



**FIOCRUZ**

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

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e  
Medicina Investigativa**

**TESE DE DOUTORADO**

**HTLV EM GESTANTES DE DOIS MUNICÍPIOS DA  
REGIÃO SUL DA BAHIA E AVALIAÇÃO DA  
TRANSMISSÃO MATERNO-INFANTIL**

**MARCO ANTONIO GOMES MELLO**

**Salvador - Bahia – Brasil  
2014**

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

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e  
Medicina Investigativa**

**HTLV EM GESTANTES DE DOIS MUNICÍPIOS DA  
REGIÃO SUL DA BAHIA E AVALIAÇÃO DA  
TRANSMISSÃO MATERNO-INFANTIL**

**MARCO ANTONIO GOMES MELLO**

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

Tese apresentada ao Curso de  
Pós-Graduação em Biotecnologia  
em Saúde e Medicina Investigativa  
para obtenção do grau de Doutor.

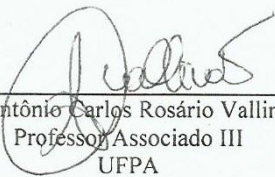
**Salvador - Bahia – Brasil**


“SOROPREVALÊNCIA E SUBTIPAGEM DO VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS  
(HTLV) E AVALIAÇÃO DA TRANSMISSÃO MATERNO-FETAL EM GESTANTES DA REGIÃO SUL DA  
BAHIA”


MARCO ANTÔNIO GOMES MELLO

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA

  
Dr. Antônio Carlos Rosário Vallinoto  
Professor Associado III  
UFPA

  
Dr. Ricardo Riccio Oliveira  
Pesquisador Titular  
CPqGM/FIOCRUZ

  
Dr.ª Rita Elizabeth Moreira Mascarenhas  
Pesquisadora Colaboradora  
CPqGM/FIOCRUZ

Data: 04 de dezembro de 2013

*Dedico este trabalho, à minha esposa Sandra Gadelha, que me acompanhou em todos os momentos dessa jornada, me transmitindo força, coragem e confiança, mostrando que, quando temos amor podemos realizar tudo.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado saúde, e por ter colocado em meu caminho todas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente nesse trabalho.

À minha amada esposa Sandra Gadelha, que foi o meu pilar de sustentação nesse trabalho, e de outros dois mais importantes nas nossas vidas. Um já publicado (Isabela), e o outro submetido (Davi).

À minha mãe, por sempre acreditar em mim, e ter investido bastante na minha educação.

Ao meu orientador, professor Dr. Luiz Alcântara, por ter aceitado me orintar, pela boa relação durante este trabalho, e por me incentivar nos momentos difíceis.

Ao meu admirável co-orientador Dr. Bernardo Galvão-Castro, pela orientação, pela experiência de vida compartilhada, pelos momentos de descontração, pela confiança e amizade.

A todos os colegas e amigos do LASP e do Centro de HTLV, especialmente a Filipe, Théssica, Aline, Gisele, Fernada, Jaqueline, Leandro, por fazer do meu ambiente de trabalho um local prazeroso.

À amiga Vivina Olavarria pela boa convivência no trabalho, e pela grande ajuda na quantificação da carga proviral do HTLV.

À Dona Eugenia, pelo acolhimento de mãe em todos os momentos.

Aos amigos Rodrigo, Cláudio e Sônia, pela boa convivência no trabalho, além da dedicação e empenho em todos os momentos que precisei.

Ao amigo Noilson Lázaro, pelo interesse e disposição em contribuir nas coletas de sangue e no seguimento das gestantes.

À Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa por todo suporte oferecido, e em especial ao corpo docente pela contribuição para o meu crescimento científico.

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, por toda estrutura e suporte oferecido.

A todos os integrantes da biblioteca do CPqGM, pelo apoio e ótimo serviço prestado.

Ao Centro integrativo e multidisciplinar de atendimento ao portador de HTLV e Hepatites virais, da Fundação Baiana para o Desenvolvimento das Ciências, pela estrutura oferecida e apoio neste trabalho.

A FAPESB, CNPq e PROPP-UESC pelo suporte financeiro.

À equipe do LAFEM-UESC, especialmente aos alunos de iniciação científica Lucas Pereira, Tâmara Coutinho e Raquel Gois Bastos e de mestrado Aline Ferreira que ajudaram na coleta de dados, manutenção do banco de dados e processamento das amostras.

À equipe dos Hospitais envolvidos, especialmente à Enfermeira Margarida do Manoel Novaes e a Neonatologista Mônica Raiol da Santa Helena por todo o apoio e suporte às mães envolvidas no estudo.

Às gestantes que aceitaram participar do estudo e se envolveram com o projeto.

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

MELLO, Marco Antonio Gomes. HTLV em gestantes de dois municípios da região sul da bahia e avaliação da transmissão materno-infantil. 91 f. il. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

### **RESUMO**

A prevalência de HTLV- 1 no Brasil é diversa, dependendo tanto da região geográfica quanto do grupo analisado. Um estudo populacional realizado em Salvador detectou prevalência de 1,76%, além de maior prevalência em mulheres e associação com menores níveis de escolaridade e renda. Como a via mais frequente de transmissão vertical do HTLV-1 é a amamentação e considerando a maior prevalência nas mulheres, é muito importante a realização de exames de triagem para HTLV-1 como parte do pré-natal. Até o momento, não existem estudos publicados sobre a soroprevalência do HTLV-1 em gestantes na região sul da Bahia. No presente estudo, as gestantes foram selecionadas em dois centros de referência regionais de saúde do sul da Bahia. Um total de 2.766 gestantes atendidas na sala de pré-parto entre novembro de 2008 e maio de 2010 foram analisados. Um questionário foi aplicado, e todas as amostras de plasma reagentes foram testadas em duplicata e confirmadas por Western blot e PCR. Além disso, mulheres positivas foram contactadas e visitadas. Os membros da família que estavam presentes durante a visita foram convidados a serem testados para o HTLV. Um estudo prospectivo foi também realizado e os recém-nascidos foram acompanhados até dois anos para avaliação da transmissão vertical. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da UESC. Foi detectada uma prevalência de HTLV foi de 1,05% (IC95%: 0.70-1.50). Não houve associação entre a infecção pelo HTLV-1 e idade, escolaridade, renda e etnia autodeclarada. A associação com o estado civil foi (OR=7,99, IC 95% 1,07-59,3, p=0,042). Além disso, 43 membros da família das mulheres HTLV-1 soropositivos foram analisados e reatividade específica foi observada em 32,56%, incluindo duas crianças de gravidez anterior. É muito importante ressaltar que a falta de HTLV-1 de triagem em mulheres grávidas pode promover a transmissão viral especialmente em áreas endêmicas. A triagem em populações vulneráveis e o uso de leite artificial para os filhos de mães soropositivas podem ser importantes métodos de baixo custo para limitar a transmissão vertical. Além disso, nossos dados reforçam a necessidade de estabelecer estratégias de busca ativa em familiares como importante ação de vigilância epidemiológica para a detecção precoce da infecção pelo vírus e para a prevenção da transmissão por contato sexual e/ou parenteral.

**Palavras-chave:** HTLV, Transmissão vertical, Gestantes.



MELLO, Marco Antonio Gomes. HTLV in pregnant women of two cities of southern bahia and evaluation of mother-child transmission. 91 f. il. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

#### **ABSTRACT**

The prevalence of HTLV-1 in Brazil is diverse, depending on both the geographic region and the group analyzed. A study conducted on general population revealed that the prevalence in Salvador was 1.76%. Besides, it was also found that the prevalence was higher amongst women and that the virus was associated with lower education and lower income. As the most frequent pathway of vertical transmission of HTLV-1 is breast-feeding, and considering the higher prevalence in women, it is very important to perform screening examinations for anti-HTLV-1 antibodies as part of routine prenatal care. So far, no studies of HTLV-1 seroprevalence in pregnant women in the Southern region of Bahia, Brazil, have been described. In this study, pregnant women were selected at the two regional reference centers for health care from Southern Bahia. A total of 2766 pregnant women attending the antenatal unit between November 2008 and May 2010 have been analyzed. A standardized questionnaire was applied and all positive plasma samples were tested repeatedly in duplicate and were confirmed by Western blot and PCR. Besides that, positive women were contacted and visited. The family members that were present during the visit were asked to be serologically screened to the virus. A prospective study was also carried out and newborns were followed up to two years for evaluation of vertical transmission. The project was approved by the Ethic Committee of UESC. HTLV-1 infection was assessed by ELISA. HTLV prevalence was 1.05% (CI95%:0.70-1.50). There was no association of HTLV-1 infection with age, education, income and ethnic differences. The association with marital status was borderline (OR=7.99; 95%CI 1.07-59.3; p=0.042). In addition, 43 family members of the HTLV-1 seropositive women have been analyzed and specific reactivity was observed in 32.56%, including two children from previous pregnancy. It is very important to emphasize that the lack of HTLV-1 screening in pregnant women can promote HTLV transmission especially in endemic areas. HTLV screening in this vulnerable population and the promotion of bottle-feeding for children of seropositive mothers could be important cost-effective methods to limit the vertical transmission.

Besides that, our data reinforce the need to establish strategies of active surveillance in household and family contacts as important epidemiological surveillance actions for the early detection of virus infection and the prevention of transmission by sexual or and parenteral contact.

**Key words:** HTLV, Vertical transmission, Pregnant.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	Distribuição geográfica dos principais focos de infecção pelo HTLV-1 (Adaptado de Gessain; Cassar, 2012).....	18
Figura 2	Distribuição do HTLV-1 no Brasil em doadores de sangue (Adaptado de CATALAN-SOARES <i>et al.</i> , 2005).....	19
Figura 3	Estrutura Morfológica do HTLV: desenho esquemático (Adaptado SALEMI, 1999).....	21
Figura 4	Organização genômica do HTLV (Adaptado de MATSUOKA & JEANG, 2007).....	22
Figura 5	Mapa da distribuição dos subtipos do HTLV-1 e os principais modos de disseminação viral pelos movimentos de populações infectadas (Adaptado de Gessain; Cassar, 2012).....	26
Figura 6	Algoritmo para o Diagnóstico Laboratorial de Infecção pelo HTLV-1/2 (Adaptado de Hemominas, 2006)	29

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATL	Leucemia de células T do adulto ( <i>Adult T cell Leukemia</i> )
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ELISA	<i>Enzyme linked Imuno Sorbent Assay</i>
env	Envelope
gag	Grupo antigênico
GLUT-1	Molécula transportadora de glicose
gp21	Glicoproteína 21
gp46	Glicoproteína 46
HBZ	<i>HTLV-1 bZIP factor gene</i>
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana ( <i>Human Immunodeficiency Virus</i> )
HTLV	Vírus Linfotrópico de células T humanas ( <i>Human T cell Lymphotropic virus</i> )
HTLV-1	Vírus Linfotrópico de células T humanas tipo 1 ( <i>Human T cell Lymphotropic virus type 1</i> )
HTLV-2	Vírus Linfotrópico de células T humanas tipo 2 ( <i>Human T cell Lymphotropic virus type 2</i> )
HTLV-3	Vírus Linfotrópico de células T humanas tipo 3 ( <i>Human T cell Lymphotropic virus type 3</i> )
HTLV-4	Vírus Linfotrópico de células T humanas tipo 4 ( <i>Human T cell Lymphotropic virus type 4</i> )
IL-2	Interleucina 2
LTR	Extremidades em repetições longas ( <i>Long Terminal Repeat</i> )
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	Fase de Leitura aberta ( <i>Open Reading Frame</i> )
p12, p30 e p13	Proteínas acessórias
pb	Pares de bases
pol	Polimerase
PTLV	<i>Primate T-cell Leukemya Virus</i>
pX	Região regulatória pX
RBD	Domínio de ligação ao receptor ( <i>Receptor Binding Domain</i> )
RNA	Ácido Ribonucléico
STLV	Vírus linfotrópico de células T em Símios ( <i>Simian T cell Lymphotropic virus</i> )
Tax	Proteína transativadora
TSP/HAM	Paraparesia Espástica Tropical ( <i>Tropical Spastic Paraparesis</i> )/ Mielopatia Associada ao HTLV ( <i>HTLV Associated Myelopathy</i> )
WB	( <i>Western Blot</i> )

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1	<b>Histórico e classificação viral</b>	14
1.2	<b>Epidemiologia do HTLV-1</b>	14
1.2.1	Aspectos gerais	14
1.2.2	Vias de transmissão	15
1.2.3	Distribuição mundial	17
1.2.4	HTLV-1 no Brasil e na Bahia	18
1.3	<b>Estrutura viral e genômica do HTLV-1</b>	20
1.4	<b>Ciclo viral, vias de transmissão célula-célula e tropismo celular</b>	23
1.5	<b>Epidemiologia molecular e origem geográfica.</b>	25
1.6	<b>Manifestações clínicas associadas à infecção pelo HTLV.</b>	27
1.7	<b>Diagnóstico Laboratorial</b>	28
2	<b>JUSTIFICATIVA</b>	30
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	31
3.1	<b>Objetivo Geral</b>	31
3.2	<b>Objetivos Específicos</b>	31
4	<b>RESULTADOS</b>	32
4.1	<b>Capítulo I</b>	33
4.2	<b>Capítulo II – dados complementares</b>	47
4.3	<b>Capítulo III - Artigo relacionado - co-autoria</b>	50
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	70
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	74
7	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	75
8	<b>Anexo I</b> .....	85
9	<b>Anexo II</b> .....	88
10	<b>Anexo III</b> .....	90
11	<b>Anexo IV</b> .....	91

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Histórico e classificação viral

O vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1) é um retrovírus pertencente à família *Retroviridae*, subfamília *Oncovirinae*, e gênero *Deltaretrovirus* e foi o primeiro retrovírus humano identificado. O seu isolamento e identificação ocorreu em 1979, através da cultura de células T primárias, suplementadas com interleucina 2 (IL-2), provenientes de um paciente com linfoma de células T cutâneo (POIESZ *et al.*, 1980). No Brasil, o HTLV-1 foi identificado pela primeira vez em 1986 entre imigrantes japoneses residentes em Campo Grande e Mato Grosso do Sul (KITAGAWA *et al.*, 1986). Dois anos mais tarde do isolamento do HTLV-1, em 1981, o HTLV-2 foi isolado a partir de células leucêmicas descritas como leucemia de células T pilosa (KALYANARAMAN *et al.*, 1982). Além desses dois tipos, foram também identificados em 2005, o HTLV-3 e o HTLV-4, em indivíduos assintomáticos de Camarões (WOLFE *et al.*, 2005; CALATTINI *et al.*, 2005). O HTLV-3 foi descrito por Calattini e colaboradores (2005) e isolado de um pigmeu que tinha contato com primatas não humanos. O HTLV-4 foi descrito por Wolfe e colaboradores (2005) e identificado em um caçador. Os HTLV tipo 1, 2 e 3 se grupam filogeneticamente com o vírus linfotrópico de células T de Símios (STLV-1, STLV-2 e STLV-3, respectivamente), e para o HTLV-4 ainda não foi encontrado o correspondente símio (WOLFE *et al.*, 2005).

### 1.2 Epidemiologia do HTLV

#### 1.2.1 Aspectos gerais

Alguns padrões epidemiológicos podem ser definidos para a infecção pelo HTLV. Primeiramente, há uma tendência à formação de agrupamentos em algumas áreas geográficas do mundo. Como exemplo, pode ser citada a alta prevalência localizada no sudoeste do Japão, enquanto que em outros países da Ásia, como China e

Coréia, não há áreas endêmicas. Segundo, a prevalência aumenta com a idade e é maior no sexo feminino. Para tentar explicar esses fatos, algumas hipóteses foram sugeridas. Em relação à maior prevalência em mulheres, tem-se justificado que a transmissão homem-mulher é mais eficaz (KAJIYAMA *et al.*, 1986; PROIETTI *et al.*, 2005). Além disso, parece não haver uma predisposição genética para adquirir o vírus, porém fatores genéticos devem ser importantes no desenvolvimento de doença. Finalmente, a infecção é mais prevalente em indivíduos de baixa renda e menor nível educacional (MOTA *et al.*, 2007).

### 1.2.2 Vias de transmissão

Dentre as principais formas de transmissão do HTLV-1 estão inclusas a transmissão pela via sexual; a via materno-infantil, especialmente, através da amamentação; e a parenteral (revisado por CATALAN-SOARES *et al.*, 2001; revisado por PROIETTI *et al.*, 2005).

A transmissão parenteral é considerada a forma mais eficiente de transmissão viral. Entretanto, desde novembro de 1993, com a obrigatoriedade do teste de triagem em serviços de hemoterapia de todo o Brasil, através da portaria 1376 do Ministério da Saúde (MS), houve uma importante redução nessa forma de transmissão. Contudo, a transmissão entre usuários de drogas injetáveis ainda é importante, ocorrendo pelo compartilhamento de seringas e agulhas contaminadas com o vírus (CATALAN-SOARES *et al.*, 2001).

Em relação à transmissão pela via sexual, podemos destacar que as mulheres constituem uma população vulnerável para infecções, devido tanto a questões biológicas, como a própria anatomofisiologia do trato geniturinário, quanto às questões relacionadas à fragilidade sócio-econômica e cultural vivenciada pelo gênero feminino. Em um estudo japonês, a probabilidade de transmissão do HTLV-1 do homem para a mulher foi de 60.8%, enquanto que o inverso foi de apenas 0.8% (KAJIYAMA *et al.*, 1986). Fatores como: realização de sexo desprotegido, muitos parceiros sexuais, presença de úlceras genitais e sexo pago estão relacionados a um maior risco (revisado por PROIETTI *et al.*, 2005).

Considerando ainda a população feminina, que é aquela onde há maior prevalência da infecção pelo HTLV, as gestantes constituem um grupo especial, em virtude do próprio período e da possibilidade de transmissão vertical de infecções, de forma congênita, perinatal, ou pós-natal, especialmente pela amamentação. De acordo ainda com HINO (2011), os linfócitos infectados presentes no leite materno sobrevivem à acidez estomacal, constituindo-se assim num importante mecanismo de disseminação do vírus. De fato, para o HTLV, a transmissão pelo leite materno é bem documentada (HINO *et al.*, 1997; PROIETTI *et al.*, 2005, CARNEIRO-PROIETTI *et al.*, 2006) e é a principal forma de transmissão viral através da via vertical.

A transmissão de mãe para filho vem sendo relacionada na literatura com fatores como a carga proviral materna, a carga proviral no leite materno, níveis de anticorpos anti-HTLV, a concordância dos alelos de HLA classe I entre mãe e filho e a duração da amamentação (VAN TIENEN *et al.*, 2012; BIGGAR *et al.*, 2006; MALONEY *et al.*, 2006, *et al.*, WIKTOR *et al.*, 1997). Neste último caso, a exposição contínua a pequenas quantidades de vírus provavelmente contribui para um maior risco de transmissão (LAWRENCE; LAWRENCE, 2004).

Vale destacar que no Japão, um estudo clássico realizado por Hino *et al.*, 1997, demonstrou que a determinação da não amamentação reduziu drasticamente a taxa de transmissão vertical, em torno de 80%. De fato, crianças alimentadas com leite artificial podem se tornar infectadas, porém em uma frequência muito menor, sendo a detecção da infecção viral no pré-natal, a forma mais eficiente de prevenção, já que medidas adicionais podem ser tomadas, como a recomendação de parto cesáreo, juntamente com a recomendação de não amamentar. Em um estudo realizado aqui no Brasil com 41 crianças nascidas de mães HTLV positivas, alimentadas com leite artificial, nenhuma foi infectada. Nesse caso, 81,5% nasceram de parto cesáreo e este fato pode ter contribuído para a ausência de transmissão vertical (BITTENCOURT *et al.*, 2002).



### 1.2.3 Distribuição mundial

Durante muitos anos, a literatura relatava que cerca de 10 a 20 milhões de pessoas no mundo estavam infectadas pelo HTLV-1 (DE THE; BOMFORD, 1993). Quase vinte anos depois, um estudo publicado por GESSAIN; CASSAR, 2012, com base nos dados epidemiológicos de artigos já publicados nas áreas endêmicas para o HTLV-1 e considerando uma população avaliada de aproximadamente um bilhão e meio, reavaliou essa prevalência e estimou que 5 a 10 milhões de indivíduos estivessem infectados com HTLV-1, sendo as regiões geográficas de maior endemicidade no mundo o sudoeste do Japão, países do Caribe, como Jamaica e Trinidad Tobago, países da África subsahariana, bem como áreas do Irã e da Melanésia, e vários países da América do Sul (Figura 1). Entretanto, a estimativa mundial, global, regional e local da prevalência do HTLV-1 ainda continua pouco conhecida devido à interferência de diferentes fatores como: 1) regiões extensas e bem populosas como a Ásia, leste e norte da África, ainda não foram estudadas para infecção do HTLV-1; 2) os testes sorológicos para triagem do HTLV-1, utilizados para avaliar a prevalência do HTLV-1 entre 1980 e 1990, apresentaram uma perda de especificidade o que levou a uma superestimativa da prevalência; 3) a maioria dos estudos realizados para avaliar a prevalência do HTLV-1 tinha como base estudos de série, como estudos em doadores de sangue, gestantes, pacientes hospitalizados, e não estudos de base populacional, que melhor representam o perfil da população geral; 4) outro ponto muito importante é que em muitas áreas já estudadas a distribuição do HTLV-1 não foi homogênea, como visto no sudeste do Japão e em algumas áreas da América do Sul. Nestas regiões foram encontrados pequenos agrupamentos com alta, ou muito alta prevalência de infecção para HTLV-1, enquanto que nas áreas ou localidades próximas às endêmicas, a prevalência não representava uma epidemia (GESSAIN; CASSAR 2012).



Figura 1-Distribuição geográfica dos principais focos de infecção pelo HTLV-1  
(Adaptado de GESSAIN; CASSAR, 2012).

O HTLV-2, por sua vez, é endêmico em grupos indígenas das Américas, sendo também muito prevalente no oeste e centro da África e entre usuários de drogas da América e Europa (revisado por CATALAN-SOARES *et al.*, 2001).

#### 1.2.4 HTLV-1 no Brasil e na Bahia

Estima-se que o Brasil tenha cerca de 2,5 milhões de portadores do vírus, o que representa o maior número absoluto de infecções no mundo (CARNEIRO-PROIETTI *et al.*, 2002). Entretanto, as taxas de prevalência são bastante heterogêneas, e essa variação depende tanto da região geográfica, como do grupo analisado (jovens, gestantes, mulheres, etc.) (CATALAN-SOARES *et al.*, 2001).

A maioria dos estudos sobre HTLV no país foi realizado em grupos específicos, como doadores de sangue, gestantes e usuários de drogas (PROIETTI *et al.*, 2005). Em relação a doadores, um levantamento realizado entre as unidades de banco de sangue da Rede Pública de 27 maiores regiões metropolitanas do país (26 Estados e o Distrito Federal) revelou maiores taxas nas regiões Norte e Nordeste, e menores na

região Sul, variando de 0,04% em Florianópolis, Santa Catarina, a 1,0% em São Luiz, Maranhão (CATALAN-SOARES *et al.*, 2005) (Figura 2). Outro estudo também com doadores de bancos de sangue, encontrou em Salvador a mais alta prevalência do país (1,36%) (GALVÃO-CASTRO *et al.*, 1997). Um dos poucos estudos de base populacional foi realizado por DOURADO *et al.*, 2003, na cidade de Salvador, detectou uma soroprevalência de 1.76% na população geral, alcançando 9.0% em mulheres com idade acima de 50 anos. Além da maior prevalência em mulheres, foi também encontrado que a prevalência estava associada com menores níveis de renda e de educação. A partir da prevalência encontrada pelo estudo de Dourado em 2003, foi estimado que cerca de 50.000 indivíduos estivessem infectados pelo HTLV-1 em Salvador. Vale destacar que muitos não devem sequer ter o conhecimento de que estão infectados.

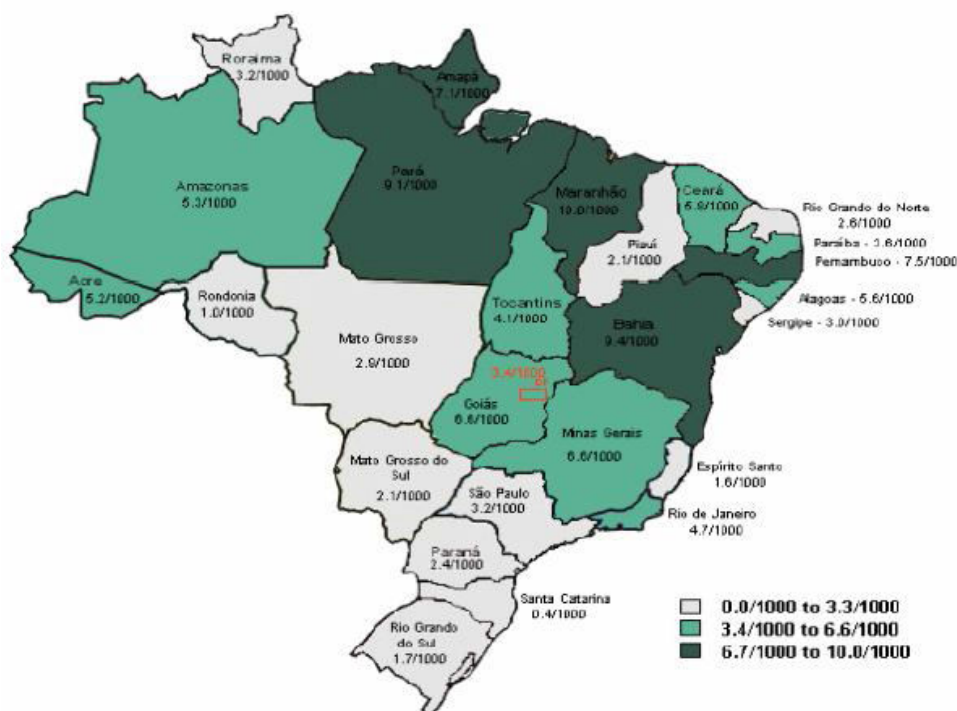


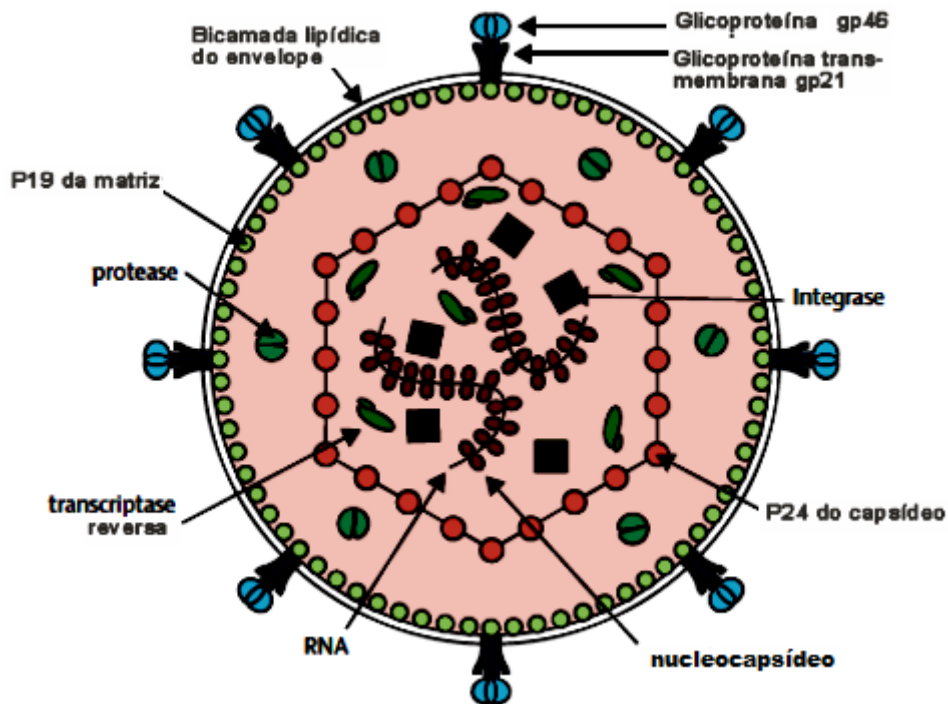
Figura 2: Distribuição do HTLV-1 no Brasil em doadores de sangue (Adaptado de CATALAN-SOARES *et al.*, 2005)

Em relação à prevalência em gestantes, de acordo com os dados do projeto sentinela correspondente ao programa nacional de doenças sexualmente transmissíveis e

AIDS do Ministério da Saúde em 1997, a prevalência nacional de HTLV no grupo das gestantes foi de 0,28%. Entretanto, no estado da Bahia foi encontrado uma prevalência de 0,84% (57 de 6754) em Salvador (BITTENCOURT *et al.*, 2001), e 0,98% na cidade de Cruz das Almas, localizada na área do Recôncavo baiano, a 149 Km de Salvador (4/408) (MAGALHÃES *et al.*, 2008). Vale destacar que essas prevalências encontradas na Bahia são de 3 a 10 vezes maiores do que aquelas encontradas em outras regiões do país (GUIMARÃES DE SOUZA *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2010; DAL FABBRO *et al.*, 2008; OLBRICH, MEIRA, 2004).

### 1.3 Estrutura viral e genômica do HTLV-1

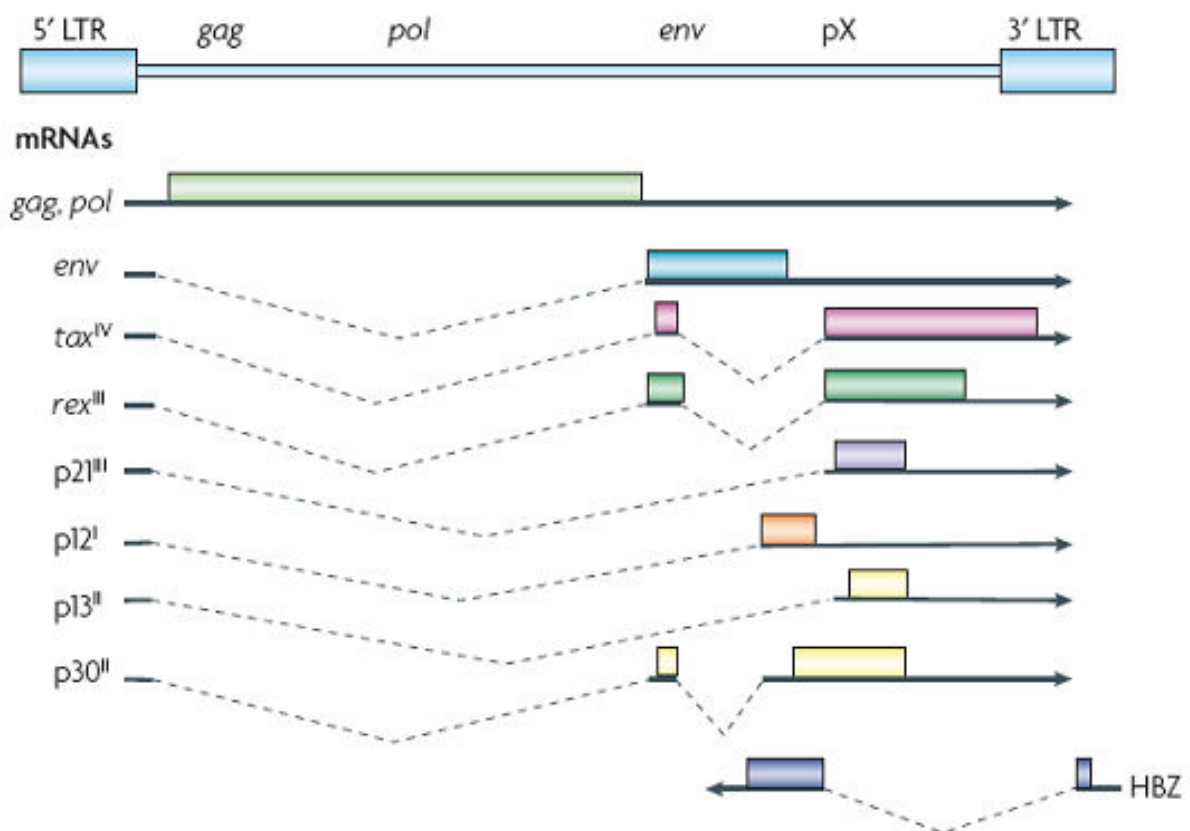
A estrutura viral do HTLV-1 apresenta características semelhantes à do Vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 1 (HIV-1), começando pela sua forma arredondada de aproximadamente 100nm de diâmetro envolvida por um envelope lipoprotéico. Da mesma forma que no HIV, a bicamada lipídica que forma o envelope viral do HTLV se origina das membranas das células hospedeiras, e suas proteínas transmembranas e de superfície são de origem viral. A glicoproteína de superfície (gp46) está envolvida no reconhecimento do receptor celular, enquanto a glicoproteína transmembrana (gp21) ancora a gp46 na superfície do envelope viral e participa nas etapas que sucedem a ligação do vírus no processo de fusão (Figura 3). Estas proteínas do envelope são expressas na superfície da célula infectada e são, portanto, as primeiras partículas a serem reconhecidas pelo hospedeiro no curso da resposta imune e são alvo para potenciais vacinas e melhorias dos testes de diagnóstico. A região da matriz se localiza logo abaixo do envelope viral, e participa na organização dos componentes virais na face interna da membrana. Logo abaixo da matriz encontramos o capsídeo icosaédrico que abriga e protege o ácido ribonucleico (RNA) viral, além das proteínas virais como a protease, a transcriptase reversa, e a integrase, que se encontram organizadas juntas neste nucleocapsídeo (OHTSUKI *et al.*, 1982) (Figura 2).



**Figura 3-Estrutura Morfológica do HTLV: desenho esquemático** (Adaptado de VERDONCK *et al.*, 2007).

O genoma do HTLV é constituído por duas fitas simples de RNA positivo, que durante o ciclo de replicação viral cada fita simples do RNA do vírus será convertida em um ácido desoxirribonucleico (DNA) de fita dupla pela ação da enzima transcriptase reversa. O próximo passo é a integração do DNA de dupla fita ao genoma da célula hospedeira humana, realizado através da ação de outra enzima chamada integrase, originando por fim, o que chama-se de provirus. Além dos genes codificantes de proteínas estruturais e enzimáticas: envelope (*env*), grupo antigênico (*gag*), polimerase (*pol*), encontrados, em todos os retrovírus, e que são responsáveis pela codificação de proteínas e enzimas importantes para a montagem do vírus, podemos destacar tanto no HTLV-1 como no HTLV-2 uma região denominada *pX*, muito importante devido a sua participação na codificação de proteínas regulatórias virais (Figura 3). A região regulatória (*pX*) tem um tamanho de cerca de 2 Kb, e está localizado anteriormente à região de extremidades em repetições longas 3' (LTR3') que flanqueia uma das extremidades do genoma proviral, sendo a extremidade oposta do genoma flanqueada

pela região LTR5'. As regiões LTR são as mais divergentes do genoma e possuem elementos importantes para a expressão dos genes virais (Figura 4). Na região *pX*, são encontradas 4 *open read frame* (ORFs) que codificam importantes proteínas regulatórias e acessórias do HTLV. A proteína transativadora (Tax) codificada pela ORF IV apresenta uma influência muito importante na patogênese do HTLV-1 principalmente devido à sua atuação na ativação de genes celulares, promovendo o aumento da expressão de protooncogenes como (c-fos, c-myc e erg), interleucinas (IL-1, IL-2, IL-3, IL-6), ou seus receptores como IL-2R, dentre outros fatores. A proteína Rex codificada pela ORF III que tem um papel na regulação pós-transcricional. Também são codificadas na região *pX* proteínas adicionais importantes como a p12 codificada pela ORF I, as p13 e p30 codificadas pela ORF II, e a HBZ codificada pela fita negativa (CHEN *et al.*, 1983; CIMINALE *et al.*, 1992) (Figura 3).



**Figura 4 - Organização genômica do HTLV** (Adaptado de MATSUOKA, JEANG, 2007).

Ainda em relação à proteína p12, o fato de ela se ligar às cadeias  $\beta$  e  $\gamma_c$  do receptor de IL-2 impedindo o transporte desse receptor para superfície celular, reforçou a hipótese do papel dessa proteína em modular a via de sinalização intracelular mediado pelos receptores de IL-2 em células infectadas pelo HTLV-1. A participação da proteína Tax em conjunto com a ação da proteína p12, contribui para a proliferação de células T (MULLOY *et al.*, 1996). Além disso, foi verificado que a proliferação e ativação de células T promovida pela proteína p12 podem ser decorrentes do aumento da fosforilação de STAT-5, elevação dos títulos de IL-2, e maior influxo de cálcio para o retículo endoplasmático promovidos por essa proteína (ALBRECHT *et al.*, 2002; NICOT *et al.*, 2001). Outro achado importante relacionado à proteína p12 foi com o sucesso do estabelecimento e manutenção da infecção, visto que, deleções ou mutações nessa proteína resultam na diminuição da infectividade em linfócitos primários quando avaliados *in vitro*, e na diminuição do brotamento viral, fato observado *in vivo* (ALBRECHT *et al.*, 2000; COLLINS *et al.*, 1998).

O HTLV-1 e HTLV-2 apresentam uma estrutura genômica similar e compartilham cerca de 70% de homologia na sua sequência de nucleotídeos. A principal diferença entre o DNA proviral do HTLV-1 com 9.032 pares de base e o DNA proviral do HTLV-2 com 8.952 pares de base, está no gene *pX* responsável pela codificação das proteínas regulatórias e acessórias, onde a similaridade encontrada nesta região entre estes dois tipos virais é de 60% (FEUER, GREEN, 2005).

#### **1.4 Ciclo viral, vias de transmissão célula-célula e tropismo celular**

A primeira etapa do ciclo viral é a interação entre um receptor da célula não infectada e as glicoproteínas de superfície do vírus (adsorção). Após esse reconhecimento, ocorre a ligação do vírus na célula, que se dá entre o domínio de ligação do receptor (RBD), localizado na glicoproteína de superfície viral, e o receptor celular (COSKUN, SUTTON, 2005). Já foi demonstrado que o HTLV é capaz de utilizar, como receptores para entrar na célula, o transportador de glicose do tipo 1 (GLUT-1) (COSKUN, SUTTON, 2005), a heparan sulfato (OKUMA *et al.*, 2003; JONES *et al.*, 2005) e a neurofilina (LAMBERT *et al.*, 2009; GHEZ *et al.*, 2010). Após

a ligação com o receptor, ocorrem modificações conformacionais na glicoproteína transmembranar levando a fusão entre o envelope viral e a membrana celular, e subsequente internalização do capsídeo. Posteriormente, via transcriptase reversa, há uma transcrição reversa, de RNA para DNA, e o material genético do vírus é incorporado ao genoma celular pela ação da integrase, formando um provírus. Quando há a ativação da célula, o provírus é transcrito e o RNA transportado para o citoplasma, onde será traduzido (SEIKI *et al.*, 1983; FRANKEL *et al.*, 1998). As proteínas formadas, juntamente com os RNAs recém-sintetizados, migram para os sítios de maturação na membrana celular, formando vírus imaturos. Novas partículas virais são então formadas e saem da célula hospedeira por brotamento (PETERLIN & TRONO *et al.*, 2003; LAIRMORE *et al.*, 2011).

Acredita-se que no início da infecção, o aumento do número de células infectadas se dê através do contato célula a célula, a partir do reconhecimento dos receptores celulares citados acima, e que mais tarde o HTLV persista por expansão clonal (PIQUE; JONES, 2012). Em relação às vias de transmissão viral por meio de contato célula-célula, algumas formas têm sido descritas para o HTLV, dentre elas: (1) sinapse virológica; (2) transmissão por filapódios, nano tubos ou conduítes; (3) transmissão a partir de partículas virais aderidas a membrana de células infectadas dentro de estruturas semelhantes aos biofilmes; (4) transmissão a partir de células apresentadoras de antígeno, especialmente células dendríticas. Em relação ao tropismo celular, o HTLV-1 tem tropismo por linfócitos T, sendo rapidamente detectado *in vivo* em linfócitos T CD4+ tanto em indivíduos assintomáticos como naqueles sintomáticos. Os linfócitos T CD4+ são, portanto, os principais reservatórios deste vírus, mas tropismo, *in vivo*, por outros tipos celulares, como: células da linhagem hematopoiética (linfócitos T CD8+, monócitos, macrófagos, linfócitos B, megacariócitos, células dendríticas), bem como células da glia (astrócitos e células da micróglia), já foi demonstrado (MANEL *et al.*, 2005).

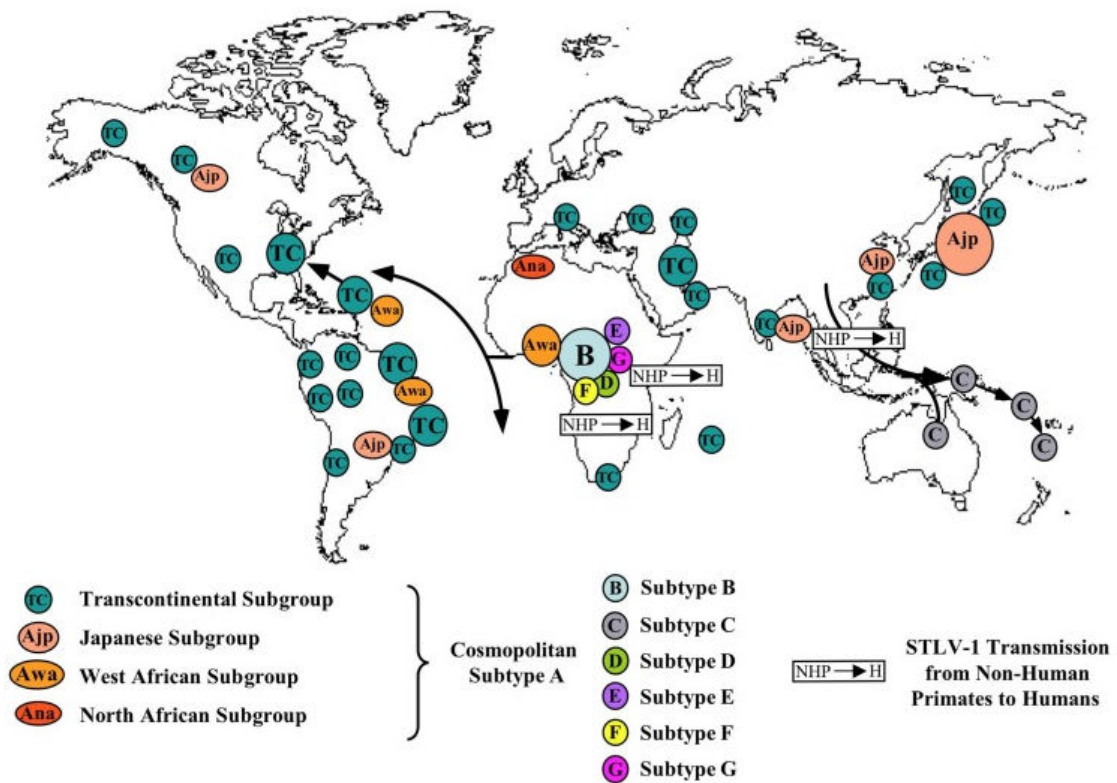


### 1.5 Epidemiologia molecular e origem geográfica.

O HTLV apresenta uma alta estabilidade genética, resultante especialmente da forma de proliferação viral que é principalmente por expansão clonal das células infectadas, muito mais do que pela infecção de novas células (GESSAIN *et al.*, 1992). Outro ponto importante refere-se à origem e dispersão do HTLV pelo mundo. As transmissões e dispersões virais, incluindo do HTLV, encontram-se intimamente relacionadas com as migrações e características étnico-geográficas das populações humanas. Alguns trabalhos sugerem que o HTLV tenha vindo junto com o comércio de escravos da África para a Bahia no período pós-colonial (MIURA *et al.*, 1994, VAN DOOREN *et al.*, 1998, YAMASHITA *et al.*, 1999, ALCANTARA *et al.*, 2003). Na cidade de Salvador, o HTLV-1 circulante pertence ao subgrupo transcontinental subtipo cosmopolita (ALCANTARA *et al.*, 2006; MOTA *et al.*, 2007), que representa o subgrupo e subtipo mais frequente em todo mundo.

Em relação à classificação do HTLV em subtipos, a partir das diferenças filogenéticas encontradas nos vírus circulantes em diversas regiões do mundo, considerando as regiões genômica mais variáveis do vírus (região *LTR* e *env*), foi possível classificar o HTLV-1 em sete subtipos (Figura 5): o subtipo **Ia** conhecido também como cosmopolita por ser endêmico em diferentes regiões geográficas na Europa, Sul da América do Norte e na América do Sul, onde se inclui o Brasil; subtipo **Ib** chamado de centro-africano; subtipo **Ic** ou melanésico, endêmico na Austrália em Papua na Nova Guiné; subtipo **Id** encontrado em pigmeus de Camarões e em um indivíduo do Gabão; **Ie** encontrado no congo; **If** encontrado em um indivíduo no Gabão; e o subtipo **Ig** encontrado em Camarões. Dentre esses, o subtipo **Ia** ou cosmopolita encontrasse dividido em cinco subgrupos de acordo com a região geográfica de origem: subgrupo **A** ou transcontinental; **B** – Japonês; **C** – do Oeste africano, **D** – Norte africano; **E** – Peru (VANDAMME *et al.*, 1998<sub>a</sub>; VAN DOOREN, *et al.*, 2001; VAN DOOREN, *et al.*, 2005).

Figura 5. Mapa da distribuição dos subtipos do HTLV-1 e os principais modos de disseminação viral pelos movimentos de populações infectadas (Adaptado de



GESSAIN; CASSAR, 2012).

Já o HTLV-2, está classificado em 4 subtipos com base em análises filogenéticas das regiões de *env* e *LTR*. O subtipo **a** encontrado nos Estados Unidos e norte da Europa; o **b** encontrado no Panamá, Colômbia, Argentina, e sul da Europa; o **c** que é decorrente de variante brasileira que apresenta uma relação filogenética com o subtipo **a** e fenotípica com o subtipo **b**, e o subtipo **d** encontrado em pigmeus da República Democrática do Congo (VANDAMME *et al.*, 1998<sub>b</sub>; HALL *et al.*, 1992; EIRAKU *et al.*, 1996).

## 1.6 Manifestações clínicas associadas à infecção pelo HTLV.

Quando avaliamos a participação dos HTLV-1 e HTLV-2 com relação às causas de doenças, fica clara a forte influência do HTLV-1 com a maioria das associações patológicas envolvendo este tipo de infecção viral. As patologias mais frequentes decorrentes da infecção pelo HTLV-1 são: a Leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL) (POIESZ *et al.*, 1980), paraparesia espástica tropical-mielopatia associada ao HTLV (TSP/HAM) (GESSAIN *et al.*, 1985; OSAME *et al.*, 1986), uveíte (MOCHIZUKI *et al.*, 1996) e dermatite infectiva (LA GRENADÉ *et al.*, 1998) sendo a ATL e a TSP/HAM as manifestações clínicas mais relevantes relacionados ao vírus. Outras patologias também têm sido vista em associação com a infecção pelo HTLV-1, como artrites (CRUZ *et al.*, 2005), síndrome de Sjogren (NAKAMURA *et al.*, 2000), tireoiditis, artropatias, polimiositis, e algumas infecções como estrogiloidíase, escabiose, e tuberculose (PROIETT *et al.*, 2005).

O risco para desenvolver TSP/HAM varia de 0,3 a 4%, e para o desenvolvimento de ATL o risco está calculado entre 1 a 5% dos indivíduos. Em relação às outras doenças associadas em geral, incluindo TSP/HAM, ATL, uveítis, polimiositis, e artropatias, o risco é de 10% para o desenvolvimento de alguma delas (MALONEY *et al.*, 1998; KITAJIMA *et al.*, 1989; NISHIOKA *et al.*, 1989).

A associação de doenças com a infecção pelo HTLV-2 não é tão frequente quando comparada ao HTLV-1. Alguns autores sugerem que os portadores do HTLV-2 apresentam uma maior predisposição às infecções bacterianas, quando associado ao aumento de pneumonia e bronquite (ROUCOUX, MURPHY, 2004). Já o estudo publicado por Yamamoto e colaboradores em 2008, sugere a associação entre a infecção pelo HTLV-2 e alguns casos raros de leucemia de células pilosas. Em 2004 foi descrito por Araujo e Hall que o HTLV-2 estava associado a doenças neurológicas semelhantes à HAM/TSP. Entretanto, ainda é muito controverso na literatura se o HTLV-2 está associado a alguma patologia.

Em relação do HTLV-3 e HTLV-4, até então, não há relatos na literatura da relação do HTLV-3 e HTLV-4 com doenças em humanos.

## 1.7 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico para infecção por HTLV-1/2 primeiramente é realizado com base em ensaios imunoenzimáticos para avaliar a presença de anticorpos no soro ou plasmas dos indivíduos contra proteínas estruturais do vírus compreendendo os genes (*env*, *gag* e *pol*). A primeira etapa compreende a fase de triagem onde são realizados ensaios sorológicos com alta sensibilidade para anticorpos contra proteínas do HTLV-1/2, visto que, esses dois vírus apresentam uma similaridade de 65% no seu conjunto protéico, porém, nesta etapa não é possível discriminar qual dos tipos de HTLV é o responsável pela infecção, apenas podemos saber se a amostra foi ou não reagente para HTLV. Nesta fase o teste mais utilizado é o ensaio imunoenzimático (ELISA) a partir do lisado viral e de proteínas recombinantes do HTLV-1 e HTLV-2, podendo também ser realizadas as reações de aglutinação em partículas de látex ou gelatina sensibilizada com antígenos virais inativos. As amostras que forem reagentes nesta etapa de triagem deverão ser confirmadas através de testes de caráter confirmatório, mais específicos, o que nos permite excluir os resultados falsamente positivos.

Para a etapa confirmatória dispomos de ensaios sorológicos e moleculares (Figura 6). Dentre os sorológicos, o mais realizado é o Western Blot (WB) que identifica anticorpos específicos para proteínas do HTLV-1 e HTLV-2. Neste teste proteínas do lisado viral, acrescidas das glicoproteínas recombinantes rgp46-I e rgp46-II, são separadas por eletroforese com base no seu peso molecular e transferidas para uma fita de nitrocelulose. Os anticorpos específicos que estiverem presentes no soro ou plasma irão reagir frente às diferentes proteínas separadas pelo peso molecular que constam na fita. A reação específica será revelada com a formação de uma mancha ou banda escura no local de cada proteína em que houve a identificação pelo anticorpo específico. A presença de banda ou mancha no local das glicoproteínas recombinantes rgp46-I ou rgp46-II na fita de nitrocelulose é o que permite identificar qual o tipo de HTLV (1 ou 2) que promoveu a infecção. Outra possibilidade é o ensaio de imunofluorescência indireta, que é utilizada em alguns laboratórios de pesquisa. Nesta técnica é feita uma diluição seriada do soro de cada amostra que será testado para presença de anticorpos frente a células da linhagem infectadas com HTLV-1 (MT-2) e HTLV-2 (Mo-t) fixadas em lâminas, e avaliadas a presença de fluorescência em

microscopia de fluorescência. A grande vantagem desta técnica é a sua especificidade juntamente com o seu baixo custo, porém, como desvantagem não é recomendada para testes em larga escala porque pode gerar subjetividade na interpretação dos resultados.

Nas situações com resultado indeterminado pelo Western blot, temos como alternativa a reação da polimerase em cadeia (PCR), que é um teste molecular confirmatório, podendo identificar qual o tipo de HTLV (1 ou 2) é o responsável pela infecção. Pelo fato da infecção por HTLV ter como característica baixa carga viral sanguínea, essa reação se destina a avaliar a presença do DNA proviral nas células mononucleares do sangue periférico. A utilização de *primers* ou iniciadores específicos para HTLV-1 ou HTLV-2 para amplificação dos fragmentos genômicos é o que nos permite ter um diagnóstico diferencial entre HTLV-1 e HTLV-2. A leitura da reação é realizada através de eletroforese e em gel de agarose corado com brometo de etídio ou corante comercial *blue green* e visualização sob luz ultravioleta. Essa técnica é a recomendada para indivíduos que apresentem alguma deficiência no sistema imune com relação à produção de anticorpos, e também para avaliação da transmissão vertical em crianças com menos de 2 anos.

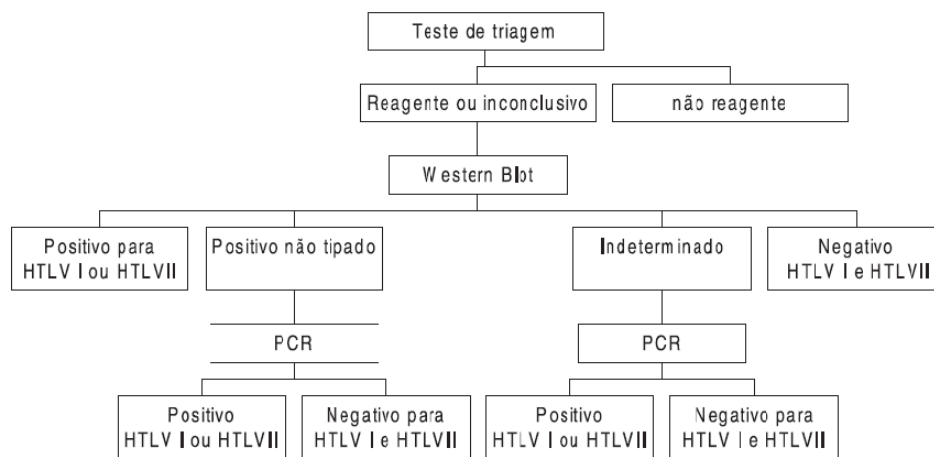


Figura 6: Algoritmo para o Diagnóstico Laboratorial de Infecção pelo HTLV-1/2 (Adaptado de HEMOMINAS, 2006)

## 2. JUSTIFICATIVA

Apesar da alta prevalência do HTLV em Salvador, e das semelhanças de colonização e do perfil turístico entre esta cidade e a região de Ilhéus, até o momento não temos qualquer informação sobre a prevalência desse vírus nesta região. De acordo com esse contexto, a determinação da prevalência deste vírus em gestantes na região sul da Bahia é extremamente importante, especificamente nas cidades de Ilhéus e Itabuna, que apresentam uma população de aproximadamente 250 mil habitantes cada, além de serem cidades de apoio para vários municípios vizinhos. Vale destacar que a prevalência da infecção pelo HTLV-1 está associada com menores níveis socioeconômicos e de educação, e que, infelizmente, o rastreamento sorológico para este patógeno, embora já tenha se tornado obrigatório pelo ministério da saúde, desde 1993 para os casos de transfusão de sangue, ainda não se faz obrigatório no pré-natal, sendo apenas preconizado, o que possibilita que muitas maternidades não o incluam na lista de exames solicitados no pré-natal. Além disso, em áreas endêmicas para HTLV-1, aproximadamente 25% das crianças amamentadas, nascidas de mães soropositivas, adquirem a infecção, enquanto que na situação de não amamentação, apenas 5% das crianças podem adquirir a infecção (revisado por BITTENCOURT, 1998). Vale destacar, que embora as patologias associadas ao HTLV-1 se manifestem em cerca de 10% dos indivíduos infectados, não há vacina para prevenir a infecção, nem tratamento satisfatório ou qualquer método aceitável para medir ou determinar o risco de doença. Outros fatores extremamente importantes são: a prevalência da infecção é maior em mulheres; o risco de transmissão pela amamentação parece ser mais importante do que pela transmissão intra-uterina ou perinatal (ANDO *et al.*, 2003) e a cada mamada a criança fica mais exposta a adquirir o vírus, o que pode ocorrer tanto através das mães sintomáticas, quanto das assintomáticas (WIKTOR *et al.*, 1997). Finalmente, esse estudo possibilitará avaliar o perfil desta infecção nas gestantes dessa região, além de, fornecer dados que podem ser usados para minimizar os riscos de infecção materno-infantil, possibilitando que intervenções e medidas de educação em saúde sejam implementadas.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Determinar a soroprevalência e identificar fatores relacionados à infecção e transmissão do HTLV em gestantes atendidas na Maternidade Santa Helena em Ilhéus, e Hospital e Maternidade Manoel Novaes em Itabuna, Bahia, no período entre novembro de 2008 a maio de 2010.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 3.2.1** Determinar a prevalência do HTLV na população de gestantes nas cidades de Ilhéus e Itabuna;
- 3.2.2** Comparar os grupos: soropositivas e soronegativas, quanto ao número de filhos, média de idade, renda mensal, escolaridade, local de residência, outras infecções e etnia autodeclarada;
- 3.2.3** Verificar a prevalência do HTLV-1 em familiares das gestantes HTLV-1 positivas, incluindo parceiros, genitores e outros filhos, a fim de avaliar vias de transmissão viral;
- 3.2.4** Determinar a carga proviral nas mães infectadas e verificar a relação posterior com transmissão materno-fetal (avaliar carga proviral nos filhos soropositivos);
- 3.2.5** Subtipar o HTLV nas mães infectadas, a partir da região LTR;

## 4. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho estão divididos em três seções subsequentes:

- 4.1 Capítulo I referente ao artigo científico submetido contendo os resultados de soroprevalência nas gestantes, comparação entre soropositivas e negativas em relação a variáveis sócio demográficas e comportamentais e da soroprevalência nos familiares avaliados.
- 4.2 Capítulo II referente a dados complementares contendo os dados de carga proviral e dados da subtipagem.
- 4.3 Artigo relacionado com o trabalho de Tese, com co-autoria, que teve como objetivo determinar a origem e circulação do HTLV no sul da Bahia, bem como a ancestralidade genômica das gestantes positivas identificadas no estudo de soroprevalência, submetido em outubro de 2013 ao periódico AIDS Research and Human Retroviruses (anexo)



**Capítulo I.****HTLV-1 in pregnant women from the Southern Bahia, Brazil: a neglected condition despite the high prevalence**

Marco Antônio Gomes Mello<sup>1,2</sup>

Email: magmello@hotmail.com

Aline Ferreira da Conceição<sup>3</sup>

Email: nineferreira@uol.com.br

Sandra Mara Bispo Sousa<sup>4</sup>

Email: marasbs@yahoo.com.br

Luiz Carlos Alcântara<sup>5</sup>

Email: lalcan@bahia.fiocruz.br

Lauro Juliano Marin<sup>3</sup>

Email: lajumarin@hotmail.com

Mônica Regina da Silva Raiol<sup>3</sup>

Email: monkaregina@yahoo.com.br

Ney Boa-Sorte<sup>6</sup>

Email: neyboasorte@gmail.com

Lucas Pereira Souza Santos<sup>3</sup>

Email: lucasuesc@hotmail.com

Maria da Conceição Chagas de Almeida<sup>7</sup>

Email: conceicao@bahia.fiocruz.br

Tâmara Coutinho Galvão<sup>3</sup>

Email: tamarauescbiomed@yahoo.com.br

Raquel Gois Bastos<sup>3</sup>

Email: quelbastos@hotmail.com

Noilson Lázaro<sup>1,6</sup>

Email: noilsongonalves@yahoo.com.br

Bernardo Galvão-Castro<sup>1,6</sup>

Email: bgalvao@bahia.fiocruz.br

Sandra Rocha Gadelha<sup>3\*</sup>

\* Corresponding author

Email: sandragadelha@hotmail.com

<sup>1</sup> LASP/CPqGM/FIOCRUZ, Salvador, Bahia, Brazil

<sup>2</sup> Faculdade de Ilhéus, Ilhéus, Bahia, Brazil

<sup>3</sup> Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Ilhéus-Itabuna Km 16–Salobrinho, Ilhéus, Bahia, Brazil

<sup>4</sup> Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, Bahia, Brazil

<sup>5</sup> LHGB/CPqGM/FIOCRUZ, Salvador, Bahia, Brazil

<sup>6</sup> Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, Bahia, Brazil

<sup>7</sup> LEMB/CPqGM/FIOCRUZ, Salvador, Bahia, Brazil

## **Abstract**

### **Background**

As the most frequent pathway of vertical transmission of HTLV-1 is breast-feeding, and considering the higher prevalence in women, it is very important to perform screening examinations for anti-HTLV-1 antibodies as part of routine prenatal care. So far, no studies of HTLV-1 seroprevalence in pregnant women in the Southern region of Bahia, Brazil, have been described.

### **Methods**

Pregnant women were selected at the two regional reference centers for health care from Southern Bahia. A total of 2766 pregnant women attending the antenatal unit between November 2008 and May 2010 have been analyzed. An extra blood sample was drawn during their routine antenatal testing. A standardized questionnaire was applied and all positive plasma samples were tested by ELISA and were confirmed by Western Blot and PCR. Besides that, positive women were contacted and visited. The family members that were present during the visit were asked to be serologically screened to the virus. A prospective study was also carried out and newborns were followed up to two years for evaluation of vertical transmission.

### **Results**

HTLV prevalence was 1.05% (CI95%:0.70-1.50). There was no association of HTLV-1 infection with age, education, income and ethnic differences. The association with marital status was borderline (OR = 7.99; 95%CI 1.07-59.3; p = 0.042). In addition, 43 family members of the HTLV-1 seropositive women have been analyzed and specific reactivity was observed in 32.56%, including two children from previous pregnancy.

Conclusion: It is very important to emphasize that the lack of HTLV-1 screening in pregnant women can promote HTLV transmission especially in endemic areas. HTLV screening in this vulnerable population and the promotion of bottle-feeding for children of seropositive mothers could be important cost-effective methods to limit the vertical transmission. Besides that, our data reinforce the need to establish strategies of active surveillance in household and family contacts as important epidemiological surveillance actions for the early detection of virus infection and the prevention of transmission by sexual or and parenteral contact.

## Keywords

HTLV, Bahia-Brazil, Vertical transmission, Pregnant, Prenatal care

## Background

It has recently been estimated that about 5 to 10 million people can be infected worldwide with HTLV [1]. However, as many regions in the world have no data, this value can be underestimated. Nevertheless, Brazil is undoubtedly an endemic area for this virus despite the fact that the worldwide distribution is not homogeneous [2] depending upon the geographic region and the analyzed group [3]. Salvador/Bahia is an area of important prevalence, according to two classical studies: one involving blood donors, and that showed that Salvador has the highest prevalence of Brazil (1.36%) [4] and another involving the overall population from Salvador, which detected a prevalence of 1.76% (reaching 8.4% in women aged 51 years or above) [5]. Besides the higher prevalence in women, the virus was associated with lower education and lower income levels [5], as well as areas with the worst indicators of socioeconomic position [6].

HTLV-1 transmission occurs from mother to child, predominantly through breastfeeding, via sexual intercourse, or through transfusion of cellular blood components [7]. The efficiency of HTLV-1 transmission is related to the route of transmission. The parenteral route (by transfusion or needles sharing) is the most efficient route of transmission. The risk of seroconversion after a transfusion may reach 60% [8]. In the sexual transmission, the infection is more efficient from males to females. In 10 years the risk can be 61% in this direction and only 0.4% in the reverse direction, ie, from women to men [9]. In the vertical transmission, the most frequent pathway of HTLV-1 transmission occurs via breastfeeding, and the risk of infection has been correlated with the provirus load in breastmilk, the concordance of HLA class-I type between mother and child, and the duration of breastfeeding [10-12].

The higher prevalence in women and the possibility of mother-to-child transmission reinforce that it is very important to perform screening for anti-HTLV-1 antibodies during prenatal care and take measures to avoid or, at least, to decrease the risks of transmission. In fact, postnatal infection by breastfeeding seems to play the most important role in vertical transmission; thus, seropositive mothers have been counseled to avoid breastfeeding [7,13,14]. In Japan, the refraining of breast-feeding conducted by HTLV-1 positive mothers dramatically reduced vertical transmission [14]. In point of fact, it has been suggested that preventing mother-to-child transmission would probably have the most significant impact on the occurrence of HTLV-1-associated diseases [15].

In addition, different clinical manifestation related to HTLV-1, such as: infective dermatitis (IDH), adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL), and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) occur in individuals who have been vertically infected [16-18].

In relation to the rate of HTLV-1 infection in pregnant women from Brazil, the prevalence is diverse and heterogenous. In Salvador, Bahia state, it was found 0.84% and 0.88% [18,19] and 0.98% in the town of Cruz das Almas, which is located in the Recôncavo area, 149 Km west from Salvador (4/408) [21]. Nevertheless, these mentioned prevalences are at least three to ten times higher than in other regions of the country [6,22-24].

Ilhéus and Itabuna are the biggest cities in Southern Bahia and are references in health services, treating people from different cities in this region. So far, no studies concerning HTLV-1 seroprevalence amongst pregnant/puerperal women from Southern Bahia have been described. Also considering the importance of these two cities and the high prevalence of HTLV both in Salvador as in other small and mid-sized cities from Bahia, we have decided to evaluate the frequency of this infection amongst women treated at the antenatal units of the two of the largest regional hospitals—one located in Ilheus and the other in Itabuna. In addition, the clinical and epidemiological data of the HTLV-1 positive women were compared with data from a group of HTLV-1 seronegative women. We have also tested HTLV infection in family members of the seropositive women so as to evaluate the possible routes of transmission.

## Results

A total of 2766 pregnant women treated at the antenatal unit between November 2008 and May 2010 were analyzed. Twenty nine pregnant women (1.05%; CI95%:0.70-1.50) were HTLV-1 positive, as confirmed by Western blot and PCR. Five of 2766 pregnant women assessed were positive by ELISA and negative after performing the Western Blot, giving a rate of 0.18% of false positive. It was verified one co-infection with HIV and no co-infection with *Treponema pallidum*. Their general prevalences were, respectively, 0.22% (CI95%:0.08-0.48) and 0.47% (CI95%:0.52-0.80).

All of the 29 HTLV-1 positives were found to be asymptomatic. As regards the place of residence, the city with more cases was Ilheus (n = 14), followed by Itabuna (n = 05). Besides, there have been two cases in Itacaré and one case in the following cities: Coaraci, Wenceslau Guimarães, Uruçuca, Itororó, Camamu, Iguai, Una and Canavieiras. Amongst the HTLV-positive women, 83.3% reported to be brown, 70.8% were illiterate, and 69% said to receive less than 1 minimum Brazilian wage per month. Only one had received a blood transfusion and, importantly, all HTLV-1 positive women who had another child breastfed him/her. Despite the fact that these women were in the pre-partum room, only two of them have been informed to be HTLV-seropositive during the prenatal care. In these cases, women were advised to have a cesarean delivery and not to breastfeed. Table 1 presents a bivariate analysis for the association of HTLV-1 infection with demographic and social variables. It was found an association with marital status. Yet, the association was not accurate (OR = 7.99; 95%CI 1.08-59.31; p = 0.042). As for the other variables, no statistically significant association has been detected.

**Table 1 Analysis for HTLV-1 positive and HTLV-1 negative pregnant women**

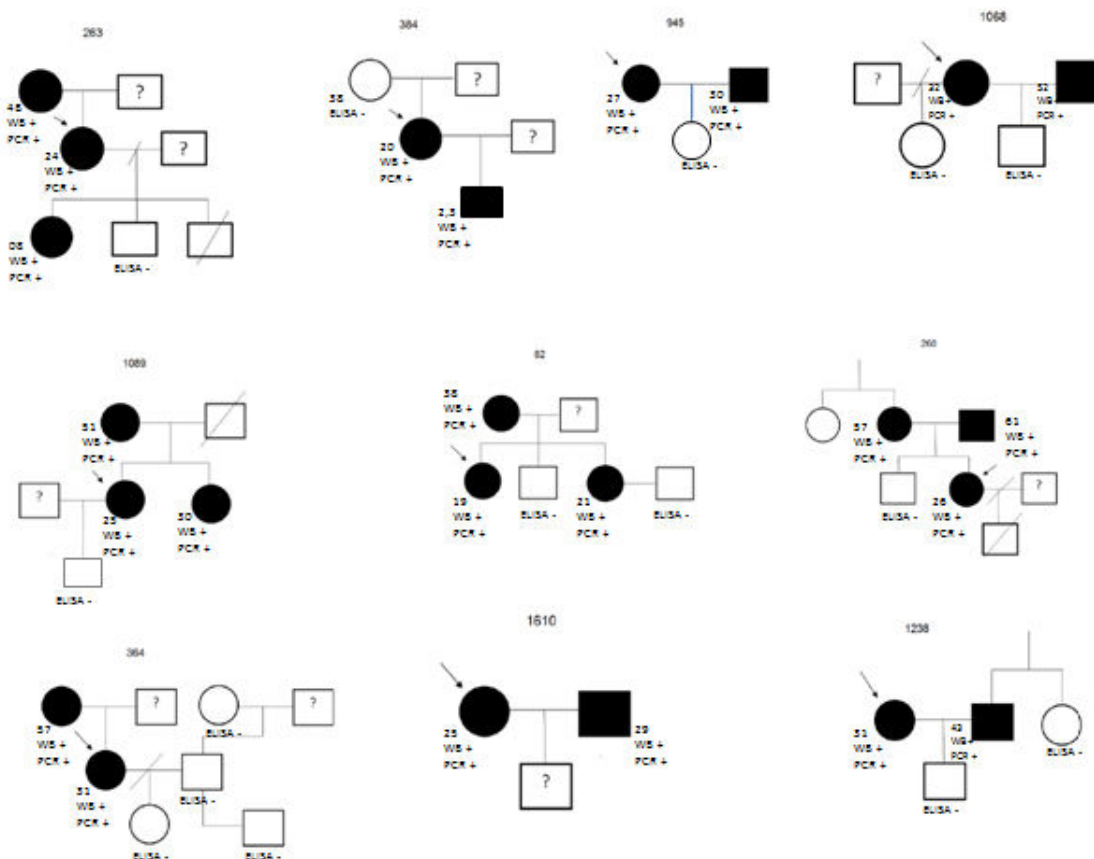
Variable	HTLV-positive N (%)	HTLV-negative N (%)	Odds ratio	95% confidence Interval
<b>Age (years)</b>				
9-19	04 (16.7)	718 (26.3)	1.00	-
20-29	18 (75.0)	1504 (55.2)	2.15	0.72-6.37
> 30	02 (8.3)	504 (18.5)	0.71	0.12-3.90
Total (N)	24	2726		
<b>Literacy</b>				
Illiterate	17 (70.8)	1771(64.8)	1.30	0.55-3.20
Literate	07 (29.2)	964 (35.2)	1.00	-
Total (N)	24	2735		
<b>Skin color</b>				
White	02 (8.3)	329 (12.0)	1.00	-
Black	02 (8.3)	687 (25.1)	0.48	0.67-3.41
Brown	20 (83.4)	1623 (59.3)	2.02	0.47-8.71
Yellow	No cases	97 (3.6)	-	-
Total (N)	24	2736		
<b>Income*</b>				
<1.0 mw	20 (69.0)	1773 (65.2)	0.46	0.11-1.85
1-2 mw	03 (10.3)	493 (18.1)	0.85	0.34-2.14
>2 mw	06 (20.7)	455 (16.7)	1.00	-
Total (N)	29	2721		
<b>Marital status</b>				

Married	01 (4.2)	706 (25.8)	1.00	-
Single/Divorced/Widow	23 (95.8)	2031(74.2)	7.99	1.07-59.3
Total (N)	24	2737		
Stable partner				
Yes	18 (75.0)	2402 (87.8)	1.00	-
No	06 (25.0)	334 (12.2)	2.40	0.94 – 6.08
Total (N)	24	2736		
History of blood transfusion				
Yes	01 (4.2)	93 (3.4)	1.20	0.16-9.24
No	23 (95.8)	2641 (96.6)	1.00	-
Total (N)	24	2734		
Alcohol use				
Yes	04 (16.7)	479 (17.5)	0.94	0.32-2.77
No	20 (83.3)	2258 (82.5)	1.00	-
Total (N)	24	2737		
Smoking				
Yes	01 (4.2)	164 (6.0)	0.68	0.91-5.08
No	23 (95.8)	2573 (94.0)	1.00	-
Total (N)	24	2737		
Tattoo or piercing				
Yes	04 (16.7)	612 (22.4)	0.69	0.23-2.03
No	20 (83.3)	2120 (77.6)	1.00	-
Total (N)	24	2732		

\* mw, minimum Brazilian wages per month.

We have been able to visit 21 women, one of which refused to continue in the study. In this opportunity, samples from 43 family members of the HTLV-1 seropositive women have been collected, including: partner (n = 10), mother (n = 8), father (n = 2), sister (n = 2), brother (n = 2), children of previous pregnancies (n = 15) and others (n = 4). Specific reactivity was observed in 14/43 ( $\approx 32.6\%$ ) individuals. Among these cases, two were children (1 son and 1 daughter—2.3 and 8 years old, respectively) of previous pregnancies from two HTLV-1 positive mothers. The other HTLV-1 seropositives were: 5 mothers, 1 father, 4 partners, 2 sisters (Figure 1). In one case, we had three generations of HTLV-1 infected by the virus (Figure 1). Moreover, half in the evaluated families (10/20) had at least one relative HTLV-1 seropositive.

**Figure 1** Pedigrees of ten families who had at least one member infected by HTLV. HTLV-1-infected and uninfected subjects are shown in black and white, respectively. The arrow indicates the proband in each family. The age of each individual HTLV-1 positive is next to their respective symbols.



## Discussion

In this study, the overall analyses of 2766 pregnant women revealed a prevalence of 1.05%. Previous studies in endemic areas of Brazil have found a similar prevalence [19,24] demonstrating that Southern Bahia is another region where the virus circulates with a prevalence much higher than in other regions of the country—at least three to ten times higher [6,21-23]. Additionally, this prevalence was much higher than the prevalence of HIV (0.22%—CI95%:0.08-0.48) and *Treponema pallidum* (0.47%—

CI95%:0.52-0.80) in the analyzed population. It is noteworthy that prevalence rates for these two microorganisms can still be overestimated, since they were calculated from the results of rapid test for HIV and Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) for *Treponema pallidum*. In the case of HTLV, all samples were subjected to confirmatory tests.

As we are studying a specific group, the results probably do not represent the overall population. However, in a study comparing data from specific populations (injecting drug users, blood donors and pregnant women), Hlela et al., have suggested that blood donors and pregnant women in Southern America and the Caribbean may be more representative of the general population and can therefore be suitable for estimating prevalence in these regions [25]. In fact, even though the prevalence rates in pregnant women do not represent the overall population, they are very important because the virus can be transmitted to children during pregnancy and, most importantly, during the breastfeeding process. Besides that, different clinical manifestations related to HTLV-1, such as: infective dermatitis (IDH), adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL), HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) occur in individuals who have been vertically infected [16].

Accordingly, it has been suggested that the detection of HTLV infection through prenatal or neonatal screening can be fundamental in sub-areas with high seropositivity rates, permitting to take preventive measures to reduce vertical transmission [6]. A classical study has demonstrated that the refraining of breast-feeding for HTLV-1 positive mothers has dramatically reduced vertical transmission in Japan [14]. Nonetheless, bottle-fed children can also become vertically infected in much lower frequencies. Then, the prenatal detection is more effective for prevention, whereas additional measures such as an elective cesarean in HTLV-positive pregnant can be taken. In a previous study involving forty-one bottle-fed children from Brazil, no case of vertical transmission was observed. In this case, 81.5% of the children were born by an elective cesarean section and this fact may have contributed to the absence of transmission [26].

In relation of the route of transmission, it was suggested that, in Salvador, the infections have been acquired via breastfeeding, and, in second place, sexually. In this study, the analysis of HTLV-1 serology in relatives, partners and children of previous pregnancies of the index case (pregnant) has revealed HTLV-1 positive cases in different family members, highlighting partners, mothers and children (1 son and 1 daughter—2.3 and 8 years old, respectively). Therefore, it can be assumed that the virus infection in Southern Bahia can be spread both sexually and vertically. In fact, both routes of transmission have been related to HTLV in endemic areas [27]. In addition, it is noteworthy that the two mentioned HTLV-positive children were breastfed. In this study, all of the HTLV-positive women contacted were advised not to breastfeed and the newborns were followed up to two years. Until that time, no positive case has been detected by PCR. Nonetheless, it has been argued that it is necessary to keep in mind that, in developed countries, the advice of not breastfeeding should be made carefully, because the health risk of early weaning can be higher than the risks of HTLV-1 related diseases [10].

Still on the familial transmission, it should be emphasized that half the evaluated families had at least a HTLV-seropositive member. Besides that, the analysis of



infection rates in family members indicated a seropositive rate of 32.55% (14/43). This number is higher than that recently found in a survey evaluating familial transmission [27] in Pará state (25.2%), another endemic area for HTLV in Brazil. Without a doubt, the above-mentioned data reinforce the need to establish strategies of active surveillance in household and family contacts as an important epidemiological surveillance action aimed at detecting early the virus infection and preventing the transmission by sexual or parenteral way. In effect, it has been shown that the virus spreads silently within families and that there is a familial aggregation of this infection [27].

This study has detected an association with marital status, but it was not precise. Besides, there was no association of HTLV-1 infection with age, education, and income according to what was found by Magalhães *et al.*, 2008, in the analysis of pregnant women from a medium sized town in Northern Brazil, unlike the observed in other studies conducted in Salvador, which have found an association between HTLV infection and lower income [5,17]. In the way, we have not found any association between the self-reported skin color and HTLV infection. However, it has been recently detected a higher HTLV prevalence in donors with black skin color [28]. In fact, the two groups (HTLV-1 positive and soronegative) analyzed in our study are very similar in terms of social, demographic and ethnic characteristics, according to the population treated at public hospitals of medium-sized Brazilian cities, where the majority of people is subjected to low levels of income and education.

## Conclusion

In summary, these results are very relevant because: (1) no studies of HTLV-1 seroprevalence in pregnant/puerperal women from the Southern region of Bahia had been described so far; (2) Southern Bahia must be another endemic area for the virus, presenting a high prevalence in pregnant women that is much higher than the national average; (3) the HTLV-1 interfamilial transmission is important and to carry out an active case search can be an important strategy in the epidemiological surveillance of this infection; (4) there is no effective treatment to HTLV infection and interventions to prevent vertical transmission in geographic areas with high prevalence would likely reduce the incidence of mother-to-child transmission and HTLV-related diseases and; (5) last but not least, despite the high prevalence observed in Southern Bahia, it seems that a number of pregnant women treated in the public health system have not been tested to HTLV during the prenatal routine in this region and may have breastfed their babies and could have infected them and spread the infection that reinforce the need for mandatory serological screening in the routine prenatal care of Bahia state.

## Methods

A cross-sectional study involving pregnant women treated at the antenatal units of the two reference health centers from Southern Bahia has been conducted: *Maternidade Santa Helena*, from Ilhéus, and *Hospital Manoel Novaes Santa Casa de Misericórdia*, from Itabuna, between November 2008 and May 2010. This macroregion covers 99 cities, totaling more than 1,025,000 women in childbearing age, and more than 25,000 live births in 2011. The mentioned hospitals treat women from these cities as well as different neighboring cities.

For the study, an extra blood sample was drawn during their routine antenatal (syphilis, HIV, ABO and Rhesus) appointments. A standardized questionnaire has been applied after informed consent to collect the following data: age, formal education, history of smoking, alcohol consumption, blood transfusion, past medical history, current medication, and income level. Furthermore, the medical records were analysed to know the results of two tests: (1) rapid test for HIV and (2) VDRL. It was included in the analyses all women who fulfilled the following criteria: (1) collected blood sample in the antenatal unit; (2) answered the standardized questionnaire; (3) signed the consent informed (in younger than 18 years old, the parents/legal guardians were asked for the permission). The project was approved by the Ethic Committee of *Universidade Estadual de Santa Cruz* (UESC).

HTLV-1 infection was assessed by ELISA (Ortho HTLV-I/HTLV-II Ab-Capture ELISE Test System). The positive plasma samples were tested repeatedly in duplicate and confirmed by Western blot (HTLV BLOT 2.4–Genelab Diagnostic). Besides, the DNA of 29 HTLV-1 positive samples was extracted by QIAgen Kit (QIAamp DNA Blood Kit), followed by a nested-PCR for the Long Terminal Repeat (LTR) region on HTLV-1. Two HTLV-1 overlapping fragments were amplified: a LTR-gag 473 bp and a LTR-tax 479 bp, as previously described [29]. HTLV-positive women were contacted by phone and visited by a healthcare team, which included, among other professionals, a pediatrician. In this opportunity, the results and the HTLV condition have been explained, and samples of family members (spouse, partners children or others, considering the known transmission routes for the virus) have been collected after informed consent to analyze HTLV infection and interfamilial transmission. All those who had interest in performing the diagnosis of HTLV were included. For minors, parents or guardians were consulted and should authorize the test. Besides, a prospective study was also carried out and newborns were followed up to two years for evaluation of vertical transmission.

Frequency distributions were determined for each variable. Age was examined in 3 different strata to analyze trends in prevalence (9-19y; 20-29y and 30y or more). The other variables (and no exposure condition) were: education (illiterate or literate), income (<1.0 minimum Brazilian wages per month (mw); 1-2 mw and >2 mw), ethnic classification, and marital status (married/with partner or single/Divorced/Widow). Known risk factors (previous blood transfusion, have tattoos and/or piercings) and lifestyle habits have been analyzed (alcohol consumption and smoking). A bivariate analysis was carried out.

Odds Ratio (ORs) and 95% confidence intervals (95% CIs) were calculated to measure the association of selected variables with HTLV-1 infection. The statistical package STATA version 10.0 was used for statistical analyses. P-values < 0.05 were considered significant.

## Competing interests

The author(s) declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

MAGM: participated in the design of the study, carried out the PCR, carried out the maintenance of the database and helped to draft the manuscript. LPSS, TCG, RGB, AFC: applied the standardized questionnaire, the informed consent and processed the blood samples to perform serology. NBS, MCCA: participated in the design of the study, performed the statistical analysis and helped to draft the manuscript. LCA: participated in the design of the study and helped in the realization of molecular analyzes. BGC: participated in the design of the study, helped to draft the manuscript. LJM, SMBS: participated in the design of the study, helped in identifying positive women, made contact and scheduled the visits, and helped to draft the manuscript. NL: carried out the ELISA and Western Blot and carried out the blood collection during the visits. MRSR: participated in the design of the study and provided orientation concerning the result of the tests and about breastfeeding during the project. SRG: conceived of the study, coordinated it and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgements

This study was financially aided by the following institutions: PROPP-UESC, FAPESB and CNPq. The authors are thankful to *LASP-FIOCRUZ-Bahia* and *Fundação Bahiana para Desenvolvimento das Ciências-Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública* for the technical and laboratorial support. The authors are also thankful to the staff of *Maternidade Santa Helena*, from Ilhéus, and *Hospital Manoel Novaes Santa Casa de Misericórdia*, from Itabuna for their operational support.

## References

1. Gessain A, Cassar O: **Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection.***Front Microbiol* 2012, **3**:388.
2. Catalan-Soares B, Carneiro-Proietti ABF, Proietti FA, Interdisciplinary HTLV Research Group: **Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil.***Cad Saúde Pública* 2005, **21**:926–931.
3. Catalan-Soares B, Proietti FA, Carneiro-Proietti ABF: **Os vírus linfotrópicos de células T humanas (HTLV) na última década (1990-2000).***Rev Bras Epidemiol* 2001, **4**:81–95.
4. Galvao-Castro B, Loures L, Rodriques LG, Sereno A, Ferreira-Junior OC, Franco LG, Muller M, Sampaio-Da-Santana A, Galvao-Castro B, Loures L, Rodriques LG, Sereno A, Ferreira-Junior OC, Franco LG, Muller M, Sampaio-Da-Santana A, Passos LM, Proietti F: **Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study.***Transfusion* 1997, **37**:242–243.

5. Dourado I, Alcântara LC, Barreto ML, Teixeira MG, Galvao-Castro B: **HTLV-1 in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics.***J Acquir Immune Defic Syndr* 2003, **34**:527–531.
6. Ribeiro MA, Proietti FA, Martins ML, Januário JN, Ladeira RV, De Oliveira MF, Carneiro-Proietti AB: **Geographic distribution of human T-lymphotropic virus types 1 and 2 among mothers of newborns tested during neonatal screening, Minas Gerais, Brazil.***Rev Panam Salud Publica* 2010, **27**:330–337.
7. Proietti FA, Carneiro-Proietti ABF, Catalan-Soares BC, Murphy EL: **Global epidemiology of HTLV-1 infection and associated diseases.***Oncogene* 2005, **24**:6058–6068.
8. Okochi K, Sato H, Hinuma Y: **A retrospective study on transmission of adult T cell leukemia virus by blood transfusion: seroconversion in recipients.***Vox Sang* 1984, **46**:245–253.
9. Kajiyama W, Kashiwagi S, Ikematsu H, Hayashi J, Nomura H, Okochi K: **Intrafamilial transmission of adult T-cell leukemia virus.***J Infect Dis* 1986, **154**:851–857.
10. van Tienen C, Jakobsen M, van der Schim Loeff M: **Stopping breastfeeding to prevent vertical transmission of HTLV-1 in resource-poor settings: beneficial or harmful?***Arch Gynecol Obstet* 2012, **2012**(286):255–256.
11. Biggar RJ, Ng J, Kim N, Hisada M, Li HC, Cranston B, Hanchard B, Maloney EM: **Human leukocyte antigen concordance and the transmission risk via breastfeeding of human T cell lymphotropic virus type I.***J Infect Dis* 2006, **193**:277–282.
12. Wiktor SZ, Pate EJ, Rosenberg PS, Barnett M, Palmer P, Medeiros D, Maloney EM, Blattner WA: **Mother-to-child transmission of human T-cell lymphotropic virus type I associated with prolonged breast-feeding.***J Hum Virol* 1997, **1**:37–44.
13. Carneiro-Proietti AB, Catalan-Soares BC, Castro-Costa CM, Murphy EL, Sabino EC, Hisada M, Galvao-Castro B, Alcantara LC, Remondegui C, Verdonck K, Proietti FA: **HTLV in the Americas: challenges and perspectives.***Rev Panam Salud Publica* 2006, **19**:44–53.
14. Hino S, Katamine S, Miyata H, Tsuji Y, Yamabe T, Miyamoto T: **Primary prevention of HTLV-1 in Japan.***Leukemia* 1997, **11**:57–59.
15. Ribeiro MA, Martins ML, Teixeira C, Ladeira R, Oliveira Mde F, Januário JN, Proietti FA, Carneiro-Proietti AB: **Blocking vertical transmission of human T cell lymphotropic virus type 1 and 2 through breastfeeding interruption.virus type 1 and 2 through breastfeeding interruption.***Pediatr Infect Dis J* 2012, **31**(11):1139–1143.
16. Bittencourt AL, Primo J, Oliveira ML: **Manifestations of the human T-cell lymphotropic virus type I infection in childhood and adolescence.***J Pediatr (Rio J)* 2006, **82**:411–420.

17. Bittencourt AL, Primo J, Oliveira ML: **Dermatite Infecçiosa e outras manifestações infato-juvenis associados à infecção pelo HTLV-1.** In *Cadernos hemominas*. XIIIth edition. Edited by Proietti AB. Belo Horizonte: Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais; 2006:174–191.
18. Dos Santos JI, Lopes MA, Deliége-Vasconcelos E, Couto-Fernandez JC, Patel BN, Dos Santos JI, Lopes MA, Deliége-Vasconcelos E, Couto-Fernandez JC, Patel BN, Barreto M, Ferreira Júnior OC, Galvão-Castro B: **Seroprevalence of HIV, HTLV-I/II and other perinatally-transmitted pathogens in Salvador, Bahia.***Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1995, **37**:343–348.
19. Bittencourt AL, Dourado I, Filho PB, Santos M, Valadão E, Alcantara LC, Galvão-Castro B: **Human T-cell lymphotropic virus type 1 infection among pregnant women in northeastern Brazil.***J Acquir Immune Defic Syndr* 2001, **26**:490–494.
20. Magalhães T, Mota-Miranda AC, Alcantara LC, Olavarria V, Galvão-Castro B, Rios-Grassi MF: **Phylogenetic and molecular analysis of HTLV-1 isolates from a medium sized town in northern of Brazil: tracing a common origin of the virus from the most endemic city in the country.***J Med Virol* 2008, **80**:2040–2045.
21. Guimarães de Souza V, Lobato Martins M, Carneiro-Proietti AB, Januário JN, Ladeira RV, Silva CM, Pires C, Gomes SC, De Martins CS, Mochel EG: **High prevalence of HTLV-1 and 2 viruses in pregnant women in São Luis, state of Maranhão, Brazil.***Rev Soc Bras Med Trop* 2012, **45**:159–162.
22. Dal Fabbro MM, Cunha RV, Bóia MN, Portela P, Botelho CA, Freitas GM, Soares J, Ferri J, Lupion J: **HTLV 1/2 infection: prenatal performance as a disease control strategy in State of Mato Grosso do Sul.***Rev Soc Bras Med Trop* 2008, **41**:148–518.
23. Olbrich Neto J, MEIRA DA: **Seroprevalence of HTLV-I/II, HIV, siphylis and toxoplasmosis among pregnant women seen at Botucatu–São Paulo–Brazil: risk factors for HTLV-I/II infection.***Rev Soc Bras Med Trop* 2004, **37**:28–32.
24. Soares BCC, Castro MSM, Proietti FA: **Epidemiologia do HTLV-I/II.** In *Cadernos hemominas*. XIth edition. Edited by Proietti AB. Belo Horizonte: Fundação Centro de Hematologia e Hemoterapia de Minas Gerais; 2000:53–75.
25. Hlela C, Shepperd S, Khumalo NP, Taylor GP: **The prevalence of human t-cell lymphotropic virus type 1 in the general population is unknown.***Aids Rev* 2009, **11**:205–214.
26. Bittencourt AL, Sabino EC, Costa MC, Pedroso C, Moreira L: **No evidence of vertical transmission of HTLV-I in bottle-fed children.***Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2002, **44**:63–65.
27. Da Costa CA, Furtado KC, De Ferreira LS, De Almeida DS, Da Linhares AC, Ishak R, Vallinoto AC, De Lemos JA, Martins LC, Ishikawa EA, De Sousa RC, De Sousa MS: **Familial transmission of human T-cell lymphotropic virus: silent dissemination of an emerging but neglected infection.***PLoS Negl Trop Dis* 2013, **13**:e2272.

28. Carneiro-Proietti AB, Sabino EC, Leão S, Salles NA, Loureiro P, Sarr M, Wright D, Busch M, Proietti FA, Murphy EL, Nhlbi Retrovirus Epidemiology Donor Study-Ii (Reds-Ii), International Component: **Human T-lymphotropic virus type 1 and type 2 seroprevalence, incidence, and residual transfusion risk among blood donors in Brazil during 2007-2009.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2012, **28**:1265–1272.

29. Alcantara LC, Oliveira T, Gordon M, Pybus O, Mascarenhas RE, Seixas MO, Gonçalves M, Hlela C, Cassol S, Galvão-Castro B: **Tracing the origin of Brazilian HTLV-1 as determined by analysis of host and viral genes.** *AIDS* 2006, **20**:780–782.

## 4.2 Capítulo II. Dados complementares

### **Carga proviral**

A quantificação da carga proviral foi realizada em 28 amostras das gestantes. Das 28 amostras avaliadas, 4 amostras apresentaram carga proviral indetectável por este método (Tabela 1). As cargas provirais são baixas e devem refletir o perfil assintomático das gestantes. Ninguém evoluiu como sintomática ao longo do estudo, sendo assim não foi possível avaliar a relação entre o nível de carga proviral e a sintomatologia.

Já foi demonstrado que em um único indivíduo, a carga proviral é relativamente estável, alcançando um valor de equilíbrio ou *set point*. Entretanto, entre indivíduos diferentes, a variação entre as cargas provirais é extremamente alta (VINE *et al.*, 2004). Até o momento não se sabe o motivo dessas diferenças individuais, e nem como o ponto de equilíbrio em cada indivíduo é alcançado. O que está bem demonstrado em vários trabalhos é que pacientes com TSP/HAM apresentam, em média, carga proviral em torno de 10 vezes maior que indivíduos assintomáticos, e esta alta carga proviral tem sido estabelecida como um fato de risco para o desenvolvimento de TSP/HAM. Porém, outros critérios, incluindo os clínicos, bem como estudos de acompanhamento devem ser realizados com intuito de esclarecer a importância da carga proviral para o manejo dos indivíduos infectados.

Gestante identificação	Carga proviral/ 10000 Cels total
82	Não detectada
190	62
196	14
260	459
364	59

766	820
923	102
1036	35
1092	843
1238	10
1610	23
174	Não detectada
245	27
263	60
384	9
527	Não realizada
568	796
735	349
945	236
1068	2
1089	153
1122	705
1171	Não detectada
1298	6
1451	1007
1504	74
1657	136
1787	Não detectada
1793	104



## Subtipagem viral

Em relação à análise dos vírus, todas as amostras foram subtipadas e classificadas como HTLV-1aA (subtipo cosmopolita, subgrupo transcontinental), utilizando a ferramenta: LASP HTLV-1 Automated Subtyping Tool (Version 1.0), através do site: <http://www.bahiana.edu.br/bioinfo/virus-genotype/html/subtypinghtlv.html> (Figura 7). Na análise filogenética, essa subtipagem foi confirmada. Todos os isolados pertenceram ao subtipo cosmopolita e subgrupo transcontinental, com bootstrap acima de 60%, em análise de 1000 réplicas, e valores de Maximum Likelihood expressos com \* $p < 0.001$ . Todas as amostras se agruparam no cluster A e B da América Latina.








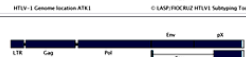

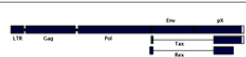


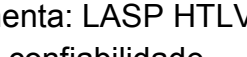
Name	Length	Report	Assignment	Support	Genome
IL0735.	799bp	<a href="#">Report</a>	subtype_a(subgroup_A)(Transcontinental)	100.0	
IL0945.	800bp	<a href="#">Report</a>	subtype_a(subgroup_A)(Transcontinental)	100.0	
IL1068.	800bp	<a href="#">Report</a>	subtype_a(subgroup_A)(Transcontinental)	100.0	
IL1171.	801bp	<a href="#">Report</a>	subtype_a(subgroup_A)(Transcontinental)	96.0	
IL1451.	800bp	<a href="#">Report</a>	subtype_a(subgroup_A)(Transcontinental)	100.0	
IL1504.	801bp	<a href="#">Report</a>	subtype_a(subgroup_A)(Transcontinental)	100.0	
IL1657.	800bp	<a href="#">Report</a>	subtype_a(subgroup_A)(Transcontinental)	100.0	
IL1787.	801bp	<a href="#">Report</a>	subtype_a(subgroup_A)(Transcontinental)	100.0	
ITA0766.	800bp	<a href="#">Report</a>	subtype_a(subgroup_A)(Transcontinental)	100.0	
ITA0923.	801bp	<a href="#">Report</a>	subtype_a(subgroup_A)(Transcontinental)	100.0	
ITA1036.	800bp	<a href="#">Report</a>	subtype_a(subgroup_A)(Transcontinental)	100.0	
ITA1092.	800bp	<a href="#">Report</a>	subtype_a(subgroup_A)(Transcontinental)	100.0	
ITA1238.	412bp	<a href="#">Report</a>	subtype_a(subgroup_A)(Transcontinental)	92.0	

Figura 7. Subtipagem de amostras HTLV positivas, a ferramenta: LASP HTLV-1 Automated Subtyping Tool (Version 1.0), com percentual de confiabilidade.

### **4.3 Capítulo III. Artigo relacionado – co-autoria**

#### **The origin of HTLV-1 in southern Bahia by phylogenetic, mtDNA and B-globin analysis**

Milena M Aleluia<sup>1</sup>, Marco A G Mello<sup>2</sup>, Luiz C J Alcântara<sup>2</sup>, Filipe F A Rego<sup>2</sup>, Lucas de S Pereira<sup>1</sup>, Bernardo Galvão-Castro<sup>2,3</sup>, Marilda de S Gonçalves<sup>2</sup>, Túlio de Oliveira<sup>4</sup>, Lauro J Marin<sup>1</sup>, Sandra M B Sousa<sup>5</sup>, Sandra R G Mello<sup>1</sup>.

1 Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, Brazil.

2 Gonçalo Moniz Research Center /Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, Bahia, Brazil.

3 Bahia School of Medicine and Public Health/Bahia Foundation for Science Development, Salvador, Bahia, Brazil.

4 Trust-Africa Centre for Health and Population Studies and Southern African Treatment Research Network, África.

5 Department of Natural Sciences, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, Bahia, Brazil

Corresponding author: Prof<sup>ª</sup> Dra. Sandra Rocha Gadelha Mello, **Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Ilhéus-Itabuna, km 16, Salobrinho, Ilhéus, BA, Zip Code 45.662-900, Brazil**

E-mail: srgmello@uesc.br

#### ***Abstract***

#### **Background**

Different hypotheses have been elaborated to explain how the HTLV spread throughout the world. It has been proposed, for example, that the virus was introduced in Bahia, Brazil, during the slave-trade period from 16<sup>th</sup> century to 19<sup>th</sup> century. This Brazilian state has the highest prevalence of HTLV infection in the country. However, there is no information about the HTLV evolutionary history in southern Bahia. Therefore, data regarding its phylogeny are fundamental in order to clarify its introduction, dynamics and dispersion.

### **Methodology/Principal Findings**

Samples of 29 HTLV-1 seropositive women have been examined. Before blood collection, all of the women answered a standardized questionnaire. The DNA of samples was extracted, followed by a nested-PCR assay for the Long Terminal Repeat (LTR). DNA sequencing was performed subsequently. The HTLV-1 LTR sequences were submitted to the LASP HTLV-1 Automated Subtyping Tool. These sequences were analyzed by phylogenetic methods. The mtDNA ancestry markers and  $\beta^A$ -globin haplotypes were analyzed by PCR/RFLP. In relation to HTLV subtyping, all samples were classified as cosmopolitan subtype and transcontinental subgroup. Results suggest an ancient post-Columbian introduction of HTLV-1a-A associated with the slave trade between the XVI and late XIX centuries in southern Bahia. As regards the ethnicity of HTLV-1-infected women, the haplotype characterization of  $\beta$ -globin gene and the mtDNA ethnicity of HTLV-1-infected women, we have detected a major African contribution, with a predominance of Benin and Bantu types.

### **Conclusions/Significance**

HTLV-1 infection is spread in Bahia and the point of origin was possibly Salvador. The phylogenetic analysis suggests an ancient post-Columbian introduction of HTLV-1a-A in southern Bahia related to the slave trade. The major African contribution in the population, similar to that seen in Salvador, corroborates and strengthens these hypotheses.

### **Author Summary**

*In general, viral transmission and dispersion - including the HTLV - are closely related to human migration and ethno-geographical characteristics. It is noteworthy that the Brazilian population is the result of miscegenation among Amerindians, Europeans and Africans, and had the influence of other minor ethnic groups. This study aimed to determine the origin of HTLV and its circulation in HTLV-positive women in southern Bahia so as to verify the ancestry of these individuals. The set of results allows for inferring about the virus origin and dispersion in Bahia state and helps us to explain and understand the high HTLV prevalence in this area, corroborating and providing further data to the literature.*

## ***Introduction***

The Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) infects approximately 20 million people in the world [1]. The reported endemic areas for this virus are sub-Saharan Africa, Central and South America, Caribbean, Japan, Melanesia and the Middle East [2 and review by 3, 4, 5]. The phylogenetic analysis of LTR region classifies the HTLV-1 into seven subtypes: a, or cosmopolitan [6]; b, or Central Africa [7]; c, or Melanesia [8]; d, or Cameroon [9]; e, or Democratic Republic of Congo [10]; f, of a Gabon individual [10]; and g, identified in Cameroon [11]. The Cosmopolitan subtype, which is the most prevalent in Latin America, is divided into 5 subgroups: A, or transcontinental, B, or Japanese, C, or East Africa, D, or North Africa [6] and E, or Peru [12].

The virus can be transmitted from mother-to-child, especially by breast-feeding; sexually and by parenteral exposure [1, 3]. Previous studies have found a HTLV prevalence of 0.28% amongst pregnant women in Brazil [13]. However, in the southern Bahia, it has been detected a prevalence of 1.05% [unpublished data]. In fact, other studies conducted in Bahia state have found similar HTLV prevalences (around to 1.0%) among pregnant women [14, 15, 16]. In addition analyzing the general population from Salvador-Bahia, have detected that this is the city with the highest HTLV prevalence in the country [17]. Information based in the LTR phylogenetic analysis and historical data served as a basis to propose that the HTLV-1 was introduced in Bahia during the slave trade period, i.e., from the 16<sup>th</sup> to the 19<sup>th</sup> century [18, 19]. In fact, Bahia is the state with the greatest African influence in the country, as confirmed by the high number of African descendants [20, 21].

The Brazilian population stems from the fusion of genetic diversity from three ethnic groups: Europeans, Amerindians and Africans, besides the influence of other groups [21, 22]. The native Amerindians [23], roughly 896.9 thousand, lived in Brazil up to 1500, when the European colonization started they were mostly male and Portuguese [24]. In addition to Portuguese, millions of immigrants such as Italian, Spaniards, Germans, Syrians, Lebanese, Japanese and others arrived in Brazil since 1820 [23]. The Africans came mainly from the 16<sup>th</sup> to the 19<sup>th</sup> century. The slave trade brought 4 million Africans to Brazil, especially from Sub-Saharan Africa. This region

covers territories even from Senegal to Nigeria, which nowadays belongs to Angola, Congo and Mozambique [25]. Indeed, the Brazilian population is characterized as an admixed population.

Studies aimed at evaluating genetic ancestry in different HTLV-1-infected populations have been conducted in order to understand the prevalence of this virus and its history. The skin color, phenotypically evaluated, has a thin correlation with the ancestry, whereas the determination of ethnic contribution has been done by analysis of molecular markers (for example: mtDNA and  $\beta$ -globin haplotypes). Haplotypes of the 5' region of the  $\beta$ -globin gene cluster has been used as an important tool to trace the origin, evolution and migration of humanity [26]. Besides that, the  $\beta$ -globin gene grouping reveals haplotypes associated with the presence of hemoglobin S in different ethnic and geographical origins: the type Benin (BEN), originated in west-central Africa; Bantu type (CAR), in south-central and eastern Africa; type (SEN) Senegal, in west Atlantic Africa, type (SAUDI), in Saudi Arabia, in the Indian subcontinent and east of the Arabian Peninsula, and the Cameroon type (CAM), along the west coast of Africa [27, 28]. Salvador has a high rate of ethnic admixture with strong African contribution, reflecting into an unusual haplotype distribution of  $\beta$ S-globin gene when compared with those described in other Brazilian states, predominantly of heterozygous CAR / BEN [29, 30].

Due to the lack of information on the evolutionary history of HTLV in southern Bahia and the high prevalence of this virus in our state, information about its phylogeny is important so as to clarify its introduction and dispersion. The haplotype characterization of  $\beta$ -globin gene and DNAm<sub>t</sub> complements the study as it generates solid and intrinsic data useful in establishing the geographic origin of the virus and the ethnicity of HTLV-1-infected women.

## **Methods**

### *Ethical Statement*

The Research Ethics Committee of the *Universidade Estadual de Santa Cruz* (UESC) has approved this study (Protocol 196/08). Express written consent was informed and obtained from all study participants.

### Study Area

To investigate the molecular characteristics of HTLV in southern Bahia, samples of 29 HTLV-1 seropositive women were analyzed. These samples are only part of a larger one has been used to analyze HTLV-seroprevalence, risk factors associated with infection and maternal-fetal transmission in 2.759 pregnant women from São José Hospital/Santa Helena Maternity, in Ilhéus, and Santa Casa de Misericórdia Manoel Novaes Hospital, in Itabuna. These are the two most important hospitals situated in the two biggest cities of southern Bahia. Besides that, these health facilities are the only ones which provide public health care, performing from 70% to 90% of child-births on SUS-provided hospitals. In addition, the analysis of mtDNA, required 29 HTLV-negative samples randomly selected using the SPSS program version 20.0.0. An error rate of 5% and a confidence level of 95% have been considered.

### Interview questionnaire

Before blood collection, all of the women have answered a standardized questionnaire with socio-demographic and behavioral questions. It has used the information of self-reported skin color (black, brown, white, yellow and Indigenous), according to IBGE criteria.

### Collection of samples

The DNA of 29 HTLV-1 positive samples was extracted by QIAgen Kit (QIAamp DNA Blood Kit), followed by a nested-PCR for the Long Terminal Repeat (LTR) region on HTLV-1. Two HTLV-1 overlapping fragments were amplified: a LTR-gag 473bp and a LTR-tax 479bp, as previously described [31]. The PCR product was purified using the Qiagen PCR Purification Kit. DNA sequencing was performed using the Taq FS Dye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) on an automated 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems Inc.) applying the identical inner primers of nested-PCR.

### Phylogenetic analysis

The new HTLV-1 LTR sequences were submitted to the LASP HTLV-1 Automated Subtyping Tool [32]. These sequences and the reference sequences selected in the database GenBank/EMBL were aligned using the ClustalX software [33].

Alignment was manually edited using the programs GeneDoc and Se-Al [34]. The first phylogenetic analyses were generated using the neighbor-joining (NJ) and maximum-likelihood (ML) methods implemented in the PAUP software version 4.0b10.19 [35]. The evolutionary model of Tamura-Nei with gamma distribution was selected as the best adaptive model for the data (parameter alpha 0.814563), using the software Modeltest 3.7 [36]. NJ trees were constructed with an optimized nucleotide substitution rate matrix and with parameter gamma distribution, employing empirical frequencies. The reliability of the NJ trees was evaluated by 1000 bootstraps. ML trees construction consisted in a heuristic search using the NJ tree, including its optimized parameters. The likelihood ratio test (LRT) was used to calculate the statistical support. Trees were visualized with the TreeView software, version 1.6.6 [37].

All Brazilian HTLV-1 LTR sequences available were downloaded from the GenBank, including the recently sequenced strains from Ilhéus and Itabuna, for the Bayesian analysis. The dataset was aligned using the Clustal X software and manually edited using the Se-Al program. We have performed the Bayesian tree in duplicate and using the MrBayes program to verify the posterior probability (PP) statistical parameter. The time of the most recent common ancestral (TMRCA) from the sequences with the sampling year provided from Genebank and the new LTR sequences was estimated for the two main Latin American clusters (Latin American cluster A [LA\_A] and Latin American cluster B [LA\_B]) using the Beast package [38]. For the Beast analysis, we have assumed the previously described evolutionary rate ( $2 \times 10^{-5}$  substitutions/site/year for one fixed mutation) [31]. The analysis in 4 independent MCMC runs was carried out so as to enhance the results reliability, using the strict molecular clock with the constant growth tree priors, the effective sample size (ESS) was considered if above 200.

#### mtDNA markers analysis

The mtDNA ancestry markers were analyzed by PCR/RFLP. The amplification primers were used according the conditions described by [39,40,41] and digestions were performed with appropriate restriction endonucleases according haplogroup: L3a / +2349 *MboI*; L3b / -8616 *MboI*; L3c / +10084 *TaqI*; L3d / -10394 *DdeI*; A / +663 *HaeII*; B / 9-bp Deletion; C / -13259 *HincII*; D / -5176 *AluI*. The haplogroups used are typical of sub-Saharan Africa: L3a, L3b, L3Cand L3d, and original Amerindian

haplogroups: A, B, C and D. The single-nucleotide polymorphism profile was determined using the previously established criteria [9, 41].

#### *β-globin haplotypes analysis*

$\beta^A$ -globin haplotypes were amplified as previously described, generating fragments from the A-globin gene cluster ( $5'\epsilon / 3'\beta$ ,  $5'\gamma A / 3'\beta$ ,  $5'\psi\beta / 3'\beta$ ,  $\psi\beta$ ,  $3'\psi\beta$ ). These fragments were purified by the Promega Wizard PCR prep system (Madison, WI), and a DNA fragment was digested with an appropriated restriction endonuclease (*XmnI*, *HindIII*, *HincII*) used for each site [42]. The fragments were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis with syber green or gel red staining under ultraviolet light.

## **Results**

A total of 21 out of the 29 HTLV-1 positive samples were successfully amplified and sequenced. The LASP HTLV-1 Automated Subtyping Tool has classified all the sequences as subtype “a” subgroup “A” with a bootstrap support of 100%. For phylogenetic analysis, the trees were reconstructed on the basis of two datasets. The first dataset contains the 713 base pair fragments of the LTR region (Figure 1). The second dataset contains all the sequences from the previous dataset and those recently identified in Mozambique (Data not shown) with a fragment of 514 base pairs [43]. The first analysis was used to confirm the statistical significance for group nodes, using the NJ and ML methods.

The entire monophyletic cluster observed in the tree (Figure 1) was also present in the analysis. It was observed that one sequence from southern Bahia (IL1787) had grouped with a sequence from Salvador (FNN159). Furthermore, another sequence from our study (IT196) had grouped with a sequence from São Francisco River Village (VSF287), and has been analyzed by [19] (Figure 1). Besides that, it was observed that other sequences from southern Bahia (IL 945, IL245, IL174) had also grouped with other sequences from Salvador (FNN 158) and Feira de Santana (FS157) (Figure 1). We can therefore infer that HTLV-1 is spread over several regions of Bahia and, possibly, the infection came from the city of Salvador, since the harbor of All Saints' Bay had been one of the most important harbors since the beginning to the end of slave trading [44]. All these analyzes have high statistical support from bootstrap values (above 60% in 1000 replicates) and ML values, expressed as  $*p < 0.001$  (Figure 1). In this same tree,



in the Latin America group B, it was possible to observe a sequence from South Africa (HTLV 24) to group together with the Brazilian and the Latin American sequences (Figure 1). In effect, the literature has demonstrated that Brazilian sequences are grouped with South African sequences [12, 45]. Furthermore, data from our analyzes corroborate the hypothesis that the Bantu population has migrated from Central Africa to South West Africa, as there have been sequences from Cameroon (2472LE) and Chile (CH26) with a common ancestor, denoting a high statistical support (Figure 1).

In the second tree (data not shown), we can verify that the new Mozambican sequences were grouped with new Brazilian strains, but without a bootstrap support. The isolated IT150 was seen to have formed a monophyletic group with a new sequence of Mozambique (GU194508) in the Latin American cluster B with statistical significance for ML analysis ( $p < 0.001$ ), but not statistically significant by bootstrap analysis. Besides the relationship among Brazilian and South African sequences, it was first presented the grouping among Bahia, while Mozambican sequences were recently identified. These data were not shown due to a short data set.

The TMRCA analysis of the two main Latin American groups shows the ancient post Columbian introduction of the HTLV-1a-A in Latin America, being LA\_A strains introduced in Brazil between 140 and 392 years ago with an ESS of 17676 and the LA\_B strains introduced between 95 and 315 years ago with an ESS of 15430. The analyzed data provided high PP support ( $>0.9$ ) to the two subject clusters.

The two groups, HTLV positive and negative controls (NC), have self-reported the color brown as the most frequent. These data were complemented with the DNAmT and  $\beta$ -globin analysis. DNAmT analysis has demonstrated that the most frequent haplogroup was the African (L3A – 27.5%, L3B – 6.8%, L3C – 37.9%, L3D– 10.3%), followed by Amerindian contribution (10.2% - haplogroup A, B and C). The analyzed African haplogroup characterizes Sub-Saharan African populations.

The analyze of  $\beta$ -globin were done in HTLV-1 positive samples of the 32  $\beta$ -globin chromosomes studied: 14 (43,7%) BEN, 13 (40,6%) CAR, 3 (9,4%) SEN and 1 (3,1%) CAM. Only one sample was found to be Atypical (Atp). The genotype showed: BEN/BEN (31.25%), BEN/CAR (25%), CAR/CAR (12.5%), CAR/CAM (18.75%), CAR/SEN (6.25%), CAR/Atypical (6.25%). Haplotype identities are indicated by combinations of plus and minus signs representing, respectively, the presence and absence of restriction sites (Table 1).

## Discussion

This study is part of a larger study that has analyzed the HTLV seroprevalence, risk factors related to the HTLV infection and maternal-fetal transmission in 2759 pregnant women from the São José Hospital/Santa Helena Maternity, in Ilhéus, and Santa Casa de Misericórdia Manoel Novaes Hospital, in Itabuna. The detected prevalence was 1.05% (unpublished data). Some data in the literature report a prevalence of 0.28% in pregnant women in Brazil [13]. However, prevalence rates of 0.9 and 1.0% were observed in two other cities from Bahia: Salvador and Cruz das Almas (Recôncavo), respectively [14, 15, 16]. These data suggest that the prevalence of HTLV-1 is an important public health problem in Bahia.

As regards the virus subtyping using the LASP HTLV-1 Automated Subtyping Tool (Version 1.0), only HTLV-1aA (cosmopolitan subtype, transcontinental subgroup) has been found. This subtype is the most prevalent in America [4]. In addition, the phylogenetic analysis demonstrated that clusters grouped in Latin America (cosmopolitan subtype and transcontinental subgroup) had a common ancestral with sequences from South Africa [12, 16, 19, 45]. The results were confirmed by phylogenetic analysis. Furthermore, all isolates of this study belonged to the cosmopolitan subtype (63% ML bootstrap  $p < 0.001$ ) and the transcontinental subgroup (74% ML and bootstrap  $p < 0.001$ ) (Figure 1). Due to the grouping of sequences in the two Latin America clusters, it is suggested that there have been multiple HTLV post-Columbian introductions. This post-Columbian introduction is indicated by the presence of sequences in both African and Brazilian clusters. These sequences can be grouped together directly in the topology tree or through a common ancestor [12, 45] (Figure 1).

Following phylogenetic analysis, it could be observed, even in the first tree (Figure 1), that southern Bahia sequences grouped with sequences from Salvador city, as well as those with a sequence belonging to a small village located in the countryside of Bahia state [19]. Furthermore, it was found that a sequence from Feira de Santana city (100 km away from Salvador) has also been grouped with sequences from southern Bahia and Salvador (Figure 1). These analyzes have strong statistical support from ML and bootstrap values (Figure 1). These results allow for inferring that HTLV-1 infection

is spread over several regions of Bahia and this infection has possibly originated from the slave trading in Salvador [44].

Concerning the introduction of HTLV in the Americas and Brazil, some studies reveal that the virus has been through human migrations, both during migrations of ancestral populations in the pre-Columbian era - from 15,000 to 35,000 years, through the Bering Strait [46, 47] - as during the slave trade and/or Asian population migration in the post-Colombian era [6, 12, 48]. In fact, a population study analyzing the  $\beta$ -globin gene in samples of Salvador has served as a basis for the hypothesis that the virus was introduced from Africa to Salvador during the slave-trading period in the eighteenth century. Likewise, recent data suggest that the African Bantu ethnic groups were brought to Bahia in this period [31]. In addition, there are reports that a migration of the Bantu population occurred in Central Africa to South West Africa about 3000 years ago [25]. Once many slaves from this area came to Salvador, it is possible that Bantu Africans had been to Brazil in that period. Therefore, it has been suggested that the HTLV-1 arrived in the city of Salvador in the post-Columbian time [49]. In addition, in the first tree, sequences from Cameroon and Chile were seen to have common ancestors with the Central African sequence in the grouping of Latin America, with high statistical support (Figure 1). These data corroborate the hypothesis that the Bantu population migrated from Central Africa to South West Africa.

As was previously demonstrated [19], the South African sequence was grouped with the Brazilian sequence (Data not shown). Hence, we can observe the grouping with new sequences from Mozambique. As one can see, the HTLV-positive sequence forms a monophyletic group with a new sequence from Mozambique in the Latin American cluster B (Data not shown), thus demonstrating that, aside from the grouping of Brazilian and South African sequences, it was also evidenced the grouping with new sequences from Mozambique. It was explained with evidences that Africans were likewise brought from the southern regions of the continent (currently: southern Angola, South Africa and Mozambique) [49, 19]. It is also known that the departures of slave ships from ports were not necessarily related to the ethnic origins of Africans. Indeed, during the colonization of South Africa by the British in the seventeenth and eighteenth centuries, many Africans migrated to neighboring regions currently known as Angola, Madagascar and Mozambique, from where they were captured and transported in the slave trade to Salvador city. Bayesian analysis confirms the previous analysis, thus

suggesting an ancient post-Columbian introduction of HTLV-1a-A related to the slave trade between the XVI and late XIX centuries.

In respect of the ethnic characterization of the analyzed population, mtDNA markers that characterize African populations and whose geographical distribution is in sub-Saharan Africa have been used [50]. The used L3 haplogroup implicated in Bantu expansion [51]. The HTLV-1 Transcontinental sub-group strains from South Africa and Mozambique suggest a common origin of HTLV-1 in both countries. This can be explained by their common people and migration patterns, as well as their intense commerce [52]. In the period from the fourteenth to the nineteenth century, approximately 4 million Africans from this region arrived to Brazil, mostly of Bantu and Sudanese origin [53]. The latter covers areas ranging from Senegal to Nigeria; regions that nowadays belong to Angola, Congo and Mozambique [25].

In ancestry-related studies using mtDNA markers in samples of urban northeastern Brazilian, Amerindian (22%) and African (44%) contributions have been verified [54]. As for the ethnic contribution in HTLV positive samples, [55] there has been a great African contribution (99.3%) in patients from the French Guiana region. We have detected a major African contribution similar to that from Salvador (Table 1) [18]. Yet, we have only found African and a small Amerindian contribution. In Brazil, a significant Amerindian contribution (10.2%) was only reported in HTLV-1 patients from the Amazon region, where the Amerindian contribution is much higher (Table 1). These data suggest that the HTLV may have had different origins.

Three samples with Amerindian contribution have been detected. In these cases, additional analyses were carried out using autosomal ancestry informative markers (AIMs) (LPL and APO - African and PV92 - Amerindian). The Amerindian contribution was

confirmed, but there was no European contribution, corroborating previous studies which have not detected European contribution in the analysis of samples from urban and rural areas of Bahia [unpublished data].

Besides the African contribution detected by mtDNA haplotype analysis, it was verified the presence of  $\beta$ -globin haplotypes (nuclear DNA) demonstrating: 43.7% Benin type (BEN), 40.6% Bantu type (CAR), 9.4% Senegal type (SEN) and 3.1%

Cameroon type (CAM). The BEN type is closely related to west-central Africa in the same way CAR is associated with south-central and eastern Africa; SEN is linked to West Africa, and CAMER is connected to the west coast of Africa (Table 1). These results complement data found in mtDNA haplotypes. Benin type is related to the west-central African region and is of Bantu and Sudanese origin. In fact, Benin and its bordering regions, such as Congo, Angola, Senegal and Nigeriawere part of the slave trade [25, 53].

Regarding to the history of Ilhéus, it is known that the Captaincy of Ilhéus had a slavery period when Dom Pedro II, in 07/26/1534, donated a vast expanse of land, beginning the colonization of the region [56]. After being a city, the region received people from Sergipe State and also slaves from different African regions [57]. In 1924, cocoa farmers began the construction of the port, allowing the export of cocoa and the cultural and foreign exchange [56]. Itabuna city, next to Ilhéus, began to be populated by cowboys from Sergipe State whose destination was Vitória da Conquista city [58]. Sergipean immigrants initiated holdings on Cachoeira river banks. Jesuits helped to catechize *Pataxó*, *Guerren* and *Camacã* natives. In 1730 and 1790, pioneers braved the wilderness and the natives [58]. Ilhéus and Itabuna used to have Amerindians from different tribes as slaves, reflecting the possible Amerindian influence detected in this study.

In summary, all virus analyzed in this study were classified as cosmopolitan subtype and transcontinental subgroup (HTLV-1aA). In addition, the phylogeny showed multiple introductions of the virus in Brazil while the TMRCA analysis confirms the previous analyzes, suggesting an ancient post-Columbian introduction of HTLV-1a-A related to the slave trade between the XVI and late XIX centuries. Additionally, the haplotype characterization of  $\beta$ -globin gene and mtDNA has complemented the study, generating solid data about the ethnicity of HTLV-1infected women. These characterizations allowed for identifying the African ethnicity with a predominance of Benin and Bantu types. There are widespread expectations that more sequences will be identified and thus enable the construction of further phylogenetic analyzes, including the characterization of the ethnic population so as to elucidate the virus's arrival hypotheses already drawn in Brazil.

## Sequence Data

The GenBank accession numbers of the new HTLV-1 fragments included in phylogenetic study were as follows: KF202307; KF202308; KF202309; KF202310; KF202311; KF202312; KF202313; KF202314; KF202315; KF202316; KF202317; KF202318; KF202319; KF202320; KF202321; KF202322; KF202323; KF202324; KF202325; KF202326; KF202327.

### Acknowledges

These sequence analyses and bioinformatics were performed in the LASP/CPqGM/FIOCRUZ. The authors are grateful to Noilson Lázaro de Souza Gonçalves and Camylla Vilas Boas Figueiredo for their technical assistance in the HTLV serology and the  $\beta$ -globin haplotypes analyses, respectively.

### References

1. CATALAN-SOARES BC, PROIETTI FA, CARNEIRO-PROIETTI ABF. (2001) Os vírus linfotrópicos de células T humanos (HTLV) na última década (1990-2000). *Revista Brasileira Epidemiologia* 4: 81-95.
2. MUELLER N. (1991) The epidemiology of HTLV-1 infection. *Cancer Causes Control* 2: 37-52.
3. PROIETTI FA, CARNEIRO-PROIETTI ABF, CATALAN-SOARES BC, MURPHY EL. (2005) Global epidemiology of HTLV-1 infection and associated diseases. *Oncogene* 24: 6058-6068.
4. GALVÃO-CASTRO B, ALCÂNTARA JCL, GRASSI RFM, MOTA-MIRANDA ACA, QUEIROZ JTA, REGO AFF, MOTA ACA, PEREIRA AS, MAGALHÃES T, TAVARES-NETO J, GONÇALVES SM, DOURADO I. (2009) Epidemiologia e origem do HTLV-1 em Salvador estado da Bahia: A cidade com a mais elevada prevalência desta infecção no Brasil. *Gazeta Médica da Bahia* 79: 3 -10.
5. GONÇALVESDU, PROIETTI FA, RIBASRJG, ARAÚJOMG, PINHEIROS R, GUEDESAC, CARNEIRO-PROIETTIABF. (2010) Epidemiology, Treatment, and Prevention of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-Associated Diseases. *Clin. Microbiol* 23: 577-589.
6. MIURA T, FUKUNAGA T, IGARASHI T. (1994) Phylogenetic subtypes of human T-lymphotropic virus type I and their relations to the anthropological background. *Proc Natl Acad Sci* 91: 1124-1127.
7. VANDAMME AM, LIU HF, GOUBAU P, DESMYTER J. (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.

8. GESSAIN A, YANAGIHARA R, FRANCINI G. (1991) Highly divergent molecular variants of human T-lymphotropic virus type from isolated populations in Papua New Guinea and the Solomon Islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7694–7698.
9. CHEN J, ZEKENG L, YAMASHITA M. (1995) HTLV isolated from a Pygmy in Cameroon is related but distinct from the known Central African type. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11: 1529–1531.
10. SALEMI M, VAN DOOREN S, AUDENAERT E. (1998) Two new human T-lymphotropic virus type I phylogenetic subtypes in seroindeterminates, a Mbuti pygmy and a Gabonese, have closest relatives among African STLV-I strains. *Virology* 246: 277–287.
11. WOLFE ND, HENEINE W, CARR KJ, GARCIA DA, SHANMUGAM V, TAMOUFE U, TORIMIRO NJ, PROSSER TA, LEBRETON MM, POU-DINGOLE E, MCCUTCHAN EF, BIRX LD, FOLKS MT, BURKE SD, SWITZER MW. (2005) Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 7994 – 7999.
12. VAN DOOREN S, GOTUZZO E, SALEMI M, WATTS E, AUDENAERT S, DUWE H, ELLERBROK R, GRASSMANN J, DESMYTER A, VANDAMME M. (1998) Evidence for a Post-Colombian introduction of human T-cell lymphotropic virus in Latin America. *J Gen Virol* 79: 2695-2708.
13. Brasil (1997) Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS Projeto sentinela: gestantes. Brasília: Ministério da Saúde. 12 p.
14. SANTOS JI, LOPES MAA, DELIÉGE-VASCONCELOS E, COUTO-FERNANDEZ JC, PATEL BN, BARRETO ML, FERREIRA JROC, GALVÃO-CASTRO B. (1995) Seroprevalence of HIV, HTLV-1/II and other perinatally-transmitted pathogens in Salvador, Bahia. *Rev. Inst. Med. Trop* 37: 343-348.
15. BITTENCOURT AL, DOURADO I, FILHO PB. (2001) Human T-cell lymphotropic virus type 1 infection among pregnant women in northeastern Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr* 26: 490–494.
16. MAGALHÃES T, MOTA-MIRANDA AC, ALCANTARA LC. (2008) Phylogenetic and molecular analysis of HTLV-1 isolates from a medium sized town in northern of Brazil: Tracing a common origin of the virus from the most endemic city in the country. *J Med Virol* 80: 2040–2045.
17. DOURADO I, ALCANTARA LC, BARRETO ML, TEIXEIRA MG, GALVAO-CASTRO B. (2003) HTLV-1 in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr* 34: 527-531.

18. ALCANTARA JRLC, VAN DOOREN S, GONÇALVES MS, KASHIMA S, COSTA MC, SANTOS FL, BITTENCOURT AL, DOURADO I, FILHO AA, COVAS DT, VANDAMME AM, GALVÃO-CASTRO B. (2003) Globin haplotypes of human T-cell lymphotropic virus type I-infected individuals in Salvador, Bahia, Brazil, suggest a post-Columbian African origin of this virus. *J Acquir Immune Defic Syndr* 33: 536-542.
19. REGO FF, ALCANTARA LC, MOURA NETO JP, MIRANDA AC, PEREIRA OS, GONÇALVES MDES, GALVÃO-CASTRO B. (2008) HTLV type 1 molecular study in Brazilian villages with African characteristics giving support to the post-Columbian introduction hypothesis. *AIDS Res Hum Retroviruses* 24: 673-677.
20. KRIEGER H, MORTON NE, MI MP, AZEVEDO E, FREIRE-MAIA A, YASUDA N. (1965) Racial admixture in Northeastern Brazil. *Annals of Human Genetics*, 19: 113-125.
21. GATTÁS GJF, GOMES L, KOHLER P. (2004) Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. *Br J Med Biolog Research* 37: 451-458.
22. CALLEGARI-JACQUES SM, SALZANO FM. (1999) Brazilian Indian/ non-Indian interactions and their effects. *Cienc Cult* 51: 166–174.
23. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (1938) Censo 2010. Available: [www.censo2010.ibge.gov.br](http://www.censo2010.ibge.gov.br). Accessed 05 December 2012.
24. Ribeiro D (1995) *O povo brasileiro: a formação e o sentido do Brasil*. São Paulo: Companhia da Letras.
25. Curtin PD (1969) *The Atlantic Slave Trade: A Census*. Madison: University of Winsconsin Press.
26. WAINSCOAT JSS, HILL AV, BOYCE AL, FLINT J, HERNANDEZ M, THEIN SL, OLD JM, LYNCH JR, FALUSI AG, WEATHERALL DJ, CLEGG JB. (1986) Evolutionary relationships of human populations from an analysis of nuclear DNA polymorphisms. *Nature* 319: 491 – 493.
27. NAGEL RL. (1984) The origin of the hemoglobin S gene: clinical, genetic and anthropological consequences. *Einstein Quarter Journal of Biology Medicine* 2: 53–62.
28. HATTORI Y, KUTLAR F, KUTLAR A, *et al.*. (1986) Haplotypes of beta S chromosomes among patients with sickle cell anemia from Georgia. *Hemoglobin* 10: 623–642.



29. AZEVEDO ES, SILVA KM, DA SILVA MC, *et al.* (1981) Genetic and anthropological studies in the island of Itaparica, Bahia, Brazil. *Hum Hered* 31: 353–357.
30. GONÇALVES MS, BOMFIM GC, MACIEL E, *et al.* (2003)  $\beta$ s-Haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador-Bahia-Brazil. *Braz JMed Biol Res* 36: 1283-1288.
31. ALCANTARA LC, OLIVEIRA T, GORDON M, PYBUS O, MASCARENHAS RE, SEIXAS MO, GONCALVES M, HLELA C, CASSOL S, GALVAO-CASTRO B. (2006) Tracing the origin of Brazilian HTLV-1 as determined by analysis of host and viral genes. *AIDS* 20: 780-2.
32. ALCANTARA LCJ, DOOREN SV, VANDAMME AM, GALVAO-CASTRO B, OLIVEIRA T. LASP HTLV-1 Automated Subtyping Tool (Version 1.0). Available: <http://www.bahiana.edu.br/bioinfo/virus-genotype/html/subtypinghtlv.html>. Accessed 08 November 2011.
33. THOMPSON JD, GIBSON TJ, PLEWNIAK F, JEANMOUGIN F, HIGGINS DG. (1997) The CLUS- TAL\_X Windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876–4882.
34. NICHOLAS KB, NICHOLAS HBJ, DEERFIELD DW. (1997) GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation. *Embnew News*30.
35. SWOFFORD DL, OLSEN GJ, WADDELL PJ, HILLIS DM. (1996) Phylogenetic inference. *Mol Syst* 2: 407–414.
36. POSADA D, CRANDALL KA. (1998) Modeltest: testing the model of dna substitution. *Bioinformatics* 14: 817– 818.
37. KUMAR S, TAMURA K, NEI M. (1994) MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers. *Cabios* 10: 189–191.
38. DRUMMOND AJ, RAMBAUT A. (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: 214.
39. TORRONI A, SCHURR TG, YANG CC, SZATHMARY EJ, WILLIAMS RC, SCHANFIELD MS, TROUP GA. (1992) Native American mitochondrial DNA analysis indicates that the Amerind and the Nadene populations were founded by two independent migrations. *Genetics* 130: 153–162.
40. TORRONI A, SCHURR TG, CABELL MF, BROWN MD, NEEL JV, LARSEN M, SMITH DG. (1993) Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs. *Am J Hum Genet* 53: 563–590.

41. TORRONI A, HUOPONEN K, FRANCALACCI P, PETROZZI M, MORELLI L, SCOZZARI R, OBINU D. (1996) Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics* 144: 1835–1850.
42. SUTTON M, BOUHASSIRA EE, NAGEL RL. (1989) Polymerase chain reaction amplification applied to the determination of  $\beta$ -like globin gene cluster haplotypes. *Am J Hematol* 32: 66–69.
43. VICENTE ACP, GUDO SE, INIGUEZ AM, OTSUKI K, BHATT N, ABREU C M, VUBIL A, BILA D, FERREIRA JROC, TANURI A, ILESH VJ. (2011) Genetic Characterization of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 in Mozambique: Transcontinental Lineages Drive the HTLV-1 Endemic. *PLoS Negl Trop Dis* 5: 1038.
44. TAVARES LHD (2001) *História da Bahia*. São Paulo/Salvador: Unesp/Edufba. 10 ed.
45. MOTA AC, VAN DOOREN S, FERNANDES FM, PEREIRA SA, QUEIROZ AT, GALLAZZI VO, VANDAMME AM, GALVÃO-CASTRO B, ALCANTARA LC. (2007) The Close relationship between south africa and latin american HTLV strains corroborated in a molecular epidemiological study of the HTLV-1 isolates from a blood donor cohort. *Aids res humretroviruses* 23: 503–507.
46. GREENBERG J, TURNER C, ZEGURA S. (1986) The settlement of the Americas: a comparison of the linguistic, dental and genetical evidence. *Curr Anthropol* 27: 477-497.
47. BONATTO SL, SALZANO FM. (1997) A single and early migration for the peopling of the Americas supported by mitochondrial DNA sequence data. *Proc Natl Acad Sci* 94: 1866-1871.
48. YAMASHITA M, VERONESI R, MENNA-BARRETO M. (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.
49. VERGER P. (1976) *Trade Relations Between the Bight of Benin and Bahia, 17th to 19th Century*. Trans. Ibadan: Evelyn Crawford, Ibadan University Press. 24–26 p.
50. SOARES P, ALSHAMALI F, PEREIRA JB, FERNANDES V, SILVA NM, AFONSO C, COSTA MD, MUSILOVÁ E, MACAULA YV, RICHARDS MB, CERNY V, PEREIRA L. (2011) The Expansion of mtDNA Haplogroup L3 within and out of Africa. *Mol Biol Evol* 29: 915-927.

51. SALAS A, RICHARDS M, DE LA FE T, LAREU MV, SOBRINO B, *et al.*. (2002) The making of the African mtDNA landscape. *Am J Hum Genet* 71: 1082–1111.
52. MELO J, BEBY-DEFAUX A, FARIA C, GIRAUD G, FOLGOSA E, *et al.*. (2000) HIV and HTLV prevalences among women seen for sexually transmitted diseases or pregnancy follow-up in Maputo, Mozambique. *J Acquir Immune Defic Syndr* 23: 203–204.
53. GOULART M. (1975) *Escravidão Africana no Brasil: Das Origens à Extinção do Tráfico*. São Paulo: RevistaAlfa-ômega. 3 ed.
54. ALVES-SILVA J, SANTOS DA SM, GUIMARAES PE, FERREIRA AC, ANDELT HJ, PENA SD, PRADO VF. (2000) The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet* 67: 444-461.
55. BRUCATO N, CASSAR O, TONASSO L, TORTEVOYE P, MIGOT-NABIAS F, PLANCOULAIN S, GUITARD E, LARROUY G, GESSAIN A, DUGOUJON JM. (2010) The imprint of the Slave Trade in an African American population: mitochondrial DNA, Y chromosome and HTLV-1 analysis in the Noir Marron of French Guiana. *BMC Evolutionary Biology* 10: 314.
56. VINHÁES JC (2001) *São Jorge dos Ilhéus: da capitania ao fim do século XX*. Ilhéus: Editus.
57. CARNEIRO E (1991) *Religiões negras e negros bantos*. Ilhéus: Civilização brasileira. 3 ed.
58. ANDRADE PM; ROCHA BL. (2005) *De Tabocas a Itabuna: Um Estudo Histórico –Geográfico/Concepção e Organização*. Itabuna: Editus.

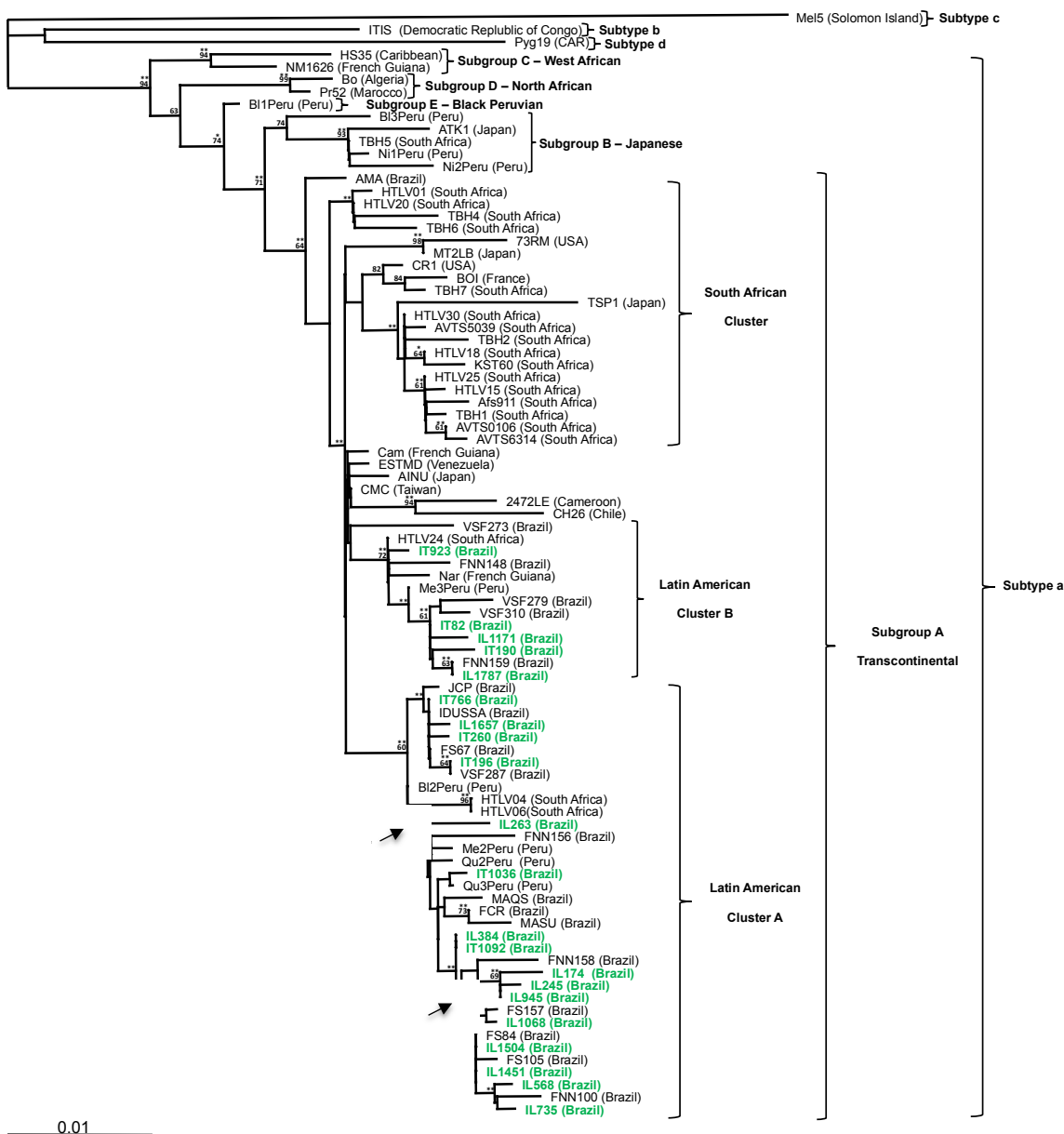


Figure 1. Rooted neighbor-joining tree of 21 HTLV-1 strains based on 714-bp fragment of the LTR region. The geographic origin is in parentheses. The new LTR sequences included in this analysis are in bold and green. The bootstrap values (above 60% in 1000 repetitions) represents the significance level for each branch corresponding to the number of times that the group has occurred in 1000 repetitions, providing statistical support to built tree. The isolated Mel5 was used as an external group to root the tree. The LRT method was considered highly statistically significant if  $p < 0.001$  (\*\*) and statistically significant if  $p < 0.005$  (\*).

**Table 1** - Frequency of the haplotypes associated with the  $\beta$ -globin gene cluster in the patients studied.

Gene $\beta^S$ Haplotypes	5' $\epsilon$ /3' $\beta$ <i>Xmn I</i>	5' $\gamma^A$ /3' $\beta$ <i>Hind III</i>	5' $\psi\beta$ /3' $\beta$ <i>Hind III</i>	$\psi\beta$ <i>Hinc II</i>	3' $\psi\beta$ <i>Hinc II</i>	n (%)
CAR/Atp	-/-	+/+	-/-	-/-	+/-	6,25
BEN/BEN	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	31,25
BEN/CAR	-/-	+/-	-/-	-/-	+/-	25
CAR/CAR	-/-	+/+	-/-	-/-	-/-	12,5
CAR/CAM	-/-	+/+	+/-	-/-	+/-	18,75
CAR/SEN	+/-	+/+	-/-	+/-	+/-	6,25
TOTAL						100

BEN (Benin), CAR (Central African Republic), CAM (Cameroon), SEN (Senegal) and Atp (Atypical)

## 5. DISCUSSÃO

Muitas infecções virais são transmitidas de mãe para filho via transplacentária ou *intrapartum*. O risco de transmissão está relacionado com diferentes fatores: (1) se a infecção materna é primária (por exemplo, no caso do vírus da imunodeficiência humana (HIV), (2) se é uma reativação (por exemplo, no caso do citomegalovírus humano (CMV) ou (3) uma infecção crônica (no caso do vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV). A transmissão pelo leite materno é bem documentada para os três vírus citados acima. Além disso, a exposição contínua a pequenas quantidades de vírus durante o período do aleitamento provavelmente contribui para um maior risco de transmissão (LAWRENCE; LAWRENCE, 2004).

A amamentação é de fato uma forma importante de transmissão materno-infantil, sendo que fatores como carga proviral materna, altos títulos de anticorpos e maior tempo de amamentação tem sido relacionados a um maior risco de infecção (VAN TIENEN *et al.*, 2012; BIGGAR *et al.*, 2006; MALONEY *et al.*, 2006, *et al.*, WIKTOR *et al.*, 1997). Porém, infelizmente, o rastreamento sorológico para o HTLV não é obrigatório na rotina pré-natal no Brasil. Se o vírus fosse detectado precocemente nas gestantes, elas poderiam ser orientadas a não amamentar seus filhos.

O Japão conseguiu reduzir a frequência da infecção pelo HTLV em cerca de 80%, selecionando as gestantes soropositivas para o HTLV-1 no pré-natal e recomendando que não amantassem (HINO *et al.*, 1997). No Brasil, infelizmente, muitas mulheres não realizam o pré-natal e quando o fazem não realizam os testes sorológicos, incluindo a pesquisa do HTLV. De acordo com a literatura, uma das maiores deficiências está na dificuldade encontrada pelas gestantes em realizar os exames laboratoriais (GOMES FILHO *et al.*, 2010). Outra dificuldade está na complexidade de se operacionalizar um atendimento pré-natal mais padronizado e que contemple a coleta e realização dos exames laboratoriais (CAVALCANTE *et al.*, 2004). Além disso, outra questão muito importante para reduzir a transmissão vertical do HTLV está na elaboração de uma política de saúde que cadastre essas gestantes HTLV positivas e que forneça o leite artificial. Vale destacar que a infecção pelo HTLV é mais

prevalente na população com menor renda, que, certamente, não conseguirá ou terá dificuldades em substituir a amamentação pelo leite artificial. Vale ressaltar que a recomendação de não amamentar deve ser feita com cautela, porque os riscos à saúde decorrentes da desnutrição ou má alimentação nessa fase poderão superar o risco da infecção pelo HTLV e do desenvolvimento das doenças relacionadas (VAN TIENEN *et al.*, 2012).

No presente trabalho, encontramos uma prevalência do HTLV-1 maior que média nacional. Valores semelhantes foram verificados na capital do estado da Bahia, Salvador (0,84%) (BITENCOURT *et al.*, 2001) e em Cruz das Almas, interior da Bahia (0,98%) (MAGALHÃES *et al.* 2008). Porém, trabalhos em outros lugares do Brasil encontraram taxas bem menores (FIGUEIRÓ-FILHO *et al.*, 2007; GOMES FILHO *et al.*, 2009; OLIVEIRA-AVELINO *et al.*, 2006; GUIMARÃES DE SOUSA *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2010; DAL FABBRO *et al.*, 2008; OLBRICH, MEIRA, 2004). Vale ressaltar que embora tenham sido detectadas altas prevalências encontradas na Bahia, seja no recôncavo, na capital, ou no sul do estado, é muito importante que sejam realizados estudos quanto a prevalência em outras áreas, mesmo que próximas, pois em áreas já bem estudadas, como no Japão, a distribuição do HTLV-1 não foi homogênea. Nestas regiões foram encontrados pequenos agrupamentos com alta, ou muito alta prevalência de infecção viral, enquanto que nas áreas ou localidades próximas às endêmicas, a prevalência não representava uma epidemia (GESSAIN; CASSAR 2012).

Ainda em relação à prevalência na Bahia, um estudo populacional demonstrou que Salvador é a cidade que apresenta maior soroprevalência do HTLV-1 com frequência de 1,76% na população geral (DOURADO *et al.*, 2003), e acredita-se que isso se deva a alta influência africana na composição da população, já que o HTLV veio da África durante o tráfico de escravos. No sul da Bahia, essa influência africana também foi verificada. Quando analisados os resultados da autodeclaração da cor de pele obtidos a partir do questionário aplicado, 72,2% das parturientes HTLV positivas se disseram pretas ou pardas, enquanto que em Itabuna esse valor foi de 81,8%. Essa maior contribuição africana na composição da população pôde ser verificada pela análise dos marcadores de ancestralidade. Em Ilhéus foi detectada uma maior frequência dos haplogrupos africanos (24,1%, 13,4% e 20,7% para os haplogrupos L3A, L3B e L3C, respectivamente) e ameríndios (3,4% dos haplogrupos A, B e C, cada). Essa maior

frequência dos haplogrupos africanos também foi verificada em Itabuna. No geral, as análises de ancestralidade revelaram: (1) maior contribuição africana na população estudada; (2) correlação entre a etnia autodeclarada e a determinada através da análise genômica e (c) determinação da origem do HTLV presente na região Sul da Bahia - os haplótipos e haplogrupos mais frequentes foram da região da África sub-Saariana, coincidindo com as regiões onde o vírus é mais prevalente e de onde veio durante o tráfico escravo (MIURA *et al.*, 1994, VAN DOOREN *et al.*, 1998, YAMASHITA *et al.*, 1999, ALCANTARA *et al.*, 2003).

Em relação à análise molecular dos retrovírus, o subtipo das amostras de HTLV encontrado foi o subtipo Cosmopolita subgrupo Transcontinental (HTLV-1aA), que é o subtipo mais disseminado em todo o mundo, além de ser aquele encontrado em maior prevalência no continente americano e no Brasil, seja em doadores de sangue, gestantes e quilombolas (SEGURADO *et al.*, 2002; LAURENTINO *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2006).

Quanto à transmissão vertical, nenhum dos filhos acompanhados na gestação avaliada, até a finalização do projeto, teve um resultado positivo para o HTLV. Os positivos foram de gestações anteriores. Na presente gestação, todas as soropositivas foram orientadas pela neonatologista/pediatra a não amamentar, enquanto que nas gestações anteriores, elas relataram ter amamentado seus filhos por mais de seis meses. Infelizmente, devido à dificuldade de comprar o leite artificial, algumas gestantes relataram estar realizando alimentação mista (amamentação + leite artificial) quando retornávamos para o acompanhamento. Vale ressaltar ainda que apenas duas gestantes que já sabiam da sua positividade para o HTLV-1 realizaram o parto cesáreo, mostrando que embora essa seja a recomendação, a não amamentação tem um efeito mais importante em prevenir a infecção.

Em relação à quantificação da carga proviral, vale ressaltar que todas as gestantes eram assintomáticas e nenhuma delas desenvolveu alguma sintomatologia, sendo assim, não há como avaliar a relação entre o nível de carga proviral e a sintomatologia. Além disso, os valores são muito heterogêneos não havendo correlação com qualquer outra variável.



Quanto às vias de transmissão do HTLV-1, foi sugerido que em Salvador as infecções foram adquiridas tanto pela amamentação, quanto por via sexual. Neste estudo, a análise sorológica para o HTLV-1 em familiares, incluindo avós, parceiros/maridos e filhos de gestações anteriores do caso índice (grávida), revelou casos positivos de HTLV-1 em diferentes membros da família, destacando parceiros, mães e filhos (1 filho e 1 filha, de 2 e 8 anos, respectivamente). Desta forma, pode-se sugerir que a infecção pelo HTLV-1 no sul da Bahia pode ter se difundido tanto sexualmente como verticalmente. Ainda sobre a transmissão familiar, deve-se enfatizar que metade das famílias avaliadas teve pelo menos um membro soropositivo para o HTLV-1. Além disso, a análise das taxas de infecção nos membros da família indicou uma taxa de soropositividade de 32,55 % (14/43). Este número é maior do que o encontrado recentemente em uma pesquisa que avaliava a transmissão familiar no estado do Pará (25,2%), outra área endêmica para o HTLV no Brasil. Sem dúvida, os dados acima mencionados reforçam a necessidade de estabelecer estratégias de vigilância ativa em familiares como uma importante ação de vigilância epidemiológica com o objetivo de detectar precocemente a infecção viral e prevenir a transmissão tanto pela via sexual, como vertical. De fato, tem sido demonstrado que o vírus se espalha silenciosamente dentro das famílias e que há uma agregação familiar da infecção (DA COSTA, *et al.*, 2013).

## CONCLUSÃO

- 4.4 A prevalência de HTLV foi de 1,05%, considerando os municípios de Ilhéus e Itabuna. Essa alta prevalência indica que o HTLV-1 deve ser rastreado durante a gravidez em mulheres do sul da Bahia. Além disso, essas mulheres HTLV-1 positivas devem ser aconselhadas a não amamentar e optar pelo parto cesáreo, a fim de reduzir a possibilidade de transmissão vertical. A relação custo-benefício da não amamentação e o uso de leite artificial foi comprovado no Japão e é recomendada pelo Ministério da Saúde e OMS.
- 4.5 Não foi encontrada associação entre a infecção pelo HTLV-1 e variáveis sócio-demográficas e comportamentais avaliadas. Foi encontrada associação com o status marital, mas a associação não foi precisa (OR=7.99; 95%CI 1.08-59.31; p=0.042).
- 4.6 Encontramos uma alta prevalência de infecção pelo HTLV em familiares das gestantes positivas: 32,55%. Esse dado reforça a necessidade de estabelecer estratégias de busca ativa em familiares de casos positivos como uma importante ação de vigilância epidemiológica objetivando tanto a detecção precoce da infecção, como a prevenção da transmissão sexual e parenteral.
- 4.7 Estes resultados são muito relevantes por que: (a) até o momento não há estudos descritos de soroprevalência da infecção pelo HTLV-1 em gestantes/puérperas na região Sul da Bahia; (b) estudos anteriores em áreas de distribuição do vírus importantes em áreas endêmicas no Brasil encontraram: 0,84% - 1,0% - Salvador/Bahia e 1,1% em Belo Horizonte/Minas Gerais; (c) sugerem uma importante transmissão intrafamiliar nesta área.
- 4.8 As cargas provirais foram baixas e devem refletir o perfil assintomático das gestantes e não puderam ser correlacionadas com a transmissão vertical.
- 4.9 Na subtipagem das amostras foi encontrado apenas o HTLV-1, subtipo cosmopolita, subgrupo Transcontinental.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ALBRECHT, B., COLLINS, N. D., BURNISTON, M.T, NISBET, J. W., RATNER, L., GREEN, P. L., AND LAIRMORE, M. D. Human T-lymphotropic virus type 1 open reading frame I p12(I) is required for efficient viral infectivity in primary lymphocytes. *J. Virol.*, v. 74, p. 9828-9835, 2000.

ALBRECHT B., D'SOUZA C.D., DING W., TRIDANDAPANI S., COGGESHALL K.M., LAIRMORE M.D. Activation of nuclear factor of activated T cells by human T-lymphotropic virus type 1 accessory protein p12(I). *J Virol.*, v. 76, p. 3493–3501, 2002.

ALCANTARA, L.C., VAN DOOREN, S., GONÇALVES, M.S., KASHIMA, S., COSTA M.C., SANTOS, F.L., BITTENCOURT, A.L., DOURADO, I., FILHO, A.A., COVAS, D.T., VANDAMME, A.M., GALVÃO-CASTRO, B. Globin haplotypes of human T-cell lymphotropic virus type I-infected individuals in Salvador, Bahia, Brazil, suggest a post-Columbian African origin of this virus. *J Acquir Immune Defic Syndr.*, v. 33(4), p.536-42, 2003.

ALCANTARA, L. C., DE OLIVEIRA T., GORDON, M., PYBU,S O., MASCARENHAS, R. E., SEIXAS, M. O., GONÇALVES, M., HLELA, C., CASSOL, S., GALVÃO-CASTRO, B. Tracing the origin of Brazilian HTLV-1 as determined by analysis of host and viral genes. *AIDS*, v. 20(5), p. 780-2, 2006.

ANDO Y, MATSUMOTO Y, NAKANO S, SAITO K, KAKIMOTO K, TANIGAWA T, EKUNI Y, KAWA M, TOYAMA T. Long-term follow up study of vertical HTLV-1 infection in children breast-fed by seropositive mothers. *J Infect.*, v. 46, p. 177-9, 2003.

ARAUJO A, HALL WW: Human T-lymphotropic virus type II and neurological disease. *Ann Neurol*, v. 56, p.10-19, 2004.

BIGGAR RJ, NG J, KIM N, HISADA M, LI HC, CRANSTON B, HANCHARD B, MALONEY EM. Human leukocyte antigen concordance and the transmission risk via breast-feeding of human T cell lymphotropic virus type I. *J Infect Dis.* v. 193(2):277-82, 2006.

BITTENCOURT AL. Vertical transmission of HTLV-1/II: a review. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* v. 40, p. 245-51, 1998.

BITTENCOURT AL., DOURADO I., FILHO PB., SANTOS M., VALADÃO E., *et al.* Human T-cell lymphotropic virus type 1 infection among pregnant women in northeastern Brazil. *J Acquir Immune Defic Syndr.* v. 26(5), p. 490-4, 2001.

BITTENCOURT AL., SABINO EC., COSTA MC., PEDROSO C., MOREIRA L. No evidence of vertical transmission of HTLV-1 in bottle-fed children. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* v. 44(2), p. 63-5, 2002.

CARNEIRO-PROIETTI, A.B.F., RIBAS JG, CATALAN-SOARES BC, MARTINS ML, BRITO-MELO GE, MARTINS-FILHO OA, *et al.* Infecção e doença pelos vírus linfotrópicos humanos de células T (HTLV-1/II) no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop.* v. 35, p. 499-508, 2002.

CARNEIRO-PROIETTI, A. B.; CATALAN-SOARES, B. C.; CASTRO-COSTA, C. M.; MURPHY, E. L.; SABINO, E. C.; HISADA, M.; GALVAO-CASTRO, B.; ALCANTARA, L. C.; REMONDEGUI, C.; VERDONCK K.; PROIETTI, F. A. HTLV in the Americas: challenges and perspectives. *Rev. Panam. Salud. Publica.*, v. 19, p. 44-53, 2006.

CALATTINI, S.; CHEVALIER, S A.; DUPREZ, R.; BASSOT, S.; FROMENT, A.; MAHIEUX, R.; GESSAIN, A. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. *Retrovirology*, v. 2: 30, 2005.

CATALAN-SOARES, B. C.; PROIETTI, F. A.; CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F. Os vírus linfotrópicos de células T humanos (HTLV) na última década (1990-2000). *Rev. Bras. Epidemiol.*, v. 4, p. 81-95, 2001.

CATALAN-SOARES, B; CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F.; PROIETTI, F. A., and INTERDISCIPLINARY HTLV RESEARCH GROUP. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-1/II): serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. *Cad. Saúde Pública*, v. 21 (3), p. 926-931, 2005.

CAVALCANTE, M.S., JUNIOR, A.N.R., DO MENINO JESUS, S. T., *et al.* Transmissão vertical do HIV em Fortaleza: revelando a situação epidemiológica de uma capital do Nordeste. *RBGO*, 2004; 26:131-8.

CHEN, I. S., MCLAUGHLIN, J., GASSON, J. C., CLARK, S. C., AND GOLDE, D. W. Molecular Characterization of genome of a novel human T-cell leukaemia virus. *Nature*, v. 305, p. 502-505, 1983.

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

COLLINS, N. D., NEWBOUND, G. C., ALBRECHT, B., BEARD, J. L., RATNER, L., AND LAIRMORE, M. D. Selective ablation of human T-cell lymphotropic virus type 1 p12<sup>I</sup> reduces viral infectivity in vivo. *Blood*, v. 91, p. 4701-4707, 1998.

COSKUN AK., SUTTON RE. Expression of glucose transporter 1 confers susceptibility to human T-cell leukemia virus envelope-mediated fusion. *J Virol.* v. 79(7), p. 4150-8, 2005.

CRUZ B. A.; CATALAN-SOARES, B.; PROIETTI, F. Manifestações neurológicas associadas ao vírus linfotrópico humano de células T do tipo I (HTLV-1). *Rev Bras Reun Atol.* v. 45, p. 71-77, 2005.

DA COSTA CA, FURTADO KC, FERREIRA L DE S, ALMEIDA D DE S, LINHARES A DA C, ISHAK R, VALLINOTO AC, DE LEMOS JA, MARTINS LC, ISHIKAWA EA, DE SOUSA RC, DE SOUSA MS: Familial transmission of human T-cell lymphotropic virus: silent dissemination of an emerging but neglected infection. *PLoS Negl Trop Dis.*, v. 13, p. 2272, 2013.

DAL FABBRO MM, CUNHA RV, BÓIA MN, PORTELA P, BOTELHO CA, FREITAS GM, SOARES J, FERRI J, LUPION J: HTLV 1/2 infection: prenatal performance as a disease control strategy in State of Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop.*v. 41, p. 148-518, 2008.

DE THE, G., AND BOMFORD, R. An HTLV-1 vaccine: why, how, for whom? *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, v. 9, p. 381–386, 1993.

DOURADO, I.; ALCÂNTARA, L. C.; BARRETO, M. L.; TEIXEIRA, M. G.; GALVAO-CASTRO, B. HTLV-1 in the general population of Salvador, Brazil: a city

with African ethnic and sociodemographic characteristics. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* v. 34, p. 527-531, 2003.

EIRAKU, N., P. NOVOA, M. DA COSTA FERREIRA, C. MONKEN, R. ISHAK, O. DA COSTA FERREIRA, S. W. ZHU, R. LORENCO, M. ISHAK, V. AZVEDO, J. GUERREIRO, M. POMBO DE OLIVEIRA, P. LOUREIRO, N. HAMMERSCHLAK, S. IJICHI, AND W. W. HALL. Identification and characterization of a new and distinct molecular subtype of human T-cell lymphotropic virus type 2. *J. Virol.* v. 70, p. 1481–1492, 1996.

FEUER, G.; GREEN, P. L. Comparative biology of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. *Oncogene.* v. 24(39), p. 5996–6004, 2005.

FIGUEIRÓ-FILHO, E.A., SENE FONTE FRA., LOPES AHA., *et al.* Frequency of HIV-1, rubella, syphilis, toxoplasmosis, cytomegalovirus, simple herpes virus, hepatitis B, hepatitis C, Chagas' disease and HTLV I/II infection in pregnant women of State of Mato Grosso do Sul. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v. 40(2), p. 181-187, 2007.

FRANKEL, A.D.; YOUNG JAT. HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem.* v. 67, p. 1-25, 1998.

GALVAO-CASTRO, B.; LOURES, L.; RODRIQUES, L. G.; SERENO, A.; FERREIRA-JUNIOR, O. C.; FRANCO, L. G.; MULLER, M.; SAMPAIO-DASANTANA, A.; PASSOS, L. M.; PROIETTI, F. Distribution of human T-lymphotropic virus type I among blood donors: a nationwide Brazilian study. *Transfusion.* v. 37, p. 242-243, 1997.

GESSAIN A, BARIN F, VERNANT JC, GOUT O, MAURS L, CALENDER A, DE THÉ G. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet.* v. 2(8452), p. 407–410, 1985.

GESSAIN, A.; GALLO, R. C.; FRANCHINI, G. 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. *J Virol.* v. 66, p. 2288–2295, 1992.

GESSAIN A, CASSAR O: Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front Microbiol.* v. 3, p. 388, 2012.

GHEZ D, LEPELLETIER Y, JONES KS, PIQUE C, HERMINE O. Current concepts regarding the HTLV-1 receptor complex. *Retrovirology*. v. 29, 7:99. doi: 10.1186/1742-4690-7-99, 2010.

GUIMARÃES DE SOUZA V, LOBATO MARTINS M, CARNEIRO-PROIETTI AB, JANUÁRIO JN, LADEIRA RV, SILVA CM, PIRES C, GOMES SC, MARTINS C DE S, MOCHEL EG: High prevalence of HTLV-1 and 2 viruses in pregnant women in São Luis, state of Maranhão, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. v. 45, p. 159-62,2012.

HALL, W. W., H. TAKAHASHI, C. LIU, M. H. KAPLAN, O. SCHEEWIND, S. IJICHI, K.NAGASHIMA, AND R. C. GALLO. Multiple isolates and characteristics of human T-cell leukemia virus type II. *J. Virol*. v. 66, p. 2456–2463, 1992.

HINO S, KATAMINE S, MIYATA H, TSUJI Y, YAMABE T, MIYAMOTO T. Primary prevention of HTLV-1 in Japan. *Leukemia*. v. 11: S3, p. 57-59, 1997.

HINO S. Establishment of the milk-borne transmission as a key factor for the peculiar endemicity of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1): the ATL Prevention Program Nagasaki. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. v. 87(4) p. 152-66, 2011.

JONES K. S., PETROW-SADOWSKI C., BERTOLETTE D. C., HUANG Y., RUSCETTI F. W. Heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of human T-cell leukemia virus type 1 virions into CD4<sup>+</sup> T cells. *J. Virol*. v. 79, p. 12692–12702, 2005

KAJIYAMA, W.; KASHIWAGI, S.; IKEMATSU, H.; HAYASHI, J.; NOMURA, H.; OKOCHI, K. Intrafamilial transmission of adult T-cell leukemia virus. *J. Infect. Dis*. v. 154, p. 851-857, 1986.

KALYANARAMAN VS, SARNGADHARAN MG, ROBERT-GUROFF M, MIYOSHI I, GOLDE D, GALLO RC: A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-1I) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science*, v. 218, p. 571-573, 1982.

KITAGAWA, T. FUJISHITA, M.; TAGUCHI, H.; MIYOSHI, I. & TADOKORO, H. Antibodies to HTLV-1 in Japanese immigrants in Brazil. *JAMA*, v. 256, p. 2342, 1986.

KITAJIMA I, MARUYAMA I, MARUYAMA Y. Polyarthritits in human T lymphotropic virus type I-associated myelopathy. *Arthritis Rheum*, v. 32, p. 1342–44, 1989.

LAIRMORE, M.D ANUPAM R, BOWDEN N, HAINES R, HAYNES RA 2ND, RATNER L, GREEN PL. Molecular Determinants of Human T-lymphotropic Virus Type 1 Transmission and Spread. *Viruses*, 2011.

LAMBERT S., BOUTTIER M., VASSY R., SEIGNEURET M., PETROW-SADOWSKI C., JANVIER S. HTLV-1 uses HSPG and neuropilin-1 for entry by molecular mimicry of VEGF165. *Blood*, v. 113, p. 5176–5185, 2009.

LA GRENADE, L.; MANNS, A.; FLETCHER, V.; DERM, D.; CARBERRY C.; HANCHARD B.; MALONEY, E. M.; CRANSTON, B.; WILLIAMS, N. P.; WILKS, R.; KANG, E. C.; BLATTNER, W. A. Clinical, pathologic, and immunologic features of human T-lymphotropic virus type I-associated infective dermatitis in children. *Arch. Dermatol.*, v. 134, p. 439-44, 1998.

LAURENTINO, RV; LOPES, IGL; AZEVEDO, VN; MACHADO, LFA; MOREIRA, MRC; LOBATO, L; ISHAK, MOG; ISHAK, R; VALLINOTO, ACR. Molecular characterization of human T-cell lymphotropic virus coinfecting human immunodeficiency virus 1 infected patients in the Amazon region of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 100(4), p.371-6. 2005.

LAWRENCE RM, LAWRENCE RA. Breast milk and infection. *Clin Perinatol* 31:501– 528, 2004.

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

MALONEY EM, CLEGHORN FR, MORGAN OS. Incidence of HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) in Jamaica and Trinidad. *J Acquir Immune Defic Syndr*, v. 17 p. 167–70, 1998.



MANEL N, BATTINI JL, TAYLOR N, SITBON M. HTLV-1 tropism and envelope receptor.

*Oncogene*. v. 24(39), p. 6016-25, 2005.

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

MIURA T, FUKUNAGA T, IGARASHI T. Phylogenetic subtypes of human T-lymphotropic virus type I and their relations to the anthropological background. *PNAS*, v. 91, p. 1124-1127, 1994.

MOCHIZUKI, M.; ONO, A.; IKEDA, E.; HIKITA, N.; WATANABE, T.; YAMAGUCHI, K. HTLV-1 uveitis. *J Acquir Immune Defic Syndr*. v. 13, p. 50-56, 1996.

MOTA AC, VAN DOOREN S, FERNANDES FM, PEREIRA SA, QUEIROZ AT, GALLAZZI VO, VANDAMME AM, GALVÃO-CASTRO B, ALCANTARA LC. The close relationship between South African and Latin American HTLV type 1 strains corroborated in a molecular epidemiological study of the HTLV type 1 isolates from a blood donor cohort. *AIDS Res Hum Retroviruses*. v. 23(4), p. 503-7, 2007.

MULLOY, J. C., CROWLEY, R. W., FULLEN, J., LEONARD, W. J., FRANCHINI, G. The human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I p12<sup>I</sup> protein binds the interleukin-2 receptor  $\beta$  and  $\gamma_c$  chains and affects their expression on the cell surface. *J. virol*. v. 70, p. 3599-3605, 1996.

NAKAMURA, H., KAWAKAMI, A., TOMINAGA, M., HIDA, A., YAMASAKI, S., MIGITA, K., KAWABE, Y., NAKAMURA, T., EGUCHI, K. Relationship between Sjogren's syndrome and human T-lymphotropic virus type I infection: follow-up study of 83 patients. *L. Lab.Clin. Med*. v. 135, p. 139-144, 2000.

NICOT C., MULLOY JC., FERRARI MG., JOHNSON JM., FU K., FUKUMOTO R., TROVATO R., FULLEN J., LEONARD WJ., FRANCHINI G. HTLV-1 p12(I) protein enhances STAT5 activation and decreases the interleukin-2 requirement for proliferation of primary human peripheral blood mononuclear cells. *Blood* v. 98, p. 823-829, 2001.

NISHIOKA K, MARUYAMA I, SATO K, KITAJIMA I, NAKAJIMA Y, OSAME M. Chronic inflammatory arthropathy associated with HTLV-1. *Lancet*, v. 1, p. 441, 1989.

OHTSUKI Y, AKAGI T, TAKAHASHI K, MIYOSHI I. Ultrastructural study on type C virus particles in a human cord T-cell line established by co-cultivation with adult T-cell leukemia cells. *Arch Virol*; v. 73, p. 69–73, 1982.

OKUMA K, DALTON KP, BUONOCORE L, RAMSBURG E, ROSE JK. Development of a novel surrogate virus for human T-cell leukemia virus type 1: inhibition of infection by osteoprotegerin. *J Virol.*, v. 77(15), p. 8562-9, 2003.

OLBRICH NETO J.; MEIRA DA: Soroprevalence of HTLV-1/II, HIV, siphylis and toxoplasmosis among pregnant women seen at Botucatu - São Paulo - Brazil: risk factors for HTLV-1/II infection. *Rev Soc Bras Med Trop.*v. 37, p. 28-32, 2004.

OLIVEIRA, S.R.; AVELINO, M.M. Human T-cell Lymphotropic Virus Type 1 seroprevalence among pregnant women in Goiânia, GO, Brazil. *RBGO*. 2006.

OSAME M, IZUMO S, IGATA A. Blood transfusion and HTLV-1 associated myelopathy. *Lancet.*; v. 2(8498) p. 104–105, 1986.

PETERLI, B.M; TRONO, D. Hide, shield and strike back: How HIV-infected cells avoid immune eradication. *Nat. Rev. Immunol.* v. 3, p. 97–107, 2003.

POIESZ, BERNARD J.; RUSCETTI, FRANCIS W.; GAZDAR, ADI F. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad SciUSA.* v. 77(12), p. 7415–7419, 1980.

PROIETTI, F. A.; CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F.; CATALAN-SOARES, B. C.; MURPHY, E. L. Global epidemiology of HTLV-1 infection and associated diseases. *Oncogene.* v. 24, p. 6058-6068, 2005.

RIBEIRO MA, PROIETTI FA, MARTINS ML, JANUÁRIO JN, LADEIRA RV, OLIVEIRA MDE F, CARNEIRO-PROIETTI AB. Geographic distribution of human T-lymphotropic virus types 1 and 2 among mothers of newborns tested during neonatal screening, Minas Gerais, Brazil. *Rev Panam Salud Publica.*, v. 27(5), p.330-7, 2010.

ROUCOUX DF, MURPHY EL: The epidemiology and disease outcomes of human T-lymphotropic virus type II. *AIDS.* v. 6, p. 144-154, 2004.

SEGURADO AAC, *et al.* Identification of human T-lymphotropic vírus type I (HTLV-1) subtypes using restrited fragment length polymorphism in a cohort of asymptomatic

carriers and patients with HTLV-1-associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis from São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 329-333, 2002.

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

SOUZA, L. A. et al. Molecular characterization of HTLV-1 among patients with tropical spastic paraparesis/HTLV-1 associated myelopathy in Belém, Pará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina tropical*, v. 39, p.504-506, 2006.

VANDAMME, A. M., SALEMI, M., DESMYTER, J. The simian origins of the pathogenic human T-cell lymphotropic virus type I. *Trends Microbiol.* v. 6, p.477–83, 1998<sub>a</sub>.

VANDAMME, A.M., SALEMI, M., VAN BRUSSEL, M., *et al.*. African origin of human T-lymphotropic virus type 2 (HTLV-2) supported by a potential new HTLV-2d subtype in Congolese Bambuti Efe Pygmies. *J Virol.* v. 72(5), p. 4327-4340, 1998<sub>b</sub>.

VAN DOOREN S, GOTUZZO E, SALEMI M, WATTS E, AUDENAERT S, DUWE H, ELLERBROK R, GRASSMANN J, DESMYTER A, VANDAMME M. Evidence for a Post-Colombian introduction of human T-cell lymphotropic virus in Latin America. *J Gen Virol.* v. 79, p. 2695-2708, 1998.

VAN DOOREN, S., SALEMI, M., VANDAMME, A. M. Dating the origin of the African human T-cell lymphotropic virus type-I (HTLV-1) subtypes. *Mol Biol Evol*; v. 18, p. 661–71, 2001.

VAN DOOREN S., MEERTENS L., LEMEY P., GESSAIN A., VANDAMME AM. Full-genome analysis of a highly divergent simian T-cell lymphotropic virus type 1 strain in *Macaca arctoides*. *J Gen Virol.* v. 86, p. 1953–59, 2005.

VAN TIENEN C, JAKOBSEN M, SCHIM VAN DER LOEFF M. Stopping breastfeeding to prevent vertical transmission of HTLV-1 in resource-poor settings: beneficial or harmful? *Arch Gynecol Obstet.* v. 286(1), p. 255-6, 2012.

VERDONCK, K.; GONZÁLEZ, E.; VAN DOOREN, S.; VANDAMME, A. M.; VANHAM, G.; GOTUZZO, E. Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. *Lancet Infect Dis*, v. 7, p. 266-281, 2007.

VINE AM, HEAPS AG, KAFTANTZI L, MOSLEY A, ASQUITH B, WITKOVER A, THOMPSON G, SAITO M, GOON PK, CARR L, MARTINEZ-MURILLO F, TAYLOR GP, BANGHAM CR. The role of CTLs in persistent viral infection: cytolytic gene expression in CD8+ lymphocytes distinguishes between individuals with a high or low proviral load of human T cell lymphotropic virus type 1. *J Immunol.* v. 173(8), p. 5121-9, 2004.

WIKTOR, S. Z.; PATE, E. J.; ROSENBERG, P. S.; BARNETT, M.; PALMER, P.; MEDEIROS, D.; MALONEY, E.M.; BLATTNER, W. A. Mother-to-child transmission of human T-cell lymphotropic virus type I associated with prolonged breast-feeding. *J Hum Virol.* v. 1(1), p. 37-44, 1997.

WOLFE, N. D., HENEINE, W., CARR, J. K., *et al.*. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proc Natl Acad Sci USA.* v. 102(22), p. 7994-9, 2005.

YAMASHITA M, VERONESI R, MENNA-BARRETO 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.* v. 261 p. 59–69, 1999.

YAMAMOTO, B., LI, M., YOUNIS, I., LAIRMORE M. D., GREEN, P. L. Human T-cell Leukemia virus type 2pos-transcriptional control protein p28 is required for viral infectivity and persistence in vivo. *Retrovirology,* v.5, p. 38, 2008.

**Anexo 1: Termo de consentimento livre e esclarecido.**

Projeto: "Soroprevalência e subtipagem do vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV) em gestantes e avaliação da transmissão materno-fetal em Ilhéus, Bahia."

Termo de consentimento livre e esclarecido  
(de acordo com Resolução nº 196/96, Conselho Nacional de Saúde)

O (a) Senhor (a) está sendo convidada a participar de uma pesquisa que tem como finalidade pesquisar e estudar o HTLV (vírus linfotrópico de células T humanas) em gestantes atendidas na Maternidade Santa Helena. Pretendemos também, neste trabalho, acompanhar as mães que forem positivas para o HTLV, os seus filhos e parentes. Esse vírus pode ser passado da mãe para o feto ou para o bebê dentro da barriga, durante o parto ou pela amamentação. Além disso, ele também é transmitido por transfusão de sangue, ato sexual, uso de drogas injetáveis, e não está relacionado ao HIV, vírus que causa a AIDS. O HTLV causa doenças diferentes da AIDS, porém também causa doenças sérias e para as quais ainda não existe tratamento estabelecido e nem cura. A maioria dos indivíduos que tem o HTLV não apresenta qualquer doença, porém podem passar o vírus para seu filho ou parceiro, e só descobre que têm o vírus quando fazem testes específicos no sangue.

O (a) Senhor (a) será convidado (a) a participar como voluntário (a). Caso aceite será realizado um exame de sangue. Esse exame poderá provocar um leve ardor causado pela picada da agulha, e, muito raramente, hematoma (mancha roxa). Esses são os mesmos efeitos que qualquer exame de sangue pode causar. Todos os testes serão acompanhados por profissional habilitado e medidas para diminuir os problemas citados serão realizadas. O (a) Senhor (a) tem liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer momento da pesquisa, sem qualquer prejuízo. A pesquisa será realizada na Universidade Estadual de Santa Cruz e qualquer dúvida você poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Profa. Dra. Sandra Rocha Gadelha Mello, através do telefone 3680 5267.

Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade. Em nenhum momento usaremos seu nome ou de seu filho. Desta forma, as identidades serão preservadas. Esclarecemos também que ao participar desta pesquisa o senhor (a) poderá não ter nenhum benefício direto, assim como não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação. Entretanto, esperamos que este estudo traga informações importantes sobre a presença do HTLV na nossa região, de forma que possamos contribuir para evitar que haja transmissão do vírus. Além disso, com este trabalho,

pretendemos compreender como o vírus passa para a outra pessoa e quais os fatores que estão envolvidos com essa transmissão.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto, preencha, por favor, os itens que se seguem.

<b>Termo de consentimento livre após esclarecimento</b>	
Eu, _____	
<p>li e/ou ouvi o esclarecimento acima e compreendi para que serve o estudo e qual o procedimento a que serei submetido. As informações esclarecem riscos e benefícios do estudo, deixando claro que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei dinheiro pa ra participar do estudo.</p> <p>Assim sendo, concordo em participar do estudo,</p> <p>Ilhéus, ____/____/____</p>	
	<p>Nome:</p> <p>Identidade:</p> <p>Telefone pessoal:</p> <p>Telefone para contato:</p> <p>Nome do contato:</p>
Assinatura voluntário	
Sandra Rocha Gadelha Mello - Mat: 734757678	Telefones Contato: (73) 3680-5267
Pesquisador responsável – DCB	E-mail: srgmello@uesc.br

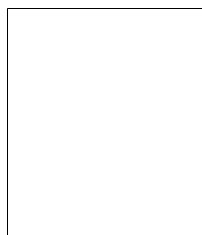
\_\_\_\_\_, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Local                          dia   mês   ano

A       rogo       do       Sr. \_\_\_\_\_,       assinam:

\_\_\_\_\_

Marca do polegar



Assinatura da Testemunha 1

---

Assinatura da Testemunha 2

**Anexo 2: Questionário aplicado.**

Projeto: "Projeto: Soroprevalência e subtipagem do vírus linfotrópico de células T humanas (HTLV) em gestantes e avaliação da transmissão materno-fetal em Ilhéus, Bahia."

**1. Dados pessoais**

Nome: \_\_\_\_\_

Nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Estado civil: ( ) solteiro(a) ( ) casado(a) ( ) viúvo(a) ( ) divorciado(a)

Filhos: ( ) Não ( ) Sim Quantos(as)? \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Tel:(\_\_ ) \_\_\_\_\_ Email: \_\_\_\_\_

Maior escolaridade: 1 ( ) 2<sup>o</sup> completo; 2 ( ) 2<sup>o</sup> incompleto; 4 ( ) 1<sup>o</sup> completo; 5 ( ) superior completo; 6 ( ) superior incompleto; 7 ( ) pós; ( ) analfabeto

Como você classifica sua cor / raça? 1 ( ) branco; 2 ( ) preto; 3 ( ) pardo; 4 ( ) amarelo; 5 ( ) indígena

Qual a sua faixa de renda familiar bruta mensal?

1 ( ) até 1 salário mín; 2 ( ) até 830 reais; 3 ( ) de 831 a 2075; 4 ( ) de 2076 a 4150; 5 ( ) >4150; 0 ( ) não sabe

**2. Comportamento**

Nos últimos trinta dias, você tomou 5 ou mais doses de bebida alcoólica numa mesma ocasião? (1 dose = 1/2 garrafa de cerveja, 1 copo de vinho ou 1 dose de uísque / conhaque / cachaça / vodka)

( ) Não ( ) Sim

Você fuma? ( ) Não ( ) Sim Quantos cigarros por dia? \_\_\_\_\_

Caso tenha outros filhos, eles foram amamentados?

( ) Não ( ) Sim Quanto tempo? \_\_\_\_\_

Exclusiva? ( ) Não ( ) Sim

Você já fez transfusão de sangue? ( ) Não ( ) Sim Quando (Ano)? \_\_\_\_\_

Você tem tatuagens ou piercing? ( ) Não ( ) Sim

Você faz ou fez uso de drogas injetáveis? ( ) Não ( ) Sim

Você tem parceiro fixo? ( ) Não ( ) Sim Quanto tempo de relacionamento? \_\_\_\_\_



Faz uso contínuo de alguma medicação? ( ) Não ( ) Sim

Para

qual

problema? \_\_\_\_\_

Qual(is) medicamento(s) é (são) usados(s)

### **3. Estado de saúde**

---

Você sabe se é portadora de algum outro problema de saúde? ( ) Não ( ) Sim

Qual? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Anexo 3 – Artigo aceito para publicação intitulado:**

HTLV-1 in pregnant women from the Southern Bahia, Brazil: a neglected condition despite the high prevalence.

Article title: HTLV-1 in pregnant women from the Southern Bahia, Brazil: a neglected condition despite the high prevalence.

*Virology Journal* 2014, **11**:28 doi:10.1186/1743-422X-11-28

**ISSN 1743-422X**

**Anexo 4: Submissão do artigo – co-autoria**

Article title: Phylogenetic, mtDNA and beta-globin analysis of HTLV-1 isolates from the southern Bahia, Brazil, reinforce an ancient post-Columbian introduction related to the slave trade in this state

MS ID : 1506526756111759

Authors : Milena M Aleluia, Marco AG Mello, Luiz C Alcântara Jr, Filipe AF Rego, Lucas PS Santos, Bernardo Galvão-Castro, Marilda S Gonçalves, Tulio Oliveira, Lauro J Marin, Sandra MB Sousa and Sandra R Gadelha

Journal : Virology Journal

Dear Mrs Aleluia

**Thank you for submitting your article.** This acknowledgement and any queries below are for the contact author. This e-mail has also been copied to each author on the paper, as well as the person submitting. Please bear in mind that all queries regarding the paper should be made through the contact author.

A pdf file has been generated from your submitted manuscript and figures. We would be most grateful if you could check this file and let us know if any aspect is missing or incorrect. Any additional files you uploaded will also be sent in their original format for review.

[http://www.virologyj.com/imedia/1506526756111759\\_article.pdf](http://www.virologyj.com/imedia/1506526756111759_article.pdf) (596K)

For your records, please find below link(s) to the correspondence you uploaded with this submission. Please note there may be a short delay in creating this file.

[http://www.virologyj.com/imedia/1116362018111759\\_comment.pdf](http://www.virologyj.com/imedia/1116362018111759_comment.pdf)

Your manuscript will be considered by our editors and will aim to contact you with an initial decision on the manuscript within six weeks.

In the meantime, if you have any queries about the manuscript you may contact us on [virologyjournal@biomedcentral.com](mailto:virologyjournal@biomedcentral.com). We would also welcome feedback about the online submission process, which can be sent to [info@biomedcentral.com](mailto:info@biomedcentral.com).

Best wishes,

The Virology Journal Editorial Team

e-mail: [virologyjournal@biomedcentral.com](mailto:virologyjournal@biomedcentral.com)