



**FIOCRUZ**

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

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

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ANÁLISE DA INTEGRAÇÃO VIRAL E CLONALIDADE DE  
LINFÓCITOS T NA DERMATITE INFECCIOSA ASSOCIADA  
AO HTLV-1**

**JULIANA MOREIRA ARGÔLO**

**Salvador – Bahia - Brasil**

**2014**

**CPqGM**

**JULIANA MORERIA ARGÔLO**  
**Análise da integração viral e clonalidade de linfócitos T na dermatite infecciosa**  
**associada ao HTLV-1**

**2014**

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

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

**ANÁLISE DA INTEGRAÇÃO VIRAL E CLONALIDADE DE  
LINFÓCITOS T NA DERMATITE INFECCIOSA ASSOCIADA  
AO HTLV-1**

**JULIANA MOREIRA ARGÔLO**

Orientador: Dra. Maria Lourdes Farré Vallve

Trabalho apresentado ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para a obtenção do grau de Mestre.

**Salvador – Bahia - Brasil**

**2014**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

A693a Argôlo, Juliana Moreira  
Análise da integração viral e clonalidade de linfócitos T na dermatite infecciosa associada ao HTLV-1 / Juliana Moreira Argôlo. - 2014.  
84 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Lourdes Farré Vallve, Laboratório de Patologia Experimental.

Dissertação (Mestrado Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2014.

1. HTLV-1. 2. Linfócitos T. 3. Reação em cadeia da polimerase. 4. Integração do provírus. 5. Dermatite. 6. Células. I.Título.

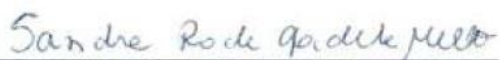
CDU 616.98

"ANÁLISE DA INTEGRAÇÃO VIRAL E CLONALIDADE DE LINFÓCITOS T NA DERMATITE  
INFECCIOSA ASSOCIADA AO HTLV-1."

**JULIANA MOREIRA ARGOLO**

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



---

Dra. Sandra Rocha Gadelha  
Professora adjunta  
UESC



---

Dra. Maria das Graças Silva Vieira  
Farmacêutico-Bioquímico  
UFBA



---

Dr. Luiz Carlos Júnior Alcântara  
Pesquisador  
CPqGM/FIOCRUZ

*Aos meus amados Didio, Pai, Mãe e PC  
que em tudo me apoiam e me sustentam,  
ofereço e dedico com todo amor e gratidão*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu maravilhoso e bondoso Deus pelo sustento em alegria e força que são renovadas a cada manhã. A Ele toda honra e toda glória!

À minha amada e linda família, que incansavelmente me conforta com apoio, orações, provisões e todo tipo de amor. Queridos marido, pais e irmão, toda minha gratidão e reconhecimento por terem acompanhado esse meu trajeto com muita paciência e dedicação. Sem vocês, literalmente, não teria conseguido. Muito obrigada!

Aos queridos e dedicados amigos, que sempre estiveram ao meu lado e torcem muito pelo meu sucesso e felicidade. Sem o amor e a amizade de vocês nada seria possível.

À minha orientadora Dra. Lourdes Farré por sua orientação, sugestões, correções e amizade. Serei eternamente grata pela oportunidade e confiança dispensadas a mim.

Aos colegas mais queridos e amados do LAPEX, Everton, Isabela, Landim, Léo, Marcelo e Vanessa, que muito me ajudaram a cumprir essa trajetória, deixando a rotina e o dia a dia muito mais fáceis e simples, possibilitando o trabalho em equipe num ambiente acolhedor e harmonioso.

À Dra. Achiléa Bittencourt, assim como a todos os integrantes do grupo HUPES/UFBA que participaram e auxiliaram na conclusão deste trabalho e no cuidado com nossos queridos pacientes.

Aos queridos pacientes portadores do HTLV-1 e seus familiares que auxiliam e ajudam no desenvolvimento do nosso trabalho. A vocês, toda admiração e gratidão com desejo inesgotável de melhoria e progresso na qualidade de vida e saúde. Tudo isso é também por vocês!

A todos os funcionários do CPqGM, HUPES/UFBA e aos colegas de outros laboratórios e colaboradores em pesquisa que também possibilitaram na realização desse estudo.

À bibliotecária Ana Maria Fiscina Vaz Sampaio pela revisão e correções que contribuíram para a finalização da dissertação.

Ao CNPq e ao CPqGM/FIOCRUZ pelo apoio financeiro para realização e conclusão deste trabalho.

ARGÔLO, Juliana Moreira Análise da integração viral e clonalidade de linfócitos T na dermatite infecciosa associada ao HTLV-1. 84 f. il. Dissertação (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

## RESUMO

A dermatite infecciosa associada ao vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1), DIH, é uma forma de eczema grave e recidivante que incide principalmente em crianças que em geral foram verticalmente infectadas pelo HTLV-1, ocorrendo lesões eritematosas, escamativas e crostosas, sendo geralmente localizadas nas regiões do couro cabeludo e retroauriculares, assim como pescoço, virilha, região paranasal, axilas, ouvido externo e narinas. Inicia-se após os 18 meses de vida e raramente persiste até a vida adulta. No Brasil, muitos casos têm sido diagnosticados na Bahia, estado brasileiro que atualmente conta com a maior casuística da literatura depois da Jamaica. Acompanhando uma coorte de 31 pacientes da faixa etária infanto-juvenil com DIH em Salvador, observou-se em esfregaço do sangue periférico, em 11 dos indivíduos, o aparecimento de linfócitos atípicos (LA) e/ou células em flor (CF), que não são comumente observados em pacientes com DIH, mas ocorrem com frequência em pacientes com leucemia/linfoma de células T do adulto (ATL). Submetemos amostras dos 31 pacientes a reações em cadeia da polimerase (PCR) para verificar se havia um clone majoritário através do padrão de clonalidade do TCR-gama. Para este ensaio, todos os 31 pacientes apresentaram padrão oligoclonal ou policlonal típico para DIH, onde não ocorre um clone predominante. A fim de verificar se o aparecimento dos linfócitos atípicos estava relacionado ao possível desenvolvimento da ATL, para os 11 indivíduos que apresentaram os LA e/ou CF em esfregaço do sangue periférico, realizamos ensaios de ILPCR para verificar a clonalidade dos linfócitos infectados pelo vírus e posteriormente sequenciamos as amostras a fim de identificar o local de integração do provírus ao genoma do portador hospedeiro. Em 7 dos 11 indivíduos identificou-se um único clone predominante nos produtos de PCR em pelo menos uma das coletas avaliadas. Nesses casos, o DNA proviral não interrompeu regiões codificadoras para genes humanos. Para um paciente, o provírus se integrou na região do gene da MAP2K1 (proteína quinase 1 ativadora de mitose), localizado no cromossomo 15. Observou-se que na presença de LA e/ou CF podem existir clones majoritários circulantes em portadores do HTLV-1 com DIH.

**Palavras-chave:** HTLV-1; DIH; Linfócitos atípicos; Células em flor; ILPCR; Clonalidade, Integração proviral.



ARGÔLO, Juliana Moreira Analysis of viral integration and T lymphocyte clonality in infective dermatitis associated with HTLV-1. 84 f. il. Dissertação (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

## ABSTRACT

Infective dermatitis associated with human T lymphotropic cells virus type 1 (HTLV-1), IDH, is a form of severe and recurrent dermatitis that occurs mostly in children who were mainly vertically infected with HTLV-1, occurring erythematous, desquamative and crusty, being generally located in regions of the scalp and retroauricular, neck, groin, paranasal region, armpits, outer ear and nostrils. It begins after 18 months of life and rarely persists into adulthood. In Brazil, several cases have been diagnosed in Bahia, the Brazilian state that currently has the highest incidence after Jamaica. Tracking a cohort of 31 patients in the juvenile age group with IDH in Salvador, we observed the appearance of atypical lymphocytes (AL) and/or flower cells (FC), which are not commonly observed in patients with IDH, but occur frequently in patients with adult T cell leukemia/lymphoma (ATL), in peripheral blood smear in 11 of the subjects. Samples of 31 patients underwent tests of PCR assays to verify if there was a major clone by the clonality patterns of gamma-TCR. For this test, all 31 patients had oligoclonal pattern or typical polyclonal of IDH, where there isn't a predominant clone. In order to verify if the appearance of the atypical cells was related to the future ATL we submitted the 11 subjects who had the AL and/or FC in peripheral blood smear to ILPCR tests conducted to analyze clonality of lymphocytes infected by the virus and subsequently these samples were sequenced to identify the integrations sites of the provirus in the host-carrier genome. A single dominant clone was observed in the PCR products from at least one of the tested samples in 7 of 11 individuals. In such cases, the proviral DNA did not interrupt coding regions for human gene. For a patient, the provirus was integrated in the region of the MAP2K1 gene (mitosis protein kinase activator 1), located on chromosome 15. We observed that in the presence of AL and/or FC may be majority clones circulating in HTLV-1 carriers with IDH.

**Keywords:** HTLV-1; IDH; Atypical lymphocytes; Flower cells; ILPCR; Clonality, Proviral integration.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Estrutura do HTLV-1	15
<b>Figura 2</b>	Estrutura genômica do HTLV-1	16
<b>Figura 3</b>	Distribuições do HTLV-1 no mundo	17
<b>Figura 4</b>	Prevalência de HTLV-1 entre doadores de sangue em capitais de 26 estados brasileiros e no Distrito Federal	18
<b>Figura 5</b>	Linfócitos atípicos observados nos esfregaços de sangue periférico procedente de pacientes com DIH	22
<b>Figura 6</b>	Mecanismo oncogênico do HTLV-I	24
<b>Figura 7</b>	Pacientes com DIH	27
<b>Figura 8</b>	Casos de ATL descritos na literatura que se manifestados na infância e Adolescência	30
<b>Figura 9</b>	Esquema simplificado do processo de rearranjo dos genes que codificam para as cadeias alfa, beta, delta e gama do receptor de célula T (TCR)	32
<b>Figura 10</b>	Padrões de expansão clonal de linfócitos T infectados	34
<b>Figura 11</b>	Esquematização do desenho do estudo que foi realizado entre o início de 2011 ao início de 2013, quando ocorreu o fechamento de todas as análises	41
<b>Figura 12</b>	Esquematização do rearranjo dos genes para cadeia gama do TCR	43
<b>Figura 13</b>	Diagrama esquemático da ILPCR. O DNA genômico foi digerido por EcoRI e depois ligado com T4 ligase para formar o DNA circular	44
<b>Figura 14</b>	Percentagens de linfócitos atípicos (LA) e células em flor (CF) observadas no esfregaço do sangue periférico em 5 pacientes da coorte com DIH ao longo de todas as coletas incluídas no estudo	51

<b>Figura 15</b> Percentagens apenas de linfócitos atípicos (LA) e sua flutuação ao longo de todas as coletas realizadas para 6 pacientes que apresentaram tais células no esfregaço do sangue periférico	52
<b>Figura 16</b> Produtos de PCR obtidos na análise do rearranjo da cadeia gama do TCR	54
<b>Figura 17</b> Produtos de PCR obtidos por PCR invertida para os pacientes 11, 18 e 21	56
<b>Figura 18</b> Alinhamento das seqüências realizado através da ferramenta BLAST para o paciente 11 e 21	57
<b>Figura 19</b> Localização do sítio de integração do DNA proviral (caixa retangular vermelha) nos respectivos cromossomos dos pacientes 11, 18 e 21, avaliados com padrão monoclonal	58
<b>Figura 20</b> A. M, marcador molecular (100 pb); amostras de coletas do paciente 15: 15-A e B produziram múltiplas bandas. B: M, marcador molecular (100 pb); amostra 15-C teve um único produto de PCR	59
<b>Figura 21</b> Localização cromossômica para a amostra 15-A. Ocorreu integração do provirus no cromossomo 1 do paciente	59
<b>Figura 22</b> Produtos de PCR purificados em gel de poliacilamida a 6% para duas amostras do paciente 16: 16-A e 16-B	60
<b>Figura 23</b> Produtos purificados de PCR em gel de poliacrilamida a 6% para o paciente 17 para as amostras 17-A e 17-B. M, Marcador molecular (100pb)	61
<b>Figura 24</b> Gel de poliacrilamida a 6% de produtos de PCR purificados para amostras do paciente 22: 22-A e 22-C	62
<b>Figura 25</b> Gel de poliacrilamida a 6% para 3 produtos de PCR purificados do paciente 30 para sua única amostra analisada, 30-A	63

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	As formas clínicas da ATL e suas características próprias	21
<b>Tabela 2</b>	Caracterização da população de estudo (coorte com DIH e grupo de portadores assintomáticos - GPA) quanto à faixa-etária e sexo	40
<b>Tabela 3</b>	Caracterização da coorte com DIH quanto ao sexo e presença ou ausência de linfócitos atípicos e/ou células em flor no sangue periférico	49
<b>Tabela 4</b>	Resumo para os resultados das técnicas de ILPCR e do sequenciamento com BLAST para os pacientes com DIH que apresentaram linfócitos atípicos e/ou células em flor nas PBMCs	64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL	<i>Atypical lymphocytes/</i> Linfócitos Atípicos
ATL	<i>Adult T cell Leukemia/</i> Leucemia/linfoma de células T do adulto
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool/</i> Ferramenta de busca de alinhamento do local básico
CF	Células em flor
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
DIH	Dermatite Infecciosa associada ao HTLV-1
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid/</i> Ácido Desoxiribonucléico
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Antibody Assay/</i> Ensaio imunoenzimático para detecção de anticorpos específicos no plasma sanguíneo
FC	<i>Flower cells/</i> Células em flor
FIOCRUZ	Fundação e Instituto Oswaldo Cruz
HAM/TSP	<i>HTLV-1-associated myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis/ Paraparesia Espástica Tropical/</i> Mielopatia Associada ao HTLV-1 HTLV-1 Human T Lymphotropic Virus type 1/ Vírus linfotrópico de Células T do Adulto tipo 1
HUPES	Hospital Universitário Professor Edgard Santos
ILPCR	<i>Inverted and Long Polymerase Chain Reaction/</i> Reação em Cadeia da Polimerase Invertida e Longa
LA	Linfócitos atípicos
LAPEX	Laboratório de Patologia Experimental
LASP	Linfócitos atípicos no sangue periférico
LTR	<i>Long Terminal Repeat/</i> Sequências Terminais Repetidas
MAP2K1	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 1 gene/</i> Gene da proteína quinase 1 ativadora de mitose
NCBI	<i>National Center for Biotechnology and Information/</i> Centro Nacional de Biotecnologia e Informação
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell/</i> Célula Mononuclear do Sangue Periférico
pb	Pares de base

PCR	<i>Polimerase Chain Reaction/</i> Reação em Cadeia da Polimerase
SM	<i>Smoldering/</i> Indolente
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	<i>T cell receptor/</i> Receptor de Célula T
TCRG	<i>T cell receptor-gamma/</i> Receptor de Célula T-gamma
UFBA	Universidade Federal da Bahia

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1	O VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS TIPO 1 (HTLV-1): BREVE HISTÓRICO..	14
1.1.1	Classificação e estrutura genômica do HTLV-1 .....	14
1.1.2	Epidemiologia do HTLV-1 .....	16
1.1.3	Principais vias de transmissão do HTLV-1 .....	19
1.2	PRINCIPAIS PATOLOGIAS RELACIONADAS AO HTLV-1 .....	19
1.2.1	A leucemia/linfoma de células T (ATL).....	20
1.2.2	A mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) e associação com outras doenças .....	25
1.2.3	A dermatite infecciosa associada ao HTLV-1 (DIH).....	25
1.2.3.1	<i>A DIH e sua associação com outras doenças</i> .....	28
1.2.3.2	Ocorrência de células em flor na ATL e na DIH.....	30
1.3	O REARRANJO GÊNICO E A CLONALIDADE DOS LINFÓCITOS T.....	31
1.3.1	Análise da integração proviral para avaliação da clonalidade de linfócitos T na infecção pelo HTLV-1. ....	33
1.4	A INTEGRAÇÃO PROVIRAL DOS RETROVÍRUS E DO HTLV-1 .....	34
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	35
<b>3</b>	<b>HIPÓTESE DO ESTUDO</b> .....	37
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	38
<b>5</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	39
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA .....	39
5.2	ANÁLISE DO FILME SANGUÍNEO .....	41
5.3	SEPARAÇÃO DE PMBCS PARA EXTRAÇÃO DO DNA .....	42
5.4	ANÁLISE DA CLONALIDADE DOS LINFÓCITOS T POR TCRG.....	42
5.5	ANÁLISE DA INTEGRAÇÃO VIRAL POR ILPCR.....	44
5.5.1	Sequenciamento .....	45
5.6	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	46
5.7	ANÁLISE DOS DADOS.....	47
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	48
6.1	PRESENÇA DE LINFÓCITOS ATÍPICOS E/OU CÉLULAS EM FLOR EM PACIENTES COM DIH E PORTADORES ASSINTOMÁTICOS. ....	48
6.2	ANÁLISE DA CLONALIDADE DOS LINFÓCITOS T PELO REARRANJO DO TCRG NOS	

	PACIENTES COM DIH.....	53
6.3	ANÁLISE DA INTEGRAÇÃO PROVIRAL POR PCR INVERTIDA E LONGA (ILPCR) E DOS PRODUTOS OBTIDOS NO SEQUENCIAMENTO PARA OS PACIENTES COM DIH NA PRESENÇA DE LINFÓCITOS ATÍPICOS E/OU CÉLULAS EM FLOR PRESENTES NO SANGUE PERIFÉRICO ATRAVÉS DA FERRAMENTA BLAST .....	55
7	<b>DISCUSSÃO</b> .....	65
8	<b>CONCLUSÕES</b> .....	73
9	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	74
	<b>ANEXO I</b> .....	83



## 1. INTRODUÇÃO

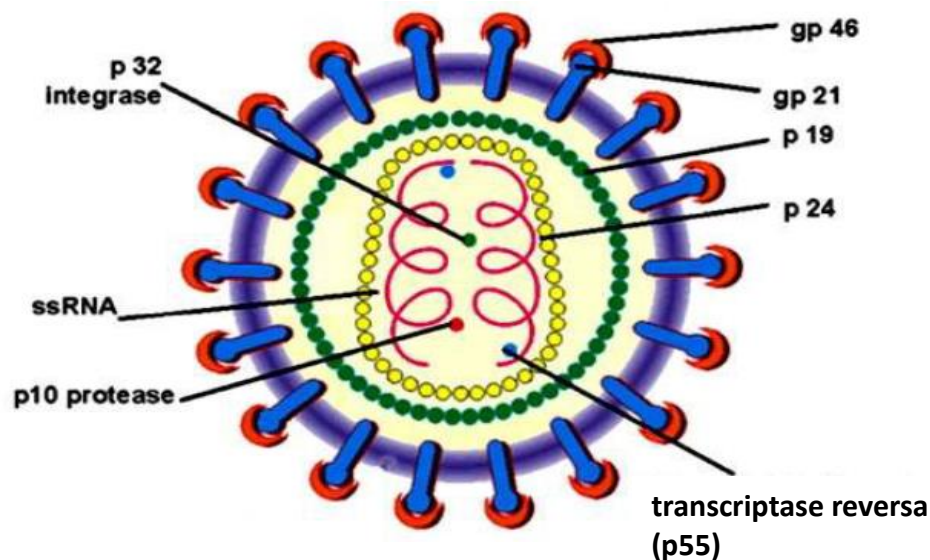
### 1.1 O VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T HUMANAS TIPO 1 (HTLV-1): BREVE HISTÓRICO

Em pacientes do sudoeste do Japão, no ano de 1977, uma forma distinta de leucemia com características clínicas e com morfologia celular especiais foi definida, sendo nomeada de Leucemia de células T do Adulto (ATL) (UCHIYAMA *et al.*, 1977). Em 1980, o HTLV-1 foi isolado e descrito como o primeiro retrovírus humano, a partir da investigação de um paciente com linfoma cutâneo de células T (POIESZ *et al.*, 1980). Um ano depois, em 1981, os soros dos pacientes do sudoeste do Japão foram analisados, confirmando positividade para anticorpos anti-HTLV-1, o que forneceu evidências para a ligação do HTLV-1 às células T malignas da ATL (GALLO; POIESZ; RUSCETTI, 1981).

Em 1982, o HTLV-2 foi isolado de um paciente com uma forma atípica de leucemia de células T pilosas (KALYANARAMAN *et al.*, 1982), e mais recentemente, os HTLV-3 e HTLV-4 foram descritos em indivíduos de Camarões, na África Central (CALATTINI *et al.*, 2005; WOLFE *et al.*, 2005).

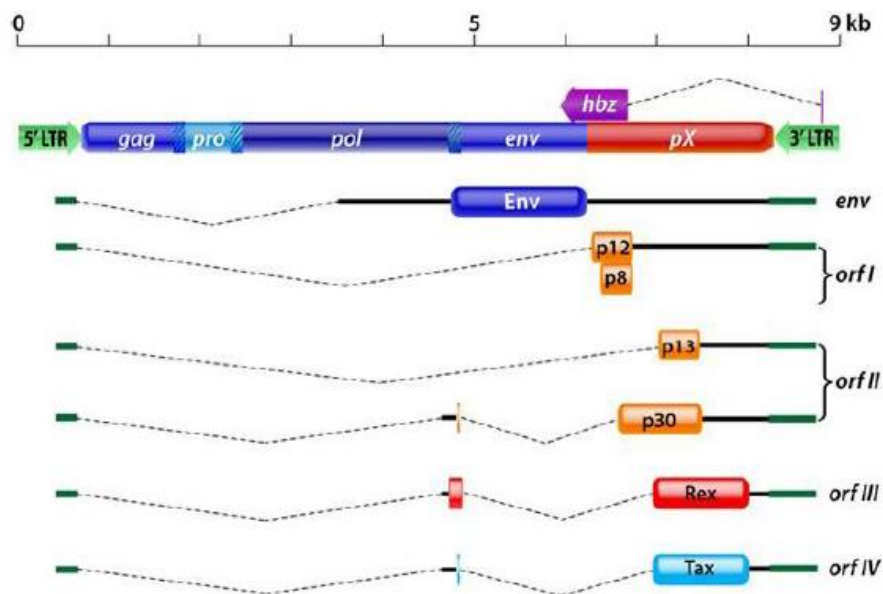
#### 1.1.1 Classificação e estrutura genômica do HTLV-1

O HTLV-1 está classificado dentro da família Retroviridae, subfamília Orthoretrovirinae e gênero *Deltaretrovirus*. Trata-se de um vírus envelopado, com diâmetro de aproximadamente 100 a 140 nanômetros (nm), possui um nucleocapsídeo icosaédrico com cerca de 80 a 100 nm. O vírus possui um genoma composto por duas fitas simples de RNA (ácido ribonucléico) com polaridade positiva (BURKE *et al.*, 1997), (Figura 1).



**Figura 1.** Estrutura do HTLV-1. (Adaptado de Calattini *et al.*, 2005)

Seu genoma possui aproximadamente 9032 pares de bases (pb) e como os demais retrovírus, possui os genes *gag*, *pol* e *env* flanqueados por sequências terminais repetitivas (*long terminal repeats* - LTR), importantes na integração do DNA proviral no DNA cromossômico da célula do hospedeiro e na regulação transcricional do genoma do HTLV-1 (MEERTENS *et al.*, 2001), (Figura 2). Entre a região *env* e 3'-LTR do genoma do HTLV-1 existe um gene denominado pX que codifica as proteínas Tax, Rex, HBZ, p12, p13, p30 e p21 relacionadas com a patogênese viral (KORALNIK *et al.*, 1992; GAUDRAY *et al.*, 2002; EDWARDS *et al.*, 2011).



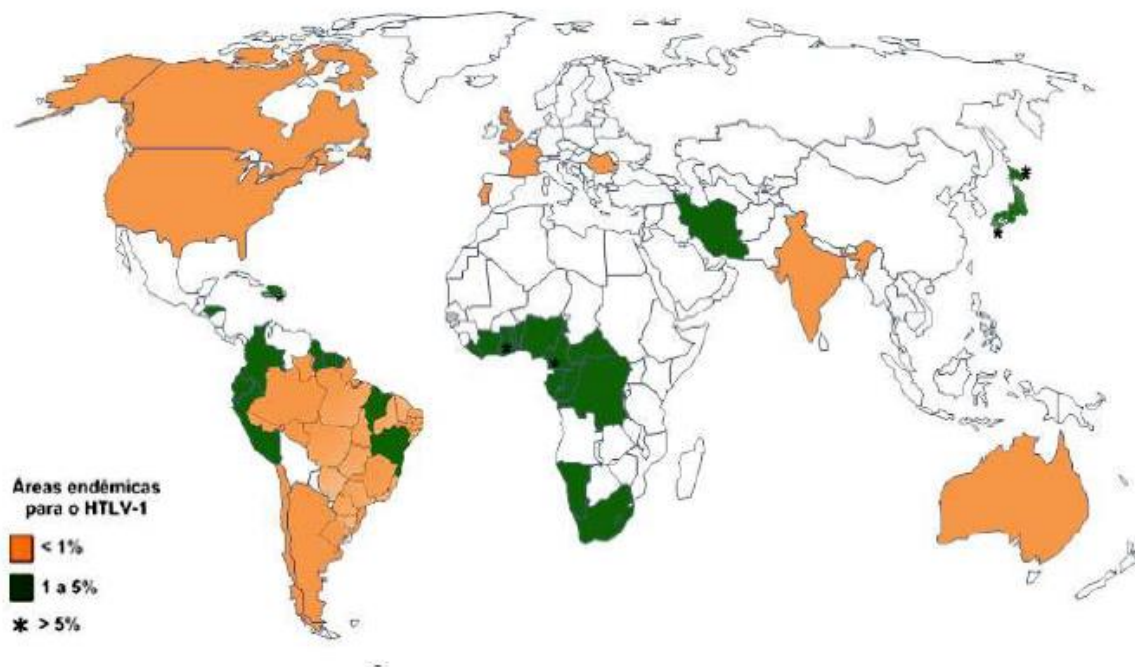
Figura

2.

Estrutura genômica do HTLV-1. Fonte: Edwards *et al.* (2011).

### 1.1.2 Epidemiologia do HTLV-1

Estima-se que 5 a 10 milhões de pessoas no mundo estão infectadas com o HTLV-1 (GESSAIN; CASSAR, 2012). As taxas de soroprevalência diferem, de acordo com a região geográfica, com a composição sócio-demográfica da população estudada e os comportamentos de risco individuais. Dados epidemiológicos mostram que a infecção pelo HTLV-1 tem distribuição mundial (DE THE; KAZANJI, 1996). No entanto, algumas áreas são endêmicas para esta infecção: sudoeste do Japão (YAMAGUCHI, 1994); (MUELLER *et al.*, 1996), África sub-Saara/Equatorial (GESSAIN; DE THE, 1996), ilhas do Caribe (LA GRENADE *et al.*, 1990), América Central, sudoeste dos Estados Unidos, na América do Sul, áreas localizadas no Irã e Melanésia (MUELLER, 1991) e Brasil (CATALAN-SOARES *et al.*, 2004; YASUNAGA; MATSUOKA, 2007a) (Figura 3).



**Figura 3.** Distribuição do HTLV-1 no mundo (adaptado de DOURADO *et al.*, 2003).

O Brasil configura-se como uma área endêmica para o HTLV-1, porém com baixo índice de prevalência e com variações (distribuição heterogênea) nas capitais (CATALAN-SOARES *et al.*, 2005) (Figura 4). A maioria destes dados foi obtido a partir de amostras provenientes de bancos de sangue ou amostras de grupos específicos (gestantes, pacientes de clínicas de doenças sexualmente transmissíveis, co-infectados), que não necessariamente representam a população geral (Dourado *et al.*, 2003).

Estima-se que o Brasil possua o maior número absoluto de soropositivos no mundo, representando cerca de 2,5 milhões e um estudo realizado demonstrou as maiores prevalências de infecção em amostras de doadores de banco de sangue que foram detectadas nos estados do Maranhão (10/1000), Bahia (9,4/1000), Pará (9,1/1000) e Pernambuco (7,5/1000) (CARNEIRO-PROIETTI, *et al.*, 2002; CATALAN-SOARES *et al.*, 2005) (Figura 4). Estes estados, principalmente o Maranhão e Bahia, possuem população afrodescendente considerável, reforçando a hipótese de que, na região Nordeste, o HTLV-1 tem origem africana e foi trazido durante o tráfico de escravos que ocorreu na colonização portuguesa (ALCANTARA *et al.*, 2003; DOURADO *et al.*, 2003; CATALAN-SOARES *et al.*, 2005). Esta hipótese é corroborada ainda

por estudos filogenéticos que demonstram que a linhagem do HTLV-1 circulante em Salvador tem relação com a encontrada na região sul da África (ALCANTARA *et al.*, 2003). Na população geral de Salvador, a infecção pelo vírus HTLV-1 ocorre em uma prevalência de aproximadamente 1,76 %, estimando haver cerca de 40 a 50 mil indivíduos portadores na cidade. Dentro da população, as taxas de infecção para os sexos são de 1,2% para os homens e 2% para as mulheres (DOURADO *et al.*, 2003). Uma possível explicação para a diferença de taxas entre os sexos é a maior eficácia da transmissão sexual homem-mulher do que o inverso (KAPLAN *et al.*, 1996).



**Figura 4.** Prevalência de HTLV-1 entre doadores de sangue em capitais de 26 estados brasileiros e no Distrito Federal. Adaptado de CATALAN-SOARES *et al.* (2005).

### 1.1.3 Principais vias de transmissão do HTLV-1

A transmissão do HTLV-1 ocorre predominantemente por três vias: vertical (mãe para filho), principalmente por intermédio da amamentação, onde a probabilidade de transmissão materno-infantil é de 10-30% e ocorrendo também por via transplacentária durante o parto (TAJIMA; ITO, 1992); horizontal, através da relação sexual com transmissão mais eficiente do homem para a mulher; e parenteral, por transfusão sanguínea ou compartilhamento de instrumentos perfuro-cortantes contaminados principalmente entre os usuários de drogas injetáveis (ZALA *et al.*, 1994).

Em Salvador, entre gestantes, observou-se que a amamentação é a via mais provável de transmissão do vírus seguida pela via sexual (BITTENCOURT *et al.*, 2001).

## 1.2 PRINCIPAIS PATOLOGIAS RELACIONADAS AO HTLV-1

Na infecção pelo HTLV-1, há desregulação do sistema imune com linfoproliferação espontânea e produção simultânea de citocinas pelas células T auxiliaadoras tipos I e II (CARVALHO *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2004), o que torna os indivíduos infectados mais susceptíveis a infecções e a parasitoses, como a escabiose e acestrongiloidíase (BRITES *et al.*, 2002; MARSH, 1996). Observou-se em Salvador que há maior risco para a tuberculose entre os portadores do HTLV-1 do que entre indivíduos não infectados por esse vírus (MARINHO *et al.*, 2005).

Sabe-se que o HTLV-1 pode causar patologias graves. Ele foi o primeiro retrovírus que demonstrou associação com uma doença humana, sendo inicialmente associado a ATL (leucemia/linfoma de células T do adulto). Posteriormente, foi associado também a HAM/TSP (mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical), uma doença inflamatória crônica do sistema nervoso central, a dermatite infecciosa (DIH) e artropatia (BITTENCOURT *et al.*, 2002; ETOH *et al.*, 1997). Sugere-se que o balanço entre o aumento das células infectadas, promovido pelo HTLV-1, e a resposta imune do indivíduo portador podem influenciar na manifestação das doenças associadas. Entretanto, aproximadamente 95% dos indivíduos portadores permanecem assintomáticos (SAITO *et al.*, 2012).

A DIH ocorre geralmente na infância, embora recentemente, casos com início tardio de DIH foram descritos em adultos (BITTENCOURT; PRIMO; OLIVEIRA., 2006; MARAGNO *et al.*, 2009), enquanto que a ATL e a HAM/TSP são comumente descritas nos indivíduos adultos.

Outras doenças que têm sido relacionadas a esse vírus no adulto são: alveolite linfocitária de células T, síndrome de Sjögren, tireoidite, doença de Behçet, e polimiosite (IJICHI *et al.*, 1996).

Embora o acúmulo das evidências sugira a importância da complexidade das interações vírus-hospedeiro e a resposta do sistema imune do hospedeiro seja um fator determinante para o risco e o tempo da doença, os mecanismos precisos sobre a patofisiologia das doenças ainda não estão claros e o tratamento não é satisfatório.

A ATL, a HAM/TSP e a DIH serão brevemente descritas a seguir.

### 1.2.1 A leucemia/linfoma de células T (ATL)

A ATL é uma forma muito agressiva de neoplasia da célula T (em maioria CD4<sup>+</sup>), resistente à quimioterapia e geralmente fatal. Ela ocorre predominantemente na idade adulta e em indivíduos afrodescendentes e desenvolve-se em aproximadamente 6,6% dos homens e 2,1% das mulheres portadores do HTLV-1 (ARISAWA *et al.*, 2000). Na Bahia, corresponde a um terço dos linfomas T diagnosticados (HS, 1997). Muito embora a ATL seja geralmente relacionada à transmissão vertical, o período de latência para seu desenvolvimento é muito longo (BITTENCOURT; PRIM; OLIVEIRA, 2006). No Brasil, a média de idade de desenvolvimento da ATL varia de 42 a 49 anos, sendo inferior em uma década à encontrada no Japão (BITTENCOURT *et al.*, 2007). Até o momento, a ATL foi classificada em 5 formas clínicas: aguda, crônica, linfomatosa, *smoldering* (indolente) e tumoral primária de pele (BITTENCOURT *et al.*, 2007; SHIMOYAMA, 1991). As formas aguda e crônica apresentam linfocitose, a qual não se observa nas outras formas clínicas da ATL (SHIMOYAMA, 1991); Tabela 1.

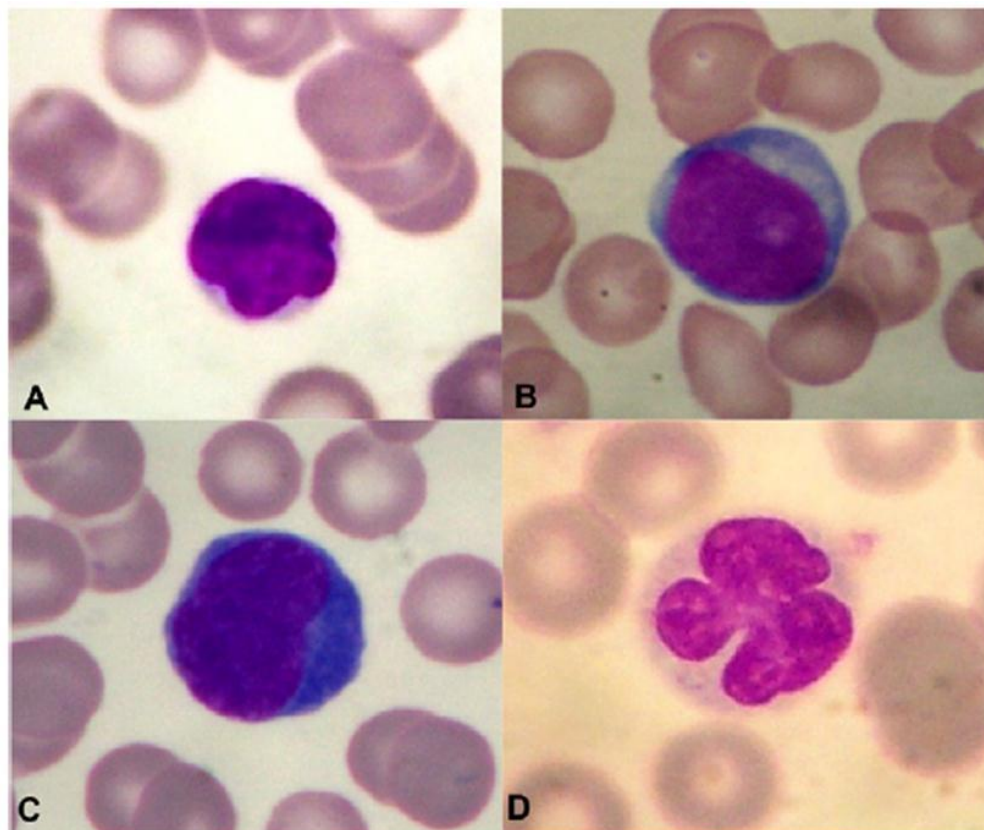
**Tabela 1.** As formas clínicas da ATL e suas características próprias.

<b>Tipos</b>	<b>Linfocitose</b>	<b>LASP</b>	<b>Células em flor</b>	<b>Órgãos envolvidos</b>
<b>Smoldering</b>	Ausente	≥ 5% < 5% #	Ocasionalmente	Pele e/ou pulmões e/ou sangue (≥ 5% de LASP no sangue periférico considera-se Smoldering)
<b>Crônica</b>	Presente	Presente	Ocasionalmente	Qualquer órgão, exceto osso, SNC e TGI
<b>Linfomatosa</b>	Ausente	≤ 1%	Ausente	Linfonodos e qualquer outro órgão
<b>Aguda</b>	Níveis elevados	Presente	Presente	Qualquer órgão + efusões corporais
<b>TPP</b>	Ausente	< 5%	Ausente	Apenas pele

LASP: linfócitos atípicos no sangue periférico; #, nos casos que há menos de 5% de LASP, é necessária biópsia comprovando linfoma; SNC: sistema nervoso central TGI, trato gastrointestinal; TPP –tumoral primária de pele. Adaptado da classificação de (SHIMOYAMA, 1991).

Na forma aguda e ocasionalmente nas formas crônica e *smoldering* da ATL, como demonstrado na figura 5, linfócitos com núcleo polilobulado com cromatina homogênea e condensada, além de nucléolo pequeno ou ausente e citoplasma basófilo, denominadas de células em flor, podem aparecer no sangue periférico dos indivíduos portadores do vírus (SHIMOYAMA, 1991). Adicionalmente a estas células, linfócitos atípicos (*abnormal lymphocytes - Ably*) com morfologias distintas também são observados (TSUKASAKI *et al.*, 1999) (Figura 5). Células em flor também foram observadas em alguns portadores assintomáticos (YAMAGUCHI *et al.*, 1988), considerando estes como casos de pré-ATL. É importante ressaltar que não foram observadas células em flor em outros tipos de linfomas ou leucemias.





**Figura 5.** Linfócitos atípicos observados nos esfregaços de sangue periférico procedente de pacientes com DIH. Coloração por Wright, X1000. A. Célula em flor pequena (protótipo). B. Célula prolinfoicitóide. C. Célula intermediária. D. Linfócito com a cromatina condensada e núcleo marcadamente polilobulado: célula em flor. Fonte: OLIVEIRA *et al.* (2010).

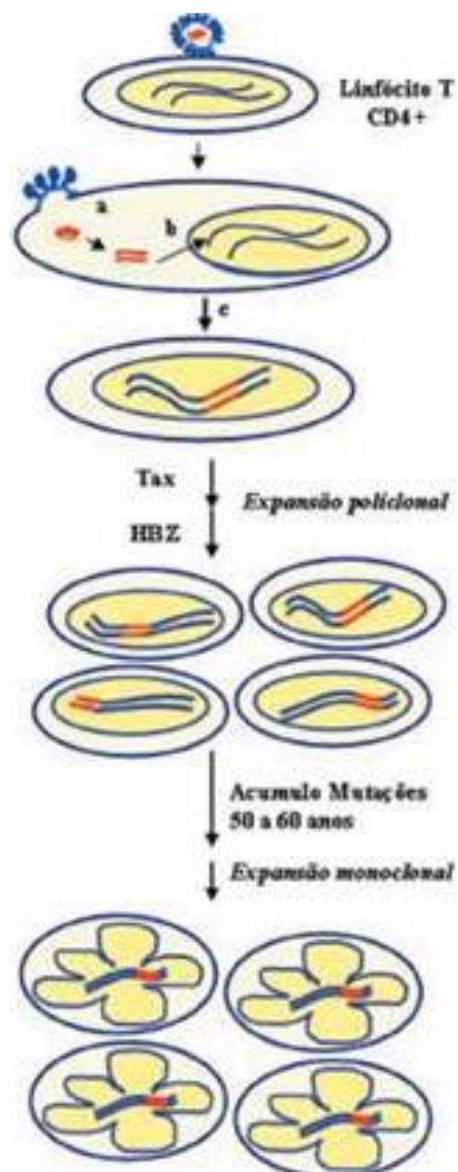
Segundo os critérios diagnósticos estabelecidos, considera-se ATL a partir da presença de 5% ou mais células em flor no sangue periférico (TSUKASAKI *et al.*, 2009). Deste modo, o aparecimento destas células, ainda que em pequena percentagem, no sangue periférico dos pacientes com DIH poderia indicar um estado de pré-ATL.

A patogênese da ATL é pouco esclarecida, mas sabe-se que múltiplos fatores podem estar relacionados com o desenvolvimento de ATL: aqueles associados ao vírus, como carga proviral elevada, e aqueles associados ao portador (MORTREUX; GABET; WATTEL, 2003); (PROIETTI *et al.*, 2005). Assim como as outras formas de leucemia/linfoma, a ATL é resultante da expansão clonal de uma única célula progenitora (INOUE *et al.*, 1998; OHSHIMA *et al.*, 1997), ocorrendo proliferação monoclonal principalmente dos linfócitos T CD4+ e CD25+.

No início da infecção pelo HTLV-1, existem múltiplas populações de células infectadas cada uma contendo o DNA proviral integrado em um local diferente do genoma do hospedeiro

(população policlonal). Uma dessas populações adquire vantagem levando à proliferação monoclonal exacerbada com um único local de integração do DNA proviral no genoma do hospedeiro. A integração monoclonal proviral do HTLV-1 no genoma da célula hospedeira parece ser randômica (SEIKI *et al.*, 1984). Uma vez integrado o DNA proviral, proteínas virais como Tax, inicialmente, e HBZ, posteriormente, são expressas e induzem a proliferação e inibição da apoptose das células infectadas através da regulação com fatores celulares envolvidos nessas vias. O aumento do número de células infectadas promovida por esses mecanismos está relacionado com a elevação da carga proviral (Figura 6) (MATSUOKA, 2005). Em resumo, a ATL se manifesta quando acontece a expansão exacerbada de um único clone celular neoplásico que adquiriu maior capacidade proliferativa, o que se conhece como proliferação monoclonal (MATSUOKA; JEANG, 2007).

Especula-se que as células em flor são o resultado da transformação neoplásica pela acumulação de alterações genéticas e epigenéticas na célula infectada, consequência da proliferação contínua e estimulada pelo provírus (YASUNAGA; MATSUOKA, 2007b); (FARRE *et al.*, 2008), figura 6.



**Figura 6.** Mecanismo oncogênico do HTLV-I. (a) Após a fusão do envelope do vírus, o core viral é introduzido, e o RNA viral transcreve-se em DNA. (b) O DNA viral dirige-se ao núcleo da célula infectada, onde se integra a seu DNA. Há síntese de proteínas virais, como a tax, que estimula a proliferação dos linfócitos e inibe a apoptose. A estimulação contínua e prolongada pode levar à acumulação de mutações e a transformação maligna dos linfócitos. Fonte: FARRE *et al.*, (2008).

### 1.2.2 A mielopatia associada ao HTLV-1/paraparesia espástica tropical (HAM/TSP) e associação com outras doenças

A HAM/TSP representa uma forma grave de mielopatia com paraparesia espástica progressiva, associada a distúrbios vesicais (OSAME *et al.*, 1990; KAWAI *et al.*, 1991), ocorrendo geralmente suas manifestações na fase adulta do indivíduo portador do vírus, ainda que casos tenham sido descritos na faixa infanto-juvenil (PRIMO *et al.*, 2005). Os pacientes com HAM/TSP têm um prognóstico ruim e aproximadamente 40% deles se tornam cadeirantes durante o curso clínico da doença (SAITO; MINEKI *et al.*, 2012).

### 1.2.3 A dermatite infecciosa associada ao HTLV-1 (DIH)

A dermatite infecciosa associada ao HTLV-1, DIH, será descrita mais detalhadamente a seguir, visto que o presente estudo trata de pacientes da faixa-etária infanto-juvenil que manifestam esta doença.

Embora o HTLV-1 tenha sido inicialmente descoberto em 1980 (POIESZ *et al.*, 1980), a dermatite foi associada à infecção pelo HTLV-1 em 1990 por La Grenade e colaboradores, sendo somente descrita 14 anos depois na Jamaica como uma forma diferente de eczema crônico (LA GRENADE *et al.*, 1998).

Em 1996, a doença começou a ser divulgada como dermatite infecciosa associada ao HTLV-1 (DIH), quando 17 casos de dermatite infecciosa foram descritos por Sweet envolvendo lesões infectivas severas acometendo regiões de orelha, face, couro cabeludo, pescoço e ombros. De acordo com este autor, o início da doença geralmente ocorre por volta dos 2 anos de idade, raramente antes dos 18 meses de vida (SWEET; SERVY; KAROW, 1996).

Um menor número de casos de DIH foi descrito em Trinidad e Tobago, Peru e Senegal (SUITE *et al.*, 1994; MAHE *et al.*, 2005). Por outro lado, no Japão, onde é elevada a prevalência da infecção pelo HTLV-1, só há referência a dois casos de DIH na infância que evoluíram para ATL na vida adulta (TSUKASAKI *et al.*, 1994).

Algumas características bacteriológicas da dermatite infecciosa foram avaliadas (WALSHE, 1967) e os critérios diagnósticos da DIH foram publicados em 1998 por La Grenade e colaboradores baseados nos estudos anteriores e em experiência própria, onde estabeleceram os

cinco critérios diagnósticos principais da DIH: 1. Eczema do couro cabeludo, axilas, virilhas, pavilhão auricular, regiões retroauriculares, pálpebras, pele paranasal e/ou pescoço; 2. Rinorréia crônica e/ou lesões crostosas no vestíbulo nasal; 3. Dermatite crônica recidivante com resposta imediata à antibioticoterapia e com recidiva após suspensão do tratamento; 4. Início precoce na infância; 5. Soropositividade para o HTLV-1.

No Brasil, muitos casos têm sido diagnosticados na Bahia, estado brasileiro que atualmente conta com a maior casuística da literatura depois da Jamaica (OLIVEIRA *et al.*, 2012); (LA GRENADE *et al.*, 1998). Em estudo realizado em Salvador, Bahia, as áreas mais envolvidas foram o couro cabeludo e as regiões retroauriculares (100% dos casos) (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Define-se a DIH como uma forma de eczema grave e recidivante que ocorre principalmente em criança, que em geral, pode ter sido infectada verticalmente pelo HTLV-1. Inicia-se após os 18 meses de vida e raramente persiste até a vida adulta (GONCALVES *et al.*, 2000). As lesões são eritematosas, escamativas e crostosas, sendo geralmente localizadas nas regiões do couro cabeludo e retroauriculares, pescoço, virilha, região paranasal, axilas, ouvido externo e narinas. Esta condição está geralmente associada com infecções por *Staphylococcus aureus* e/ou *Streptococcus beta haemolyticus* (LA GRENADE *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2005) (Figura 7).



**Figura 7.** Pacientes com DIH. **A.** Paciente do sexo feminino de 9 anos com lesões escamo-eritematosas no couro cabeludo e região retroauricular desde 1 mês de vida. **B.** Menina de 6 anos com doença desde 1 ano de idade, lesões eritematosas, crostosas e escamosas nas regiões de dobra dos braços. **C.** Menina com 9 anos de idade e pápulas eritematosas e escamosas disseminadas, além de folículos papulares desde os 8 anos. **D.** Menina de 8 anos de idade com lesões escamosas, eritematosas e crostosas. **E.** Menino de 12 anos com lesões crostosas nas narinas desde os 11 meses de idade. **F.** Menino de 3 anos com DIH desde os 2, blefarconjuntivite bilateral com acometimento das sobrancelhas.

Embora as crostas nasais sejam um achado comum, elas podem estar ausentes em alguns casos (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Apenas dois estudos têm sido conduzidos a respeito das características epidemiológicas e dermatológicas de uma série de casos de DIH com diagnóstico confirmado e positividade sorológica para o HTLV-1: um na Jamaica, no qual 50 pacientes foram avaliados, e outro na Bahia, Brasil, envolvendo 42 casos (LA GRENADE *et al.*, 1998); (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Em estudo realizado na Jamaica, a DIH correspondeu a 10% dos casos de eczema infantil (LA GRENADE *et al.*, 1998). Nesse país, a prevalência de portadores infantis de HTLV-1 em

1991 foi de 1% e, acima dos 20 anos de idade, de 8,1% (MURPHY *et al.*, 1991). Em 2000, 28 crianças portadoras do HTLV-1 foram acompanhadas durante 7,5 anos em média, e observou-se que apenas uma desenvolveu DIH (apresentou carga proviral elevada), concluindo que, em crianças infectadas verticalmente, a probabilidade de desenvolver essa infecção aos 4 anos de idade é de 2% (MALONEY *et al.*, 2000). Nesse mesmo estudo, que incluiu 181 filhos de portadoras desse vírus, foi observada uma taxa de transmissão vertical elevada, igual a 15,5%. A frequência da DIH é maior no sexo feminino, variando de 60 a 65% (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

A patogênese da DIH é ainda desconhecida e não se sabe por que apenas algumas crianças infectadas desenvolvem essa doença, a maioria permanecendo assintomática. Existe a possibilidade de que o desenvolvimento dessa dermatite seja multifatorial, estando envolvidos fatores genéticos e imunológicos e carga proviral elevada (LA GRENADE *et al.*, 1998; PRIMO, *et al.*, 2009; NASCIMENTO *et al.*, 2009).

Segundo La Grenade *et al.* (1996), existe a possibilidade de que o desenvolvimento dessa dermatite esteja ligado a fatores genéticos, desde que já foram descritos casos de DIH/HAM-TSP em mais de um membro da mesma família (PRIMO *et al.*, 2005; LA GRENADE *et al.*, 1998).

#### *1.2.3.1 - A DIH e sua associação com outras doenças*

Foi observado que pacientes com DIH podem manifestar HAM/TSP ainda na infância ou adolescência. O grupo de estudos sobre infecções pelo HTLV-1 na infância e adolescência do complexo HUPES-UFBA (Hospital Universitário Professor Edgar Santos da Universidade Federal da Bahia) em parceria com pesquisadores do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM), FIOCRUZ-BA, têm observado na criança, casos de DIH que evoluíram para a forma infanto-juvenil da HAM/TSP (PRIMO *et al.*, 2005).

Os pacientes de DIH podem evoluir para ATL (HANCHARD *et al.*, 1991); (BITTENCOURT *et al.*, 2001) e recentemente, um caso de manifestação simultânea de ATL e HAM/TSP em uma adolescente com DIH foi descrito na Bahia (BITTENCOURT e FARRÉ, 2008).

Por outro lado, 35% dos casos com ATL, que apresentaram forma clínica tumoral primária

de pele<sup>1</sup> observados na Bahia, têm história de eczema severo/grave na infância, resistente a tratamento e com comprometimento do couro cabeludo, compatível com o diagnóstico de DIH. Desses casos, 14% deles têm associação com HAM/TSP, o que mostra uma estreita correlação entre estas patologias (BITTENCOURT; OLIVEIRA, 2005; BITTENCOURT *et al.*, 2007). É possível que a DIH represente um indicador prognóstico de condições patológicas associadas ao HTLV-1 que possam vir ocorrer mais tardiamente, na fase adulta do indivíduo portador. Contudo, ainda se desconhece os fatores envolvidos no desenvolvimento de HAM/TSP e ATL em pacientes com DIH.

Ainda que a ATL ocorra geralmente no adulto, há relatos na literatura de 24 casos diagnosticados com ATL na infância e adolescência (Figura 9); (BITTENCOURT *et al.*, 2006) *apud* (CARNEIRO-PROIETTI *et al.*, 2006), cujas manifestações clínicas são, em sua maioria, semelhantes às observadas no adulto. Seis tinham idade igual ou inferior a 10 anos na época do diagnóstico (MAHE *et al.*, 2004; VILMER *et al.*, 1985).

---

<sup>1</sup> A forma tumoral primária de pele é uma das 5 formas clínicas da ATL e caracteriza-se por apresentar tumores na pele e ausência de linfocitose, hipercalcemia, envolvimento linfonodal e de outros órgãos internos (BITTENCOURT *et al.*, 2005).



**Tabela 1 -** Casos da literatura de ATL ocorrendo na infância e adolescência<sup>76</sup>

Nº	Autores	Idade/ sexo	Pele	LN	Baço e/ou fígado	MO	SNC	Sobrevida (anos)
1	Vilmer et al. <sup>77</sup>	1/M	+	-	-	-	-	Vivo (8)
2	Foucar et al. <sup>78</sup>	16/F	+	+	+	+	-	Óbito (0,1)
3	Ikaí et al. <sup>79</sup>	10/F	+	-	-	-	-	Vivo (3,6)
4	Ratner et al. <sup>80</sup>	7/F	+	...	...	...	...	Óbito (...)
5	Fort et al. <sup>81</sup>	16/M	-	+	+	-	-	Óbito (0,2)
6	Blank et al. <sup>82</sup>	17/M	-	+	+	...	...	Óbito (...)
7	Williams et al. <sup>83</sup>	12/M	-	...	+	+	-	...
8	Wilks et al. <sup>84</sup>	16/F	+	+	+	+	-	Óbito (0,3)
9	Broniscer et al. <sup>85</sup>	16/F	+	+	+	+	+	Vivo (...)
10	Lin et al. <sup>86</sup>	12/F	+	+	-	+	-	Vivo (5)
11	Valle et al. <sup>87</sup>	15/M	+	+	+	...	...	Óbito (0,2)
12	Lewis et al. <sup>88</sup>	13/M	+	-	-	-	-	Vivo (...)
13	Bittencourt et al. <sup>89</sup>	18/F	+	+	-	+	-	Óbito (1,9)
14	Bittencourt et al. (comunicação pessoal)*	9/M	+	-	-	-	-	Vivo (14)
15	Pombo de Oliveira et al. <sup>90†</sup>	2/F	+	+	+	...	+	Óbito (2)
16	Pombo de Oliveira et al. <sup>90*</sup>	18/M	+	+	+	...	+	Óbito (0,6)
17	Pombo de Oliveira et al. <sup>90*</sup>	11/M	+	+	+	...	+	Óbito (4)
18	Pombo de Oliveira et al. <sup>90*</sup>	15/M	+	+	-	...	+	Óbito (0,2)
19	Pombo de Oliveira et al. <sup>90*</sup>	14/M	+	+	+	...	-	Óbito (0,5)
20	Pombo de Oliveira et al. <sup>90*</sup>	16/F	-	+	+	...	-	Óbito (0,2)
21	Pombo de Oliveira et al. <sup>90*</sup>	16/F	-	+	+	...	-	Óbito (0,2)
22	Pombo de Oliveira et al. <sup>90*</sup>	7/M	-	+	-	...	-	Vivo (3)
23	Mahé et al. <sup>31</sup>	17/F	+	+	-	...	-	Óbito (0,16)
24	Oliveira et al. <sup>91</sup>	16/F	+	-	-	-	-	Viva (1,4)

ATL = leucemia/linfoma de células T do adulto; LN = linfonodos; MO = medula óssea; SNC = sistema nervoso central; ... = sem referência.

\* Integração viral de tipo monoclonal.

† Medula óssea envolvida em quatro casos.

**Figura 8.** Casos de ATL descritos na literatura que se manifestados na infância e adolescência. Fonte: BITTENCOURT *et al.*, (2006).

### 1.2.3.2 - Ocorrência de células em flor na ATL e na DIH

Há cinco anos, o grupo de estudos sobre infecções pelo HTLV-1 na infância e adolescência do complexo HUPES-UFBA/CPqGM-FIOCRUZ vem acompanhando uma coorte de pacientes com DIH e avaliando parâmetros clínicos, histopatológicos, hematológicos e moleculares que possam vir a ser marcadores de evolução da DIH para ATL e HAM/TSP.

No acompanhamento da coorte de pacientes com DIH foi recentemente observado de 1-4% de linfócitos atípicos e/ou células em flor em esfregaço do sangue periférico (OLIVEIRA *et al.*, 2010); Figura 5. Uma vez que células em flor já foram observadas em alguns portadores assintomáticos (INOUE *et al.*, 1998) e estes foram considerados como casos de pre-ATL, a observação dessas células em pacientes com DIH pode vir a ser um marcador importante da evolução para a ATL.

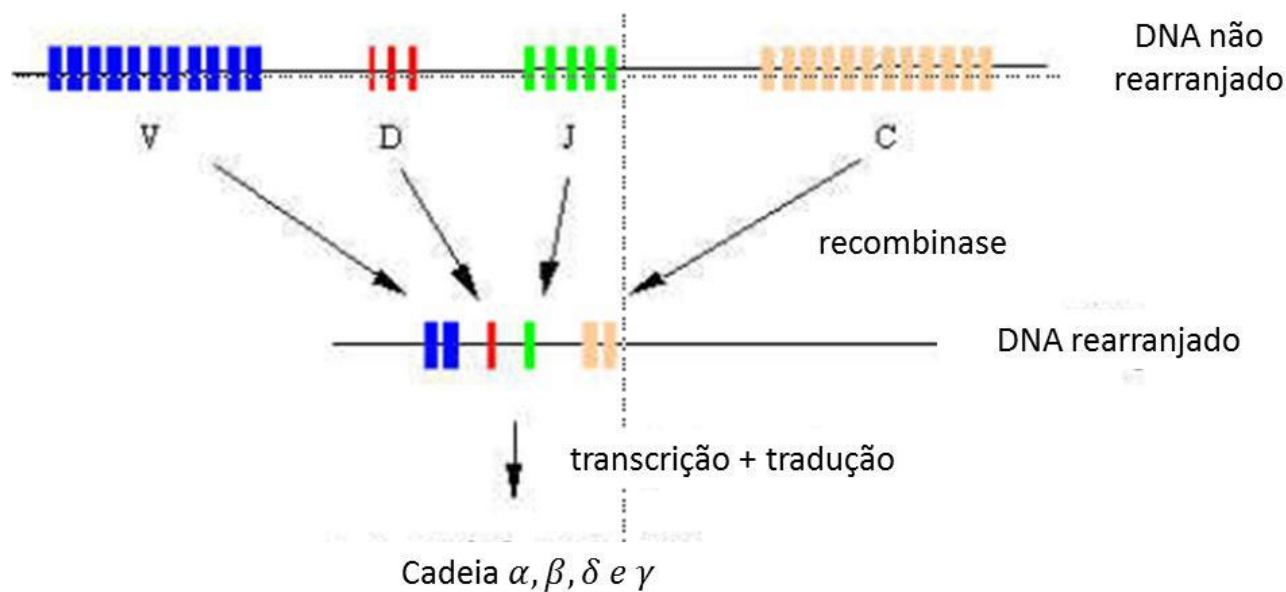
Como a ATL se manifesta quando acontece a expansão exacerbada de um único clone celular neoplásico que adquiriu maior capacidade proliferativa (proliferação monoclonal) (MATSUOKA; JEANG, 2007), assim a detecção de uma população de linfócitos atípicos com proliferação exacerbada e monoclonal (onde todas as células se originariam de uma única célula transformada) nesses pacientes, poderia ser um possível marcador de evolução de DIH para ATL.

### 1.3 O REARRANJO GÊNICO E A CLONALIDADE DOS LINFÓCITOS T

Os linfócitos T originam-se de um precursor comum da medula óssea que se torna comprometido com a linhagem dos linfócitos. Os progenitores das células T migram e completam sua maturação no timo. A maturação inicial é caracterizada pela proliferação celular induzida por citocinas, principalmente a IL-7, levando a um aumento acentuado do número de linfócitos imaturos. Essa maturação envolve a recombinação somática dos segmentos de genes dos receptores de antígenos e a expressão das moléculas do receptor de célula T (TCR) nos precursores das células T. A expressão dos receptores de antígenos é essencial para a sobrevivência e maturação dos linfócitos em desenvolvimento e para os processos de seleção que levam a um repertório diversificado de especificidades antigênicas (KNOEHEL *et al.*, 2005).

Os TCRs podem estar formados pelas cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ . Estas são codificadas por genes que inicialmente contém os segmentos V, J e D. Na maturação dos linfócitos T no timo acontece a recombinação somática destes segmentos gênicos que envolve a junção do segmento V aos segmentos recombinados DJ, ou diretamente a junção V e J em outros *loci*. Esse processo de recombinação gênica é mediado por um complexo de enzimas recombinases que inclui um complexo linfócito-específico RAG-1 e RAG-2 (Figura 9), (ABBAS *et al.*, 2005).

Os genes das cadeias  $\beta$  e  $\gamma$  do TCR têm sido os alvos preferencias para detecção de células T monoclonais, uma vez que o rearranjo gênico para a cadeia TCR- $\alpha$  é altamente complexo e o gene das cadeias do TCR- $\delta$  estão frequentemente deletados em linfócitos T maduros.



**Figura 9.** Esquema simplificado do processo de rearranjo dos genes que codificam para as cadeias alfa, beta, delta e gama do receptor de célula T (TCR). Fonte: Adaptado de ABBAS *et al.* (2005).

Para estudar a clonalidade das populações de linfócitos T circulantes (diferenciar uma população de linfócitos T policlonal de uma monoclonal), precisa-se recorrer a técnicas de biologia molecular, pois não existem ferramentas morfológicas ou imunofenóticas que consigam fazer essa diferenciação. Segundo Assaf *et al.* (2000), através de tais técnicas pode-se fazer a análise da presença de populações de células T monoclonais através da detecção de rearranjos dos genes que codificam para as diferentes cadeias do receptor dos linfócitos T (TCR). A análise do rearranjo dos genes que codificam para o TCR vem sendo utilizada para diagnóstico molecular de leucemia e linfoma de células T em geral. Esta técnica baseia-se na amplificação por PCR de regiões gênicas rearranjadas que codificam para as cadeias do TCR. Para esta análise são utilizados oligos (*primers*) degenerados, capazes de amplificar muitos rearranjos ao mesmo tempo, o que permite detectar um padrão de múltiplas bandas para populações policlonais (policlonalidade) e um padrão discreto, sem muitas ou até uma única banda, para populações oligoclonais e monoclonais (monoclonalidade) (DISS *et al.*, 1995; VAN DONGEN *et al.*, 2003).

Sendo assim, acredita-se na possibilidade de que exista uma conversão do padrão policlonal de expansão/proliferação dos linfócitos T infectados para o padrão monoclonal na evolução de DIH para ATL, respectivamente (ETOH *et al.*, 1997); (BITTENCOURT; FARRÉ, 2008).

### 1.3.1 Análise da integração proviral para avaliação da clonalidade de linfócitos T na infecção pelo HTLV-1.

Na infecção pelo HTLV-1, existem duas estratégias específicas para analisar a clonalidade de células infectadas: uma baseada na técnica de *Southern Blot* (SB) (TSUKASAKI *et al.*, 1997) e a outra baseada na amplificação por PCR, onde foram desenvolvidas a PCR invertida (TAMIYA *et al.*, 1995) e a PCR invertida e longa (ILPCR) (ETOH *et al.*, 1997). Tanto o método SB como o da ILPCR utilizam o princípio de que o HTLV-1 integra o seu genoma proviral no genoma da célula infectada e que esta integração é randômica, o que significa que, em cada célula infectada e originária de uma população de células portadoras do DNA proviral, o local de integração proviral é diferente. Assim, todas as células de uma população de linfócitos que prolifera seguindo um padrão monoclonal, onde todas as células provem de um linfócito infectado original, têm o DNA proviral integrado no mesmo local do genoma, apresentando padrão de integração monoclonal.

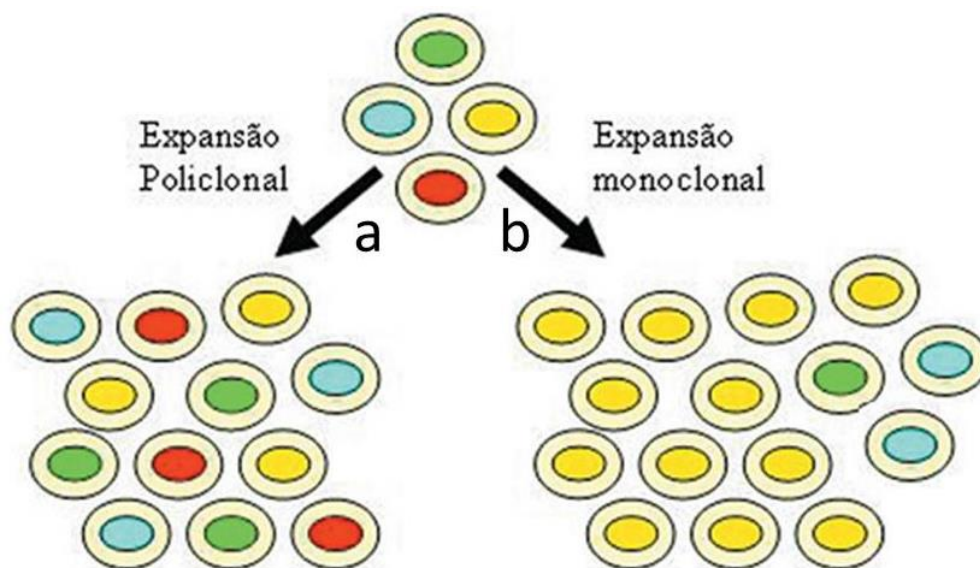
Para a realização do SB, necessita-se de quantidade significativa de DNA, que nem sempre está disponível. Nesta estratégia se utiliza inicialmente uma enzima de restrição para cortar o DNA humano a fim de que não existam alvos de restrição no DNA proviral. Os fragmentos gerados são detectados com uma sonda contendo unicamente fragmentos do genoma viral. A visualização de uma banda única indica a presença de um clone predominante abundante (padrão monoclonal).

A PCR invertida é mais sensível e precisa de menos DNA para a sua realização. Através desta estratégia, gera-se um produto de PCR que, ao ser sequenciado, permite identificar a região do genoma humano onde o provírus se integrou.

Uma vez que as lesões tumorais na pele de pacientes com ATL não apresentam um padrão histológico característico e simulam a mesma histologia observada em outros linfomas cutâneos não associados ao HTLV-1, como a micose fungóide ou o linfoma anaplásico de grandes células (BITTENCOURT *et al.*, 2009), ambas as estratégias são de grande utilidade para fazer diagnóstico diferencial de ATL em relação a linfomas cutâneos T. Este diagnóstico diferencial é muito importante, principalmente em áreas endêmicas para o HTLV-1, pois o prognóstico e o tratamento são diferentes nestas neoplasias.

Diferentemente do que ocorre na ATL, na DIH espera-se encontrar uma população policlonal de linfócitos T infectados (oriunda da proliferação de diferentes clones infectados) e um padrão de integração policlonal (policlonalidade dos linfócitos), pois em cada clone de células

infectadas o DNA proviral pode ter integrado em uma região diferente do genoma da célula (GILLET *et al.*, 2011) (Figura 10).



**Figura 10.** Padrões de expansão clonal de linfócitos T infectados. Os linfócitos que tem integração do DNA proviral em diferentes áreas do genoma humano e que contêm diferentes rearranjos nos genes que codificam para o TCR estão marcados em várias cores. (a) Expansão policlonal: a população linfocitária origina-se de vários linfócitos. (b) Expansão monoclonal: a população linfocitária origina-se de um único linfócito que adquiriu capacidade proliferativa maior que os demais e por isso todos têm o DNA proviral integrado no mesmo local e contêm o mesmo rearranjo dos genes que codificam para o TCR. Fonte: adaptado de FARRE *et al.* (2008)

#### 1.4 A INTEGRAÇÃO PROVIRAL DOS RETROVÍRUS E DO HTLV-1

Para diferentes retrovírus, alguns estudos têm mostrado que a integração viral no genoma da célula hospedeira não é totalmente aleatória, mas que cada retrovírus parece possuir alvos preferenciais no genoma humano (MITCHELL *et al.*, 2004).

Cada retrovírus também tem como alvo uma característica região consenso de sequências nucleotídicas repetidas no local da integração (WU *et al.*, 2005). As diferenças preferências de cada retrovírus são determinadas por uma série de fatores conhecidos, incluindo propriedades da integrase viral (LEWINSKI *et al.*, 2006), proteínas que auxiliam na adesão ao DNA (AL-MAWSAWI *et al.*, 2006), proteínas celulares (BUSHMAN, 2003) e a estrutura da cromatina no local da integração (PRUSS *et al.*, 1994; WANG *et al.*, 2007). Por exemplo, sabe-se que o HIV

tem um viés de integração em direção aos genes, onde a integração é direcionada às ilhas CpG e aos sítios de iniciação de transcrição dos genes (CIUFFI *et al.*, 2006).

Para o HTLV-1 foi mostrado que *in vivo* há influência seletiva para a distribuição genômica dos sítios de integração proviral em infecção persistente pelo HTLV-1 (MEEKINGS *et al.*, 2008).

## 2. JUSTIFICATIVA

Este projeto iniciou-se após a observação de linfócitos atípicos, incluindo células em flor, em filmes sanguíneos de pacientes com DIH (OLIVEIRA *et al.*, 2010). As células em flor são características das formas graves da ATL e também foram observadas em raros casos de portadores assintomáticos adultos em percentagens de até 5%, sendo considerados como casos de pré-ATL (YAMAGUCHI *et al.*, 1988). Até o momento, somente na Bahia essas células foram descritas na faixa-etária infanto-juvenil, em pacientes com DIH (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Uma vez que a ATL apresenta padrão monoclonal de integração proviral, este estudo pretende investigar se nos pacientes com DIH que apresentaram células atípicas, também se observa o padrão monoclonal característico da ATL para proliferação dos linfócitos T infectados. Este tipo de padrão de integração não foi antes observado em portadores na faixa infanto-juvenil.

Estudos mostram que no caso do desenvolvimento da ATL em portadores do HTLV-1, que acontece a partir da quarta década de vida, o vírus foi adquirido principalmente por transmissão vertical (BARBOSA *et al.*, 1999; POMBO DE OLIVEIRA *et al.*, 1999). Deste modo, o desenvolvimento de padrão monoclonal nestes pacientes possivelmente acontece durante um longo período a partir da infecção. Considerando que os pacientes de DIH, que desenvolvem esta doença na infância e adolescência, adquiriram o vírus também por via vertical, o desenvolvimento deste padrão monoclonal ocorreria durante um menor tempo de convivência com o HTLV-1. A observação do padrão monoclonal na faixa infanto-juvenil poderia indicar que, em pacientes com DIH, existem fatores que podem induzir precocemente o desenvolvimento da ATL.

Adicionalmente, após o aparecimento de linfócitos atípicos e/ou células em flor, ressaltamos a importância da verificação da percentagem dessas células: se ela se mantém ou apresenta oscilação no sangue periférico. Tal acompanhamento permitirá compreender se a presença de linfócitos atípicos flutua ao longo do tempo ou se corresponde a um fenômeno pontual.

Ainda que não se conheçam os mecanismos que levam ao surgimento das células em flor no sangue periférico, a sua relação com as formas graves da ATL confere relevância para um possível diagnóstico de pré-ATL. A fim de compreender melhor a importância clínica e diagnóstica da presença desse tipo de linfócito atípico na evolução da DIH para ATL e sendo que estas células já foram observadas em assintomáticos na idade adulta (YAMAGUCHI *et al.*, 1988), a sua presença também será avaliada em um grupo de portadores assintomáticos da faixa-etária infanto-juvenil para avaliar se este fenômeno acontece também em portadores assintomáticos desta faixa-etária, não estando somente relacionado com a manifestação de DIH.

### **3. HIPÓTESE DO ESTUDO**

Na evolução da DIH para a ATL pode existir conversão do padrão policlonal de expansão dos linfócitos infectados pelo HTLV-1 para o padrão monoclonal. A presença de células em flor no sangue periférico de pacientes com DIH está relacionada com o aparecimento de um clone predominante, podendo ser observado um padrão de integração proviral monoclonal através de análise molecular.



#### 4. OBJETIVOS

##### **Objetivo geral:**

- Determinar se a presença de linfócitos atípicos e/ou células em flor no sangue periférico de pacientes com DIH está associada com a observação de um padrão de proliferação monoclonal de linfócitos infectados pelo HTLV-1.

##### **Objetivos específicos:**

1. Avaliar o rearranjo dos genes *TCR-gama (TCRG)* nos linfócitos T circulantes nos pacientes portadores do HTLV-1 com DIH na presença e ausência de linfócitos atípicos e/ou células em flor no sangue periférico;
2. Naqueles pacientes com DIH com linfócitos atípicos e/ou células em flor no sangue periférico, analisar o padrão de integração proviral (mono ou policlonal) das células infectadas e identificar o local de integração do provírus no genoma do hospedeiro;
3. Acompanhar os pacientes da coorte com DIH e avaliar o aparecimento, a permanência ou a flutuação da percentagem de linfócitos atípicos e/ou células em flor no sangue periférico;
4. Investigar se a presença de linfócitos atípicos e/ou células em flor também pode ser observada em portadores assintomáticos na faixa-etária infanto-juvenil.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA

O presente estudo inclui uma coorte composta por 31 pacientes com DIH, que tem sido acompanhada clínica e laboratorialmente durante pelo menos seis anos (2006 - 2012) e um grupo de 11 portadores assintomáticos do HTLV-1, sendo estes indivíduos irmãos dos pacientes com DIH que foram também acompanhados clínica e laboratorialmente pelo período de 1 ano (2011 – 2012). O grupo de portadores assintomáticos (GPA), assim como o de DIH, correspondem a amostras de conveniência. Dos 31 pacientes incluídos, 9 também apresentam HAM/TSP.

A distribuição por sexo e idade de ambos os grupos está representada na tabela 2. A coorte com DIH foi composta por 20 indivíduos do sexo feminino e 11 do sexo masculino enquanto que o grupo de portadores assintomáticos esteve formado por 7 indivíduos do sexo masculino e 4 do sexo feminino.

Todos os indivíduos incluídos neste estudo tiveram a sorologia para HTLV-1 investigada por ELISA e confirmada por *Western blot* e PCR. O diagnóstico de DIH foi realizado segundo critérios pré-estabelecidos (LA GRENADE *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2005). Todos os portadores apresentavam sorologia negativa para HIV e pertenceram à faixa-etária infante-juvenil. Como citado anteriormente, todos os indivíduos incluídos no estudo foram acompanhados clinicamente durante o período do estudo observando aspectos dermatológicos e neurológicos relacionados com as doenças associadas ao HTLV-1 (LA GRENADE *et al.*, 1998); (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Todos os 31 pacientes da coorte eram afro-descendentes e de classe socioeconômica baixa. Dois dos 31 pacientes eram irmãos. Três dos pacientes eram órfãos e estavam residindo em orfanatos ou como moradores de rua. Para esses pacientes, os dados do início da doença, assim como do período de amamentação são desconhecidos. Um paciente que tinha mãe soronegativa para o vírus tinha histórico de transfusão sanguínea. O período de amamentação dos pacientes da coorte com DIH variou entre 1 – 72 meses (média de 24,2 meses; informação de 28 pacientes). Para o GPA este dado não foi analisado.

**Tabela 2.** Caracterização da população de estudo (coorte com DIH e grupo de portadores assintomáticos - GPA) quanto à faixa-etária e sexo.

<b>Comparação dos grupos quanto à idade e sexo</b>						
Grupo	Idade média	Idade mediana	Sexo*	n° de indivíduos	%	TOTAL
Coorte DIH	18,5	19	F	20	64.5	31
			M	11	35.5	100
GPA	18,5	17	F	4	36.4	11
			M	7	63.6	100

Obs.: As idades foram calculadas a partir da data de nascimento de cada indivíduo pertencente aos dois grupos até a data do fechamento das coletas, que ocorreram até o ano de 2012. \*F, sexo feminino e M, sexo masculino.

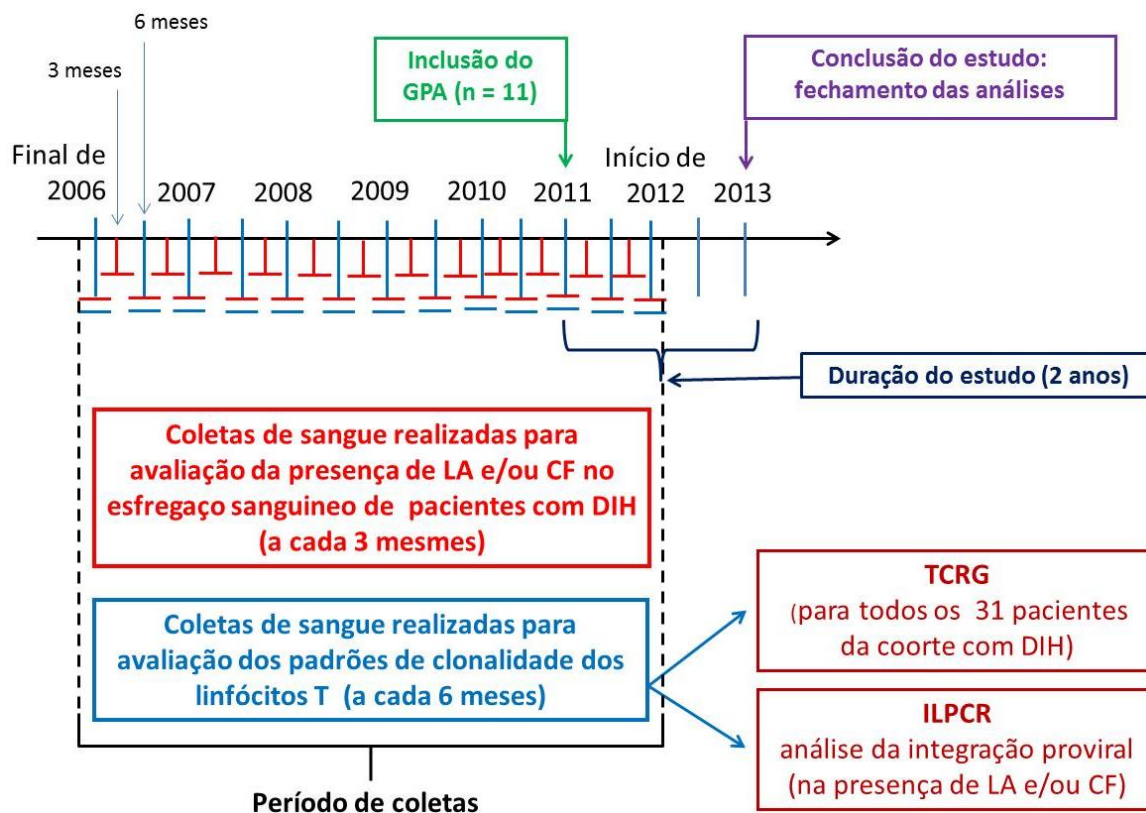
Ao final do ano de 2006 foi iniciada a investigação pela presença de linfócitos atípicos e células em flor no sangue periférico nos pacientes com DIH. Para isto, foram realizadas coletas e filme sanguíneo a cada 3 meses. Para fins do presente estudo, esta investigação e o acompanhamento desses pacientes ocorreram até o início do ano de 2012, com exceção de três pacientes que foram a óbito antes desse período. Destes, dois em 2008, sendo um por cardite reumática (Paciente 18) e outro por insuficiência renal e sepsis (Paciente 14). O terceiro, em 2009, por desidratação causada por diarreia (Paciente 6).

Durante o período de investigação, a cada duas coletas (correspondendo a cada 6 meses), parte do material coletado foi utilizado para a realização da extração de DNA e posterior análise da clonalidade celular por PCR. Devido à dificuldade financeira das famílias dos pacientes para poder comparecer nas avaliações agendadas, não foi possível obter material de todos os pacientes em todas as coletas, resultando em 2 a 4 coletas por indivíduo por ano.

Os esfregaços sanguíneos foram analisados no Serviço de Anatomia Patológica do HUPES-UFBA. Para as análises moleculares, realizadas no Laboratório de Patologia Experimental (LAPEX) do CPqGM/FIOCRUZ, foram coletados até 20 mL de sangue periférico.

O acompanhamento dos portadores assintomáticos foi iniciado em 2011 para fins comparativos com os resultados observados para os pacientes com DIH (Figura 11). Durante o período de investigação, estes também foram avaliados segundo critérios previamente estabelecidos para diagnóstico de DIH, HAM/TSP E ATL (LA GRENADE *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2005; OSAME *et al.*, 1990). Para este grupo, o número de avaliações variou entre 1 e 3 no período do estudo. A avaliação molecular iniciou-se em 2011, sendo que foram

usadas amostras de DNA coletadas de maneira retrospectiva e amostras coletadas prospectivamente.



**Figura 11.** Esquemática do desenho do estudo que foi realizado entre o início de 2011 ao início de 2013, quando ocorreu o fechamento de todas as análises. Porém, todas as coletas foram realizadas no período que compreende o final de 2006 ao início de 2012. De maneira geral, as coletas para realização dos filmes sanguíneos ocorreram a cada 3 meses (isto não se repetiu para todos os pacientes da coorte, pois alguns realizaram coletas em intervalos maiores), enquanto que para as avaliações de clonalidade dos linfócitos, a cada 6 meses. LA, linfócitos atípicos; CF, células em flor; TCRG, receptor de célula T, cadeia  $\gamma$  (gama); ILPCR, PCR invertida e longa; GPA, grupo de portadores assintomáticos.

## 5.2 ANÁLISE DO FILME SANGUÍNEO

A percentagem de linfócitos atípicos foi determinada entre 100 leucócitos contados por análise microscópica em filme do sangue periférico corados com Wright. A identificação dos linfócitos atípicos foi baseada nos critérios morfológicos estabelecidos por Tsukasaki et al. (1999).

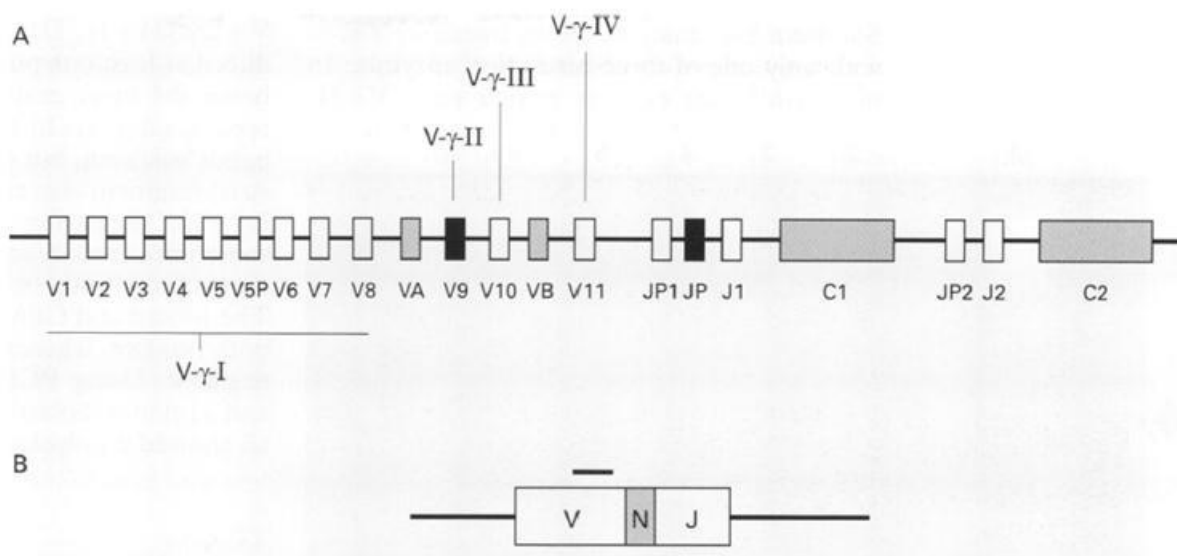
### 5.3 SEPARAÇÃO DE PMBCS PARA EXTRAÇÃO DO DNA

Para separação das células mononucleares do sangue periférico (*Peripheral Mononuclear Blood Cells*: PBMC) utilizou-se de 5 a 20 mL de sangue e Ficoll-Hypaque (Ficoll-Paque Plus-GE Healthcare), pelo gradiente de densidade através da centrifugação. A obtenção de DNA genômico das células mononucleares foi feita utilizando-se um protocolo de tratamento com proteinase K, realizando em seguida a sua extração através do *QIAmp DNA Mini Kit* (QIAGEN) seguindo as recomendações do fabricante.

O DNA extraído do PBMC foi quantificado utilizando o equipamento NanoDrop (*Thermo Fisher Scientific*) de acordo com as instruções do fabricante. Valores da relação de absorbâncias a 260nm e 280nm (260/280) próximos a 1,8 foram considerados satisfatórios para o DNA extraído.

### 5.4 ANÁLISE DA CLONALIDADE DOS LINFÓCITOS T POR TCRG

O estudo da clonalidade de linfócito T foi realizado pela análise do rearranjo dos genes que codificam para a cadeia gama ( $\gamma$ ) do receptor de célula T (TCR). Esta estratégia baseia-se na técnica de PCR utilizando oligos (*primers*) múltiplos e degenerados que se ligam a genes que codificam para as cadeias variáveis do TCR. Seguindo o protocolo descrito por Diss *et al.* (1995), as sequências de *primers* utilizadas foram V $\gamma$ I: 5'-TCTGGG/CTCACACTCC/TCACTTC-3'; V $\gamma$ III/IV: 5'-CTCACACTCC/TCACTTC-3' e J $\gamma$ 1/2: 5'-CAAGTGTTGTTCCACTGCC-3'. O *primer* V $\gamma$ I pode se ligar a todos os genes da família V $\gamma$ I; o *primer* V $\gamma$ III/IV se liga a genes das famílias V $\gamma$ III e V $\gamma$ IV (genes V10 e V11) e o *primer* J $\gamma$ 1/2 é complementar a V $\gamma$ I e V $\gamma$ II (Figura 13). O tamanho esperado dos produtos para esse *set* de *primers* está entre 70-95 pares de bases (pb).



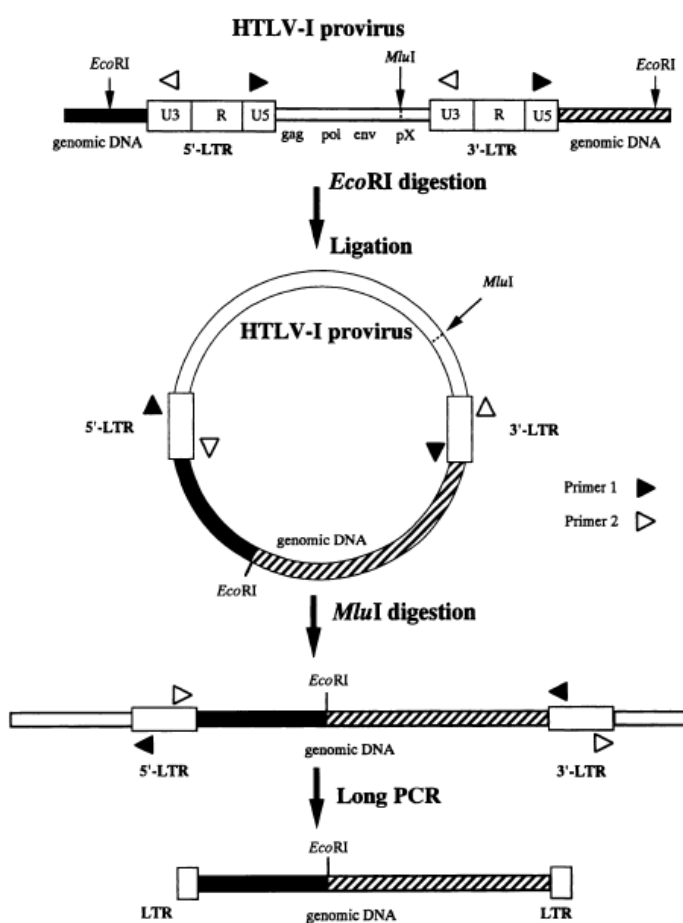
**Figura 12.** Esquemática do rearranjo dos genes para cadeia gama do TCR. A. Organização dos genes que codificam para a cadeia  $\gamma$  do TCR e regiões reconhecidas pelos *primers* utilizadas nas PCR para análise do rearranjo do mesmo. B. Cadeia  $\gamma$  do TCR rearranjada mostrando as posições em que o *primer* permite a amplificação de regiões dos genes V-N-J. Fonte: DISS *et al.*, (1995).

Para as PCR utilizou-se 100 ng de DNA, 1 U de Taq polimerase, 10 ng de cada *primer*, 400  $\mu$ M de dNTPs, 2,0 mM de  $MgCl_2$  e tampão contendo Tris-HCl 20 mM (pH 8,4) /  $KCl_2$  50 mM num volume final de 50  $\mu$ L. As reações foram amplificadas em termociclador *Eppendorf* com as seguintes condições de temperatura: 95°C por 5 minutos para desnaturação do DNA, 55°C por 1 minuto para pareamento dos *primers* e 73°C por 1 minuto para extensão do *primer* pela Taq polimerase durante 40 ciclos.

Os produtos das reações foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%. Os géis foram corados com brometo de etídio e fotografados sob luz ultravioleta. Esta avaliação foi realizada para todos os pacientes em todas as coletas. Na visualização de até duas bandas por amostra com fragmentos de tamanho esperado entre 55 a 100 pares de bases foram consideradas como padrão de amplificação monoclonal. A visualização de múltiplas bandas formando um rastro foi considerada como padrão de amplificação policlonal.

## 5.5 ANÁLISE DA INTEGRAÇÃO VIRAL POR ILPCR

Utilizamos a técnica do PCR invertido e longo (ILPCR) (ETOH *et al.*, 1997), onde o DNA genômico humano é digerido com *EcoRI* que não digere regiões provirais do HTLV-1, mas apenas sequências do DNA humano; sendo ligado com T4 DNA ligase para causar *self ligation* (auto ligação), e novamente cortado com a enzima *MluI* que digere a região pX do HTLV-1 (Figura 2). Esta última digestão impede a amplificação do provírus, permitindo que o produto de PCR (amplicon) possua regiões viral e humana (Figura 13).



**Figura 13.** Diagrama esquemático da ILPCR. O DNA genômico foi digerido por *EcoRI* e depois ligado com T4 ligase para formar o DNA circular. Este DNA circular contém DNA genômico flanqueado por sequência do provírus HTLV-1. As setas indicam os *primers* utilizados na ILPCR. Uma vez que estes *primers* podem amplificar tanto DNAs genômicos flanqueados como o próprio provírus, o DNA circular foi digerido com *MluI* para evitar a amplificação do provírus. Fonte: ETOH *et al.* (1997), Cancer Research.

O DNA duplamente digerido é utilizado como molde para PCR com oligonucleotídeos específicos 5'-TGTCTGGCCCTGCCTGACCCTGCTTGCTCAACTCTACGTCTTTG-3' e 5'-AGTCTGGCCCCTGACCTTTTCAGACTTCTGTTTC-3'. Estes *primers* anelam-se às regiões U5 (posições 556-589) e U3 (posições 8345-8378) da região LTR do DNA proviral, respectivamente. As reações foram amplificadas em termociclador *Eppendorf* com as seguintes condições de temperatura: 92°C por 3 minutos para desnaturação do DNA, 55°C a 59°C (a depender da otimização da reação) por 30 segundos para pareamento dos *primers* e 72°C por 30 segundos para extensão do *primer* pela Taq DNA polimerase durante 40 ciclos. Os produtos de PCR foram analisados em gel de poliacrilamida a 6% e corados com brometo de etídio após eletroforese.

Na presença de bandas únicas (padrão monoclonal), estas foram purificadas com *QIAquick PCR purification kit* (QIAGEN) e sequenciadas. Para as reações que produziram mais de um produto (banda) de PCR, estes foram cortados do gel com auxílio de um estilete descartável para único uso, sendo colocados em tubos *Eppendorf* separados e submetidos à purificação utilizando *Gel Extraction QIAquick PCR purification kit* (QIAGEN) segundo recomendações do fabricante. Os produtos purificados também foram sequenciados.

### 5.5.1 Sequenciamento

Este processo baseou-se no protocolo de terminação de cadeia, também conhecido por método de Sanger (SANGER *et al.*, 1977) e foi realizado na Plataforma de Sequenciamento do CPqGM. A reação para cada amostra sequenciada foi constituída de 0,75 µL de tampão diluente, 1 µL de BigDye Terminator V3.1® (Life Technologies), 0,5 µM de *primer* e 6,25 µL de DNA molde resultante da purificação. As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto, 30 ciclos de 15 segundos a 96°C (desnaturação), 15 segundos a 50°C (hibridização) e 4 minutos a 60°C (polimerização).

Em cada poço contendo produto de sequenciamento foi adicionado 40 µL de isopropanol. Incubou-se por 30 minutos em temperatura ambiente para a precipitação dos produtos de amplificação. Em seguida, centrifugou-se a placa por 45 minutos a 3600 rpm e descartou-se o sobrenadante. Posteriormente, adicionou-se em cada poço 200 µL de etanol a 70% e centrifugou-se a placa por 20 minutos a 3600 rpm. Ao final, o sobrenadante foi descartado e o material precipitado foi desidratado



em temperatura ambiente por 30 minutos. As amostras foram ressuspensas em 10  $\mu$ L de formamida e desnaturadas a 95°C por 5 minutos antes de serem sequenciadas no aparelho ABI Prism 3100 (Applied Biosystems).

As sequencias nucleotídicas obtidas a partir do sequenciamento dos produtos das reações de ILPCR foram analisadas quanto a sua similaridade com sequencias presentes no *GenBank* (bando de dados). Para isto, utilizou-se a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), disponível na rede do Centro Nacional de Biotecnologia e Informação (*National Center for Biotechnology Information* - NCBI, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Assim, foi possível identificar a região genômica onde o DNA proviral estava integrado, bem como o cromossomo em que ocorreu tal integração. Produtos contendo apenas sequências humanas foram considerados como inespecíficos da reação de PCR. Produtos de PCR contendo sequencia unicamente viral também foram desconsiderados, pois estes devem possivelmente ter sido originados por falha técnica da segunda restrição (digestão com *MluI*), a qual torna a molécula circular (resultado da etapa pós-ligação) em linear. A molécula linear, por sua vez, deve possuir sequencia humana flanqueada por sequencias virais em ambas as extremidades. Ao ocorrer a falha da *MluI*, a molécula permanece circular e, no momento da amplificação, os *primers* virais amplificam apenas regiões do vírus que estão flanqueadas por genoma humano, resultando num produto exclusivamente viral.

Deste modo, para que os resultados obtidos após o sequenciamento fossem considerados satisfatórios, as sequencias analisadas deveriam conter obrigatoriamente sequências nucleotídicas humanas e virais, como resultado da técnica de ILPCR, a fim de identificar o sítio de integração do provírus do HTLV-1 no genoma do hospedeiro.

Esta técnica foi aplicada somente para os pacientes com DIH que apresentaram linfócitos atípicos e/ou células em flor em esfregaço do sangue periférico a fim de observar a monoclonalidade dos linfócitos.

## 5.6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os responsáveis legais das crianças e adolescentes consentiram a criopreservação do material biológico dos mesmos e as pesquisas aqui propostas, mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE, Anexo I), aprovado pela CONEP (registro 13097). Também foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CPqGM, FIOCRUZ.

## 5.7 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados de todos pacientes da coorte com DIH e dos portadores assintomáticos incluídos no estudo estão registrados em um banco de dados da ferramenta Microsoft Excel. As sequências foram analisadas utilizando o programa Chromaspro 1.41 (BECKMAN *et al.*, 2008). Adicionalmente, os alinhamentos com sequências contidas em banco de dados foram realizados, como comentado anteriormente, mediante a utilização da ferramenta Blast (*Basic Local Alignment Search Tool*), disponível na rede do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Para a localização cromossômica, utilizou-se outra ferramenta relacionada ao GenBank, o Ensembl Browser ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) que permite a visualização da região interrompida pelo DNA proviral no cromossomo humano. Para esta busca, deve-se primeiramente ter o arquivo da sequência a ser analisada em formato FASTA. Esta sequência é adicionada ao campo correspondente para que seja comparada às sequências similares às sequências de DNA humano e/ou viral do banco de dados. Uma vez encontrada, a sequência é identificada e localizada no cromossomo correspondente.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 PRESENÇA DE LINFÓCITOS ATÍPICOS E/OU CÉLULAS EM FLOR EM PACIENTES COM DIH E PORTADORES ASSINTOMÁTICOS.

Na tabela 3 estão apresentados os dados referentes à presença de linfócitos atípicos e/ou células em flor dos 31 pacientes incluídos no estudo, considerando todas as análises de filme sanguíneo realizadas durante o período de 2006 a 2012. Onze (35,5%) dos 31 pacientes apresentaram linfócitos atípicos no sangue periférico e destes apenas 5 também apresentaram células em flor em pelo menos uma das coletas realizadas ao longo deste período (Figuras 15 e 16).

Para o grupo de portadores assintomáticos ( $n = 11$ ) incluídos no presente estudo, nenhum destes apresentou linfócitos atípicos e/ou células em flor nos filmes de sangue periférico em nenhuma das análises realizadas de 2011 a 2012.

**Tabela 3.** Caracterização da coorte com DIH quanto ao sexo e presença ou ausência de linfócitos atípicos e/ou células em flor no sangue periférico.

Caracterização dos pacientes da coorte com DIH				
Paciente	Sexo	Ano de nascimento	Linfócitos atípicos	Células em flor
1	F	1997	-	-
2	F	1995	-	-
3	F	1998	-	-
4*	F	1988	-	-
5*	M	1997	P	P
6 <sup>‡</sup>	F	1987	-	-
7	F	1990	-	-
8	M	1993	-	-
9	M	1989	-	-
10	M	1991	-	-
11*	F	1989	P	-
12*	F	1988	-	-
13*	F	1993	P	-
14 <sup>‡*</sup>	M	1986	-	-
15*	F	1995	P	-
16*	F	1991	P	P
17	F	1998	P	-
18 <sup>‡*</sup>	M	1994	P	P
19	M	1996	-	-
20	F	1989	-	-
21	F	1993	P	-
22	F	1996	P	P
23	F	2005	-	-
24*	F	1987	-	-
25*	F	2001	-	-
26	M	2001	-	-
27	M	1994	-	-
28	F	1993	-	-
29	M	1988	-	-
30	F	2005	P	P
31	M	1990	P	-
<b>TOTAL</b>			<b>11</b>	<b>5</b>

Legenda: “F”, para sexo feminino; “M”, sexo masculino; “-”, sem linfócitos atípicos ou células em flor no sangue periférico; “P” para presença de linfócitos atípicos ou células em flor em sangue periférico. OBS.: A célula em flor é um tipo de linfócito atípico. <sup>‡</sup>Pacientes que foram a óbito: 6 em 2009 e 14 e 18 em 2008. \*Pacientes de DIH que manifestaram HAM/TSP. Para as coletas realizadas, os dados são demonstrados a seguir nas figuras 15 e 16.

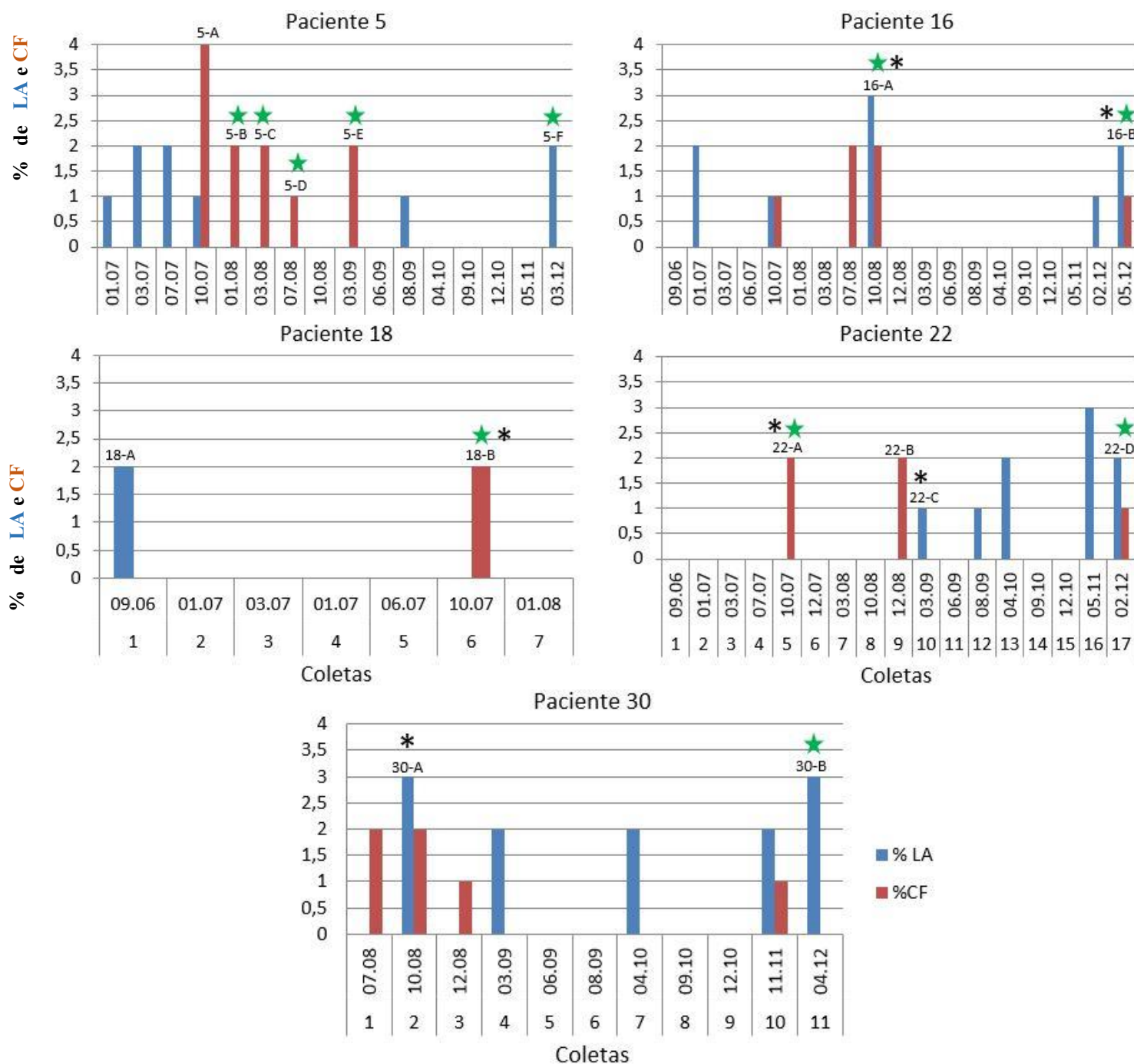
Os gráficos da figura 14 mostram a percentagem de linfócitos atípicos e/ou células em flor, por paciente, observados ao longo de todo o estudo. Já para os gráficos da figura 15, são mostradas apenas as percentagens de linfócitos atípicos. Os valores apresentaram flutuação entre os indivíduos e entre as diferentes coletas realizadas para cada um deles, com variações de 1 a 4% para presença de linfócitos atípicos e/ou células em flor nos seus filmes sanguíneos.

Nesses gráficos estão apresentadas as amostras, identificadas por seus respectivos códigos, que foram submetidas aos testes de TCRG – representadas por uma estrela verde - em cor preta - e/ou aos testes de ILPCR seguido do sequenciamento – representadas pelo símbolo “\*” em cor preta. A amplificação para análise do rearranjo dos genes que codificam para o TCRG foi realizada para todos os 31 pacientes da coorte com DIH em diferentes experimentos, independentemente da presença ou ausência de linfócitos atípicos e/ou células em flor no correspondente filme do sangue periférico. Já para os testes da ILPCR, seguido do sequenciamento, o critério para escolha das amostras foi a presença de linfócitos atípicos e/ou células em flor no sangue periférico. Os resultados de cada técnica serão apresentados e discutidos separadamente a seguir (subitens 6.2 e 6.3).

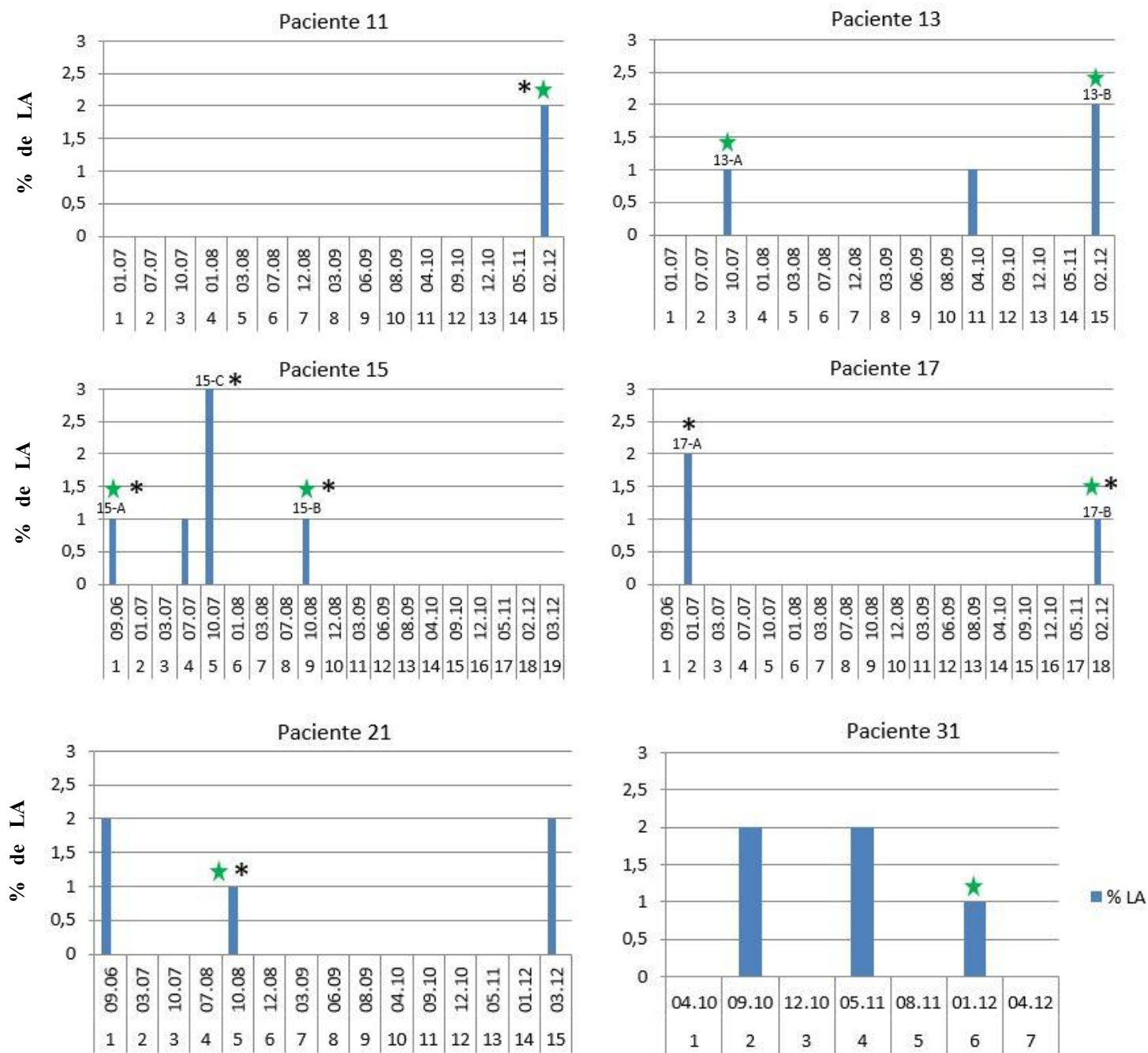
Foi possível a realização de ambos os testes (TCRG e ILPCR) para uma mesma amostra para os seguintes casos: amostras 16-A, 16-B, 18-B e 22-A (Figura 14) e amostras 11, 15-A, 15-B, 17-B e 21 (Figura 15). Analisando cada paciente individualmente, percebe-se que, em alguns casos, algumas amostras não possuem código. Isto se deve ao fato de que esta pode ter sido a única amostra analisada dentro do grupo de todas as amostras do paciente (Ex.: Pacientes 11, 21 e 31, figura 15) ou ao fato de não ter sido analisada em nenhum momento por limitações das amostras.

O principal motivo para a não realização dos testes em algumas amostras foi a quantidade de DNA ou a qualidade do mesmo, quando sua concentração era baixa ou inferior a necessária para realização do teste. Por isso, nem todas as amostras, referentes a todas as coletas realizadas durante o período de acompanhamento para cada paciente, foram submetidas às análises de TCRG e/ou ILPCR e posterior sequenciamento.

A seguir, para cada paciente, foram demonstradas todas as coletas realizadas, sendo cada uma identificada por um número inteiro em ordem crescente, representando a data de cada coleta através do mês e ano (Figuras 15 e 16).



**Figura 14.** Percentagens de linfócitos atípicos (LA) e células em flor (CF) - valores demonstrados à esquerda dos gráficos (abscissa) - observadas no esfregaço do sangue periférico em 5 pacientes da coorte com DIH ao longo de todas as coletas incluídas no estudo. Para as coletas, estão apresentadas as suas respectivas datas, referente ao mês e ano. Os valores da percentagem de LA e CF estão demonstrados à esquerda dos gráficos (abscissa) e foram determinados entre 100 leucócitos contados por análise microscópica em esfregaço do sangue periférico corados com Wright. OBS.: “estrela verde” para as amostras que foram submetidas ao ensaio de TCR-gama e “\*” para amostras que foram submetidas a ILPCR e posterior sequenciamento para análise da integração viral.

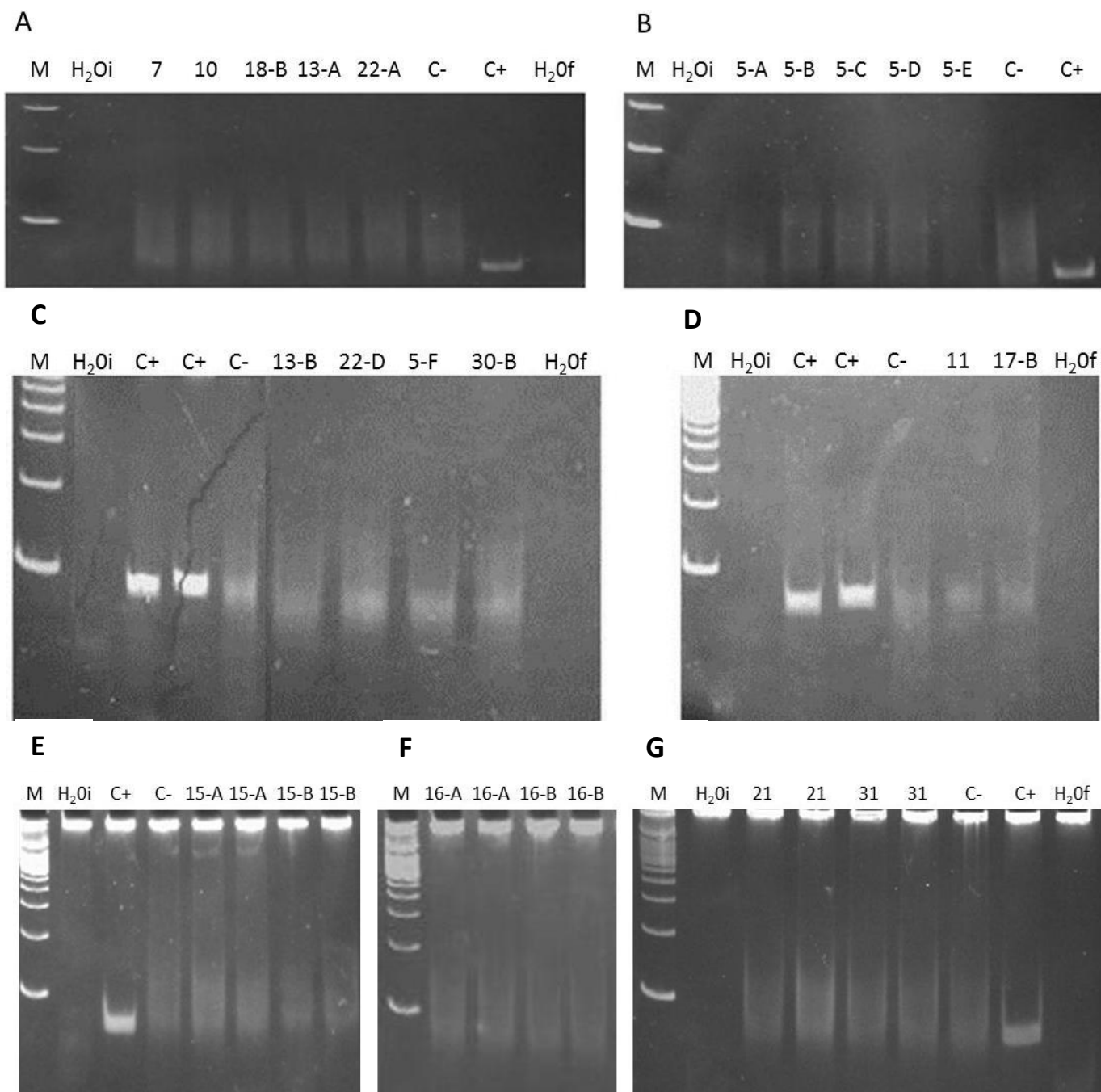


**Figura 15.** Percentagens apenas de linfócitos atípicos (LA) e sua flutuação ao longo de todas as coletas realizadas para 6 pacientes que apresentaram tais células no esfregaço do sangue periférico. Os valores da percentagem de LA estão demonstrados à esquerda dos gráficos (abscissa) e foram determinados entre 100 leucócitos contados por análise microscópica em esfregaço do sangue periférico corados com Wright. OBS.: “estrela verde” para as amostras que foram submetidas ao ensaio de TCR-gama e “\*” para amostras que foram submetidas a ILPCR e posterior sequenciamento para análise da integração viral. OBS.: O código das amostras 15-A, 15-B e 15-C, que estão na sequência 15-A → 15-B → 15-C no gráfico, representam a ordem cronológica das análises e não à ordem cronológica das coletas.

## 6.2 ANÁLISE DA CLONALIDADE DOS LINFÓCITOS T PELO REARRANJO DO TCRG NOS PACIENTES COM DIH.

Como dito anteriormente, a amplificação para análise do rearranjo dos genes que codificam para o TCR foi realizada para todos os 31 pacientes da coorte com DIH em diferentes experimentos, independentemente da presença ou ausência de linfócitos atípicos e/ou células em flor no correspondente filme do sangue periférico. No total, foram analisadas 134 amostras que foram coletadas em diferentes momentos do acompanhamento dos pacientes, mas aqui só serão demonstrados através de figuras alguns desses resultados (Figura 16). Para todas as 134 amostras foi identificado padrão policlonal para o rearranjo dos genes da cadeia gama do TCR (TCRG), indicando proliferação de múltiplas populações de linfócitos T, caracterizado pela presença de múltiplos produtos de PCR (Figura 16). Para esta análise, o padrão de proliferação clonal dos linfócitos T circulantes no sangue periférico desses pacientes não se associou ao aparecimento de células atípicas nas referidas amostras, não sendo detectado, portanto, nenhum clone predominante.





**Figura 16.** Produtos de PCR obtidos na análise do rearranjo da cadeia gama do TCR. Géis de poliacrilamida a 10% representativos. M, marcador (100 pb); linhas H<sub>2</sub>O<sub>i</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>f</sub> correspondem, respectivamente, às águas inicial e final utilizadas na reação a fim de verificar contaminação; C-, controle negativo realizado com DNA extraído de PMBC de indivíduo não portador do HTLV-1 e sadio; C+, controle positivo realizado com DNA procedente de paciente com forma aguda de ATL; A: as linhas 7 e 10 correspondem a pacientes da coorte com DIH que não apresentaram linfócitos atípicos (LA) no sangue periférico; linhas 18-B, 13-A e 22-A correspondem a pacientes que apresentaram LA no sangue periférico. Os pacientes 18 e 22 também apresentaram 2% de células em flor (CF) nesta coleta (Out 2007, vide figura 15). B: as linhas 5-A até 5-E correspondem a diferentes amostras do paciente 5 que apresentaram em todas as coletas de 1 a 4% de CF no sangue periférico (figura 15); C: Produtos de PCR obtidos na análise do rearranjo da

cadeia gama do TCR nas coletas realizadas em 2012; linha 13-B corresponde a paciente que apresentou 2% de linfócitos atípicos (LA) no sangue periférico; linhas 22-D, 5-F e 30-B são pacientes que apresentaram, além dos LA, células em flor. **D**: linhas 11 e 17-B correspondem a pacientes com DIH que apresentaram LA no sangue periférico. **E**: as linhas 15-A e 15-B correspondem às coletas 1 e 9 do paciente 15 (duplicatas), respectivamente, com presença de 1% de LA no sangue periférico (Figura 15). **F**: linhas 16-A (3% LA e 2% CF) e 16-B (2% LA e 1% CF) correspondem às coletas 9 e 18 do paciente 16 (Figura 15). **G**: linhas 21 correspondem à coleta 5 (1% LA, figura 15); linhas 31 correspondem à coleta 6 (1% LA, figura 15).

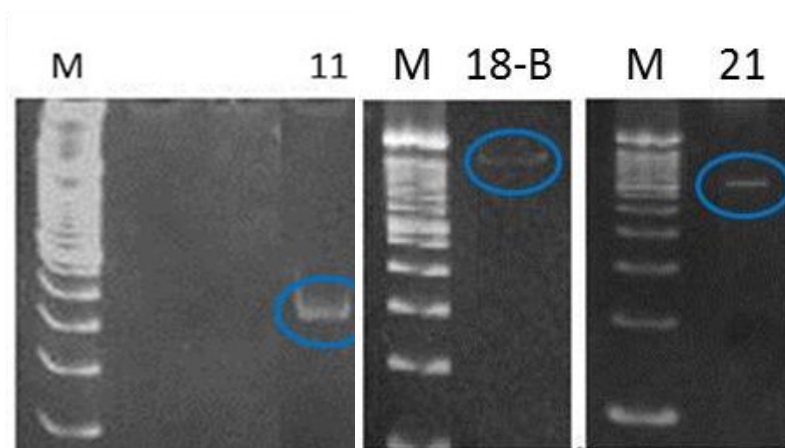
### 6.3 ANÁLISE DA INTEGRAÇÃO PROVIRAL POR PCR INVERTIDA E LONGA (ILPCR) E DOS PRODUTOS OBTIDOS NO SEQUENCIAMENTO PARA OS PACIENTES COM DIH NA PRESENÇA DE LINFÓCITOS ATÍPICOS E/OU CÉLULAS EM FLOR PRESENTES NO SANGUE PERIFÉRICO ATRAVÉS DA FERRAMENTA BLAST

Para a avaliação da integração proviral por ILPCR foram incluídos apenas os 11 pacientes da coorte que apresentaram linfócitos atípicos e/ou células em flor no sangue periférico. Para estes pacientes as amostras incluídas estão identificadas nos gráficos das figuras 15 e 16, demonstradas por uma estrela verde. A escolha destas amostras se deu de acordo com a disponibilidade de DNA na presença de linfócitos atípicos e/ou células em flor no sangue periférico. Após a realização das etapas de análise do perfil de clivagem por enzima de restrição, como descrito anteriormente na metodologia, todas as amostras incluídas dos 11 pacientes mostraram amplificação por PCR e serão apresentadas através de figuras a seguir.

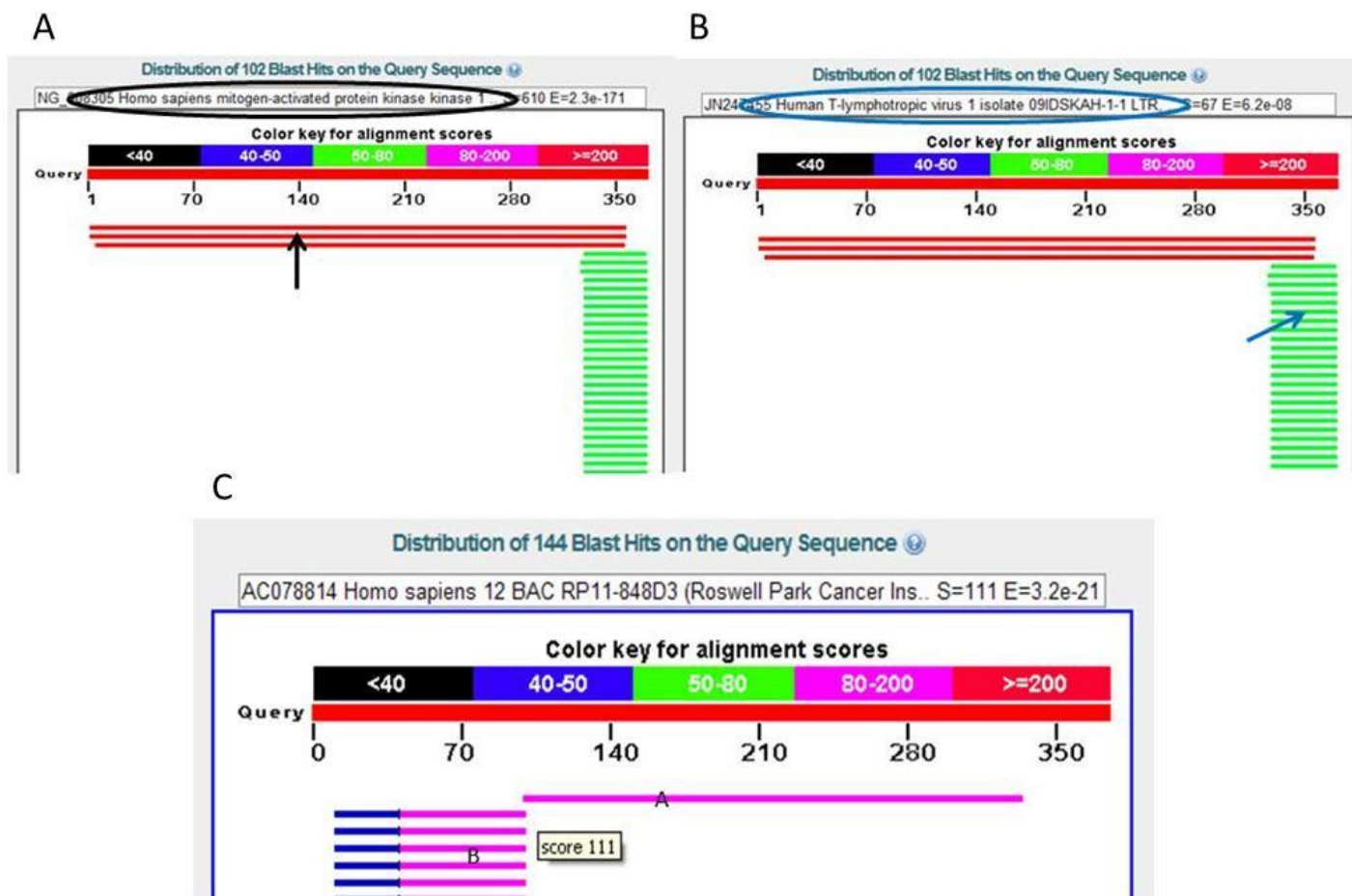
Os produtos de PCR obtidos foram purificados e sequenciados para comprovação de conteúdo de DNA humano e viral a fim de comprovar a integração proviral no genoma do hospedeiro. Para as amostras que obtiveram mais de um produto de amplificação na mesma reação de PCR, as bandas foram individualmente cortadas do gel e submetidas à purificação. Para as amostras de cada paciente incluídas neste estudo (vide figuras 14 e 15), esses procedimentos foram repetidos e, em alguns casos, mais de um produto de PCR foi obtido, totalizando 50 produtos de PCR sequenciados. Nas figuras 18, 21, 23 e 24 estão circuladas em azul as bandas que tiveram integração proviral confirmada por sequências humana e viral em sua composição, e em vermelho, as que possuíam apenas sequência humana ou apenas sequência viral, não sendo confirmada integração proviral para as referidas amostras. As demais amostras circuladas em amarelo foram sequenciadas, mas a qualidade da sequência não permitiu análise pelo BLAST. A seguir, estão demonstrados para cada paciente os resultados de ILPCR e, para alguns pacientes, o alinhamento

da sequência analisada utilizando a ferramenta BLAST para a identificação de sequências humanas e virais, além da localização cromossômica.

Nos pacientes 11, 18 e 21 foi analisada somente uma amostra para cada um deles representada pelos seguintes códigos: 11, 18-B e 21, respectivamente (Figura 17). Para estas amostras foi observado um único produto de PCR e em todos os casos foi observada a presença de sequências de DNA humano e viral através da análise do alinhamento das sequências pelo BLAST (Figura 18).



**Figura 17.** Produtos de PCR obtidos por PCR invertida para os pacientes 11, 18 e 21. Estes foram visualizados em gel de acrilamida a 6% e purificados. Os produtos obtidos correspondentes às bandas circulas em azul apresentaram integração proviral confirmada por sequências humana e viral em sua composição. M, marcador molecular (100 pb); 11, 18-B e 21 com um único produto de PCR.

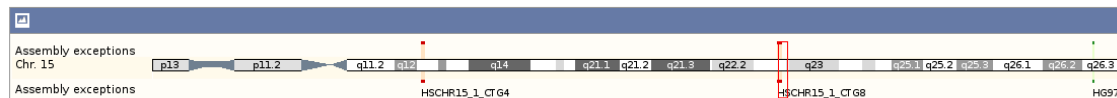


**Figura 18.** Alinhamento das seqüências realizado através da ferramenta BLAST para o paciente 11 e 21. A. Identificação da seqüência humana (seta preta) contida no produto de PCR para o paciente 11. B. Identificação da seqüência proviral (seta azul) contida no produto de PCR para o paciente 11. C. Identificação da seqüência humana contida no produto de PCR para o paciente 21. Observam-se as seqüências gênicas humana (A) e da região LTR do HTLV-1 (B). Obs. O alinhamento para o paciente 18 não está demonstrado aqui, porém a integração proviral foi comprovada.

A análise das sequências mostrou que os cromossomos onde o DNA proviral foi integrado foram: cromossomo 1 para o paciente 18, cromossomo 12 para o paciente 21 e cromossomo 15 para o paciente 11 (Figura 19).

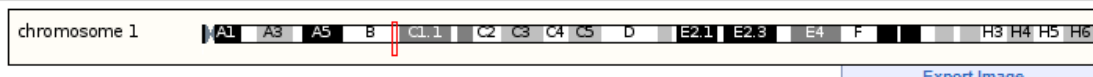
### Paciente 11

Chromosome 15: 66,588,586-66,751,757



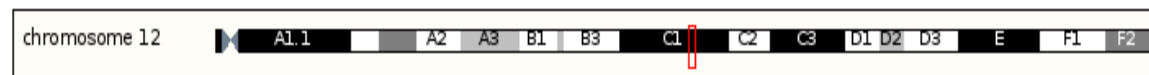
### Paciente 18

Chromosome 1: 41,699,949-42,699,948



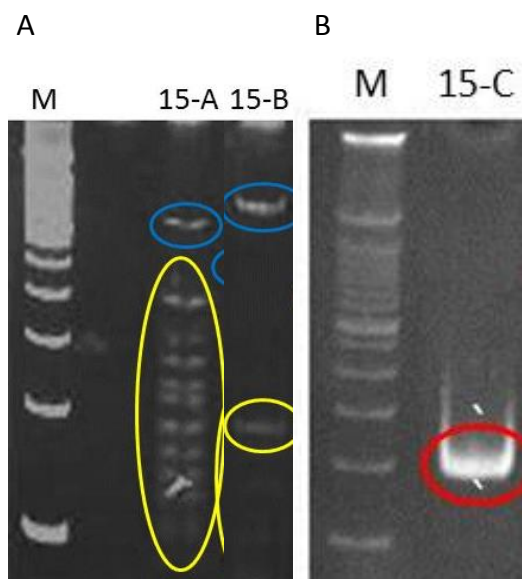
### Paciente 21

Chromosome 12: 61,579,861-61,769,330



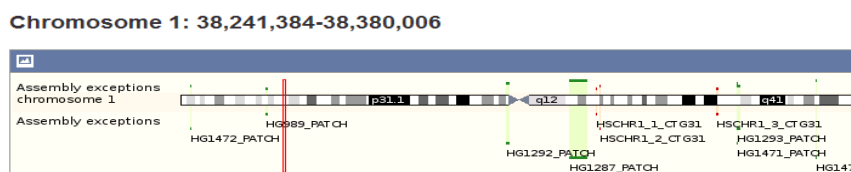
**Figura 19.** Localização do sítio de integração do DNA proviral (caixa retangular vermelha) nos respectivos cromossomos dos pacientes 11, 18 e 21, avaliados com padrão monoclonal.

Para o paciente 15, foram analisadas três amostras: 15-A, 15-B e 15-C (verificar que no gráfico, as amostras encontram-se em ordem de coleta, mas seus códigos se referem a ordem cronológica das análises, figura 15). Ocorreu amplificação de mais de cinco produtos de PCR para a amostra 15-A, dois produtos para a amostra 15-B e um único produto para a amostra 15-C (Figuras 21A e B).



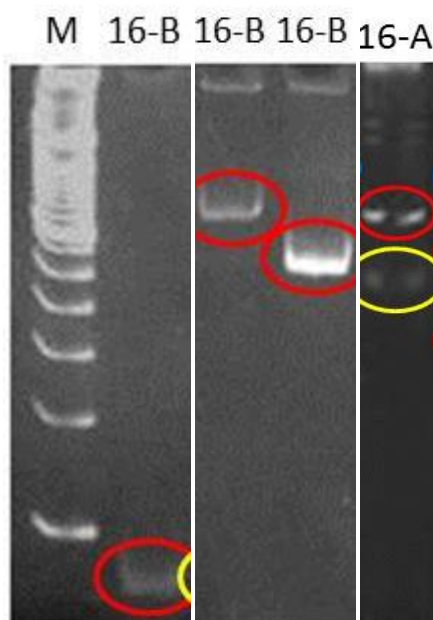
**Figura 20.** A, marcador molecular (100 pb); amostras de coletas do paciente 15: 15-A e B produziram múltiplas bandas. B: M, marcador molecular (100 pb); amostra 15-C teve um único produto de PCR. OBS.: O paciente 15 apresentou linfócitos atípicos não caracterizados como células em flor (figura 15).

O produto circulado em azul para a amostra 15-A, mais os dois produtos circutados em azul e amarelo para a amostra 15-B e o único produto circulado em vermelho para a amostra 15-C foram sequenciados. Porém, através da análise pelo BLAST, observou-se integração proviral apenas nos produtos circutados em azul para as amostras 15-A e 15-B, através da presença de sequencias humana e viral em sua composição. Para ambas as amostras ocorreram 1% de LA no sangue periférico (Figura 15). O sequenciamento do único produto da amostra 15-C (circulado em vermelho) não constatou integração proviral por apresentar apenas sequencia humana em sua composição. A localização cromossômica para as amostras 15-A e 15-B ocorreu no mesmo cromossomo 1 (Figura 21), porém os sítios de integração foram diferentes, mostrando que não correspondem ao mesmo clone proviral.



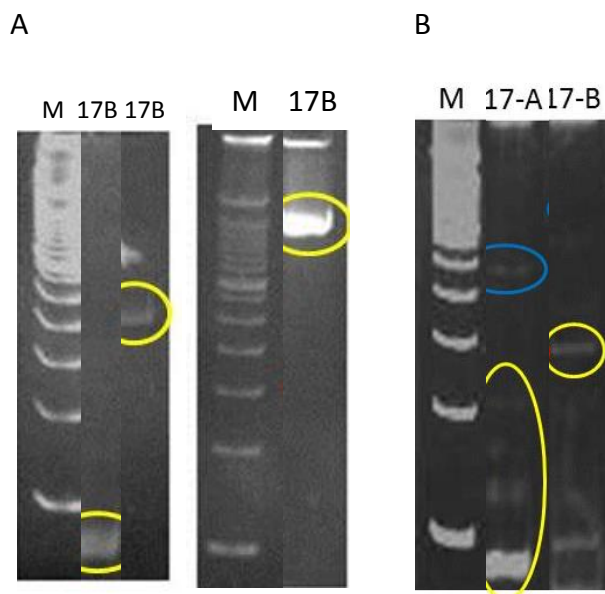
**Figura 21.** Localização cromossômica para a amostra 15-A. Ocorreu integração do provirus no cromossomo 1 do paciente.

Para o paciente 16 foram analisadas duas amostras: 16-A e 16-B (ver gráfico da figura 14). Para a amostra 16-A foram amplificados dois produtos de PCR e para a amostra 16-B ocorreu amplificação de três produtos. Esses 5 produtos de PCR foram sequenciados, mas apenas quatro tiveram qualidade para análise pelo BLAST, sendo um para a amostra 16-A (banda circulada em vermelho) e três para a amostra 16-B (bandas circuladas em vermelho, figura 22). Contudo, os alinhamentos feitos no BLAST mostraram exclusivamente sequencias virais em sua composição, não sendo constatada integração proviral neste paciente.



**Figura 22.** Produtos de PCR purificados em gel de poliacrilamida a 6% para duas amostras do paciente 16: 16-A e 16-B. As bandas circuladas em vermelho apenas mostraram sequencias virais, não constatando integração proviral em cromossomo humano.

No paciente 17 foram analisadas duas amostras: 17-A e 17-B (ver gráfico na figura 15). Para a amostra 17-A ocorreu amplificação de cinco produtos de PCR (1 produto circulado em azul e 4, em amarelo, Figura 23B) e para a amostra 17-B foram amplificados quatro produtos (circulados em amarelo, Figura 23). Todos os produtos de ambas as amostras foram sequenciados, mas apenas um deles, da amostra 17-A (banda circulado em azul), mostrou sequencias do DNA humano e viral, constatando integração proviral do HTLV-1 no cromossomo 20 deste paciente. Os demais 4 produtos da amostra 17-A, em amarelo, não tiveram qualidade satisfatória para o sequenciamento.



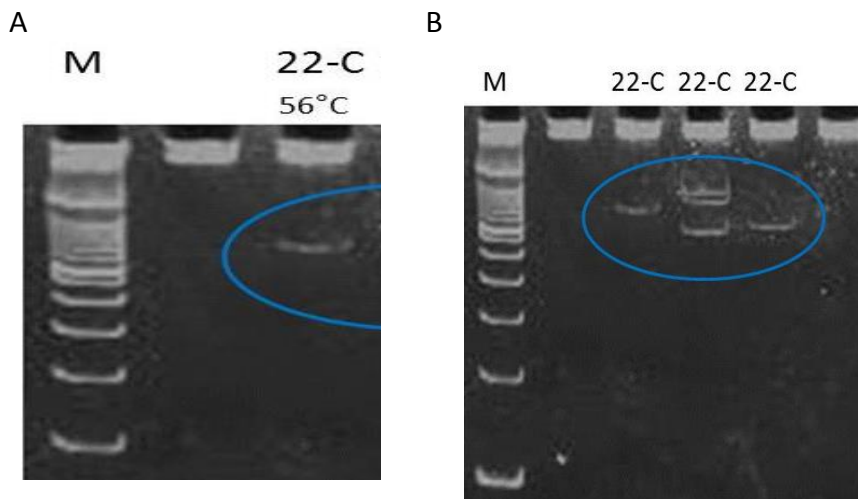
**Figura 23.** Produtos purificados de PCR em gel de poliacrilamida a 6% para o paciente 17 para as amostras 17-A e 17-B. M, Marcador molecular (100pb). **A.** Produtos de PCR para a amostra 17-B. **B.** Produtos de PCR para as amostras 17-A e 17-B. O produto circulado em azul apresentou sequencias humana e viral, mostrando integração do provirus no cromossomo 20 deste paciente.

Os produtos sequenciados da amostra 17-B não tiveram similaridade significativa encontrada em nenhuma das sequencias obtidas para comparação com os clones do BLAST. Portanto, os resultados do sequenciamento não foram satisfatórios, o que impediu concluir a análise desta coleta. Deste modo, não foi possível realizar o alinhamento para identificar a integração proviral para esta amostra.

Para o paciente 22, quatro amostras foram analisadas: 22-A, 22-B, 22-C e 22-D (a amostra 22-B e 22-D não demonstraram amplificação para ILPCR, sendo que para a amostra 22-D só houve amplificação no teste do TCRG como demonstrado anteriormente na figura 16, ver também gráfico na figura 14). Na amostra 22-A ocorreu amplificação de um único produto de PCR (Figura 24A) e o sequenciamento mostrou sequencias humana e viral, evidenciando integração proviral no cromossomo 3. Para a amostra 22-C, cinco produtos foram amplificados (Figura 24B). Todos estes produtos foram sequenciados e também demonstraram integração proviral pela observação de sequencias humana e viral através da análise das sequencias pela ferramenta BLAST. Contudo, para estes cinco produtos da amostra 22-C, a integração proviral ocorreu em três cromossomos: 1, 8 e 19 (o cromossomo 1 foi identificado para os dois produtos de maior tamanho da amostra 22-C, porem os sítios de integração foram em locais diferentes). Estes dados sugerem que diferentes



clones foram responsáveis pela proliferação/expansão clonal do vírus no sangue periférico desse paciente e por isso não foi constatada a monoclonalidade dos linfócitos T circulantes ou a presença de um clone majoritário dentro da amostra analisada.



**Figura 24.** Gel de poliacrilamida a 6% de produtos de PCR purificados para amostras do paciente 22: 22-A e 22-C. M, Marcador molecular (100 pb) **A.** Único produto de PCR da amostra 22-A com sequências humana e viral, que mostrou integração do provírus no cromossomo 3. **B.** Cinco produtos de PCR da amostra 22-C com sequências humanas e virais, mostrando integração do provírus em três cromossomos diferentes.

E por fim, para o paciente 30 ocorreram três produtos de PCR para apenas uma amostra analisada: 30-A (Figura 25). Os três produtos foram submetidos ao sequenciamento, mas apenas um demonstrou sequências humana e viral (banda circulada em azul), comprovando integração proviral no cromossomo 10 deste paciente. Nos outros dois produtos analisados (circulados em vermelho) foram observadas apenas sequências humanas.



**Figura 25.** Gel de poliacrilamida a 6% para 3 produtos de PCR purificados do paciente 30 para sua única amostra analisada, 30-A. M, Marcador molecular (100 pb). Em azul, produto mostrou sequencias humana e viral no sequenciamento. Os demais, em vermelho, possuíram apenas sequencias humanas.

Os produtos de ILPCR para os pacientes 5, 13 e 31, que não foram demonstrados aqui através de figuras, tiveram rendimento abaixo de 5 ng/uL na sua quantificação, o que prejudicou a análise do resultado do sequenciamento. Sendo assim, consideramos os resultados do sequenciamento não satisfatórios, o que impossibilitou concluir acerca da integração proviral para as amostras analisadas desses pacientes.

Em resumo, foi possível avaliar a presença de sequencias humanas e/ou virais nos produtos da ILPCR em 8 dos 11 pacientes incluídos neste análise. Dos 8, em 7 pacientes foram detectadas sequencias do DNA humano e viral na mesma sequência analisada. No outro paciente somente foram detectadas sequencias do HTLV-1.

Nestes 7 pacientes (11, 15, 17, 18, 21, 22 e 30), através da análise de pelo menos um dos produtos de PCR obtidos, com o auxílio da ferramenta BLAST ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), observou-se que para as sequencias detectadas corresponderam à integração proviral e não à amplificação inespecífica.

Destas 7 amostras, para os pacientes 11, 15, 17, 18, 21 e 30 observou-se a identificação de um único clone predominante nos produtos de PCR em pelo menos uma das coletas avaliadas. Para o paciente 15, o clone detectado em cada uma das duas amostras avaliadas não foi o mesmo.

Nesses casos, o DNA proviral não interrompeu regiões codificadoras para genes humanos. Sabe-se por enquanto que, para o paciente 11 (cromossomo 15), o provírus se integrou na região do gene da MAP2K1 (proteína quinase 1 ativadora de mitose).

A seguir, a tabela 4 resume os resultados para a ILPCR e o sequenciamento com BLAST dos pacientes da coorte com DIH que foram submetidos a estas análises.

**Tabela 4.** Resumo para os resultados das técnicas de ILPCR e do sequenciamento com BLAST para os pacientes com DIH que apresentaram linfócitos atípicos e/ou células em flor nas PBMCs.

Grupo	Paciente	Código/ Amostra	% LA/CF	Nº de produtos sequenciados	Nº produtos com sequencias H+V	Integração proviral	Cromossomo	Nº de clones majoritários na amostra
LA	11	11	2/0	1	1	SIM	15	1
		15-A	1/0	+ de 5	1	SIM	1	+ de 1
	15	15-B	1/0	2	1	SIM	1	
		15-C	3/0	1	0	NÃO	-	-
		17-A	2/0	5	1	SIM	20	1
		17-B	1/0	4	*	NÃO	-	-
	21	21	1/0	1	1	SIM	12	1
CF	16	16-A	3/2	1	0	NÃO	-	-
		16-B	2/1	3	0	NÃO	-	-
	18	18-B	0/2	1	1	SIM	1	1
		22-A	0/2	1	1	SIM	3	1
	22	22-B	0/2	0	0	NÃO	-	-
		22-C	1/0	5	3	SIM	1, 8, e 19	+ de 1
		22-D	2/1	0	0	NÃO	-	-
	30	30-A	3/2	3	1	SIM	10	1

Obs.: LA, linfócitos atípicos; CF, células em flor; H + V, sequencia humana e viral; H, apenas sequencia humana; V, apenas sequencia viral; “\*”, sequencias sem similaridade no BLAST; “-”, sem dados.

## 7. DISCUSSÃO

Na literatura, existem sete relatos de evolução de DIH para ATL (HANCHARD *et al.*, 1991; TSUKASAKI *et al.*, 1994; MAHE *et al.*, 2004; BITTENCOURT & FARRÉ, 2008) e alguns podem ser destacados a seguir: três casos referidos como provável DIH, no Japão, evoluíram após vários anos para ATL (TSUKASAKI *et al.*, 1994); Mahé *et al.* relataram um caso de DIH em que o paciente, aos 17 anos, apresentou quadro de ATL de forma crônica, falecendo devido a infecções bacterianas múltiplas (MAHE *et al.*, 2004); em 2008, foi descrito um caso de DIH na Bahia que evoluiu para HAM/TSP e forma indolente de ATL, na qual se comprovou integração proviral do HTLV-1 em biopsia de pele (FARRÉ *et al.*, 2008). O estudo do padrão de expansão clonal é de grande importância para detectar casos pré-ATL nos portadores assintomáticos e casos de evolução de DIH para ATL. Por isso, a identificação precoce de clonalidade de células T no sangue periférico dos portadores assintomáticos com linfócitos atípicos no sangue é um alerta adicional para detectar precocemente o surgimento de ATL nesses casos (SALES *et al.*, 2005).

Entre o final de 2006 até 2012, investigou-se a presença de células atípicas em filmes de sangue periférico em pacientes da nossa coorte a fim de compreender a possível evolução de DIH para ATL. Em 11 pacientes com DIH, células atípicas foram observadas, ocorrendo em mais de uma coleta. Porém, suas percentagens eram flutuantes e, em nenhum caso, as percentagens foram crescentes. É importante destacar que nenhum deles teve diagnóstico de ATL nem apresentou alguma lesão cutânea suspeita de linfoma. Frisando também que as percentagens destas células com atipias se mantiveram baixas (0-4%), quando se considera como critério diagnóstico para a ATL um mínimo de 5% dessas células no sangue periférico (somente em um paciente, e para uma coleta, chegaram a 4%).

Uma vez que a ATL se desenvolve durante um longo período de tempo entre a aquisição do vírus, que geralmente ocorre durante a amamentação (GALLO *et al.*, 1994) e seu diagnóstico, que geralmente ocorre na quinta década da vida, a pesquisa sobre a importância da presença destas células na evolução de DIH para ATL requer um período mais longo de acompanhamento dos pacientes. Também não podemos descartar que, nos pacientes com DIH (que pertencem à faixa infanto-juvenil), existam um clone ou clones celulares infectados e majoritários, porém que cresçam lentamente e que apresentem as atipias. Estes clones não parecem ter grande capacidade proliferativa porque senão observaríamos aumento progressivo em quantidade de células durante

as análises realizadas no período do estudo.

De qualquer modo, uma vez que a literatura considera pré-ATL aqueles portadores assintomáticos que apresentam células em flor no sangue periférico (YAMAGUCHI *et al.*, 1988), os pacientes de DIH com tais células no sangue periférico também poderiam ser considerados como casos de pré-ATL que precisam de uma maior atenção clínica. A observação da flutuação nas percentagens de células atípicas ainda não é compreendida quanto a sua causa e desenvolvimento nesses pacientes. Ela pode estar relacionada com múltiplos fatores, entre eles a pressão exercida pelo sistema imune sobre um mesmo clone, que controle a sua população ou que possa levar ao desaparecimento de clones presentes e aparecimento de novos clones (SAITO; MINEKI *et al.*, 2012), ou até relacionada com a sensibilidade do método de detecção nos filmes sanguíneos, dada a pequena percentagem em que estas células foram observadas.

Existem relatos isolados de linfócitos atípicos em pacientes com DIH e dermatite atópica (LA GRENADE *et al.*, 1998; MALONEY & WEINBERG, 2004). Linfócitos atípicos, não identificados como células em “flor” e não caracterizados morfológicamente foram detectados em 10/45 (22,2%) pacientes com DIH e em 5/35 (14,3%) pacientes com dermatite atópica (LA GRENADE *et al.*, 1998). Em outro estudo realizado com 28 crianças HTLV-1 positivas, sete dessas desenvolveram dermatite seborréica e quatro apresentaram anemia. Nessas crianças, a carga proviral foi mais elevada do que nas crianças HTLV-1 positivas sem essas patologias. Quatro dessas crianças apresentaram linfócitos atípicos no sangue periférico (acima de 3,0%), mas a carga proviral foi semelhante à das crianças sem linfócitos atípicos. Esses linfócitos não foram caracterizados como células em “flor” (MALONEY & WEINBERG, 2004).

A presença de células em flor em crianças e adolescentes com DIH, doença com elevada carga proviral, pode ser considerada como indicativo de maior risco para o desenvolvimento de ATL comparado a ocorrência dessas células em portadores adultos assintomáticos (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Por outro lado, nos casos incluídos no presente estudo, o período de infecção é curto, incluindo criança com 7 anos de idade. De acordo com Shimoyama *et al.* (1991), casos com 5% ou mais de linfócitos atípicos no sangue periférico do indivíduo portador do HTLV-1, mesmo que não apresente manifestação clínica da doença, deve ser considerado como paciente de ATL *smoldering* (SM). Contudo, no presente estudo observamos até 4% de linfócitos atípicos detectados em apenas uma ocasião ou coleta, sendo um evento pontual e, portanto, não considerando estes pacientes como ATL forma SM.

Dados de estudos paralelos realizados com estes pacientes mostram que no período do presente estudo os pacientes com linfócitos atípicos e/ou células em flor não apresentaram linfocitose elevada. A linfocitose de mais de 5.000 linfócitos/l<sup>3</sup> é característica das formas mais graves da ATL que apresentam altas percentagens de linfócitos atípicos e células em flor (BITTENCOURT *et al.*, 2007). Uma vez que estas células atípicas foram reportadas em uma percentagem de portadores adultos do HTLV-1 (SHIMOYAMA, 1991) incluímos um grupo de portadores assintomáticos na faixa infanto-juvenil. Não detectamos estas células em nenhum assintomático. Porém, o número amostral foi menor que no grupo com DIH e precisaria ser aumentado para poder avaliar a relação da presença destas células atípicas nesta faixa etária com o grupo de pacientes. Ainda que o acompanhamento do grupo dos portadores assintomáticos tenha sido menor, este grupo apresenta uma mediana de idade similar à coorte com DIH e, portanto, a probabilidade do aparecimento destas células atípicas poderia ser a mesma que no grupo dos pacientes com DIH, uma vez que se trata de um fenômeno independente da manifestação de DIH e relacionado com o tempo de infecção. A distribuição por sexo é diferente entre o grupo com DIH e dos portadores assintomáticos, pois como previamente reportado, a frequência da DIH é maior no sexo feminino (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Este fato precisa ser observado no momento de estabelecer o grupo controle de portadores assintomáticos para descartar viés por fatores hormonais (GABET *et al.*, 2000).

O fato de, nos pacientes com ATL, existir um clone de linfócitos T infectado majoritário e que isto leve a observação de um padrão monoclonal quando é analisado o rearranjo dos genes da cadeia gama do TCR no DNA extraído do PBMC, avaliamos se este padrão já era observado em pacientes com DIH que apresentaram linfócitos atípicos no sangue periférico. Analisando os resultados do TCRG, pudemos observar que os padrões obtidos foram policlonais mesmo para aqueles pacientes que apresentaram atipias nos filmes sanguíneos. Então, se existe um clone que começa a apresentar maior população nestes pacientes com presença de linfócitos atípicos ou células em flor, esta população deve ser ainda muito pequena para ser detectada por esta técnica.

É importante ressaltar que para a análise do rearranjo dos genes da cadeia gama do TCR (TCRG) avaliam-se todos os linfócitos da amostra, independentemente se estes estejam ou não infectados. Isto dilui os clones de linfócitos infectados entre todos os linfócitos presentes na amostra, podendo dificultar essa detecção para possíveis populações majoritárias, porém pequenas. Deste modo, os dados obtidos pela técnica de avaliação de rearranjos do TCRG não permite

relacionar os resultados obtidos à presença de células em flor e linfócitos atípicos em sangue periférico em pacientes com DIH que possuam a presença de um clone majoritário infectado. A experiência do nosso grupo na avaliação destes rearranjos na ATL valida esta técnica para detecção de clones majoritários no sangue periférico em pacientes até com a forma *smoldering* da ATL, que não apresentam linfocitose e onde raramente se observam células em flor e linfócitos atípicos no sangue periférico. Deste modo, os resultados aqui mostrados sugerem que com esta técnica não podemos afirmar a presença de clones majoritários relacionados com a presença de células atípicas no sangue periférico, sendo necessária a aplicação de técnicas mais sensíveis para aprofundar o estudo.

Visando utilizar uma estratégia que avaliasse unicamente as células infectadas na amostra composta pelas PBMCs, os pacientes com linfócitos atípicos e/ou células em flor foram submetidos a análise da integração proviral por PCR invertido (ILPCR). A outra técnica disponível, *Southern Blot* (SB), apesar de também detectar células infectadas através da hibridização por sonda contendo a sequência viral, requer maior quantidade de DNA nas amostras para que a análise seja satisfatória, o que limita o seu poder de detecção. Além disso, esta técnica não permite a identificação do local onde ocorreu a integração proviral, não permitindo avaliar o possível impacto das sequências humanas interrompidas na transformação da célula infectada. O SB, embora capaz de detectar populações clonais de células T em diversos tipos de linfoma, também apresenta baixa sensibilidade, requer longo período para a execução, exige grandes quantidade de DNA de alta qualidade e a utilização de sondas radioativas, dificultando sua utilização como ferramenta de diagnóstico (DISS *et al.*, 1995; ASSAF *et al.*, 2000; SALES *et al.*, 2005). Por tais motivos, a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi e tem sido aplicada para este fim.

Submetemos, por isso, os 11 pacientes que apresentaram atipias em seus filmes sanguíneos a investigação da integração proviral pela técnica de ILPCR. Observou-se padrão monoclonal em 7 deles após a comprovação por sequenciamento da presença de sequências humanas e virais no produto analisado em pelo menos uma das amostras avaliadas por paciente. Para o paciente 15 foram analisadas duas amostras e o clone detectado em cada uma das duas amostras avaliadas não foi o mesmo. Localizamos, também no cromossomo, o local onde a integração do provirus aconteceu. Porém, a investigação dos impactos desta integração nas sequências humanas onde o provirus foi inserido encontra-se em andamento.

Os indivíduos soropositivos para o HTLV-1 assintomáticos que apresentam integração monoclonal do DNA proviral nos linfócitos do sangue periférico são considerados como casos de pré-ATL (TSUKASAKI *et al.*, 1999) e essa condição ocorre em cerca de 1,7% - 2% dos portadores (IMAIZUMI *et al.*, 2005). Sendo assim, em nosso estudo, consideramos os 7 (22,6%) pacientes com DIH que apresentaram integração monoclonal do DNA proviral em linfócitos do sangue periférico como casos de pré-ATL.

Através da análise da localização cromossômica, observou-se que não houve um padrão comum de integração do DNA proviral e este não interrompeu regiões codificadoras para genes humanos na maioria dos pacientes, embora todos os pacientes tenham manifestado a DIH e ainda apresentaram linfócitos atípicos e/ou células em flor no sangue periférico. Curiosamente, para 3 pacientes ocorreu integração no cromossomo 1, mas em regiões distintas (Tabela 4). Apenas para um paciente (paciente 11), o provírus se integrou na região do gene da MAP2K1 (proteína quinase 1 ativadora de mitose). Este gene está localizado no cromossomo 15 do ser humano e dá origem à proteína das famílias quinase que atuam como ativadoras da mitose. A quinase é uma proteína reguladora de sinais extracelulares e age como ponto integrante para múltiplos sinais bioquímicos para desencadear a cascata de quinases também no interior da célula. É componente essencial para a transdução de sinal, estando envolvida em diversos processos celulares como proliferação, diferenciação, regulação e desenvolvimento da transcrição (CHOI *et al.*, 2012). Este gene desempenha papel crucial na divisão celular, o que contribui para a proliferação e aumento da população de células.

Com a avaliação de várias amostras para um mesmo paciente, pretendíamos estudar se na presença de um clone majoritário, este se mantinha no tempo. Nas amostras disponíveis isto não foi possível ser observado ora por falta de material ou bom resultado da técnica nas diferentes amostras para um mesmo paciente. As dificuldades técnicas com a realização desta metodologia ocorreram principalmente na etapa de sequenciamento, o que dificultou obter melhores resultados para alguns pacientes e a comparação de várias amostras para outros, que permitisse o acompanhamento dos clones.

A técnica de ILPCR apresenta algumas limitações, pois se trata de uma técnica puramente qualitativa, que requer DNA em concentrações adequadas para conclusão da análise e os produtos obtidos são difíceis de sequenciar por conta do rendimento da reação anterior. Esta dificuldade se deve ao fato de que partimos de um fragmento de DNA que passou por duas reações de restrição,



limitando suas quantidade e qualidade para submetê-lo à PCR e finalmente à reação de sequenciamento.

A avaliação desses clones é importante para o acompanhamento junto às manifestações clínicas e hematológicas de cada paciente.

Nos pacientes em que se observou padrão monoclonal pela técnica de ILPCR, diferentemente observou-se padrão policlonal na análise do rearranjo do TCRG. Esta diferença pode estar relacionada com o fato de que a técnica de análise do rearranjo avalia a clonalidade de todos os linfócitos presentes na amostra. Já a técnica de ILPCR avalia unicamente os linfócitos infectados pelo HTLV-1.

A detecção de padrões de integração monoclonais em pacientes com DIH não foi ainda reportado na literatura, sendo este achado inédito. É, portanto, um resultado relevante deste trabalho a observação de clones majoritários em portadores da faixa infanto-juvenil que apresentam menor tempo de convivência com o HTLV-1 que os pacientes com ATL. Porém, o impacto na evolução da DIH na presença de clones majoritários, ainda que pequenos, necessita de aprofundamento em estudo. Não se deve negligenciar a presença de células em "flor" e de integração proviral do HTLV-1 já na infância e adolescência em pacientes com DIH, e que juntamente com elevada carga proviral, poderiam indicar maior risco para o desenvolvimento de ATL. Sendo assim, sugere-se que estudos com acompanhamento mais longo da coorte são necessários para poder estabelecer este risco.

Por outro lado, não temos como relacionar estes dois fenômenos, pois pela limitação destas técnicas não temos como afirmar que o clone majoritário observado na técnica de ILPCR corresponde às células em flor ou linfócitos atípicos observados no filme sanguíneo. A técnica da ILPCR é qualitativa e não quantitativa, e esta é outra das limitações do estudo.

Utilizando um sequenciamento de alto rendimento para mapear e quantificar os sítios de inserção do provírus, Bagham e colaboradores (2014), assim como Gillet (2013) conseguiram identificar a clonalidade da população de células T infectadas pelo HTLV-1 em pacientes com estromboloidíase e DIH, através da contagem dos diferentes clones e a abundância de cada um deles. Constatou-se que há forte seleção para a proliferação de clones majoritários e abundantes, que provavelmente sejam os principais responsáveis pelo desenvolvimento de doenças associadas ao vírus (BANGHAM; COOK; MELAMED, 2014); (GILLET *et al.*, 2013). Futuramente, pensamos na possibilidade de submeter nossas amostras a esta técnica para avaliar quais clones

estão em proliferação e abundância, acompanhando as manifestações clínicas e evolução desses pacientes para a ATL.

Para complementar este estudo, sugere-se incluir na avaliação de clonalidade por ILPCR um grupo de pacientes com DIH sem células atípicas no sangue periférico como grupo controle, pois, como comentado, para pacientes com forma *smoldering* da ATL é possível a observação de clones majoritários em portadores que não apresentam atipias no sangue periférico. É importante destacar que a detecção de um padrão monoclonal não significa a presença de um clone único.

Linfócitos atípicos no sangue periférico foram vistos em cerca de 1/3 dos 215 portadores japoneses no estudo de coorte Myazaki. A média de idade desses pacientes foi de 62,5 anos. Nesse estudo houve uma correlação positiva entre elevada carga proviral e a presença de células atípicas Miyazaki (HISADA *et al.*, 1998), o mesmo tendo sido observado posteriormente por Kamihira (KAMIHIRA *et al.*, 2003).

É importante comentar que as causas de morte dos três óbitos ocorridos nos pacientes incluídos neste estudo, um dos quais foi submetido à autópsia, não apresentou alguma relação com leucemia/linfoma.

As observações do presente trabalho também reforçam a discussão de que, segundo Bittencourt *et al.*, (2006) é aconselhável que se faça sorologia para o HTLV-1 em todos os casos de eczema severo em crianças e adolescentes em uma área endêmica para HTLV-1. A manifestação de ATL não se restringe somente à faixa adulta Também em crianças portadoras do HTLV-1 podem ser detectados fenômenos característicos desta grave neoplasia. Deste modo, os casos de DIH devem ser acompanhados com exames dermatológicos, neurológicos e moleculares periodicamente.

Embora a carga proviral não seja o foco principal do nosso estudo, é importante ressaltar que pode existir correlação ou influência no desenvolvimento da DIH e na HAM/TSP para os pacientes da nossa coorte que manifestaram ambas as doenças na faixa infanto-juvenil. Elevada carga proviral tem sido também observada em pacientes adultos com HAM/TSP (MANNIS *et al.*, 1999) e recentemente foi demonstrado que os pacientes com DIH apresentam carga proviral mais elevada quando comparados aos portadores assintomáticos adultos e aos pacientes adultos com HAM/TSP (PRIMO *et al.*, 2009).

Os dados obtidos no presente estudo demonstram que a DIH é uma doença grave, pois além de causar problemas dermatológicos e neurológicos, pode representar fator de risco para o

surgimento mais precoce de ATL. Entre as limitações do presente estudo destacam-se: pequeno tempo de seguimento, e a não realização do teste de integração viral em todos os pacientes com linfócitos atípicos. Como perspectivas, consideramos aprofundar as análises dos locais de integração no genoma do hospedeiro com auxílio da bioinformática.

## 8. CONCLUSÕES

1 - A análise do padrão de clonalidade do TCR-gama revelou policlonalidade para todos os pacientes com DIH, mesmo entre aqueles que apresentaram LA e/ou CF no sangue periférico, não sendo detectado um clone majoritário circulante através dessa técnica;

2 – A análise através da técnica e ILPCR mostrou que podem existir clones majoritários circulantes na presença de LA e/ou CF, sendo observado padrão de integração proviral monoclonal em 7 dos 11 pacientes com DIH que apresentaram tais células em esfregaço do sangue periférico. Porém, não se constatou padrão comum no local da integração do provírus no genoma do hospedeiro;

3 – Observou-se que a presença de LA e/ou CF em pacientes com DIH não é um fenômeno pontual, pois ocorrem flutuações nas suas percentagens sem aumento aparente;

4 – Não foram detectadas CF e LA em sangue periférico dos pacientes assintomáticos.

## 9. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K; Andrew, H. **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- ALCANTARA, L. C. et al. Globin Haplotypes os Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 – Infected individuals in Salvador, Bahia, Brazil, Suggest a Post-Columbian African Origin of This Virus. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, v. 3, n. 4, aug. 2003.
- ALCANTARA, L. C. et al. Brazilian HTLV Type 2a Strains from Intravenous Drug Users (IDUs) Appear to have originated from two sources: Brazilian Ameridians and European/North American IDUs. **Aids Res. Human Retrov.**, v. 19, n. 6, p. 519-523, 2003.
- AL-MAWSAWI, L. Q. et al. Discovery of a small-molecule HIV-1 integrase inhibitor-binding site. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, n. 26, p. 10080-5, jun. 2006.
- ARISAWA, K. et al. Evaluation of adult T-cell leukemia/lymphoma incidence and its impact on non-Hodgkin lymphoma incidence in southwestern Japan. **Int. J. Cancer**, v. 85, n. 3, p. 319-24, feb. 2000.
- ASSAF, C. et al. High detection rate of T-cell receptor beta chain rearrangements in T-cell lymphoproliferations by family specific polymerase chain reaction in combination with the GeneScan technique and DNA sequencing. **Blood**, v. 96, n. 2, p. 640-6, jul. 2000.
- BANGHAM, C. R.; COOK, L. B.; MELAMED, A. HTLV-1 clonality in adult T-cell leukaemia and non-malignant HTLV-1 infection. **Semin. Cancer Biol.**, v. 26C, p. 89-98, jun. 2014.
- BARBOSA, H. S. et al. Adult T-cell leukemia/lymphoma in northeastern Brazil: a clinical, histopathologic, and molecular study. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr**, v. 21, n. 1, p. 65-71, may. 1999.
- BECKMAN et al. Visible Genetics OpenGene. Virginia, USA, 2008. (Versão 1.41) [Software].
- BITTENCOURT, A. L. et al. Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) presenting in the skin: clinical, histological and immunohistochemical features of 52 cases. **Acta Oncol.**, v. 48, n. 4, p. 598-604, 2009.
- BITTENCOURT, A. L. et al. Adult T-cell leukemia/lymphoma in Bahia, Brazil: analysis of prognostic factors in a group of 70 patients. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 128, n. 5, p. 875-82, nov. 2007.
- BITTENCOURT, A. L. et al. Human T-cell lymphotropic virus type 1 infection among pregnant women in northeastern Brazil. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, v. 26, n. 5, p. 490-4, apr. 2001.
- BITTENCOURT, A. L.; FARRÉ, L. Leucemia/linfoma de células T do adulto. **An. Bras. Dermatol.**, v. 83, p. 351-359, 2008.

BITTENCOURT, A. L.; OLIVEIRA, M. D. F. Dermatite infecciosa associada ao HTLV-I (DIH) infante-juvenil e do adulto. **An. Bras. Dermatol.**, v. 80, p. S364-S369, 2005.

BITTENCOURT, A. L.; PRIMO, J.; OLIVEIRA, M. F. Manifestations of the human T-cell lymphotropic virus type I infection in childhood and adolescence. **J. Pediatr.**, v. 82, n. 6, p. 411-20, nov.-dec. 2006.

BITTENCOURT, A. L. et al. No evidence of vertical transmission of HTLV-I in bottle-fed children. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 44, p. 63-65, 2002.

BRITES, C. et al. Severe and Norwegian scabies are strongly associated with retroviral (HIV-1/HTLV-1) infection in Bahia, Brazil. **AIDS**, v. 16, n. 9, p. 1292-3, Jun 14 2002.

BURKE, W. et al. Recommendations for follow-up care of individuals with an inherited predisposition to cancer. II. BRCA1 and BRCA2. Cancer Genetics Studies Consortium. **JAMA**, v. 277, n. 12, p. 997-1003, Mar 26 1997.

BUSHMAN, F. D. Targeting survival: integration site selection by retroviruses and LTR-retrotransposons. **Cell**, v. 115, n. 2, p. 135-8, Oct 17 2003.

CALATTINI, S. et al. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. **Retrovirology**, v. 2, p. 30, 2005.

CARNEIRO-PROIETTI, A. B. et al. HTLV in the Americas: challenges and perspectives. **Ver. Panam. Salud Publ.**, v. 19, n. 1, p. 44-53, Jan 2006.

CARNEIRO-PROIETTI, A. B. F. et al. Infecção e doença pelos vírus linfotrópicos humanos de células T (HTLV-I/II) no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 35, p. 499-508, 2002.

CARVALHO, E. et al. Cytokine profile and immunomodulation in asymptomatic human T-lymphotropic virus type 1-infected blood donors. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, v. 27, p. 1 - 6, 2001.

CATALAN-SOARES, B. et al. [Human T-cell lymphotropic virus in family members of seropositive blood donors: silent dissemination]. **Rev. Panam. Salud Publ.**, v. 16, n. 6, p. 387-94, Dec 2004.

CATALAN-SOARES, B. et al. 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. Saude Publ.**, v. 21, n. 3, p. 926-31, May-Jun 2005.

CHOI, Y. L. et al. Oncogenic MAP2K1 mutations in human epithelial tumors. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 5, p. 956-61, May 2012.

CIUFFI, A. et al. Integration site selection by HIV-based vectors in dividing and growth-arrested IMR-90 lung fibroblasts. **Mol. Ther.**, v. 13, n. 2, p. 366-73, Feb 2006.

DE THE, G.; KAZANJI, M. An HTLV-I/II vaccine: from animal models to clinical trials? **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum Retrovirol.**, v. 13 Suppl 1, p. S191-8, 1996.

DISS, T. C. et al. The polymerase chain reaction in the demonstration of monoclonality in T cell lymphomas. **J. Clin. Pathol.**, v. 48, n. 11, p. 1045-50, Nov 1995.

DOURADO, I. et al. HTLV-I in the general population of Salvador, Brazil: a city with African ethnic and sociodemographic characteristics. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, v. 34, n. 5, p. 527-31, Dec 15 2003.

DUGGAN, D. B. et al. HTLV-I-induced lymphoma mimicking Hodgkin's disease. Diagnosis by polymerase chain reaction amplification of specific HTLV-I sequences in tumor DNA. **Blood**, v. 71, n. 4, p. 1027-32, Apr 1988.

EDWARDS, D. et al. Orf-I and orf-II-encoded proteins in HTLV-1 infection and persistence. **Viruses**, v. 3, n. 6, p. 861-85, Jun 2011.

ETOH, K. et al. Persistent clonal proliferation of human T-lymphotropic virus type I-infected cells in vivo. **Cancer Res.**, v. 57, n. 21, p. 4862-7, Nov 1 1997.

FARRE, L. et al. Fas 670 promoter polymorphism is associated to susceptibility, clinical presentation, and survival in adult T cell leukemia. **J. Leukoc. Biol.**, v. 83, n. 1, p. 220-2, Jan 2008.

GABET, A. S. et al. High circulating proviral load with oligoclonal expansion of HTLV-1 bearing T cells in HTLV-1 carriers with strongyloidiasis. **Oncogene**, v. 19, n. 43, p. 4954-60, Oct 12 2000.

GALLO, D.; DIGGS, J. L.; HANSON, C. V. Evaluation of two commercial human T-cell lymphotropic virus western blot (immunoblot) kits with problem specimens. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, n. 9, p. 2046-9, Sep 1994.

GALLO, R. C.; POIESZ, B. J.; RUSCETTI, F. W. Regulation of human T-cell proliferation: T-cell growth factor and isolation of a new class of type-C retroviruses from human T-cells. **Haematol. Blood Transf.**, v. 26, p. 502-14, 1981.

GAUDRAY, G. et al. The complementary strand of the human T-cell leukemia virus type 1 RNA genome encodes a bZIP transcription factor that down-regulates viral transcription. **J. Virol.**, v. 76, n. 24, p. 12813-22, Dec 2002.

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

GESSAIN, A.; DE THE, G. What is the situation of human T cell lymphotropic virus type II (HTLV-II) in Africa? Origin and dissemination of genomic subtypes. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum Retrovirol.**, v. 13 Suppl 1, p. S228-35, 1996.

GILLET, N. A. et al. Strongyloidiasis and infective dermatitis alter human T lymphotropic virus-1 clonality in vivo. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 4, p. e1003263, 2013.

GILLET, N. A. et al. The host genomic environment of the provirus determines the abundance of HTLV-1-infected T-cell clones. **Blood**, v. 117, n. 11, p. 3113-22, Mar 17 2011.

GOMES, I. et al. Human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) infection in neurological patients in Salvador, Bahia, Brazil. **J. Neurol. Sci.**, v. 165, n. 1, p. 84-9, May 1 1999.

GONCALVES, D. U. et al. HTLV-I associated infective dermatitis may be an indolent HTLV-I associated lymphoma. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 4, n. 2, p. 100-2, Apr 2000.

HANCHARD, B. et al. Childhood infective dermatitis evolving into adult T-cell leukaemia after 17 years. **Lancet**, v. 338, n. 8782-8783, p. 1593-4, Dec 21-28 1991.

HISADA, M. et al. Predictors of level of circulating abnormal lymphocytes among human T-lymphotropic virus type I carriers in Japan. **Int. J. Cancer**, v. 77, n. 2, p. 188-92, Jul 17 1998.

HS, B. **Linfoma associado a infecção pelo HTLV-I na Bahia**. 1997. 166 Tese de Doutorado, Universidade Federal da Bahia

IJICHI, S. et al. HAM/TSP: recent perspectives in Japan. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum Retrovirol.**, v. 13 Suppl 1, p. S26-32, 1996.

IMAZUMI, Y. et al. Natural course of HTLV-1 carriers with monoclonal proliferation of T lymphocytes ("pre-ATL") in a 20-year follow-up study. **Blood**, v. 105, n. 2, p. 903-4, Jan 15 2005.

INOUE, M. et al. Characterization of mRNA expression of IkappaB alpha and NF-kappaB subfamilies in primary adult T-cell leukemia cells. **Jpn. J. Cancer Res.**, v. 89, n. 1, p. 53-9, Jan 1998.

KALYANARAMAN, V. S. et al. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. **Science**, v. 218, n. 4572, p. 571-3, Nov 5 1982.

KAMIHIRA, S. et al. Significance of HTLV-1 proviral load quantification by real-time PCR as a surrogate marker for HTLV-1-infected cell count. **Clin. Lab. Haematol.**, v. 25, n. 2, p. 111-7, Apr 2003.

KAPLAN, J. E. et al. Male-to-female transmission of human T-cell lymphotropic virus types I and II: association with viral load. The Retrovirus Epidemiology Donor Study Group. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum Retrovirol.**, v. 12, n. 2, p. 193-201, Jun 1 1996.

KAWAI, H. et al. HTLV-I-associated myelopathy (HAM/TSP) with Hashimoto's thyroiditis. **J Exp. Med.**, v. 38, n. 3-4, p. 99-102, Dec 1991.



KNOECHEL, B. et al. The link between lymphocyte deficiency and autoimmunity: roles of endogenous T and B lymphocytes in tolerance. **J. Immunol.**, v. 175, n. 1, p. 21-6, Jul 1 2005.

KORALNIK, I. J. et al. Protein isoforms encoded by the pX region of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, n. 18, p. 8813-7, Sep 15 1992.

LA GRENADE, L. et al. Clinical, pathologic, and immunologic features of human T-lymphotropic virus type I-associated infective dermatitis in children. **Arch. Dermatol.**, v. 134, n. 4, p. 439-44, Apr 1998.

LAGRENADE, L. et al. Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. **Lancet**, v. 336, n. 8727, p. 1345-7, Dec 1 1990.

LEWINSKI, M. K. et al. Retroviral DNA integration: viral and cellular determinants of target-site selection. **PLoS Pathog**, v. 2, n. 6, p. e60, Jun 2006.

MAHE, A. et al. Integration of basic dermatological care into primary health care services in Mali. **Bull. World Health Organ.**, v. 83, n. 12, p. 935-41, Dec 2005.

MAHE, A. et al. Human T-cell leukaemia/lymphoma virus type 1-associated infective dermatitis in Africa: a report of five cases from Senegal. **Br. J. Dermatol.**, v. 150, n. 5, p. 958-65, May 2004.

MALONEY, E. M. et al. Human T cell lymphotropic virus type I-associated infective dermatitis in Jamaica: a case report of clinical and biologic correlates. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 19, n. 6, p. 560-5, Jun 2000.

MALONEY, S. A.; WEINBERG, M. Prevention of infectious diseases among international pediatric travelers: considerations for clinicians. **Semin. Pediatr. Infect. Dis.**, v. 15, n. 3, p. 137-49, Jul 2004.

MARAGNO, L. et al. Human T-cell lymphotropic virus type 1 infective dermatitis emerging in adulthood. **Int. J. Dermatol.**, v. 48, n. 7, p. 723-30, Jul 2009.

MARINHO, J. et al. Increased risk of tuberculosis with human T-lymphotropic virus-1 infection: a case-control study. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, v. 40, n. 5, p. 625-8, Dec 15 2005.

MARSH, B. J. Infectious complications of human T cell leukemia/lymphoma virus type I infection. **Clin. Infect. Dis.**, v. 23, n. 1, p. 138-45, Jul 1996.

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

MATSUOKA, M.; JEANG, K. T. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. **Nat. Rev. Cancer**, v. 7, n. 4, p. 270-80, Apr 2007.

MEEKINGS, K. N. et al. HTLV-1 integration into transcriptionally active genomic regions is associated with proviral expression and with HAM/TSP. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 3, p. e1000027, Mar 2008.

MEERTENS, L. et al. Molecular and phylogenetic analyses of 16 novel simian T cell leukemia virus type 1 from Africa: close relationship of STLV-1 from *Allenopithecus nigroviridis* to HTLV-1 subtype B strains. **Virology**, v. 287, n. 2, p. 275-85, Sep 1 2001.

MELBYE, M. et al. HTLV-1 infection in a population-based cohort of older persons in Guinea-Bissau, West Africa: risk factors and impact on survival. **Int. J. Cancer**, v. 76, n. 3, p. 293-8, May 4 1998.

MITCHELL, R. S. et al. Retroviral DNA Integration: ASLV, HIV, and MLV Show Distinct Target Site Preferences. **PLoS Biol.**, v. 2, n. 8, p. e234, 2004.

MORTREUX, F.; GABET, A. S.; WATTEL, E. Molecular and cellular aspects of HTLV-1 associated leukemogenesis in vivo. **Leukemia**, v. 17, n. 1, p. 26-38, Jan 2003.

MOTA, A. C. et al. 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 Retrovir.**, v. 23, n. 4, p. 503-7, Apr 2007.

MUELLER, N. The epidemiology of HTLV-I infection. **Cancer Causes Control**, v. 2, n. 1, p. 37-52, Jan 1991.

MUELLER, N. et al. Findings from the Miyazaki Cohort Study. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.**, v. 13 Suppl 1, p. S2-7, 1996.

MURPHY, E. L. et al. Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) seroprevalence in Jamaica. I. Demographic determinants. **Am. J. Epidemiol.**, v. 133, n. 11, p. 1114-24, Jun 1 1991.

NASCIMENTO, M. C. et al. Infective dermatitis has similar immunological features to human T lymphotropic virus-type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 156, n. 3, p. 455-62, Jun 2009.

NCBI/BLAST. **Basic Local Alignment Search Tool. National Center for Biotechnological Information**. 2013. Disponível em: < [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)>. Acesso em: 23 jun 2013

OHSHIMA, K. et al. Clonal integration and expression of human T-cell lymphotropic virus type I in carriers detected by polymerase chain reaction and inverse PCR. **Am. J. Hematol.**, v. 54, n. 4, p. 306-12, Apr 1997.

OLIVEIRA MDE, F. et al. Infective dermatitis associated with human T-cell lymphotropic virus type 1: evaluation of 42 cases observed in Bahia, Brazil. **Clin. Infect. Dis.**, v. 54, n. 12, p. 1714-9, Jun 2012.

OLIVEIRA MDE, F. et al. Flower cells in patients with infective dermatitis associated with HTLV-1. **J. Clin. Virol.**, v. 48, n. 4, p. 288-90, Aug 2010.

OLIVEIRA MDE, F. et al. Infective dermatitis associated with the human T cell lymphotropic virus type I in Salvador, Bahia, Brazil. **Clin. Infect. Dis.**, v. 40, n. 11, p. e90-6, Jun 1 2005.

OSAME, M. et al. Nationwide survey of HTLV-I-associated myelopathy in Japan: association with blood transfusion. **Ann. Neurol.**, v. 28, n. 1, p. 50-6, Jul 1990.

POIESZ, B. et al. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 77, p. 7415 - 7419, 1980.

POIESZ, B. J. et al. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 77, n. 12, p. 7415-9, Dec 1980.

POMBO DE OLIVEIRA, M. S. et al. Geographic diversity of adult t-cell leukemia/lymphoma in Brazil. The Brazilian ATLL Study Group. **Int. J. Cancer**, v. 83, n. 3, p. 291-8, Oct 29 1999.

PRIMO, J. et al. High HTLV-1 proviral load, a marker for HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, is also detected in patients with infective dermatitis associated with HTLV-1. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 42, n. 8, p. 761-4, Aug 2009.

PRIMO, J. R. et al. Infective dermatitis and human T cell lymphotropic virus type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in childhood and adolescence. **Clin. Infect. Dis.**, v. 41, n. 4, p. 535-41, Aug 15 2005.

PROIETTI, F. A. et al. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. **Oncology**, v. 24, n. 39, p. 6058-68, Sep 5 2005.

PRUSS, D. et al. The influence of DNA and nucleosome structure on integration events directed by HIV integrase. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 40, p. 25031-41, Oct 7 1994.

SAITO, M. et al. HTLV-1 Infection and Its Associated Diseases. **Leuk. Res. Treat.**, v. 2012, p. 1, 2012.

SALES, M. M. et al. Clonally rearranged T-cell receptor beta chain genes in HTLV-I carriers with abnormal, non-flower-like, lymphocytes. **Eur. J. Haematol.**, v. 75, n. 4, p. 280-7, Oct 2005.

SANTOS, S. et al. Exacerbated inflammatory cellular immune response characteristics of HAM/TSP is observed in a large proportion of HTLV-I asymptomatic carriers. **BMC Infect. Dis.**, v. 4, n. 1, p. 7, 2004.

SEIKI, M. et al. Nonspecific integration of the HTLV provirus genome into adult T-cell leukaemia cells. **Nature**, v. 309, n. 5969, p. 640-2, Jun 14-20 1984.

SHIMOYAMA, M. Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). **Br. J. Haematol.**, v. 79, n. 3, p. 428-37, Nov 1991.

SUITE, M. et al. A survey to determine the prevalence of leprosy in a community in east Trinidad. **Lepr. Rev.**, v. 65, n. 2, p. 122-9, Jun 1994.

SWEET, V.; SERVY, E. J.; KAROW, A. M. Reproductive issues for men with cancer: technology and nursing management. **Oncol. Nurs. Forum**, v. 23, n. 1, p. 51-8, Jan-Feb 1996.

TAJIMA, K.; ITO, S. [Epidemiology of HTLV-I]. **Uirusu**, v. 42, n. 1, p. 49-57, Jun 1992.

TAMIYA, S. et al. Adult T cell leukemia following HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: case reports and implication to the natural course of ATL. **Leukemia**, v. 9, n. 10, p. 1768-70, Oct 1995.

TSUKASAKI, K. et al. Definition, prognostic factors, treatment, and response criteria of adult T-cell leukemia-lymphoma: a proposal from an international consensus meeting. **J. Clin. Oncol.**, v. 27, n. 3, p. 453-9, Jan 20 2009.

TSUKASAKI, K. et al. Diversity of leukaemic cell morphology in ATL correlates with prognostic factors, aberrant immunophenotype and defective HTLV-1 genotype. **Br. J. Haematol.**, v. 105, n. 2, p. 369-75, May 1999.

TSUKASAKI, K. et al. Integration patterns of HTLV-I provirus in relation to the clinical course of ATL: frequent clonal change at crisis from indolent disease. **Blood**, v. 89, n. 3, p. 948-56, Feb 1 1997.

TSUKASAKI, K. et al. Infective dermatitis among patients with ATL in Japan. **Int. J. Cancer**, v. 57, n. 2, p. 293, Apr 15 1994.

UCHIYAMA, T. et al. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. **Blood**, v. 50, p. 481 - 492, 1977.

VAN DONGEN, J. J. et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. **Leukemia**, v. 17, n. 12, p. 2257-317, Dec 2003.

VILMER, E. et al. Smouldering T lymphoma related to HTLV-I in a Sicilian child. **Lancet**, v. 2, n. 8467, p. 1301, Dec 7 1985.

WALSHE, M. M. Infective dermatitis in Jamaican children. **Br. J. Dermatol.**, v. 79, n. 4, p. 229-36, Apr 1967.

WANG, G. P. et al. HIV integration site selection: analysis by massively parallel pyrosequencing reveals association with epigenetic modifications. **Genome Res.**, v. 17, n. 8, p. 1186-94, Aug 2007.

WOLFE, N. D. et al. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 102, n. 22, p. 7994-9, May 31 2005.

WU, X. et al. Weak palindromic consensus sequences are a common feature found at the integration target sites of many retroviruses. **J. Virol.**, v. 79, n. 8, p. 5211-4, Apr 2005.

YAMAGUCHI, K. Human T-lymphotropic virus type I in Japan. **Lancet**, v. 343, n. 8891, p. 213-6, Jan 22 1994.

YAMAGUCHI, K. et al. Polyclonal integration of HTLV-I proviral DNA in lymphocytes from HTLV-I seropositive individuals: an intermediate state between the healthy carrier state and smouldering ATL. **Br. J. Haematol.**, v. 68, n. 2, p. 169-74, Feb 1988.

YASUNAGA, J.; MATSUOKA, M. Human T-cell leukemia virus type I induces adult T-cell leukemia: from clinical aspects to molecular mechanisms. **Cancer Control**, v. 14, n. 2, p. 133-40, Apr 2007a.

YASUNAGA, J.; MATSUOKA, M.. Leukaemogenic mechanism of human T-cell leukaemia virus type I. **Rev. Med. Virol.**, v. 17, n. 5, p. 301-11, Sep-Oct 2007b.

ZALA, C. et al. Human T-cell lymphotropic virus type I disease in Argentine intravenous drug users with human immunodeficiency virus type 1 infection. **J. Acquir. Immune Defic. Syndr.**, v. 7, n. 8, p. 870-1, Aug 1994.

## ANEXO I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

### PACIENTE ÍNDEX DE DERMATITE INFECCIOSA (DIH)

TERMO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE OU DO RESPONSÁVEL PARA CONTINUAÇÃO NA EXTENSÃO DO PROJETO SOBRE PATOGÊNESE DAS DOENÇAS ASSOCIADAS AO HTLV-1 NA INFÂNCIA E ADOLESCÊNCIA.

Nome do paciente: \_\_\_\_\_

Nome do responsável, quando menor: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Tel.: \_\_\_\_\_ Grau de parentesco: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Eu entendo que sendo portador do vírus denominado HTLV-1 e de dermatite infecciosa associada a esse vírus e ou mielopatia associada ao HTLV-1, consinto em continuar participando como paciente na extensão do projeto anterior, agora denominado **PATOGÊNESE DAS DOENÇAS ASSOCIADAS AO HTLV-1 NA INFÂNCIA E ADOLESCÊNCIA**, com o acréscimo de estudos genéticos imunológicos e de biologia molecular. Já fui esclarecido (a) anteriormente que essa doença é de longa duração e de difícil tratamento e que poderá no futuro evoluir para outras doenças como a leucemia/linfoma e mielopatia e por isto deverei ser acompanhado (a) regularmente e por tempo indeterminado nos ambulatórios de Dermatologia e de Neuropediatria do Complexo Hospitalar Universitário Prof. Edgard Santos. Permito ser examinado clinicamente de 6 em 6 meses ou antes caso apresente intercorrências e que sejam retirados de 20 a 30ml. de meu sangue para coleta de células 6 em 6 meses ou de 12 em 12 meses e feita biópsia da lesão em atividade para esclarecimento diagnóstico. As células do sangue e da pele serão usadas para estudo das células (avaliação da resposta citotóxica e imunoregulatória dos linfócitos T) e extração do DNA para avaliação da expressão gênica viral de TAX e HBZ), estudos genéticos, da carga viral e da clonalidade de linfócitos e, se houver monoclonalidade dos linfócitos, para realizar a pesquisa do tipo de integração viral, no sentido de melhor esclarecer a natureza da minha doença e de sua possível evolução para linfoma/leucemia. Permito que seja feita documentação fotográfica, mas que em caso de publicação minha identidade não seja revelada e que seja protegida a minha identificação.

Permito que este material seja guardado em banco de DNA no Laboratório LAPEX da FIOCRUZ, segundo as disposições vigentes, e que venha a servir posteriormente para estudos genéticos humanos. Estou ciente que esse material só poderá ser utilizado em outros estudos após nova autorização minha e do respectivo Comitê de Ética em Pesquisa.

Permito também participar de um estudo sobre manifestações oculares e do ouvido interno na minha doença, o que deverá trazer benefícios para mim.

Fui informado (a) também que a minha participação neste projeto de pesquisa é totalmente voluntária e gratuita, sem ônus da minha parte e de que a minha recusa nesta participação não implicará em nenhuma restrição ao meu atendimento médico ou ao de meus parentes que já estejam participando e, também, que mesmo assinando esse termo de consentimento eu poderei retirar essa permissão em qualquer momento sem punições ou perda dos benefícios a que temos direito. A decisão de abandonar o estudo não acarretará em prejuízo para os meus atendimentos futuros. Os riscos durante a realização dos exames são riscos pequenos e será prestada toda assistência médica necessária durante a realização dos mesmos ou em suas não previstas complicações.

Durante a participação no projeto de pesquisa, serei acompanhado regularmente no sentido de detectar precocemente as outras doenças associadas a esse vírus, receberei aconselhamento e tratamento adequado após o diagnóstico. Além disso, a minha participação neste estudo ajudará os médicos a aprenderem mais sobre os efeitos do vírus HTLV-1 nos portadores de dermatite, o que permitirá que eu/ou outras pessoas beneficiem-se no futuro, pois, esse estudo poderá contribuir para esclarecer fatores de risco associados a outras doenças relacionadas ao vírus HTLV-1.

A minha identidade confidencial e caso algum resultado do estudo venha a ser publicado, não seremos proprietários de quaisquer informações decorrentes deste estudo e não poderemos solicitar que estas informações sejam retiradas dos dados do estudo, pois elas serão absolutamente anônimas.

Qualquer dúvida ou complicação que ocorra no transcurso desse estudo, nós poderemos contatar com a Dra. Maria de Fátima Santos Paim de Oliveira, no Setor de Dermatologia do Ambulatório Magalhães Neto (Tel.: 71 3283-8360) ou com o Dr. Eduardo Martins Netto, Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa, da Maternidade Climério de Oliveira – UFBA (Tel.: 71 3283-9275 ou 3283-9211).

NO CASO DE VOCÊ TER DIFICULDADE PARA LER (Sim  ou Não , O ESCRITO ACIMA, DEVE ATESTAR TAMBÉM QUE O(A) DR(A). \_\_\_\_\_, QUANDO DA LEITURA PAUSADA DESSE DOCUMENTO, ESCLARECEU TODAS SUAS DÚVIDAS E PARA CONCORDAR EM PARTICIPAR DO ESTUDO, VOCÊ DEVERÁ COLOCAR ABAIXO A IMPRESSÃO DO SEU DEDO POLEGAR.

_____	_____/_____/_____
Assinatura ou impressão digital do representante legal	Data
_____	_____/_____/_____
Assinatura do pesquisador	Data
_____	_____/_____/_____
Assinatura do “pesquisando” quando capaz	Data