figueredo, J. Kerbauy, V.R. Arruda, M.F. Sonati, S.T.O. Saad, F.F. Costa and T.A. Stoming. 1994. Sickle cell disease in a Brazilian population from São Paulo: A study of the  $\beta^S$ -gene haplotypes. *Human Heredity*. 44:322-327.
- Gonçalves, M.S., G.C Bomfim, E. Maciel, I. Cerqueira, I.L. Queiroz, G. Bomfim, E. Adorno, A. Albuquerque, A. Pontes, R. Muniz, M.F. Dupuit, G.B. Fernandes and M.G. Reis. 2002.  $\beta^S$ -haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador-Bahia-Brazil. *Brazilian J. Med. Biol. R.* In press.
- Hahn, B.H., G.M. Shaw, M. Popovic, A. Lo-Monico, R.C. Gallo and F. Staal-Wong. 1984. 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. *International Journal of Cancer*. 34(5):613-618.

- Hattori, Y., F. Kutlar, A. Kutlar, V.C. Mackie and T.H. Huisman. 1986. Haplotypes of beta S chromosomes among patients with sickle cell anemia from Georgia. *Hemoglobin*. 10:623-42.
- Kitagawa, T., M. Fujishita, H. Tacagushi, I. Miyoshi and H. Tadokoro. 1986. Antibodies to HTLV-I in Japanese immigrants in Brazil. *JAMA*. 256:2342.
- Lanclos, K.D., C. Öner, A.J. Dimovisk, Y.C. Gu and T.H.J. Huisman. 1991. Sequence variations in the 5' flanking and IVS-II regions for the  $G\gamma$  and  $A\gamma$ - globin genes of  $\beta^S$  chromosomes with five different haplotypes. *Blood*. 7:2488-96.
- Lapoumeroulie, C., O. Dunda, G. Trabuchet, M. Mony-Lobe, D. Labie, J. Elison and R. Krishnamoorthy. 1989. A novel sickle cell gene of yet another origin in Africa: The Cameroon type. *Blood*. 74:255A.
- Mboudjeka, I., L. Zekeng, M. Yamashita, J. Takehisa, E. Ido, T. Miura, S. Ohkura, M. Ikeda, L. Kaptue and M. Hayami. 1997. Prevalence and phylogenetic analysis of HTLV-I isolates in Cameroon, including those of the Baka Pygmy. *Jpn J Cancer Res*. 88, 619-624.
- Miura, T., M. Yamashita, V.Zaninovic, L. Cartier, J. Takehisa, T. Igarashi, E. Ido, T. Fujiyoshi, S. Sonoda, K. Tajima and M. Hayami. 1997. Molecular phylogeny of human T-cell leukemia virus type I and II of Amerindians in Colombia and Chile. *Journal of Molecular Evolution*.44:S76-S82.
- Miura, T., T.Fukunaga and T. Igarashi. 1994. Phylogenetic subtypes of human T-lymphotropic virus type I and their relations to the anthropological background. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Unites states of America*. 91:1124-1127.
- Mueller, N., A. Okayama, S. Stuver and N. Tachibana.1996. Findings from the Miyazaki Cohort Study. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*. 13:S2-S7.

- Nagel, R.L. 1984. The origin of the hemoglobin S gene: clinical, genetic and anthropological consequences. *Einstein Quarter Journal of Biology Medicine*. 2:53-62.
- Nagel, R.L. and H.M. Ranney. 1990. Genetic epidemiology of structural mutations of the  $\beta$ -globin gene. *Seminar. in Hematology*. 27:342-359.
- Nicholas, K.B., H.B.J. Nicholas, and D.W. Deerfield. 1997. GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation. *EMBNEW.NEWS*.
- Pinsky, J. 1988. O escravo negro. In Pinsky, J., *A escravidão no Brasil*. Ed Contexto, São Paulo. pp.24.
- Rodrigues, N. 1977. Os africanos no Brasil. 9:13-70. Companhia Editora Nacional (5<sup>a</sup> ed), São Paulo, Brasil.
- Salemi, M., S. Van Dooren, E. Audenaert, E. Delaporte, P. Goubau, J. Desmyter and A.-M. Vandamme. 1998. Two new human T-lymphotropic virus type I phylogenetic subtypes in seroindeterminates, a Mbuti pygmy and a Gabonese, have closes relatives among African STLV-I strains. *Virology*. 246:277-287.
- Strimmer, K. and A. von Haeseler. 1997. Likelihood-mapping: a simple method to visualize phylogenetic content of a sequence alignment. *PNAS (USA)*. 94:6815-6819.
- Sutton, M., E.E. Bouhassira and R.L. Nagel. 1989. Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of  $\beta$ -like globin gene cluster haplotypes. *American Journal of Hematology*. 32:66-69.
- Swofford, D.L., G.J. Olsen, P.J. Waddell and D.M. Hillis. 1996. Phylogenetic inference. In *Molecular systematics*, 2nd edition (ed. D.M. Hillis et al.), pp. 407-514. Sinauer, Sunderland, Massachusetts

- Vallejo, A. and A. Garcia-Saiz. 1995. Typing human T-cell lymphotropic virus (HTLV-I and HTLV-II) by nested polymerase chain reaction: application to clinical specimens. *Jour. Virol. Meth.* 51:9-18.
- Van Dooren, S., E. Gotuzzo, M.Salemi, D. Watts, E. Audenaert, S. Duwe, H. Ellerbrok, R. Grassmann, J. Desmyter and A.-M. Vandamme. 1998. Evidence for a Post-Colombian introduction of human T-cell lymphotropic virus in Latin America. *Journal of General Virology.* 79:2695-2708.
- Vandamme, A.M., M. Salemi, S. Van Dooren, P. Goubau, M. Van Brussel and J. Desmyter.1998. The simian origins of the pathogenic human T-cell lymphotropic virus type I. *Trends in Microbiology.* 6:477-483.
- Verger, P. 1968. Flux et reflux de la traite des nègres entre le Golfe de Benin et Bahia de Todos os Santos. Mouton, Paris.
- Verger, P. 1976. Mouvement des navires. P.12. In Verger, P., *Trade relations between the Bight of Benin and Bahia, 17<sup>th</sup> to 19<sup>th</sup> century*, trans. Evelyn Crawford, Ibadan, Ibadan University Press. pp.24-26.
- Viana Filho, L. 1988. O negro na Bahia. 31-224. Nova Fronteira (3<sup>a</sup> ed), Rio de Janeiro, Brasil.
- Vidal, A.U., A. Gessain, M. Yoshida, F. Tekaiia, B. Garin, B. Guillermain, T. Schuls, R. Farid and G. De The. 1994. Phylogenetic classification of human T cell leukaemia/lymphoma virus type I genotypes in five major molecular and geographical subtypes. *Journal of General Virology.* 75:3655-66.
- Xia, X. 2000. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. Departament of Ecology and Biodiversity, University of Hong Kong.
- Yamashita, M., R. Veronesi, M. Menna-Barreto, W.J.Jr. Harrington, C. Sampoio, C. Brites, R. Badaro, A. S. Andrade-Filho, S. Okhura, T. Igarashi, T. Miura, D. Chamone, O. Bianchini, C. Jardim, S. Sonoda and M. Hayami. 1999.

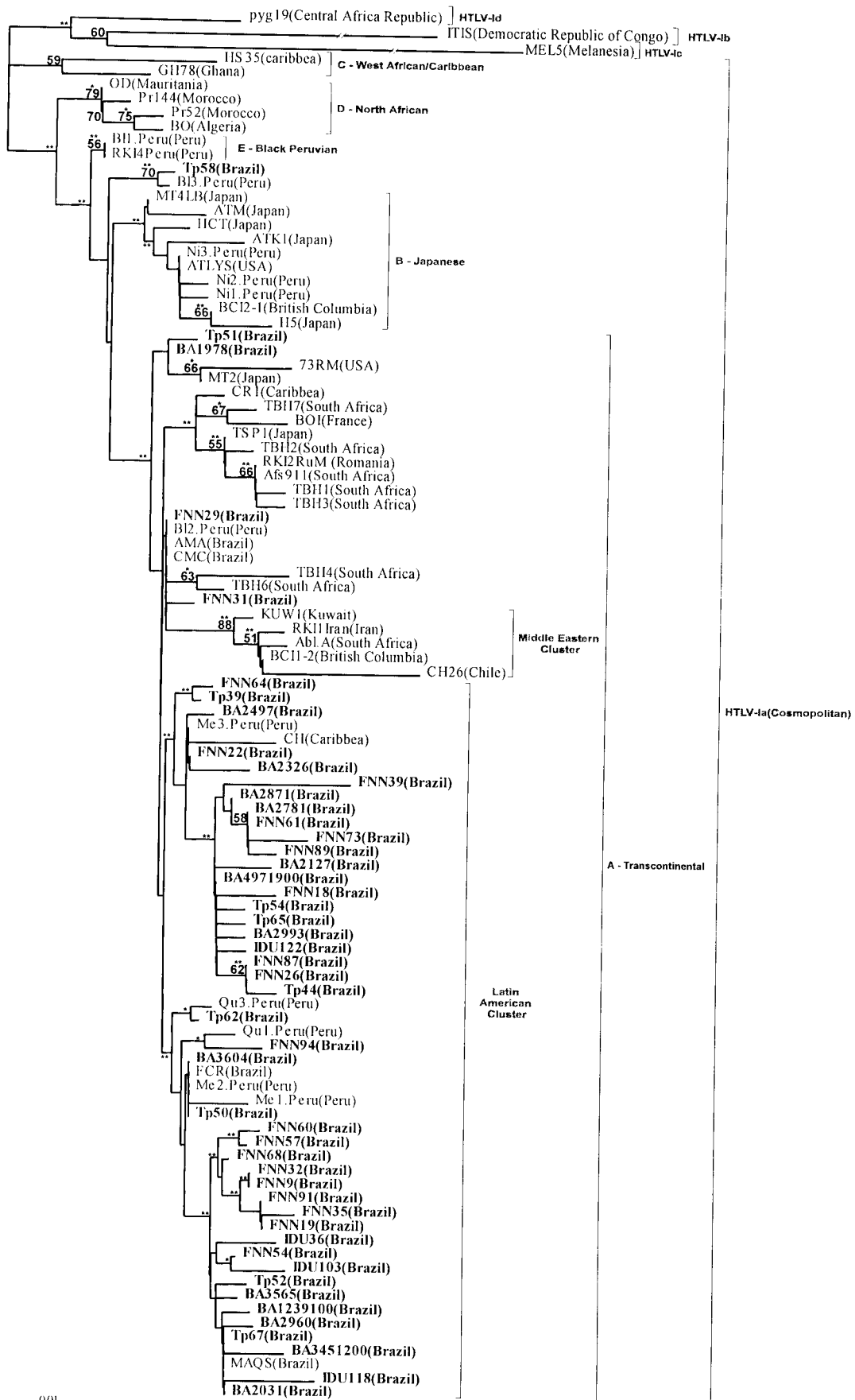


Molecular epidemiology of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) Brazil: the predominant HTLV-1s in South America differ from HTLV-1s of Japan and Africa, as well as those of Japanese immigrants and their relatives in Brazil. *Virology*, 261:59-69.

Zago, A., M.S. Figueiredo and S.H. Ogo. 1992. Bantu  $\beta^S$ -cluster haplotype predominates among Brazilian black. *American Journal of Physiology and Anthropology*. 88:295-98.

## FIGURE LEGENDS

**Fig.1.** Rooted NJ tree of 82 HTLV-I strains based upon a 420 bp fragment of the LTR region. The bootstrap values (above 50% and using 1000 bootstrap samples) on the branches represent the percentage of trees for which the sequences at one end of the branch form a monophyletic group. Mel5, ITIS and pyg19 are used as outgroups. Geographical origin and ethnic origin are given in italics between parentheses. Newly sequenced LTRs included in this analysis are the following Salvador population isolates. Only 49 isolates were included in this tree. The other ones with identical sequences are demonstrated in italics below: **BA2031** = *BA3229, BA3525, BA2746 and BA2567*; **BA2497** = *BA3076200*. **Tp61** = *Tp43, Tp59, Tp60, TP79, IDU7, IDU22, IDU126, IDU131, IDU150 and FNN78*; **FNN72** = *FNN82*; **FNN9** = *FNN83 and FNN70*; **IDU103** = *IDU71, IDU104 and IDU108*; **FNN28** = *IDU69 and IDU77*; **FNN87** = *Tp41 and Tp42*; **FNN72** = *FNN82*; **IDU5** = *IDU8 and TP71*; **Tp64** = *Tp81*. The isolates *FNN28, IDU69 and IDU77* are identical to BI2.Peru The \*\* means that the ML method was highly significant with a P value < 0.001 or significant with a P value <0.05/



001

**Table 1 A** - Frequency of the atypical haplotypes associated with the  $\beta$ -globin gene cluster. **B** - Frequency of the haplotypes associated with the number of patients studied.

<b>A</b>				<b>B</b>						
Chromosomes (n)				Patients (n)						
Samples/n	BEN	CAR	SEN	Samples/n	BEN/ BEN	CAR/ CAR	SEN/ SEN	BEN/ CAR	BEN/ SEN	CAR/ SEN
FNN/38	18 (47.4%)	14 (36.8%)	6 (15.8%)	FNN/19	5 (26.3%)	3 (15.8%)	2 (10.5%)	7 (36.8%)	1 (5.3%)	1 (5.3%)
TP/12	6 (50%)	6 (50%)	-	TP/6	2 (33.4%)	2 (33.3%)	-	2 (33.3%)	-	-
BA/18	7 (38.9%)	-	11 (61.1%)	BA/9	3 (33.3%)	-	5 (55.6%)	-	1 (11.1%)	-
TOTAL/68	31 (45.6%)	20 (29.4%)	17 (25%)	TOTAL/34	10 (29.4%)	5 (14.7%)	7 (20.6%)	9 (26.5%)	2 (5.9%)	1 (2.9%)

BEN (Benin), CAR (Central African Republic) and SEN (Senegal).

Table 2 – Frequency of the atypical haplotypes of  $\beta^S$  globin gene of HTLV-I subjects from Salvador.

	Xmn I	Hind III	Hind III	Hinc II	Hinc II	Hinf I	Hpa I	n	%
$\beta^S$ Benin	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	-/-		
I	-/-	+/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-	1	4.8
II	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/-	+/-	1	4.8
III	-/-	+/-	-/-	-/-	+/-	-/-	+/-	1	4.8
IV	-/-	+/-	-/-	-/-	+/+	+/-	+/-	1	4.8
V	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-	1	4.8
VI	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	1	4.8
VII	+/-	+/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/-	1	4.8
XIII	-/-	+/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/-	1	4.8
IX	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-	+/+	+/-	1	4.8
X	-/-	+/-	+/-	-/-	+/+	+/-	+/-	2	9.4
XI	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	+/-	2	9.4
XII	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/-	2	9.4
XIII	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/-	6	28.6
$\beta^S$ CAR		+/+	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+		
I		+/+	+/-	-/-	+/-	+/+	+/-	1	16.7
II		+/+	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	1	16.7
III		+/-	-/-	-/-	+/-	+/+	+/-	2	33.3
IV		+/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	2	33.3
$\beta^S$ Senegal	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+		
I	+/-	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	+/-	1	14.3
II	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	+/-	1	14.3
III	+/+	+/+	-/-	-/-	+/-	+/-	+/-	1	14.3
IV	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-	+/+	+/-	2	28.5
V	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	+/-	1	14.3
VI	+/+	+/+	-/-	+/+	+/-	+/+	+/-	1	14.3

**Manuscrito nº 4****Brazilian HTLV-IIa strains from IDUs could have originated from two sources:  
Brazilian Amerindians and European/North American IDUs**

Authors: Luiz Carlos Jr. Alcantara,<sup>1,2</sup> Nice Shindo,<sup>1,2</sup> Maria Cristina Ramos Costa,<sup>3</sup> Simone Kashima,<sup>3</sup> Sonia Van Dooren,<sup>4</sup> Marco Salemi,<sup>4</sup> Dimas Tadeu Covas,<sup>3</sup> Anne-Mieke Vandamme,<sup>4</sup> and Bernardo Galvão-Castro.<sup>1,2\*</sup>

*Author's affiliation: 1-Advanced Public Health Laboratory, Gonçalo Moniz Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Bahia, Brazil; 2-Bahia School of Medicine and Public Health/Foundation for Development of Science, Salvador, Bahia, Brazil; 3-Blood Center of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil; 4-Rega Institute for Medical Research, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium;*

**ABSTRACT**

In Brazil, HTLV-II have been detected in blood donors and IDUs from urban areas as well as in native Indians living in the Amazon basin world wide, in endemic regions. Three main HTLV-II subtypes have been identified: IIa, IIb and IIc. In Brazil only subtype IIa has been detected. However a molecular variant of the subtype IIa, characterized by an extended Tax protein and also called HTLV-IIc, has been isolated from Brazilian blood donors, IDUs and Indians. In the present study we analyzed HTLV-II infections in Salvador-Bahia-Brazil from 10 IDUs and a Chilean woman living in this city. Through the sequence of *env*, *tax* and LTR we demonstrated that 10 of the studied isolates are related to the Brazilian subtype IIa molecular variant described in previous studies. We showed that most of the HTLV-IIa Brazilian strains comprise a phylogenetic group harboring a considerable degree of diversity. Interestingly, we demonstrated for the first time in Brazil the presence of a subtype IIa, from IDUs, closely related to the prototype Mo but distinct from the Brazilian IIa molecular variant.

## INTRODUCTION

The Human T-Cell Lymphotropic Virus Type I (HTLV-I) and Type II (HTLV-II) are retroviruses widely spread throughout the world. Both viruses present similar biological properties and T lymphocyte tropism (8, 9, 11). HTLV-II infections are prevalent in Amerindian populations and in intravenous drug users (IDUs) from North America, Europe and Southeast Asia (10).

In Brazil, HTLV-II has been detected in blood donors and IDUs from urban areas as well as in native Indians living in the Amazon basin (4, 6, 14, 15, 21). Recently, it was demonstrated that IDUs residing in Salvador, a Northeast city of the country, present the highest HTLV-II seroprevalence rate (8,8%) observed so far in a Brazilian population (1). Also HTLV-II prevalence detected in pregnant women in this city was 0.03% (3).

Three main HTLV-II subtypes are established: II (18), IIb (13) and IIc (22). In Brazil only subtype IIa has been identified. A molecular variant of subtype IIa (18) has been identified in Brazilian blood donors, IDUs and Kayapo Indians, living in the Amazon basin (2, 4, 12, 14). Based on its LTR and *env* sequence divergence, and on the properties of its Tax protein, it was suggested that this variant should be considered as a new HTLV-II subtype namely IIc (4). The sequence analysis of the *tax* gene of HTLV-II on some of these Brazilian isolates shows the absence of the characteristic stop codon at the position 8,203 as it is seen in the Mo sequence, demonstrating that the tax protein in these Brazilian samples is extended by 25 amino acids at the carboxy terminal as it is observed in HTLV-II subtype b (4, 14).

Recently, we demonstrated through phylogenetic analysis that HTLV-II *env* sequences from Tiriyo Indians are closely related to isolates from IDUs living in urban areas of Southern Brazil (19). In the present study HTLV-II isolates from Salvador,

Northeast of Brasil were analyzed on three different regions of the proviral genome *env*, *tax* and LTR. We demonstrated that most of the studied isolates are related to the subtype IIa molecular variant circulating in Brazil, which is distinct from representatives of subtypes IIa and IIb present in North America and Europe. We report the identification of the first HTLV-IIa subtype closely related to the prototype Mo but different from all previous IIa strains described in Brazil. In addition, we demonstrated that most of the HTLV-IIa Brazilian strains comprise a characteristic phylogenetic group with a considerable intra-group level of diversity.

## MATERIALS AND METHODS

### Study population

Intravenous blood samples were collected, between 1994 and 1996, from ten co-infected HIV and HTLV-II IDUs in Salvador-Bahia City (BAIDU2, BAIDU25, BAIDU28, BAIDU70, BAIDU72, BAIDU81, BAIDU86, BAIDU148, BAIDU187 and BAIDU211) and one HTLV-II-seropositive Chilean woman living in this city (BANS291). This woman did not report the use of intravenous drugs. These samples came from two different cross-sectional studies (1, 7).

### PCR amplification

Genomic DNA was extracted from whole blood using the GFX Genomic blood DNA purification kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Due to the limited availability of DNA, not all genomic regions were analyzed for all samples (Table 1). For amplification of the fragment of 630 nucleotides comprising part of the *env* gene a nested



PCR was carried out as follows. BANS291, BAIDU2, BAIDU72, BAIDU81, BAIDU86, BAIDU187 and BAIDU211 samples were submitted to a first round PCR using the primers BSEF4 (5'CAGGCAATAACGACAGATAA3') and FLENV.R1 (5'AAGCTTAA GCTTACTGTGGATGGGTCAATGGTAGGGG3'), corresponding to nt 6011-6031 and 6669-6705 of the HTLV-II Mo isolate, respectively, followed by a second round PCR using the primers GP21F1 (5'CTGCAACAACCTCCATTATCCT3') and GP21R1 (5'CTG CAGAAGCTAGCAGGTCTA3'), corresponding to nt 6031-6051 and 6641-6661 of the HTLV-II Mo isolate. Reactions were performed in 100 µl reaction mixtures containing 2 µg of DNA, 2.5 U of Taq DNA polymerase (Perkin Elmer-, Norwalk, CT), 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM each deoxynucleotide triphosphate and 100 pmol of each primer. PCR cycling conditions consisted of: one cycle at 94°C for 5 min and 30 cycles at 94°C for 1 min, 56°C for 1 min and 72°C for 2 min. Five microliters of the initial amplified product was used in the nested reaction. Both first and second round of amplifications was cycled as above. In order to complete the *env* analysis, primers L1 (5'CAGTATGCAGCCCAAATAG3') and M2 (5'CACGTAGACGGGGTATCCC AT3'), corresponding respectively to position 6283-6302 and 7246-7265 of HTLV-II Mo isolate were used. This PCR was carried out under the following cycling conditions: one cycle at 94°C for 3 min; 35 cycles at 94°C for 1 min, 60°C for 1 min and 72°C for 1 min and 30 sec, followed by one cycle at 72°C for 10 min. For amplification of the HTLV-II-LTR gene BAIDU2, BAIDU25, BAIDU28, BAIDU70, BAIDU86 and BAIDU148 samples were submitted to nested PCR using the outer primers BSQF6/BSDR3 and inner primers BSQF2/BSDR4 which amplifies a fragment of the 672 bp for HTLV-II (21). For amplification of the entire *pX* gene, nested PCR of the BAIDU2 was carried out in order to prepare two overlapping products as described elsewhere (4). All amplified products were analyzed in a 2% agarose gel electrophoresis followed by ethidium bromide staining.

## Nucleotide sequencing and phylogenetic analysis

PCR products amplified from the *env*, LTR and *tax* region were purified using the Promega (Madison, WI) Wizard PCR prep system and sequenced in a Perkin-Elmer/ABI Prism 377 DNA Stretch Sequencer using Taq FS Dye terminator cycle sequencing. The same PCR inner primers were used in the sequencing reactions. Sample BAIDU2 was sequenced in the *env* region using also primers L1a (5'CAATGGGCACGAGAAGC3') and M1 (5'TTCCTCTAACCCCGCTCAC3'). Multiple sequence alignment for the *env*, LTR and *pX* region of the studied samples together with related sequences in the GenBank/EMBL database was done with the Dambe program (23) using the Clustal algorithm and further edited in the GeneDoc program (17). The empirical transition:transversion ratio were determined in Puzzle 4.0.2 program. Aligned sequences were used in Phylip v. 3.572 (5) to construct neighbor-joining (NJ) and maximum-likelihood (ML) trees using the F84 substitution model. The reliability of the NJ trees was evaluated by analyzing 1,000 bootstrap replicates. The trees were drawn with the TreeView 1.4 program.

### Accession numbers.

The GenBank accession numbers of the HTLV-II fragments included in the phylogenetic study are as follows:

*Env* analysis: PP1664 (Y14570), Efe2 (Y14365), G2 (AF074965), G12 (S67034), PIL (AF058086), FOR2 (AF058079), P7 (AF058085), P5 (AF058083), Gab (Y13051), NRA (L20734), Gu (X89270), WH7 (U32900), WH6 (M85226), PH230PCAM (Z46837), MO (M10060), KAY1 (U19110), KAY2 (U19109), K96 (AF326584), RP329 (AF326583), IVDARos (AF058089), SP5 (U32895), SP-WV (AF139382).

*LTR* analysis: PP1664 (Y14570), Efe2 (Y14365), NAV.DS (U10257, PH230PCAM (Z46838), LA8A (U10256), Mo (M10060), PUERB.RB (U10262), NOR2N (U10258), ATL18 (U10252), Mexy17 (L42510), BRAZ.A21 (U10253), KAY73 (L42509), KAY139 (L42508), Kayapo83 (AF139390), Kayapo78 (AF139388), Kayapo79 (AF139389), RP329 (AF326583), SP-WV (AF139382), Tyrio80 (AF139391). Belem02 (AF139392), Belem10 (AF139393), G12 (L11456), WYU1 (U12792), PUERB.AG (U10261), SEM1051 (U10264), PENN7A (U10260), WYU2 (U12794), PYGCAM1 (Z46888), SEM1050 (U10263), NRA (L20734), ITA47A (U10254), NY185 (U10259), AA (L77238), JA (L77239), 324 (L77243), RVP (L77244), SPAN129 (U10265), SPAN130 (U10266), 130 (L77242) RC (L77235), ITA50A (U10255), Gu (X89270), JAN (L77241), SMH1 (Y09147), SMH2 (Y09148), I-OV (Y09155), I-OG (Y09154), I-IT (Y09151), SFIDU 5-5 (U73010), SFIDU 6-2 (U73022), OkInd 15-8 (U73015), IVDUros (AF054272), SFIDU 4-10 (U73016), SFIDU 6-4 (U73018), Pilaga (AF054271), OkInd 14-7 (U73009), FOR6 (AF054273), Gab (Y13051), G2 (AF074965), BCIH2-1 (AF185282).

*PX* analysis: PP1664 (Y14570), Efe2 (Y14365), Mo (M10060), RP329 (AF326583), K96 (AF326584), SP-WV (AF139382), Gu (X89270), NRA (L20734), Gab (Y13051), G2 (AF074965), G12 (S67034).

The GenBank accession numbers of the HTLV-II fragments sequenced in our laboratory and included in the phylogenetic analysis are as follows. *Env*: BANS291 (AF197284), BAIDU86 (AF197283), BAIDU81 (AF197282), BAIDU72 (AF197281), BAIDU211 (AF197280), BAIDU187 (AF197279), BAIDU2 (AF401496). *LTR*: BAIDU70 (AF401495), BAIDU148 (AF401491), BAIDU86 (AF401492), BAIDU25 (AF401493), BAIDU28 (AF401494), BAIDU2 (AF401496). *PX*: BAIDU2 (AF401496).

## RESULTS

### **Nucleotide sequence and phylogenetic analysis of the *env* region**

The phylogenetic analysis of a fragment of 586 bp corresponding to the coding region of the viral gp21 envelope protein of 7 isolates from Salvador (Fig. 1) showed that these isolates belong to subtype IIa (98% of bootstraps). However these sequences formed two separated clusters both well supported by the bootstrap analysis. Six of these sequences (BANS291, BAIDU72, BAIDU81, BAIDU86, BAIDU187 and BAIDU211) formed a cluster supported by 72% of bootstraps inside the subtype IIa cluster. One isolate (BAIDU2) clustered together with the North American isolate Mo with 94% bootstrap support.

### **Nucleotide sequence analysis of the LTR region**

The phylogenetic analysis of a fragment of 626 bp comprehending almost the entire LTR region confirms that all the six analyzed isolates (BAIDU2, BAIDU25, BAIDU28, BAIDU70, BAIDU86 and BAIDU148) belong to subtype IIa (Fig. 2). This result was supported by a bootstrap value of 100%. Furthermore, five of these sequences formed a unique cluster inside subtype IIa which was highly significant with a P value  $<0.01$  when analyzed by ML method and well supported by bootstrap value of 99% in the Neighbor Joining algorithm. However the sequence of sample BAIDU2 clustered together with North American and European sequences with 62% of bootstrap value, and a  $P < 0.01$  in the ML analysis. BAIDU2 and BAIDU86 were the only isolates for which we could study LTR sequences besides *env* due to the limited availability of genomic DNA (Table 1).

### **Nucleotide sequence analysis of the *tax* gene**

A fragment of 1,643 bp covering almost the entire *pX* gene and corresponding to 6,055-8,896 bp position in the HTLV-IIa Mo prototype, was studied in the sample BAIDU2 since this was the only sample with sufficient available genomic DNA (Table 1 and Fig. 3). BAIDU2 is displayed outside the Brazilian subtype IIa cluster in the phylogenetic tree but together with HTLV-II sequences from a North American IDU. This result is highly supported by a bootstrap value (100%) and also highly significant when Maximum Likelihood method was used ( $P < 0.01$ ).

## **DISCUSSION**

In the present study we demonstrated that genetic subtypes of HTLV-II isolates from infected patients living in Salvador, Brazil, belong to subtype IIa. Our results confirm that subtype IIa is so far the only HTLV-II subtype circulating in Brazil (4, 12, 14, 20). In addition the majority of the presently studied isolates clustered together generating the so-called Brazilian cluster inside the subtype IIa clade which is also sometimes called IIc. It has also been suggested that the existence of a single clade of Brazilian viruses inside the HTLV-IIa clade is only poorly supported on the basis of *env* analysis (14). Our results confirm this previous conclusion since in the phylogenetic analysis using *env* sequences we did not observe a single Brazilian clade within subtype IIa (Fig 1). However when LTR sequences were analyzed a clear Brazilian clade was defined based on the ML method ( $P$

<0.01) although only poorly supported with the NJ method (bootstrap support < 50%) as previously demonstrated (14).

This Brazilian HTLV-IIa molecular variant is quite divergent, suggesting an ancient introduction of this virus in Brazil. Interestingly, these Brazilian Ila sequences are derived from viruses from IDUs, blood donors and Amerindians, suggesting a local introduction of this virus from Amerindians into the blood donor and drug user population (19). This is in contrast to the HTLV-II infection in other drug users world-wide, who are all infected with a particular variant of either HTLV-IIa or HTLV-IIb, closely related with the virus found in North-American drug users.

One of our isolates (BANS291) was obtained from a Chilean woman residing in Salvador and was characterized as subtype Ila in the *env* phylogenetic analysis. Up to now only subtype Iib has been identified in Chile (16). Since this sequence cluster together inside the Brazilian Ila clade (72% of bootstrap), it is possible that her infection could have happened in Brazil. Unfortunately the lack of genomic DNA from most of the studied samples made it impossible to analyze the *env*, LTR and *tax* genes for most of the samples, thereby limiting the phylogenetic information available for these strains.

The phylogenetic analysis of BAIDU2 using LTR and *env* sequences clearly showed that this isolate belong to the subtype Ila. However this isolate cluster outside the Brazilian variant group as demonstrated in *env* and LTR analysis (62% of bootstrap and  $P < 0.01$ ). Furthermore these results were confirmed by a bootstrap value of 100% in *pX* analysis. Interestingly, the sequence analysis of the *tax* gene in this isolate identified a stop codon at the position 8,203 similar as found in North American and European HTLV-IIa sequences, in contrast to the other IDU strains which belong to the Brazilian HTLV-IIa molecular variant. This observation is consistent with the *env*, LTR and *pX* phylogenetic analysis of this isolate. Previous studies on the *tax* gene sequence demonstrated that the

Brazilian HTLV-II isolates which are phylogenetically classified as subtype IIa show a nucleotide substitution at the position 8,203 (T – C) in comparison to the subtype IIa prototype Mo. This substitution leads to the generation of a tax protein, which is 25 amino acids longer in these isolates (4, 14) when compared to the protein produced by the subtype IIa prototypes. This extended tax protein is characteristic of HTLV-IIb subtype, and this variant is therefore also called HTLV-IIc. The BAIDU2 represents the first described Brazilian HTLV-IIa, which is phylogenetically close related to the ones from North America, and Europe displaying the characteristic stop codon in the tax protein-coding region. The similarity of this strain with the prototype HTLV-IIa strain Mo is 99% in the *env* gene and 95% in the LTR region. It is possible that this sample represents a new introduction of North American/European HTLV-IIa in Salvador-Bahia-Brazil. Indeed, this sample was obtained from a sectional study performed in the historical district of the city (Pelourinho). This district besides being the most important touristic place of the Northeast of Brazil is surrounded by areas of drug users and drug dealers' (1). Although the *env* gene from this isolate has 99% of identify with the *env* gene from MO prototype, it is only 95% of identify to MO in the LTR region.

Our phylogenetic results demonstrated that it is imperative to analyze different genomic regions of HTLV-II proviruses in order to genetically characterize Brazilian strains and to infer the possible origins of this virus in the South American continent.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This study was partially supported by CADCT/Seplantec/Bahia State Government (grant number 98934) and Brazilian National Research Council (grant number 520605/95 NV). We are grateful to Dr. Tarcisio Andrade for providing the IDUs samples.

## REFERENCES

1. **Andrade, T. M., I. Dourado, and B. Galvao-Castro.** 1998. Associations among HTLV-1, HTLV-II, and HIV in injecting drug users in Salvador, Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* **18**:186-7.
2. **Biggar, R. J., M. E. Taylor, J. V. Neel, B. Hjelle, P. H. Levine, F. L. Black, G. M. Shaw, P. M. Sharp, and B. H. Hahn.** 1996. Genetic variants of human T-lymphotropic virus type II in American Indian groups. *Virology.* **216**:165-73.
3. **Bittencourt A. L., Dourado I., Filho P. B., Santos M., Valadao E., Alcantara L. C., Galvao-Castro B.** 2001. Human T-cell lymphotropic virus type 1 infection among pregnant women in Northeastern Brazil. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes.* **26**:490-4.
4. **Eiraku, N., P. Novoa, M. da Costa Ferreira, C. Monken, R. Ishak, O. da Costa Ferreira, S. W. Zhu, R. Lorengo, M. Ishak, V. Azvedo, J. Guerreiro, M. P. de Oliveira, P. Loureiro, N. Hammerschlak, S. Ijichi, and W. M. Hall.** 1996. Identification and characterization of a new and distinct molecular subtype of human T-cell lymphotropic virus type 2. *J Virol.* **70**:1481-92.
5. **Felsenstein, J.** 1989. PHYLIP (Phylogeny Inference Package), V.3.572. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle. .
6. **Ferreira Junior, O. C., R. S. Vaz, M. B. Carvalho, C. Guerra, A. L. Fabron, J. Rosembliit, and N. Hamerschlak.** 1995. Human T-lymphotropic virus type I and type II infections and correlation with risk factors in blood donors from Sao Paulo, Brazil. *Transfusion.* **35**:258-63.



7. **Gomes, I., A. Melo, F. A. Proietti, O. Moreno-Carvalho, L. A. Loures, M. C. Dazza, G. Said, B. Larouze, and B. Galvao-Castro.** 1999. Human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) infection in neurological patients in Salvador, Bahia, Brazil. *J Neurol Sci.* **165**:84-9.
8. **Hall, W. W., T. Kubo, S. Ljichi, Takahashi T, and S. Zhu.** 1994a. Human T-cell leukemia/lymphoma virus, type II (HTLV-II): emergence of an important newly recognised pathogen. *Semin Virol.* **5**:165-78.
9. **Hall, W. W.** 1994b. Human T cell lymphotropic virus type I and cutaneous T cell leukemia/lymphoma [published erratum appears in *J Exp Med* 1995 Jan 1;181(1):441]. *J Exp Med.* **180**:1581-5.
10. **Hall, W. W., R. Ishak, S. W. Zhu, P. Novoa, N. Eiraku, H. Takahashi, M. d. C. Ferreira, V. Azevedo, M. O. Ishak, O. d. C. Ferreira, C. Monken, and T. Kurata.** 1996. Human T lymphotropic virus type II (HTLV-II): epidemiology, molecular properties, and clinical features of infection. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* **13 Suppl 1**:S204-14.
11. **Hollsberg, P., and D. A. Hafler.** 1993. Pathogenesis of diseases induced by human lymphotropic virus type I infection. *N Engl J Med.* **328**:1173-82.
12. **Ishak, R., W. J. Harrington, Jr., V. N. Azevedo, N. Eiraku, M. O. Ishak, J. F. Guerreiro, S. B. Santos, T. Kubo, C. Monken, S. Alexander, and et al.** 1995. Identification of human T cell lymphotropic virus type IIa infection in the Kayapo, an indigenous population of Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses.* **11**:813-21.
13. **Lee, H., K. B. Idler, P. Swanson, J. J. Aparicio, K. K. Chin, J. P. Lax, M. Nguyen, T. Mann, G. Leckie, A. Zanetti, and et al.** 1993. Complete nucleotide sequence of HTLV-II isolate NRA: comparison of envelope sequence

variation of HTLV-II isolates from U.S. blood donors and U.S. and Italian i.v. drug users. *Virology*. **196**:57-69.

14. **Lewis, M. J., P. Novoa, R. Ishak, M. Ishak, M. Salemi, A. M. Vandamme, M. H. Kaplan, and W. W. Hall.** 2000. Isolation, cloning, and complete nucleotide sequence of a phenotypically distinct Brazilian isolate of human T-lymphotropic virus type II (HTLV-II). *Virology*. **271**:142-54.

15. **Maloney, E. M., R. J. Biggar, J. V. Neel, M. E. Taylor, B. H. Hahn, G. M. Shaw, and W. A. Blattner.** 1992. Endemic human T cell lymphotropic virus type II infection among isolated Brazilian Amerindians. *J Infect Dis*. **166**:100-7.

16. **Miura, T., M. Yamashita, V. Zaninovic, L. Cartier, J. Takehisa, T. Igarashi, E. Ido, T. Fujiyoshi, S. Sonoda, K. Tajima, and M. Hayami.** 1997. Molecular phylogeny of human T-cell leukemia virus type I and II of Amerindians in Colombia and Chile. *J Mol Evol*. **44 Suppl 1**:S76-82.

17. **Nicholas, K. B., H. B. J. Nicholas, and D. W. Deerfield.** 1997. GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation. *EMBNEW.NEWS*. **4**.

18. **Shimotohno, K., Y. Takahashi, N. Shimizu, T. Gojobori, D. W. Golde, I. S. Chen, M. Miwa, and T. Sugimura.** 1985. Complete nucleotide sequence of an infectious clone of human T-cell leukemia virus type II: an open reading frame for the protease gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **82**:3101-5.

19. **Shindo N., L. C. J. Alcantara, S. Van Dooren, M. Salemi, M. C. R. Costa, S. Kashima, D. T. Covas, A. Teva, I. Brito, M. Pelegrini, A-M. Vandamme, and B. Galvao-Castro.** 2001. Human Retroviruses (HIV and HTLV) in Brazilian Indians: Seroepidemiological study and molecular epidemiology of HTLV-II isolates. Submitted.

20. **Switzer, W. M., F. L. Black, D. Pieniazek, R. J. Biggar, R. B. Lal, and W. Heneine.** 1996. Endemicity and phylogeny of the human T cell lymphotropic virus type II subtype A from the Kayapo Indians of Brazil: evidence for limited regional dissemination. *AIDS Res Hum Retroviruses*. **12**:635-40.
21. **Switzer, W. M., D. Pieniazek, P. Swanson, H. H. Samdal, V. Soriano, R. F. Khabbaz, J. E. Kaplan, R. B. Lal, and W. Heneine.** 1995. Phylogenetic relationship and geographic distribution of multiple human T-cell lymphotropic virus type II subtypes. *J Virol*. **69**:621-32.
22. **Vandamme, A. M., M. Salemi, M. Van Brussel, H. F. Liu, K. Van Laethem, M. Van Ranst, L. Michels, J. Desmyter, and P. Goubau.** 1998. 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**:4327-40.
23. **Xia, X.** 2000. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. Department of Ecology and Biodiversity, University of Hong Kong.

## Figure legends:

**Fig.1.** Rooted NJ tree of seven new HTLV-II strains along with a representative set of HTLV-II strains based upon a 586 bp fragment of the *env* region. The bootstrap values (above 50% and using 1,000 bootstrap samples) on the branches represent the percentage of trees for which the sequences at one end of the branch form a monophyletic group. Efe2 and PP1664 strains are used as outgroups. Geographical origin and ethnic origin are given between parentheses (not on my graph). Newly sequenced *env* included in this analysis are in bold. Statistical evaluation of branch lengths using ML results in some clades being better supported than others (\*\* =  $p < 0.01$  or \* =  $p < 0.05$ ).

**Fig.2.** Rooted NJ tree of six HTLV-II strains based upon a 626 bp fragment of the LTR region. The bootstrap values (above 50% and using 1,000 bootstrap samples) on the branches represent the percentage of trees for which the sequences at one end of the branch form a monophyletic group. Efe2 and PP1664 strains are used as outgroups. Geographical origin and ethnic origin are given between parentheses. Newly sequenced LTR included in this analysis are in bold. Statistical evaluation of branch lengths results in some clades being better supported than others (\*\* =  $p < 0.01$  or \* =  $p < 0.05$ ).

**Fig.3.** Rooted NJ tree of one HTLV-II strains based upon a 1,643 bp fragment of the *pX* region. The bootstrap values (above 50% and using 1,000 bootstrap samples) on the branches represent the percentage of trees for which the sequences at one end of the branch form a monophyletic group. Efe2 and PP1664 strains are used as outgroups. Geographical origin and ethnic origin are given between parentheses. New *pX* sequences included in this analysis are in bold. Statistical evaluation of branch lengths results in some clades being better supported than others (\*\* =  $p < 0.01$ ).

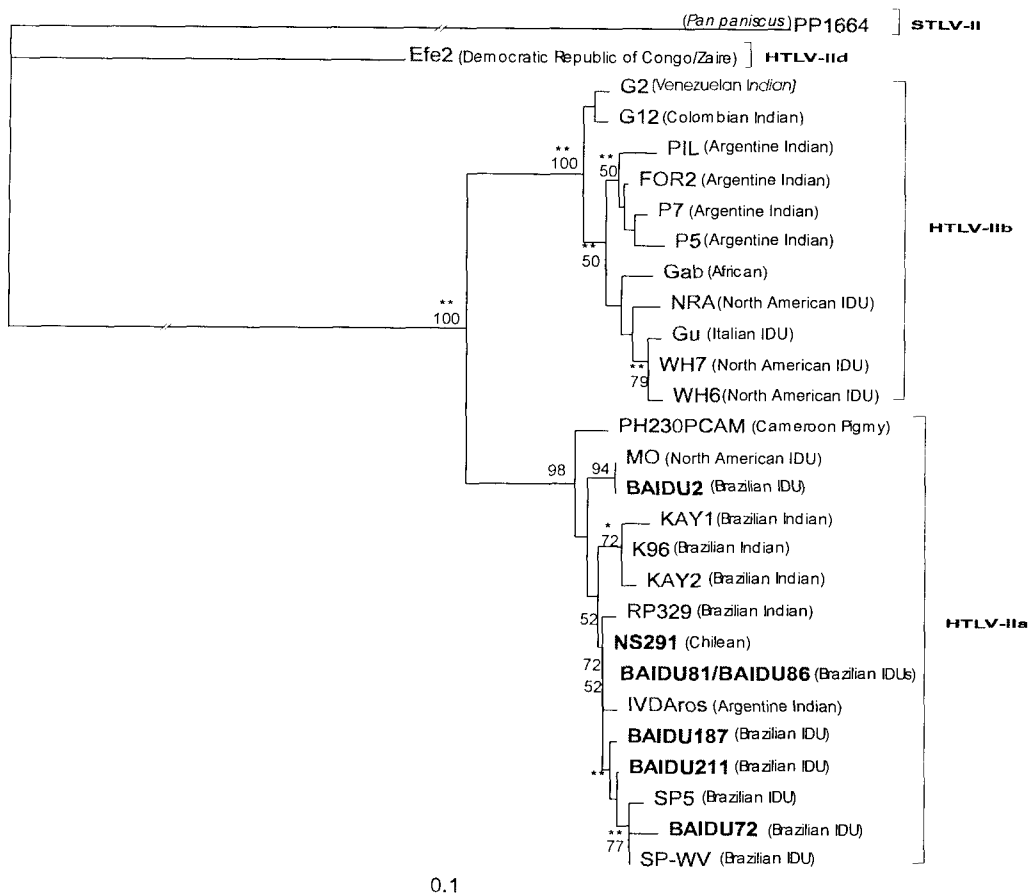


Fig. 1.

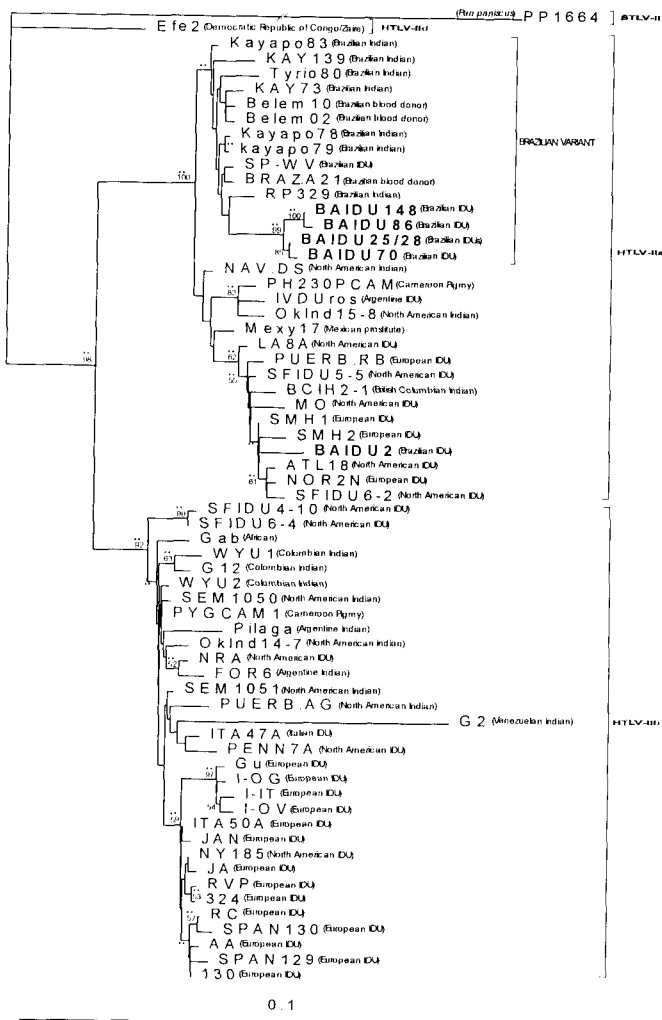


Fig. 2.

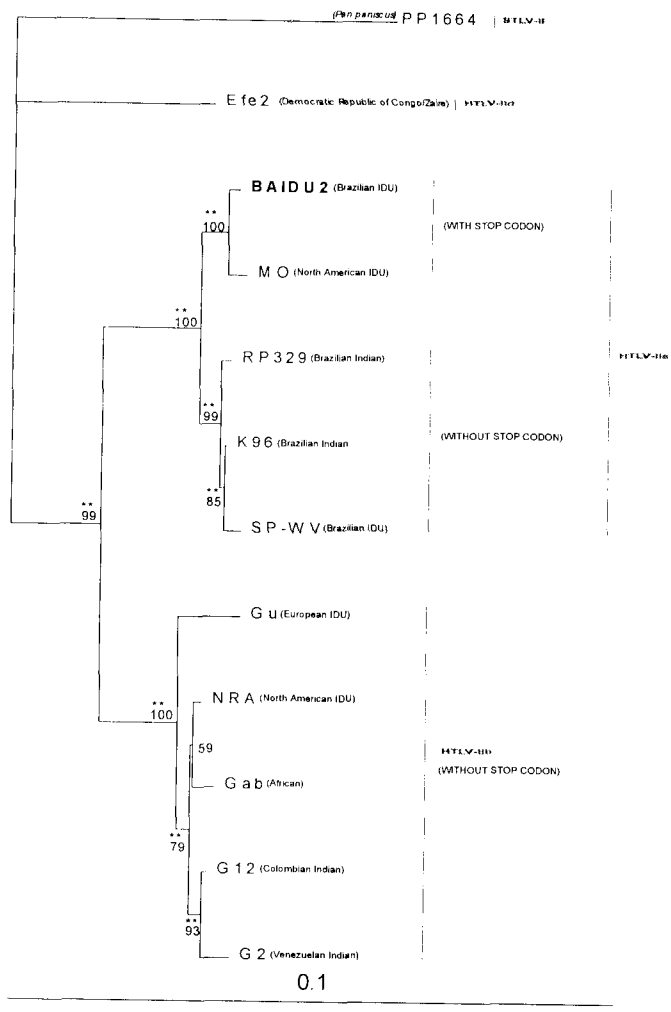


Fig. 3.

**Table 1.**

<b>Samples</b>	<b>PCR/Sequenced genomic regions</b>		
	<b>env</b>	<b>LTR</b>	<b>pX</b>
BAIDU2	yes	yes	yes
BAIDU25		yes	
BAIDU28		yes	
BAIDU70		yes	
BAIDU72	yes		
BAIDU81	yes		
BAIDU86	yes	yes	
BAIDU148		yes	
BAIDU187	yes		
BAIDU211	yes		
NS291	yes		



**Manuscripto n<sup>o</sup> 5**

**Title: Human Retroviruses (HIV and HTLV) in Brazilian Indians: seroepidemiological study and molecular epidemiology of HTLV-II isolates**

Authors: Nice Shindo,<sup>1,2,7\*</sup> Luiz C.J. Alcantara,<sup>1,2</sup> Sonia Van Dooren,<sup>3</sup> Marco Salemi,<sup>3</sup> Maria C.R Costa,<sup>4</sup> Simone Kashima,<sup>4</sup> Dimas T. Covas,<sup>4</sup> Antônio Teva,<sup>5</sup> Marco Pellegrini,<sup>6</sup> Ivo Brito,<sup>6</sup> Anne-Mieke Vandamme<sup>3</sup> and Bernardo Galvão-Castro.<sup>1,2</sup>

*Author's affiliation: 1-Advanced Public Health Laboratory, Gonçalo Moniz Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Bahia, Brazil; 2-Bahia School of Medicine and Public Health/Foudantion for Development of Science, Salvador, Bahia, Brazil; 3-Rega Institute, Catholic University of Leuven, Belgium; 4-Blood Center of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil; 5-IOC, Oswaldo Cruz Foundation/Rio de Janeiro, Brazil; 6-CN-DST/AIDS, Brazilian Ministry of Health; 7-Federal University of Rio de Janeiro.*

\* Corresponding author:

Nice Shindo

Advanced Public Health Laboratory, Gonçalo Moniz Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Bahia, Brazil

Rua Waldemar Falcão 121 Brotas, Salvador, Bahia, Brasil – 40295-001

Telephone # 55 71 356 8822 extensions 213/246/255

Fax # 55 71 356 2255 Email: [shindo@cpqgm.fiocruz.br](mailto:shindo@cpqgm.fiocruz.br)

## ABSTRACT

To investigate serological, epidemiological and molecular aspects of HTLV-I, HTLV- II, and HIV-1 infections in Amerindian populations in Brazil, we tested 683 and 321 sera from Tiriyo and Waiampi Indians respectively. Both HIV-1 and HTLV-II infections were detected in very low prevalences among the Tiriyo while only HTLV-I was present among the Waiampis, also in low prevalence. Analysis of the nucleotide sequence of the 631 bp of the *env* gene obtained from the three HTLV-II isolates detected among the Tiriyo demonstrated by RFLP that these viruses belong to subtype IIa. Phylogenetic analysis of this same fragment showed that these sequences cluster closer to HTLV-II isolates from IDUs living in urban areas of Southern Brazil than to the same gene sequence studied in another Brazilian tribe, the Kayapos. Our results confirm the distribution of Brazilian HTLV-II sequences in a unique cluster I and cluster IIa and suggest that there is a considerable degree of diversity within this cluster. We also report for the first time HIV-1 infection among Brazilian Amerindians.

## INTRODUCTION

The Human T-Cell Lymphotropic Virus Type I (HTLV-I) and Type II (HTLV-II) are retroviruses widely spread throughout the world.<sup>1,2</sup> HTLV-I is related to Adult T-Cell Leukemia (ATL)<sup>3</sup> and to a neurologic syndrome called HTLV-I associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP).<sup>4,5</sup> Until now there have been no reported oncogenic effects of HTLV-II, however cases of HTLV-II associated diseases have been described.<sup>6</sup>

HTLV-II infections were first detected in intravenous drug users (IDUs) co-infected with HIV-1 in North America, Europe and Southeast Asia.<sup>7-11</sup> Several seroprevalence studies have demonstrated endemic foci of HTLV-II in Amerindians.<sup>12-27</sup> In Brazil HTLV-II is reported as endemic in several Indian populations with high prevalence: Kayapo (33.3-57.9%);<sup>18,24,28,29</sup> Kraho (12.2%);<sup>24</sup> Mundukuru (8.1%), Tiriyo (15.4%) and Arara do Laranjal (11.4%).<sup>29</sup>

In a study on HTLV-II isolates from IDUs living in the United States two subtypes were suggested (IIa and IIb), based on two distinct restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns.<sup>9</sup> Later phylogenetic studies on HTLV-II have lead to the establishment of three main subtypes: HTLV-IIa, HTLV-IIb<sup>9,29-32</sup> and HTLV-Iid.<sup>33</sup> Although HTLV-IIa and IIb have been reported in different Amerindians with a predominance of the subtype IIb<sup>12,25,34,27</sup> only HTLV-IIa has been detected in Brazilian Indians<sup>12,19,26,28,29</sup> and in Brazilian IDUs.<sup>15,35</sup> It has been suggested that the Brazilian HTLV-IIa isolates might be a distinct molecular variant of the prototype Iia.<sup>29</sup> Furthermore the study of one Brazilian IDU HTLV-II isolate showed that this virus does not have

the characteristic tax stop codon seen in the subtype IIa *tax* gene thus sharing some similarity with the extended HTLV-IIb Tax protein.<sup>15,35</sup>

To date, a high prevalence of HTLV-II infections and no Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) infections have been demonstrated in Brazilian Indians. In the present paper, we report a very low prevalence of HTLV-II and a introduction of HIV-1 subtype B infection in these populations. Furthermore we report the first *env* phylogenetic analysis of HTLV-II from Tiriyo Indians and confirm that the HTLV-II isolates belong to a molecular distinct variant of the IIa cluster.

## MATERIALS AND METHODS

This work was performed in the framework of the Brazilian Ministry of Health National Program for STD/AIDS control. Indeed due to a suspected AIDS case in a Tiriyo Indian actions were taken in order to evaluate the magnitude of a potential HIV outbreak in this population. Thus, a prevalence survey was carried out in almost 100% of the Tiriyo and Waiampi tribes. The Waiampi tribe was included because it is well known that both tribes have relationships between each other.

**Study population, serology and HIV-1 subtyping.** The Tiriyo Indian population speaks the Caribe language and lives at the border between Suriname and Brazil. From a total of about 1,700 individuals, 750 live in Brazil spread throughout 15 villages. The Waiampi Indian population speaks the Tupi-Guarani language and live at the border between French Guyana and Brazil. From a total of 1200 individuals, 450 live in Brazil in the State of Amapa. Briefly, the

sampling from the two tribes was represented by approximately 50% male and 50% female. The majority of the individuals (83% among the Tiriyo and 89% among the Waiampis) were under forty years of age. In this category 37% and 22% are represented by children at ages between 0 and 10 years old while 46% and 67% are represented by individuals at reproductive ages (between 11 and 39 years) in the Tiriyo and Waiampi tribes respectively.

Five milliliters of intravenous blood samples were collected from the Tiriyo and Waiampi tribes between April and May of 1997 in tubes containing EDTA and without anticoagulant respectively. These samples were left at room temperature to allow spontaneous sedimentation and coagulation. Plasma, sera and buffy coat were collected, frozen in dry ice, and shipped by plane to the Advanced Public Health Laboratory (LASP/CPqGM/Fiocruz) in Salvador where they were kept at  $-70^{\circ}\text{C}$  until use.

According to the algorithm recommended by the Brazilian Ministry of Health, with small modifications, plasma and sera were screened for HIV-1 and 2 and HTLV antibodies. The samples were screened for HIV-1/2 by two Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) methods simultaneously: Enzygnost<sup>R</sup> Anti HIV-1/2 Plus (Behring, Marburg, Germany) (gp32) and Vironostika. R/ HIV – UNI – FORMII Plus O (Organon Teknika BV, Boxtel, Holland). Repeatedly reactive samples were submitted to indirect immunofluorescence assay (IFA) (Biomanguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil) and Western Blot (WB) (HIV Blot 2.2, Genelab Diagnostics – Singapore Science Park, Singapore). WB patterns were interpreted according to manufacturer's instruction. Specimens were considered HIV-1 positive (2 env bands: gp160/gp41 and gp120 and gag bands: p17, p24, p55 or pol (p31, p51, p66), negative

(absence of viral specific band or p17 only) or indeterminate (viral specific band present, but pattern does not meet the criteria for positive).

HTLV-I/II samples were screened by ELISA (rp21e-enhanced EIA Cambridge Biotech Corp Worcester, USA). Repeatedly reactive samples were confirmed as HTLV-I or HTLV-II by WB (HTLV Blot 2.4 Genelabs, Singapore). Results were interpreted according to manufacturer's instructions, namely: a) HTLV-I positive: gag p19 with or without p24 and two env (gp21 and gp46-I; b) HTLV-II positive: gag p24 with or without p19 and two env gp21 and rgd46-II; c) HTLV positive: gag p19 and env gp21. d) Indeterminate: specific bands detected but did not meet the criteria for positive HTLV-I, HTLV-II or HTLV e) negative: absence of specific bands. HIV-1 subtype was identified by Heteroduplex Mobility Assay (HMA) as described elsewhere.<sup>36</sup>

**Polymerase chain reaction.** Genomic DNA was extracted from buffy coat from Tiriyo samples with positive and indeterminate serology using the GFX Genomic blood DNA purification kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). First round PCR was performed on the extracted DNA from the indeterminate serology samples to amplify a fragment of the *env* gene using the primers 12E3 (5'GACCACCAACACCATGGG3') and 12E4 (5'GCTAGGGCGGAG ACAAGCC3'). These primers amplify a fragment of the 987 bp and of 975 bp for the HTLV-I and II positive samples respectively, corresponding to nucleotides (nt) 5169-5186 and 6123-6141 of the HTLV-II Mo isolate. A second round was carried out using nested primers 1E8 (5'TCAAGAAGTTTCACACCTCAAT3') and 1E5 (5'GATTTC CATGGTATAGAGGGCT C3'), which amplify a 198 bp fragment of HTLV-I, corresponding to nt 5607-5628 and 5782-5804 of the HTLV-II Mo isolate. Alternative second round was carried

out using the nested primers 8 (5'CAGCCAAGTGTCCCTTCGA3') and 9 (5'ATTTGAGTATTTTGGTCG3'), which amplify a fragment of 203 bp for HTLV-II corresponding to nt 5602-5620 and 5787-5804 of the HTLV-II Mo isolate. Reactions were performed in 50  $\mu$ l reaction mixtures containing 1.5  $\mu$ g of DNA, 2.5 U of Taq DNA polymerase, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM each deoxynucleotide triphosphate and 10  $\mu$ mol of each primer. PCR cycling conditions consisted of: one cycle at 94°C for 5 min and 35 cycles at 94°C for 40 sec, 55°C for 40 sec and 72°C for 30 sec. Five microliters of the initially amplified product were used in the nested reaction. First and second rounds of amplifications were cycled as above. The amplified products were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis followed by ethidium bromide staining.

For restriction fragment length polymorphism and nucleotide sequence analysis, a fragment corresponding to 631-nucleotides from the transmembrane glycoprotein gp21 was amplified from samples that were HTLV-II PCR positive. The first set of primers were BSEF4 (5'CAGGCAATAACGACAGATAA3') and FLENV.R1 (5'AAGCTTAAGCTTACTGTGGA TGGGTCAATGGTAGGGG3'), corresponding to nt 6011-6031 and 6669-6705 of the HTLV-II Mo isolate, respectively, followed by second round PCR using primers GP21F1 (5'CTGCAACAACCTCCATTATCCT3') and GP21R1 (5'CTGCAGAAGCTAGCAGGTCTA3'), corresponding to nt 6031-6051 and 6641-6661 of the HTLV-II Mo isolate. Reactions were performed in 100  $\mu$ l reaction mixtures containing 2  $\mu$ g of DNA, 2.5 U of Taq DNA polymerase, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25 mM each deoxynucleotide triphosphate and 100  $\mu$ mol of each primer. PCR cycling conditions consisted of:

one cycle at 94°C for 5 min and 30 cycles at 94°C for 1 min, 56°C for 1 min and 72°C for 2 min. Five microliters of the initial amplified product was used in the nested reaction. First and second rounds amplifications were cycled as above. The amplified products were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis followed by ethidium bromide staining.

**Restriction fragment length polymorphism analysis.** Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis was done on the 631 bp *env*-HTLV-II amplified fragments to identify the HTLV-II subtypes. The amplified products were purified using the Promega (Madison, WI) Wizard PCR Prep System and subsequently digested with *XhoI* restriction endonuclease (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD) as previously described.<sup>29</sup> The same fragment was digested with *SacII* (New England Biolabs, Beverly, MA), according to the manufacturer's instructions. Digested and undigested samples were directly electrophoresed on 3% agarose gels followed by ethidium bromide staining.

**Nucleotide sequencing and phylogenetic analysis.** PCR products amplified for RFLP analysis were purified as above and sequenced in a Perkin-Elmer/ABI Prism 377 DNA Stretch Sequencer using *Taq* FS dye terminator cycle sequencing. The same PCR primers were used in the sequencing reactions. The multiple sequence alignment of the Tiriyo Indian samples together with related HTLV-II sequences from the GenBank/EMBL database was done with the Dambé program using the Clustal algorithm and further edited with the GeneDoc program. The empirical transition:transversion was determined using the Puzzle 4.0.2 program. Aligned sequences were used with Phylip v. 3.572<sup>37</sup> to construct Neighbor Joining (NJ) and Maximum Likelihood (ML)



trees, using the F84 substitution model. The reliability of the NJ trees was evaluated by analyzing 1,000 bootstrap replicates. The trees were drawn with the Tree View 1.4 program.

## RESULTS

**Prevalence of Human Retroviruses in Brazilian Indian Populations.** Serum and plasma samples from a total of 1,004 Indians belonging to Tiriyo and Waiampi tribes were initially screened by ELISA for HIV-1/2 antibodies. Fifty out of 683 Indians from the Tiriyo tribe were repeatedly reactive in Vironostika R and only one (sample 469) in Enzygomost ELISA when screened for HIV-1/2. The analysis of these samples by WB showed the following results: one positive (sample 469), 29 negative (27 samples with no bands and 2 samples with p17 only); 19 indeterminate (18 with p24 only and one with p24 and p17). Only one specimen (469) was reactive by IFA, 48 were non-reactive and one showed unspecific pattern of fluorescence. Twenty-nine out of 321 Indians from the Waiampi tribe were repeatedly reactive in Organon ELISA and none was reactive by Behring ELISA when screened for HIV-1/2. Twenty samples were negative by WB (18 samples with no bands and 2 with p17 only), 9 were indeterminate (p24) and none were positive. All but two samples were non-reactive by IFA. These two samples yielded a non-specific pattern of immunofluorescence, but were negative by WB. The only HIV-1 positive sample detected among the Tiriyo Indians was subtyped as B using HMA.<sup>36</sup> Regarding HTLV antibodies evaluation (Table 1), 23 samples from the Tiriyo tribe were repeatedly reactive by ELISA. From these, 2 were HTLV-II positive, 2 were indeterminate and 19 were negative by

WB. PCR analyses was performed on these positive and indeterminate samples. PCR amplification of the HTLV-II *env* region confirmed HTLV-II infection of the two seropositive samples and of one of the indeterminate samples. Regarding the Waiampi tribe, seven were repeatedly positive by HTLV ELISA. From these 7 samples 2 were positive, 3 indeterminate and 2 negative by WB. Since DNA was not available for these samples PCR was not done.

Taking these results together, we can assume that the overall prevalences of HIV, HTLV-I and HTLV-II were 0.10%, 0.19% and 0.29%, respectively as seen on Table 2. In the Tiriyo tribe HIV-1 and HTLV-II were detected, while only HTLV-I was detected in the Waiampi tribe. The indeterminate serology results for retroviruses HTLV and HIV could be due to cross reactivity to infection such as malaria which induces polyclonal B cell activation as has been previously suggested.<sup>38</sup>

**Molecular Characterization.** RFLP analysis of the 631bp fragments amplified from the envelope region encoding the transmembrane protein gp21 was used to identify the sample's subtype. Thus *XhoI* digestion of these products resulted in two DNA fragments of 180 bp and 450 bp, indicating that all 3 samples, were infected with HTLV-IIa subtype (Fig. 1). To determine whether there were significant differences in nucleotide sequence between the three Tiriyo Indian HTLV-II *env* sequences, the amplified products representing the transmembrane gp21 protein gene regions were sequenced and analyzed. The alignment of these sequences with HTLV-II-Mo<sup>39</sup> and HTLV-II-KAY1<sup>29</sup> demonstrated the presence of two mutations (6580 and 6582 nt) creating a *SacII* restriction endonuclease site that when cleaved generates two fragments of 530 bp and 100 bp (Fig. 2). The comparison of the amino acid sequence of the transmembrane gp21

protein between HTLV-II-Mo,<sup>39</sup> HTLV-IIa Kay1,<sup>29</sup> HTLV-IIb G12,<sup>34</sup> and the three HTLV-II Tiriyo sequences, showed two amino acid changes: Gln-468 and Arg-469 were replaced by Arg-468 and Gln-469.

**Phylogenetic analysis.** We restricted our phylogenetic analysis of the transmembrane portion of the *env* gene considering the larger number of gp21 sequences relative to the low number of complete *env* sequences deposited in GenBank. Phylogenetic trees were constructed and evaluated by two different methods: NJ and ML. The reliability of the NJ topology was statistically evaluated using 1,000 molecular bootstrap replicates. The three Tiriyo Indian sequences were all identical and clearly cluster in the HTLV-IIa group of sequences with a bootstrap support of 98% for NJ (Fig. 3). Within HTLV-IIa, they do not cluster together with the Brazilian Indian Kayapo sequences. The HTLV-IIb clade was supported by 96% of the bootstrap replicates. In addition when ML method was used, the branch leading to the HTLV-IIa and IIb subtypes displayed *p* values < 0.01.

## DISCUSSION

Until now, a very high prevalence of HTLV-II infection, few cases of HTLV-I and no cases of HIV infection have been reported in Brazilian Indian populations.<sup>24, 28, 29, 38, 40, 41</sup> In the present study, we identified for the first time the introduction of HIV among Brazilian Indians. Also, we demonstrated low prevalence of HTLV-II and HTLV-I. Indeed, we detected an HTLV-II prevalence of 0.44% in the Tiriyo tribe that is much lower than that one (15.4%) reported

previously.<sup>29</sup> These discordant results could be due to the small sampling size studied before. On the other hand, only HTLV-I infection (0.56%) was observed in the Waiampi tribe in agreement to previous reports.<sup>42</sup>

In different studies prevalences as high as 57.9% have been reported for HTLV-II infections in Kayapo Indians,<sup>18,24,28,29</sup> These differences of prevalence rates among the Kayapo and the tribes studied here might be explained by the difference in ancestry of these indigenous populations in addition to the distances in their locations. As a matter of fact, they represent different linguistic groups, Kayapo (Gé), Tiriyo (Caribe) and Waiampi (Tupi-Guarani) which could also suggest different origins and probably a lack of communication between these tribes.<sup>43</sup> Tiriyo and Waiampi are located 216 miles apart while the distance between Kayapo and Tiriyo/Waiampi is 586 miles.

We could demonstrate by RFLP and nucleotide sequence analysis that all three infected Indians in the Tiriyo tribe harbored the HTLV-IIa subtype similar to the virus previously reported in Kayapo.<sup>29</sup> Subtype IIa has been identified among Brazilian Indians,<sup>12,19,26,29</sup> IDUs and blood donors in Brazil. However, we report here the first *env* gene phylogenetic characterization in HTLV-II among Tiriyo Indians. Phylogenetic analysis in LTR and *env* sequences from Brazilian HTLV-IIa isolates shows that these viruses formed a separate group inside the IIa cluster<sup>12,27,29,35</sup> Although, we have analyzed *env* gene sequences only, our results clearly demonstrate that the three Tiriyo sequences are identical and cluster inside subtype IIa, both in NJ and ML trees with high bootstrap support, and p values < 0.01 respectively. These sequences clustered closely with HTLV-IIa isolates present in IDUs from urban areas of Southern Brazil, but separately from

Kayapo Indians which is in agreement to data previously reported when the LTR sequence from a Tiriyo Indian was used.<sup>35</sup>

Our results show that there is considerable diversity within the Brazilian HTLV-IIa subtype sequences. Further sequencing studies on LTR and *tax* regions of the provirus should determine whether the HTLV-II in the Brazilian population has unique characteristics.

Different ancestry could explain the difference of prevalences among Brazilian Indian tribes. Besides infections of HTLV-I and HTLV-II in Waiampi and Tiriyo populations respectively could be due to a recent introduction of these viruses through contact with Brazilian non-Indians. In fact, when some of the Tiriyo Indians need medical care they travel to Macapa or Belem cities where they stayed for periods up to a month to be treated. Furthermore it has been reported that some of these Indians travel to other cities (Obidos, Oriximina and Paramaribo) to trade goods.<sup>44</sup> The latest hypothesis is supported by the low overall HTLV prevalence and by the phylogenetic closeness between the Tiriyo and IDU sequences observed in this study. Furthermore, the recent introduction of HIV infection in the Tiriyo population demonstrated in the present study also corroborates contacts with non-Indians.

Finally, considering the susceptibility of Indian populations to acquire infections from non-Indian populations, urgent health measures to prevent serious outbreaks in the Brazilian Indian populations are being implemented.

## ACKNOWLEDGMENTS

N.S. and L.C.J.A. contributed equally to this work. This study was partially supported by CADCT/Seplantec/Bahia State Government (grant number 98934) and Brazilian National Research Council (grant number 520605/95 NV). We are grateful to Mr. Noilson Gonçalves for performing serological assays and to Stevenson Craig for reviewing this manuscript.

## SEQUENCE DATA

**Accession numbers.** The GenBank accession numbers of the HTLV-II *env* fragments included in the phylogenetic study are as follows: U19110, KAY1; U19109, KAY2; U32899, SP1; U32897, SP3; Z46837, PH230PCAM ; X80244, MD; X80243, BO; X80242, VA; Z468889, PYGCAM1; S67034, G12; Z47788, JPS; U32904, 72969N; X80241, GU; U32900, WH7; M85226, WH6; U72524, VIET13; U72525, VIET19, U72527, VIET32; M10060, MO;<sup>39</sup> L20734, NRA<sup>31</sup> and Y14365, Efe2.<sup>33</sup> The GenBank accession numbers of the HTLV-II *env* fragments sequenced in our laboratory and included in the phylogenetic analysis are as follows: AF197276, Tiriyo22; AF197277, Tiriyo26 and AF197278, Tiriyo525. The GenBank accession numbers of the two STLV-II *env* fragments included as outgroup in the analysis are Y14570, Pp1664<sup>45</sup> and U90557, PanP.<sup>46</sup>

## REFERENCES

1. Hall WW, Kubo T, Ljichi S, Takahashi T and Zhu SW: Human T-cell leukemia/lymphoma virus, type II (HTLV-II): emergence of an important newly recognized pathogen. *Semin Virol* 1994; 5: 165-78.
2. Mueller N: The epidemiology of HTLV-I infection. *Cancer Causes Control* 1991; 2: 37-52.
3. Hinuma, Y: Retrovirus etiology of adult T-cell leukemia. *Leuk Res* 1993; 17: 379-81.
4. Gessain A, Barin F, Vernant JC et al.: Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in-patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* 1985; 2: 407-10.
5. Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H and Igata A: HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet* 1986; 1: 1031-32.
6. Murphy EL: The clinical epidemiology of human T-lymphotropic virus type II (HTLV-II). *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996; 13 Suppl 1: S215-9.
7. Feigal E, Murphy E, Vranizan K et al.: Human T cell lymphotropic virus types I and II in intravenous drug users in San Francisco: risk factors associated with seropositivity. *J Infect Dis* 1991; 164: 36-42.
8. Fukushima Y, Takahashi H, Hall WW et al.: Extraordinary high rate of HTLV type II seropositivity in intravenous drug abusers in South Vietnam. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995; 11: 637-45.
9. Hall WW, Takahashi H, Liu C et al.: Multiple isolates and characteristics of human T-cell leukemia virus type II. *J Virol* 1992; 66: 2456-63
10. Lee H, Swanson P, Shorty VS, Zack JA, Rosenblatt JD and Chen IS: High rate of HTLV-II infection in seropositive i.v. drug abusers in New Orleans. *Science* 1989; 244: 471-5.
11. 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; 2: 125-8.

12. Biggar RJ, Taylor ME, Neel JV et al.: Genetic variants of human T-lymphotropic virus type II in American Indian groups. *Virology* 1996; 216:165-73.
13. Biglione M, Gessain A, Quiruelas S et al.: Endemic HTLV-II infection among Tobas and Matacos Amerindians from north Argentina [letter]. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1993; 6: 631-3.
14. Duenas-Barajas E, Bernal JE, Vaught DR et al.: Coexistence of human T-lymphotropic virus types I and II among the Wayuu Indians from the Guajira Region of Colombia. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992; 8: 1851-5.
15. 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; 70: 1481-92.
16. Ferrer JF, Del Pino N, Esteban E et al.: High rate of infection with the human T-cell leukemia retrovirus type II in four Indian populations of Argentina. *Virology* 1993; 197: 576-84.
17. Fujiyama C, Fujiyoshi T, Miura T et al.: A new endemic focus of human T lymphotropic virus type II carriers among Orinoco natives in Colombia [letter]. *J Infect Dis* 1993; 168: 1075-7.
18. Fujiyoshi T, Li HC, Lou H et al.: Characteristic distribution of HTLV type I and HTLV type II carriers among native ethnic groups in South America. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999; 15: 1235-9.
19. Hall WW, Ishak R, Zhu SW et al.: Human T lymphotropic virus type II (HTLV-II): epidemiology, molecular properties, and clinical features of infection. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996; 13 Suppl 1: S204-14.
20. Heneine W, Kaplan JE, Gracia F et al.: HTLV-II endemicity among Guaymi Indians in Panama [letter]. *N Engl J Med* 1991; 324: 565.
21. Lairmore MD, Jacobson S, Gracia F et al.: Isolation of human T-cell lymphotropic virus type 2 from Guaymi Indians in Panama. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 8840-4.
22. Levine PH, Jacobson S, Elliott R et al.: HTLV-II infection in Florida Indians. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993; 9: 123-7.



23. Ijichi S, Zaninovic V, Leon FE et al.: Identification of human T cell leukemia virus type IIb infection in the Wayu, an aboriginal population of Colombia. *Jpn. J. Cancer Res* 1993; 84: 1215-1218.
24. Maloney EM, Biggar RJ, Neel JV et al.: Endemic human T cell lymphotropic virus type II infection among isolated Brazilian Amerindians. *J Infect Dis* 1992; 166: 100-7.
25. Miura T, Yamashita M, Zaninovic V et al.: Molecular phylogeny of human T-cell leukemia virus type I and II of Amerindians in Colombia and Chile. *J Mol Evol* 1997; 44 Suppl 1: S76-82.
26. Switzer WM, Black F L, Pieniazek D, Biggar RJ, Lal RB and Heneine W: Endemicity and phylogeny of the human T cell lymphotropic virus type II subtype A from the Kayapo Indians of Brazil: evidence for limited regional dissemination. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996; 12: 635-40.
27. Switzer WM, Pieniazek D, Swanson P et al.: Phylogenetic relationship and geographic distribution of multiple human T-cell lymphotropic virus type II subtypes. *J Virol* 1995; 69: 621-32.
28. Black FL, Biggar RJ, Neel JV, Maloney EM and Waters DJ: Endemic transmission of HTLV type II among Kayapo Indians of Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1994; 10: 1165-71.
29. Ishak R, Harrington WJ Jr, Azevedo VN et al.: Identification of human T cell lymphotropic virus type IIa infection in the Kayapo, an indigenous population of Brazil. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995; 11: 813-21.
30. Dube DK, Sherman MP, Saksena NK et al.: Genetic heterogeneity in human T-cell leukemia/lymphoma virus type II. *J Virol* 1993; 67: 1175-84.
31. Lee H, Idler KB, Swanson P et al.: Complete nucleotide sequence of HTLV-II isolate NRA: comparison of envelope sequence variation of HTLV-II isolates from U.S. blood donors and U.S. and Italian i.v. drug users. *Virology* 1993; 196: 57-69.
32. Takahashi H, Zhu SW, Ijichi S, Vahlne A, Suzuki H and Hall WW: Nucleotide sequence analysis of human T cell leukemia virus, type II (HTLV-II) isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1993; 9: 721-32.

33. Vandamme AM, 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: 4327-40.
34. Pardi D, Kaplan JE, Coligan JE, Folks TM and Lal RB: Identification and characterization of an extended Tax protein in human T-cell lymphotropic virus type II subtype b isolates. *J Virol* 1993; 67: 7663-7.
35. Lewis MJ, Novoa P, Ishak R et al.: Isolation, cloning, and complete nucleotide sequence of a phenotypically distinct Brazilian isolate of human T-lymphotropic virus type II (HTLV-II). *Virology* 2000; 271: 142-54.
36. Delwart EL, Shpaer EG, Louwagie J et al.: Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 env genes. *Science* 1993; 262: 1257-61.
37. Felsenstein J: PHYLIP (Phylogeny Inference Package), 1989; V.3.572. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
38. Nakauchi CM, Linhares AC, Maruyama K: Prevalence of human T cell leukemia virus-I (HTLV-I) antibody among populations living in the Amazon region of Brazil (preliminary report). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1990; 85: 29-33.
39. Shimotohno K, Takahashi Y, Shimizu N et al.: Complete nucleotide sequence of an infectious clone of human T-cell leukemia virus type II: an open reading frame for the protease gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985; 82: 3101-5.
40. Andrada-Serpa MJ, Dobbin JA, Gomes P et al.: Incidence of retroviruses in some Brazilian groups. *Immunol Lett* 1988; 18:15-8.
41. Galvao-Castro B and Pereira MS: HTLV-III antibody in Brazilian Indians. *Lancet* 1986; 1: 976.
42. Talarmin A, Vion B, Ureta-Vidal A, Du Fou G, Marty C and Kazanji M: First seroepidemiological study and phylogenetic characterization of human T-cell lymphotropic virus type I and II infection among Amerindians in French Guyana. *J Gen Virol* 1999; 80: 3083-8.

43. Salzano FM, Neel JV, Gershowitz H and Migliazza EC: Intra and intertribal genetic variation within a linguistic group: the Ge-speaking Indians of Brazil. *Am J Phys Anthropol* 1977; 47: 337-47.
44. Brazilian Ministry of Health, National Program for STD/AIDS Control: "Relatorio de Viagens à Terra Indigena Tumucumaque", Brasilia, May 1997.
45. Van Brussel M, Salemi M, Liu HF et al.: The simian T-lymphotropic virus STLV-PP1664 from *Pan paniscus* is distinctly related to HTLV-2 but differs in genomic organization. *Virology* 1998; 243: 366-79.
46. Digilio L, Giri A, Cho N, Slattery J, Markham P and Franchini G: The simian T-lymphotropic/leukemia virus from *Pan paniscus* belongs to the type 2 family and infects Asian macaques. *J Virol* 1997; 71: 3684-92.

Table 1. Demographic and Laboratorial Data of HTLV Infected Brazilian Indians<sup>a</sup>

Identification	Village	Sex, Age	ELISA OD / CO		WB/bands			PCR	
			I	2	I	II	Ind.	I	II
<b>Tiriyo</b>									
22	Missão Tiriyo	F, 42	2,91	4,18	--	21, 24, 38, 53, 46II		--	+
26	Missão Tiriyo	M, 11	4,0	5,31	--	21, 19, 24, 38, 53, 46II		--	+
525	Pönötö	F, 18	1,18	1,52			19, 26, 28, 32	--	+
611	Munemi	M, 51	1,51	1,78			19, 26, 28	--	--
<b>Vaiampi</b>									
10	Manilha	M, 43	1,04	1,12			46 I	ND	ND
35	Camopi	F, 26	4,89	6,40	21,19,24,26,28, 32,38,46,53,46 I			ND	ND
75	Mariry	M, 8	1,20	1,38			32	ND	ND
291	Ywyrareta	M, 9	5,60	5,60	21,19,24,26,28, 32,38,46,53,46 I			ND	ND

Abbreviations: F, Female; M, Male; <sup>a</sup> Samples initially seroreactive on ELISA were further analyzed by WB and PCR/RFLP analysis to differentiate HTLV-I and HTLV-II infections (*env*) and HTLV-IIa subtypes (*env*); +, positive; -, negative; OD, optical density; CO, cut off; ND, not done; Ind., indeterminate.

**TABLE 2. Prevalence of Human Retroviruses in Brazilian Indians**

Indian Tribes	HTLV			HIV				
	I	II	IND	IND				
	n	n (%)	n (%)	n (%)	1	2	p24	_p17
	n	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
WAIAMPI	321	2 (0,62)	0 (0)	2 (0,62)	0 (0)	0 (0)	9(2,80)	2(0,62)
TIRIYO	683	0 (0)	3 (0,44)	1 (0,14)	1 (0,14)	0 (0)	18(2,60)	2(0,29)
TOTAL	1004	2 (0,19)	3 (0,29)	3 (0,29)	1 (0,10)	0 (0)	27 (2,70)	4 (0,40)

IND, undetermined samples.

## FIGURE LEGENDS

**Fig.1.** Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of the *env* region encoding the transmembrane protein gp21. The amplified products were digested with *XhoI* and analyzed by 2% agarose gel electrophoresis. Lanes 1, 2 and 3 correspond to DNA from PBMCs of Tiriyo Indians 22, 26 and 525 respectively, before *XhoI* digestion. Lanes 1A, 2A and 3A represent the *XhoI* digested products from Tiriyo Indians 22, 26 and 525 respectively. Lane M shows the molecular weight marker.

**Fig.2.** Gel electrophoretic analysis after *SacII* digestion of the PCR products from Tiriyo samples to confirm the cleavage site observed in the sequences. DNA from fresh PBMCs was amplified with primers flanking the gene region encoding the transmembrane gp21 protein. Lanes 1 and 1A show non-digested and digested controls: the same *env* PCR fragment was amplified from an HTLV-IIa seropositive IDU. Lanes 2, 3 and 4 represent the undigested products from the Tiriyo Indians PCR fragments 22, 26 and 525 respectively. Lane 2A, 3A and 4A represent the digested products from the Tiriyo Indians PCR fragments 22, 26 and 525 respectively. Lane M represents the molecular weight marker.

**Fig.3.** Rooted NJ tree of three HTLV-II strains based upon a 537 bp fragment of the *env* region. The bootstrap values (above 50% and using 1000 bootstrap samples) on the branches represent the percentage of trees for which the sequences at one end of the branch form a monophyletic group. Efe2, PP1664 and PanP strains are used as outgroups. Geographical origin and ethnic origin are given between parentheses. Newly sequenced *env* included in this analysis are the following three Tiriyo Indians: 22, 26 and 525 (in bold). Statistical evaluation of branch lengths results in some clades being better supported than others (\*\* =  $p < 0.01$  or \* =  $p < 0.05$ ).

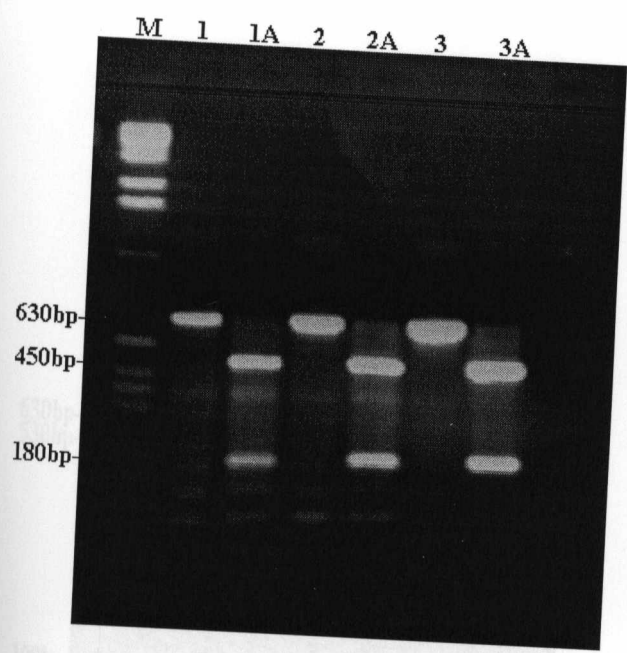


Fig. 1.

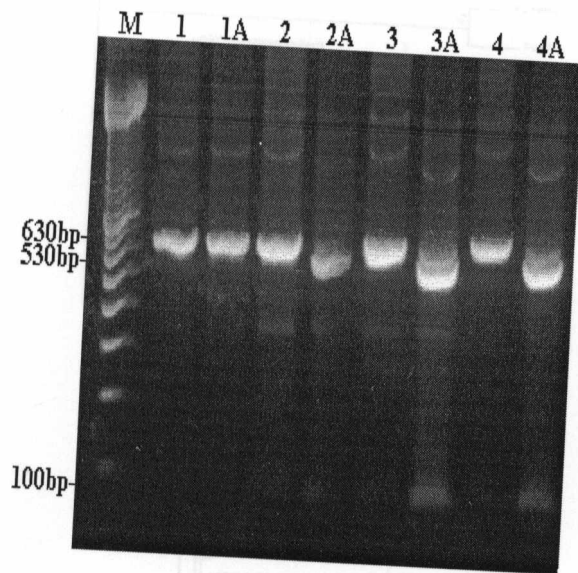


Fig. 2.



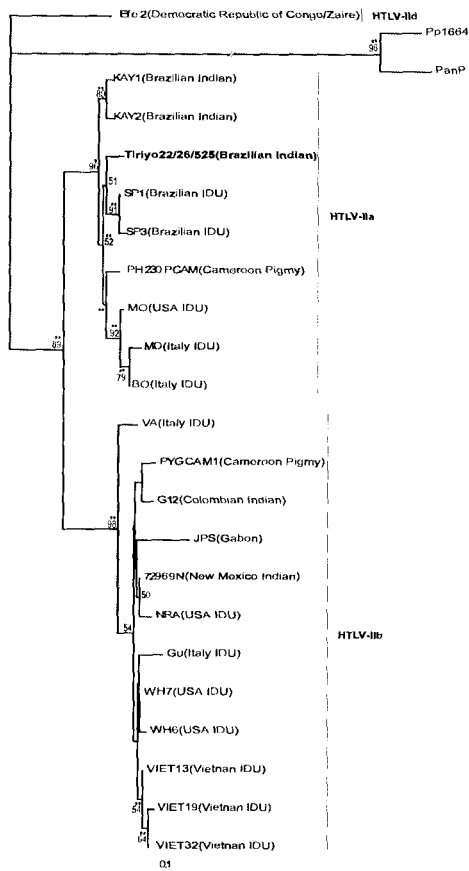


Fig. 3.