

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

**CARACTERIZAÇÃO DAS VARIANTES GENOTÍPICAS DO HTLV EM UM GRUPO
DE PACIENTES ACOMPANHADOS EM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DO ESTADO
DO RIO DE JANEIRO**

JANAINA CARDOSO FELIX

Rio de Janeiro

Outubro de 2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

F316 Felix, Janaina Cardoso

Caracterização das variantes genotípicas do HTLV em um grupo de pacientes acompanhados em Hospital Universitário do Estado do Rio de Janeiro / Janaina Cardoso Felix. – Rio de Janeiro, 2014.

xv, 76 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2014.

Bibliografia: f. 64-75

1. HTLV. 2. Subtipos. 3. Epidemiologia. 4. WB indeterminado. I. Título.

CDD 616.0797

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

**CARACTERIZAÇÃO DAS VARIANTES GENOTÍPICAS DO HTLV EM UM
GRUPO DE PACIENTES ACOMPANHADOS EM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DO
ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

por

JANAINA CARDOSO FELIX

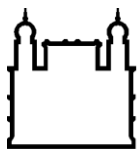
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de concentração: Diagnóstico, epidemiologia e controle de doenças infecciosas e parasitárias.

Orientador: Dr. Márcio Neves Bóia

Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres e Reservatórios - LABPMR

Rio de Janeiro

Outubro de 2014



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Medicina Tropical

**CARACTERIZAÇÃO DAS VARIANTES GENOTÍPICAS DO HTLV EM UM GRUPO
DE PACIENTES ACOMPANHADOS EM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DO ESTADO
DO RIO DE JANEIRO**

ORIENTADOR: Dr. Márcio Neves Bóia

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora:

Dra. Elba Regina Sampaio de Lemos - IOC/ FIOCRUZ (Presidente)

Dra. Dirce Bonfim de Lima – HUPE – UERJ (Membro)

Dra. Alena Mayo Iñiguez - IOC/ FIOCRUZ (Revisora)

Dr. Sergio Henrique Seabra – UEZO (Suplente)

Dr. Julio Vianna Barbosa - IOC/ FIOCRUZ (Suplente)

RIO DE JANEIRO

2014

iii

“Comece desafiando suas próprias suposições.
Suas suposições são suas janelas no mundo.
Esfregue-as de vez em quando, ou a luz não
entrará.”

(Alan Alda)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por permitir que eu chegasse até aqui.

Ao meu orientador, Dr. Márcio Neves Bóia, que permitiu que eu entrasse em sua equipe e acreditou que eu seria capaz de realizar esse trabalho. Um obrigada especial pelos ensinamentos que levarei por toda vida e principalmente pelo carinho e atenção.

Ao Dr. Rodrigo Cunha, com quem aprendi muito sobre ética, respeito e solidariedade. “Dr. Rodrigo, somos uma equipe e sem seus conselhos, esse momento não seria possível”.

Ao Dr. Filipe Anibal, por permitir que eu ampliasse conhecimentos com sua equipe contribuindo para minha formação horizontalizada.

À toda equipe do Laboratório de Genética Molecular de Microorganismos pela atenção e ensinamentos. Em especial à Dra. Ana Carolina Paulo Vicente, por permitir e contribuir para o meu aprendizado em assuntos ainda novos para mim; e à Koko Otsuki (Rosa) pela paciência, dedicação e ensinamentos para desenvolver este projeto.

Ao Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios/IOC, por me acolher e sempre dispostos a ajudar. “Michele, obrigada pelas orientações burocráticas!”

Ao meu marido, Eduardo Almeida, pelo incentivo, por acreditar em mim e ser meu alicerce. “Eduardo, amo você!”.

Ao meu coordenador e amigo Dr. Fábio Moreira pela oportunidade de ministrar aulas para o ensino superior. “Fábio, serei eternamente grata a você e à FAMATH por esta oportunidade e por acreditar em mim”.

Aos amigos do mestrado, Ana Cláudia Terças, Beatriz Coronato, Carina Martins, Deiviane Calegar, Liana Stretch, Luciana Dias, Luzinei Couto, Nathalia Beatriz, Tayany de Deus e muitos outros, por compartilhar tantos momentos e fazer parte dessa trajetória.

À Coordenação do Programa de Medicina Tropical – IOC/FIOCRUZ pela oportunidade de realizar esse curso, mas principalmente pelo carinho com seus alunos.

Aos companheiros de trabalho do HUPE, em especial Fabiano Rodrigues, Fernanda Spala e Márcia Guerraro pela amizade e por contribuir com a realização desse projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

Aos pacientes, que confiaram e permitiram a realização desse trabalho, sendo eles o real motivo de toda investigação.

Por fim, a banca examinadora por ter aceitado prontamente o convite.

SUMÁRIO

	Pág.
AGRADECIMENTOS	v
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xi
LISTA DE QUADROS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Breve Histórico	1
1.2 O Vírus Linfotrópico de Células T Humanas	3
1.3 Epidemiologia	7
1.4 Transmissão do HTLV	11
1.5 Diagnóstico Laboratorial	15
1.6 Doenças Associadas	22
1.7 Prevenção	31
2. OBJETIVOS	33
2.1 Objetivo Geral	33
2.2 Objetivos Específicos	33
3. METODOLOGIA	34
3.1 Local e grupo de estudo	34
3.2 Entrevista e coleta de sangue	35
3.3 Teste Sorológico de Triagem (ELISA)	36
3.4 Teste Sorológico Confirmatório (<i>WB</i>)	37
3.5 Teste de Análise Molecular (PCR)	37
3.6 Purificação do Produto da PCR	40
3.7 Sequenciamento dos Produtos da PCR	41
3.8 Análise de Dados	41
4. RESULTADOS	42
4.1 Caracterização do Grupo de Estudo	42

4.1.1 – Sexo	42
4.1.2 – Idade	42
4.1.3 – Grupo Étnico	42
4.1.4 – Naturalidade	43
4.1.5 – Estado Civil	44
4.1.6 – Aleitamento Materno	44
4.1.7 – Contatctante Sexual HTLV+	45
4.1.8 – Uso de Drogas Injetáveis	45
4.1.9 – Transfusão de Sangue	45
4.1.10 – Co-infecção	46
4.1.11 – Estágio Clínico	46
4.2 Análises Moleculares	46
4.2.1 Análise da região Tax do HTLV	47
4.2.2 Análise da região LTR do HTLV-1	48
4.2.3 Análise de Subtipos	54
5. DISCUSSÃO	56
5.1 – Caracterização do Grupo de Estudo Quanto Aos Possíveis Fatores de Risco Analisados	56
5.2 – Características Moleculares – Tipagem e Subtipagem do HTLV	60
6. CONCLUSÕES	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
8. ANEXOS	76
8.1 Questionário	76

RESUMO

O Vírus Linfotrófico de Células T Humanas (HTLV) foi o primeiro retrovírus identificado em humanos e posteriormente associado à leucemia/linfoma de células T do adulto (LTA). Podem-se encontrar quatro tipos: HTLV-1, HTLV-2, HTLV-3 e HTLV-4, sendo os dois primeiros de maior prevalência. Estima-se que cerca de 10 milhões de pessoas no mundo e 2,5 milhões no Brasil, estejam infectadas pelo HTLV. O HTLV-1 possui sete subtipos e o HTLV-2, quatro. Recentemente, foi identificado o subtipo HTLV-1b no estado do Rio de Janeiro, sendo anteriormente encontrado somente na África Central. A análise dos subtipos é importante em estudos sobre a origem geográfica e disseminação dos isolados virais. O presente estudo teve como principal objetivo caracterizar as variantes genotípicas do HTLV em um grupo de pacientes acompanhados no Hospital Universitário Pedro Ernesto – UERJ. Objetivou também caracterizar o grupo quanto aos possíveis fatores de risco para infecção pelo HTLV, descrever a ocorrência de doenças associadas com HTLV, caracterizar o grupo quanto aos subtipos de HTLV, descrevendo-os de acordo com a naturalidade dos pacientes e caracterizar os casos de pacientes com sorologia de *WB* indeterminado utilizando técnicas de biologia molecular. Foram estudados pacientes com a infecção pelo HTLV, sintomática ou assintomática, com sorologia positiva ou indeterminada. As amostras foram submetidas ao teste confirmatório pela PCR. A infecção foi confirmada em 31 dos 33 participantes do estudo. Dentre os positivos, 28 foram HTLV-1a e os demais HTLV-2b. O gênero mais frequente foi o feminino. Pacientes adultos, casados e pardos foram os mais frequentes dentro das variáveis de faixa etária, estado civil e grupo étnico, respectivamente. A maioria dos pacientes relatou não saber se manteve contato sexual com portador de HTLV, não fazer uso de drogas injetáveis ou já ter realizado transfusão de sangue. Dentre as co-infecções detectadas, estiveram HIV e HCV. Apenas 9,7% dos pacientes apresentou sintomatologia, sendo todos os casos de mielopatia associada ao HTLV-1. Apenas 29% dos pacientes informaram ter amamentado. Dos seis pacientes com *WB* indeterminado, cinco foram confirmados para HTLV-1 e um para HTLV-2. O único paciente usuário de drogas injetáveis era portador de HTLV-2b. Recomenda-se novos estudos com populações abertas do Rio de Janeiro, com maior número de participantes, afim de determinar mais precisamente a prevalência do HTLV e seus subtipos na região.

Palavras-chave: HTLV, Subtipos, Epidemiologia e *WB* Indeterminado

ABSTRACT

The Human T-Cell Lymphotropic Virus (HTLV) was the first human retrovirus identified and associated to leukemia/lymphoma, adult T-cells (ATL). Can be found four types: HTLV-1, HTLV-2, HTLV-3 and HTLV-4. The first two are the most prevalent. About 10 million people around the world and 2.5 million in Brazil, are infected with HTLV. The HTLV-1 type is subdivided into seven subtypes and HTLV-2 in four. Recently, HTLV-1b was identified in the state of Rio de Janeiro. This subtype it was found only in Central Africa. The analysis of subtypes is important in studies of geographical origin and dissemination of viral isolates. The present study aimed to characterize the genotypic variants of HTLV in a group of patients treated at University Hospital Pedro Ernesto - UERJ. Aimed to characterize the group as to the possible risk factors for HTLV infection, describing the occurrence of diseases associated with HTLV, characterized the group as to the HTLV subtypes; correlations between subtypes and local of infection; assess risk factors and confirm or exclude cases of patients with indeterminate or not typed serology. This study characterized the group as to the possible risk factors for HTLV infection, describing the occurrence of diseases associated with HTLV, characterized the group as the subtypes of HTLV, describing them according to the naturalness of patients and characterize the cases of patients with serology indeterminate WB using molecular biology techniques. Patients were studied with HTLV, symptomatic or asymptomatic, with positive or indeterminate WB serology. The specimens were subjected to confirmatory testing by PCR. The infection was confirmed in 31 of 33 study participants. Among positives, 28 were HTLV-1a and other HTLV-2b. The most frequent was the female gender. Adult patients, married and browns were the most frequent within the variables of age, marital status and ethnic group, respectively. Most patients reported not knowing remained sexual contact with HTLV carrier, do not use intravenous drugs or have already done blood transfusion. The co-infections detected were HIV and HCV. Only 9.7% of patients had symptoms, and all cases of myelopathy associated with HTLV-1. Only 29% of patients reported having breastfed. Of the six patients with indeterminate WB five were confirmed HTLV-1 and HTLV-2. The only patient injecting drug user was infected by HTLV-2b. We recommend further studies with open populations of Rio de Janeiro, with the largest number of participants in order to more precisely determine the prevalence of HTLV and its subtypes in the region.

Keywords: HTLV, Subtypes, Epidemiology and WB Indeterminate

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATLL – leucemia /linfoma de células T do adulto
ATLV – vírus da leucemia de células T do adulto
CO – *cut-off*
DIP – Doenças Infecciosas e Parasitárias
DNA – ácido desoxirribonucleico
dNTPs – deoxinucleotídeos trifosfatados
DST – doença sexualmente transmissível
EIA – ensaio imunoenzimático
ELISA – ensaio imunoenzimático
env – envelope
gag – grupo antígeno específico
Glut – transreceptor de glicose
gp – glicoproteína
HBZ – *basic zipper factor*
HEMORIO – Instituto de Hematologia do Rio de Janeiro
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA - antígeno leucocitário humano
HTLV – vírus linfotrópico de células T humana
HUPE – Hospital Universitário Pedro Ernesto
Ig E- imunoglobulina E
Ig M- imunoglobulina M
IOC – Instituto Oswaldo Cruz
LTR – *long terminal repeats*
MgCl₂– cloreto de magnésio
mRNA- RNA mensageiro
OMS – organização mundial da saúde
Orf- *open reading frames*
PCR – reação de cadeia da polimerase

PET/MAH – paraparesia espástica tropical ou mielopatia pelo HTLV

pol – protease/polimerase/integrase

PPD - Derivado Purificado da Proteína do bacilo da tuberculose

PTLV – vírus linfotrópico de células T de primatas

RNA – ácido ribonucléico

STLV – vírus linfotrópico de células T de símios

SUS – Sistema Único de Saúde

TAE – Tris-Acetato EDTA

Tax – gene ativador de transcrição

Th-1 – linfócitos T auxiliares subpopulação 1

Th-2 – linfócitos T auxiliares subpopulação 2

TMB – Tetrametilbenzidina

TNF-alfa - fator de necrose tumoral alfa

UERJ – Universidade do Estado do Rio de Janeiro

WB – Western blot

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1: Distribuição dos genes pX do HTLV, suas proteínas e funções. Modificado de Martins et al (2010). pág. 5

Quadro 1.2 – Proteínas do HTLV usadas no critério de interpretação do teste de *Western blot*. Modificado de Sabino e Carvalho (2010). pág. 17

Quadro 1.3: Outras doenças inflamatórias e níveis de associação com HTLV-1. pág. 31

Quadro 3.1: Iniciadores genéricos para HTLV, região Tax (218 pb). Adaptado de GenBank ATK-1 (2014). pág. 39

Quadro 3.2: Iniciadores específicos para região LTR do HTLV-1 (678 pb). Adaptado de GenBank ATK-1 (2014). pág. 40

Quadro 4.1: Frequência e percentual dos gêneros no grupo de estudo (n=31). pág. 42

Quadro 4.2: Frequência e percentual de idade do grupo de estudo (n=31). pág. 43

Quadro 4.3: Frequência e percentual de grupos étnicos no grupo de estudo (n=31). pág. 43

Quadro 4.4: Frequência e percentual da naturalidade do grupo de estudo (n=31). pág. 43

Quadro 4.5: Frequência e percentual de estados civis no grupo de estudo (n=31). pág. 44

Quadro 4.6: Frequência e percentual de aleitamento materno nos pacientes (n=31). pág. 44

Quadro 4.7: Frequência e percentual de relações sexuais de pacientes com portadores HTLV (n=31). pág. 45

Quadro 4.8: Frequência e percentual de pacientes que já realizaram transfusão de sangue (n=31). pág. 45

Quadro 4.9: Frequência e percentual de co-infecção (n=31). pág. 46

Quadro 4.10: Frequência e percentual de manifestação clínica (n=31). pág. 46

Quadro 4.11: Frequência e percentual de diagnóstico final no grupo de estudo (n=33). pág. 47

Quadro 4.12: Dados epidemiológicos e moleculares, com resultados confirmatórios para HTLV em pacientes do HUPE-UERJ. pág. 55

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1: Esquema representativo do HTLV. Modificado de Verdonck et al (2007). pág. 3
- Figura 1.2: Esquema Genômico do HTLV-1. Modificado de Dustin et al. (2011). pág. 4
- Figura 1.3: Ciclo de Replicação do HTLV. Modificado de Lairmore et al (2012). pág. 6
- Figura 1.4: Origem e disseminação do HTLV-1 (Verdonck et al., 2007). pág. 7
- Figura 1.5: Disseminação e distribuição mundial do HTLV-2. Modificado de Roucoux e Murphy (2004). pág. 9
- Figura 1.6: Soroprevalência do HTLV-1 e 2 entre doadores de sangue no Brasil. Catalan-Soares et al. (2005). pág. 10
- Figura 1.7: Formas de Transmissão do HTLV-1 e HTLV-2. Modificado de Paiva e Casseb (2014). pág. 11
- Figura 1.8: Algoritmo de Diagnóstico para HTLV, conforme Manejo Clínico HTLV. Fundação Hemominas (2013).pág. 21
- Figura 1.9: Modelo da patogênese ATLL na infecção pelo HTLV-1. Modificado de Yoshida et al. (2010). pág. 24
- Figura 1.10: Modelo da patogênese PET/MAH. Adaptado de Cadernos Hemominas HTLV (2010). pág. 25
- Figura 1.11: Foto de criança com dermatite infecciosa. A – infecção anterior ao tratamento; B – infecção após início do tratamento. Modificado de Verdonck et al. (2007). pág. 29
- Figura 4.1: PCR da Região Tax em 33 amostras (identificadas por um número seguido da letra U), demonstrando amplificação em todas as amostras. Primer: AV42F e AV43R (218pb). pág. 47
- Figura 4.2: PCR da Região LTR do HTLV-1, com destaque para 10 amostras com amplificação (identificadas por um número seguido da letra U). Primer: HFL9 e HFL10 (675pb). pág. 48

Figura 4.3: Alinhamento das sequências da região Tax de dezoito pacientes, demonstrando similaridade entre as mesmas e as cepa referências HAM116 (HTLV-1aA) e ATK (HTLV-1aB). As amostras marcadas com quadrado referem-se aos pacientes *WB* indeterminado. pág. 49

Figura 4.4: Alinhamento das sequências da região Tax de três pacientes, demonstrando similaridade entre as mesmas e as cepas referências MAVMM (HTLV-2b) e BRL038 (HTLV-2b). O intervalo entre a posição 130 e 180 não apresentou polimorfismo. As amostras marcadas com quadrado referem-se aos pacientes *WB* indeterminado. pág. 50

Figura 4.5: Alinhamento das sequências da região Tax de três pacientes, demonstrando similaridade entre as mesmas e as cepas referências padrões MA_VMM (HTLV-2b) e BRLO02 (HTLV-2c). As amostras marcadas com quadrado referem-se aos pacientes *WB* indeterminado. pág. 51

Figura 4.6: Alinhamento das sequências da região LTR de dez pacientes, demonstrando similaridade entre as mesmas. As amostras marcadas com quadrado referem-se aos pacientes *WB* indeterminado. pág. 52

Figura 4.6: (Continuação) Alinhamento das sequências da região LTR de dez pacientes, demonstrando similaridade entre as mesmas. As amostras marcadas com quadrado referem-se aos pacientes *WB* indeterminado. pág. 53

Figura 4.7: Percentual dos subtipos de HTLV no grupo de estudo (n=31). pág. 54

1. INTRODUÇÃO

1.1 Breve Histórico

O HTLV, Vírus Linfotrópico de Células T Humanas, é responsável por infecção crônica que pode desencadear diversos processos patogênicos em seus portadores ou permanecer assintomática (Martins e Stancioli, 2006). O HTLV é classificado em quatro tipos: HTLV-1, HTLV-2, HTLV-3 e HTLV-4, sendo os dois últimos, ainda pouco conhecidos quanto à transmissão entre seres humanos e a capacidade de desenvolvimento de doenças (Wolf et al., 2005). Os HTLV-1 e 2 possuem ampla distribuição mundial e o Brasil está entre os países com maior número de pessoas infectadas (Gessain e Cassar, 2012).

O HTLV-1 foi o primeiro retrovírus descrito em humanos. Foi isolado no ano de 1979 por Poiesz e colaboradores no laboratório do pesquisador Dr. Robert Gallo, do Instituto Nacional do Câncer nos Estados Unidos. A partir de culturas de linfócitos extraídos de um paciente norte-americano de 28 anos com diagnóstico de leucemia/linfoma cutâneo de células T do adulto (LTA), foi possível identificar o HTLV-1 (Poiesz et al., 1980). Ao mesmo tempo, pesquisadores japoneses identificaram em linhagens de células humanas um retrovírus, por eles denominado “vírus da leucemia de células T do adulto” (ATLV). Após essa publicação, em 1981, japoneses e norte-americanos iniciaram um trabalho conjunto para analisar e comparar os isolados de ATLV e HTLV-1. Nessas análises, ficou comprovado que ambos eram o mesmo vírus, permanecendo então a denominação HTLV-1 (Poiesz et al., 1981).

Em 1982, Gallo e equipe identificaram HTLV-2 em um paciente com tricoleucemia de células T. Entretanto, pesquisas realizadas na época, não relataram associação entre o vírus e essa leucemia. Em 2005, foram descobertos os HTLV-3 e HTLV-4 na África Central, em amostras de sangue total de indivíduos assintomáticos que viviam no sudeste de Camarões e que apresentavam sorologia indeterminada para HTLV (Gessain et al., 2013).

Estudos sugerem que o HTLV-1 teve origem no continente africano a partir do contato entre primatas humanos e não-humanos infectados. Essa hipótese é reforçada por este ser o único continente onde são encontrados todos os PTLV (Vírus Linfotrópico de Células T de Primatas) (Verdonck et al., 2007). Existem duas hipóteses sobre a disseminação do HTLV-1 para as Américas. A primeira sugere que tenha ocorrido através das migrações de populações

infectadas pelo Estreito de Bering durante a última glaciação, chegando e se disseminando de de 10.000 a 35.000 anos A.C. A segunda, na era Pós-Colombiana, através do tráfico de escravos vindos da África e de migrações de populações, principalmente japonesas, após a segunda guerra mundial. Já o HTLV-2, pode ter sido introduzido inicialmente no continente americano através da migração de populações asiáticas pelo Estreito de Bering. Nos últimos anos sua disseminação pode ter ocorrido pelo contato dos índios americanos com os usuários de drogas intravenosas (UDIV) e pelo compartilhamento de agulhas contaminadas (Vandamme et al., 2000).

Apesar do HTLV-1 ser mais frequentemente associado com sintomatologia clínica quando comparado ao HTLV-2, inúmeras são as manifestações decorrentes desses vírus. As doenças associadas ao HTLV podem ser neoplásicas (Leucemia/Linfoma de células T do adulto - LTA), síndromes inflamatórias (mielopatia, uveíte, alveolite, entre outras) e complicações infecciosas (estrongiloidíase, escabiose, dermatite infectiva e tuberculose) (Verdonck et al., 2007; Steinfort et al., 2008; Desailoud e Hober, 2009).

No Brasil, a infecção pelo HTLV foi relatada pela primeira vez em imigrantes japoneses, no ano de 1986 (Kitagawa et al., 1986). Posteriormente, em 1989, foram descritos os primeiros casos da síndrome inflamatória Mielopatia pelo HTLV-1 em São Paulo e no Ceará (Costa et al., 1989 e Martins-Castro et al., 1989). A leucemia/linfoma de células T do adulto associado ao HTLV foi diagnosticada pela primeira vez no Brasil em 1990, no Rio de Janeiro (Oliveira et al., 1990). Atualmente, a infecção pelo HTLV está disseminada por todo o mundo. Estudos de prevalência da infecção, indicam que aproximadamente 10 milhões de pessoas estejam infectadas, porém ainda serão necessários inúmeros estudos, com maior abrangência, para que se tenha melhor conhecimento da infecção pelo HTLV na população mundial (Gessain e Cassar, 2012).

1.2 O Vírus Linfotrópico de Células T Humanas

O HTLV pertence à família Retroviridae, subfamília *Orthoretrovirinae*, gênero *Deltaretrovirus*, onde está inserido o grupo dos Vírus Linfotrópicos de Células T de Primatas (PTLV) (ICTV, 2013). Dentro do grupo dos PTLV, temos os HTLV (do tipo 1 ao 4) e seus correspondentes Símios, STLV (do tipo 1 ao 3). O HTLV-4 é o único que ainda não possui STLV equivalente (Goff et al., 2007).

Estrutura Morfológica

A estrutura morfológica do HTLV (Figura 1.1) é semelhante a de outros retrovírus. Sua estrutura é composta por um envelope arredondado, composto por duas camadas de proteolipídios (originados da membrana plasmática da célula do hospedeiro) com aproximadamente 100nm de diâmetro. Na parte externa do envelope estão inseridas as proteínas gp46 (de superfície) e gp21 (transmembrana), enquanto que na parte interna, está a p19 (proteína de matriz). Mais internamente localiza-se o capsídeo viral, formado pela proteína p15, de formato icosaédrico e que protege o material genômico viral e suas enzimas. No nucleocapsídeo encontramos o RNA viral e as enzimas transcriptase reversa, integrase e a protease funcional (Goff, 2007; Verdonck et al., 2007).

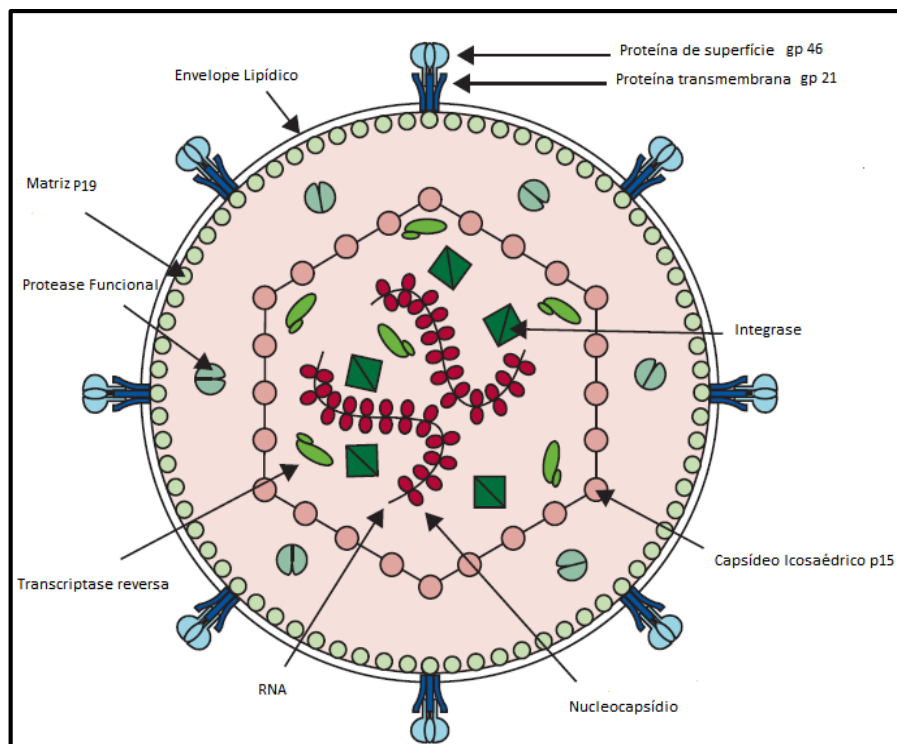


Figura 1.1: Esquema representativo do HTLV. Modificado de Verdonck et al (2007)

Estrutura Genômica

O material genético do HTLV é composto por duas fitas simples de RNA com polaridade positiva e assim como outros retrovírus (Figura 1.2). O HTLV possui os genes *gag* (grupo antígeno específico), *pol* (protease, polimerase, integrase) e *env* (envelope), além de uma

sequência próxima à extremidade 3', chamada região pX, que não é observada em outros retrovírus (Goff, 2007).

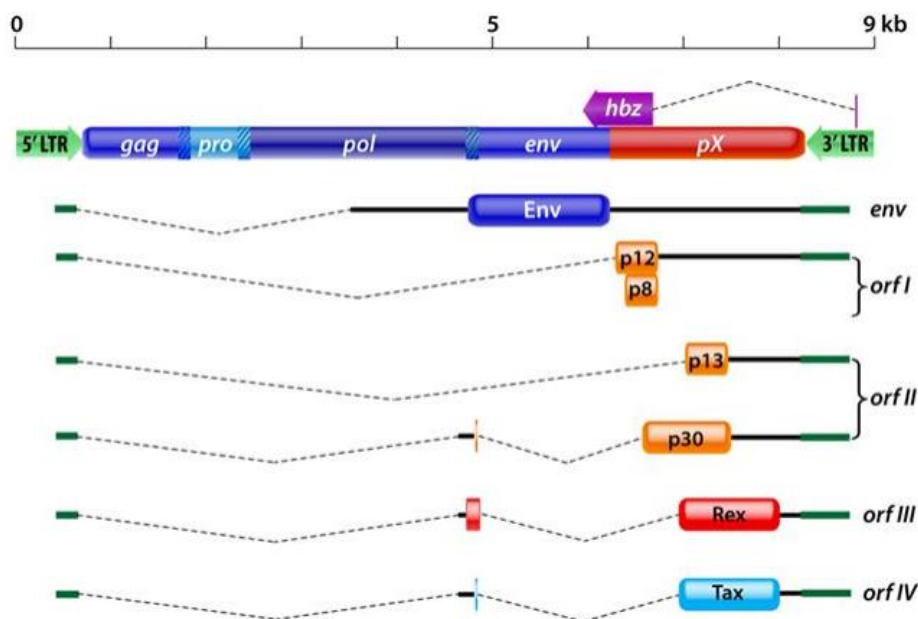


Figura 1.2. Esquema Genômico do HTLV-1. Modificado de Dustin et al. (2011)

A região pX (Figura 1.2) contém quatro *open reading frames* (ORF): pX-I, pX-II, pX-III e pX-IV que ficam localizados no genoma pró-viral na região 3'. As pX, ORF III e IV codificam duas proteínas regulatórias, a TAX e a REX, que estão envolvidas na regulação da expressão viral. As pX, ORF I e II codificam outras proteínas regulatórias e acessórias que contribuem para infectividade viral, ativação das células do hospedeiro e manutenção de altas cargas virais (Quadro 1.1) (Dustin et al., 2011).

O genoma possui ainda, em cada extremidade, uma região chamada LTR (*Long Terminal Repeats*), cujas sequências são importantes na produção de novos vírions e na integração do DNA proviral no DNA cromossômico do hospedeiro (Seiki et al., 1983). O DNA proviral do HTLV-1 possui 9032 pares de base (pb) enquanto o HTLV-2, 8952 pb.

Em 2009, foi descoberto um fator de transcrição *antisense* chamado de HBZ (HTLV-1 *basic zipper factor*). A ação da proteína HBZ está relacionada com a patogênese da infecção do HTLV estimulando a proliferação de células infectadas e estaria associada à oncogênese na infecção pelo vírus (Matsuoka e Green, 2009).

A similaridade entre HTLV-1 e HTLV-2 é maior na região dos genes tax e rex, sendo aproximadamente 75%, e menor na região LTR, cerca de 30%. A variabilidade genética observada em amostras tanto de HTLV-1 quanto de HTLV-2, tem levado à descrição de subtipos e subgrupos que podem fornecer maiores informações sobre as relações evolutivas entre eles (Rosenblatt et al., 1984).

Quadro 1.1 - Distribuição dos genes pX do HTLV, suas proteínas e funções. Modificado de Martins et al (2010)

ORFs	PROTEÍNA	FUNÇÃO
pX I	p12	Ativação da STAT5, aumentar o cálcio intracelular.
pX II	p30 e p13	Inibição da atividade da acetiltransferase e estabilização da p53.
pX III	Rex (p27/p21)	Regular a expressão das proteínas do HTLV; estabilizar, modular o processamento e o transporte do RNAm do núcleo.
pX IV	Tax (p40)	Transativador dos produtos dos genes virais e celulares.

Caracterização Gênica

Em relação a outros retrovírus, o HTLV possui alta estabilidade genética que pode ser explicada, por exemplo, pela sua forma de replicação (expansão clonal de células infectadas). Aliado a isso, acredita-se que a taxa de mutação do HTLV, seja aproximadamente de 1% em 1000 anos, o que pode contribuir para tal condição (Gessain et al., 1992). A região TAX do HTLV representa a área mais conservada do genoma viral, enquanto a região LTR representa a de maior variabilidade. Por apresentar tal variabilidade, as sequências dessa região são favoritas para estudos de caracterização genotípica e análises evolutivas desse vírus (Santos e Lima, 2005).

Baseado em estudos filogenéticos da região LTR, foi possível identificar sete subtipos de HTLV-1: HTLV-1a, HTLV-1b, HTLV-1c, HTLV-1d, HTLV-1e, HTLV-1f e HTLV-1g. O subtipo HTLV-1a é dividido em cinco subgrupos: A, B, C, D e E, conforme suas distribuições em diferentes regiões geográficas (Verdonck et al., 2007). A identificação dos subtipos e subgrupos do HTLV está diretamente relacionada com a sua origem geográfica e não a

patogênese viral. Portanto, o estudo da epidemiologia molecular do HTLV tem possibilitado um maior conhecimento quanto a origem, evolução e disseminação desse vírus.

Ciclo de Replicação

O HTLV é um retrovírus e de acordo com a classificação de Baltimore (Baltimore, 1971), ele pertence a Classe VI por apresentar RNA de fita simples positiva, com DNA intermediário no ciclo biológico do vírus.

Após penetrar no hospedeiro o HTLV infecta preferencialmente as células TCD4+ por um processo chamado de fusão, onde o envelope do vírus se funde à membrana da célula hospedeira para entrada do capsídeo viral (Figura 1.3). Após penetrar na célula, ocorre desnudamento e seu material genômico (duas fitas simples de RNA positivas) e as enzimas transcriptase reversa, integrase e protease, iniciam o processo de replicação. Com auxílio da transcriptase reversa, uma fita é transcrita em RNA-DNA e depois em DNA-DNA, formando o pró-vírus. A integrase faz a clivagem na extremidade 3' e o leva para o núcleo, onde será integrado ao genoma celular. Após isso, a célula produz RNA mensageiro e ocorre a produção de proteínas e enzimas necessárias para novas cópias virais. Ocorre a montagem do vírus e a saída da célula é feita através do mecanismo de brotamento (Lairmore e Franchini, 2007).

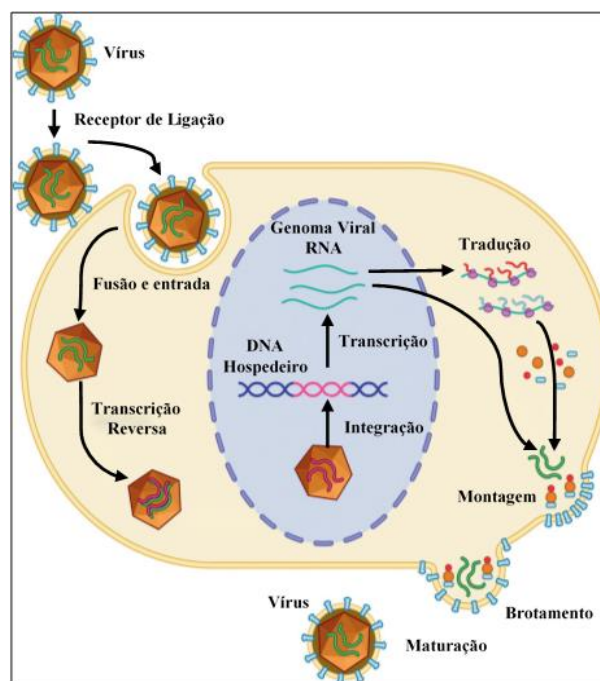


Figura 1.3: Ciclo de Replicação do HTLV. Modificado de Lairmore et al (2012).

1.3 Epidemiologia

Em 2012, Gessain e Cassar, estimaram entre 5 a 10 milhões de pessoas portadoras do HTLV-1 no mundo. Esse resultado baseou-se em diversos estudos de prevalência desse vírus realizados em diferentes regiões. O número de pessoas afetadas pode ser ainda maior, uma vez que os estudos de prevalência são realizados em grupos específicos, como doadores de sangue, usuários de drogas intravenosas, gestantes e indígenas. Dessa forma, sem estudos populacionais amplos, determinar a prevalência mundial do HTLV torna-se muito difícil e os dados levantados variam de acordo com a região geográfica, fatores de riscos de cada indivíduo e aspectos sócio demográficos da população estudada (Gessain e Cassar, 2012). Os HTLV-1 e 2 são os tipos com maior prevalência, tendo o HTLV-1 sete diferentes subtipos identificados e o HTLV-2, quatro subtipos (Eiraku et al., 1996; Salemi et al., 1996; Vandamme et al., 1998).

Estudos demonstraram que o PTLV originou-se em primatas africanos e depois migrou para a Ásia onde evoluiu para o STLV-1 (Figura 1.4). O STLV-1 disseminou-se para a Índia, Japão, Indonésia e retornou para a África. Na África, após inúmeras transmissões interespecíes, o STLV-1 evoluiu dando origem ao HTLV-1a, HTLV-1b, HTLV-1d, HTLV-1e, HTLV-1f e HTLV-1g. O subtipo HTLV-1c teve sua origem a partir do contato entre símios e humanos indonésios que migravam para a Melanésia. O tráfico de escravos e o aumento da mobilidade populacional, podem ter contribuído para a disseminação do HTLV-1a para diferentes áreas como Novo Mundo, Japão e Oriente Médio (Verdonck et al., 2007).

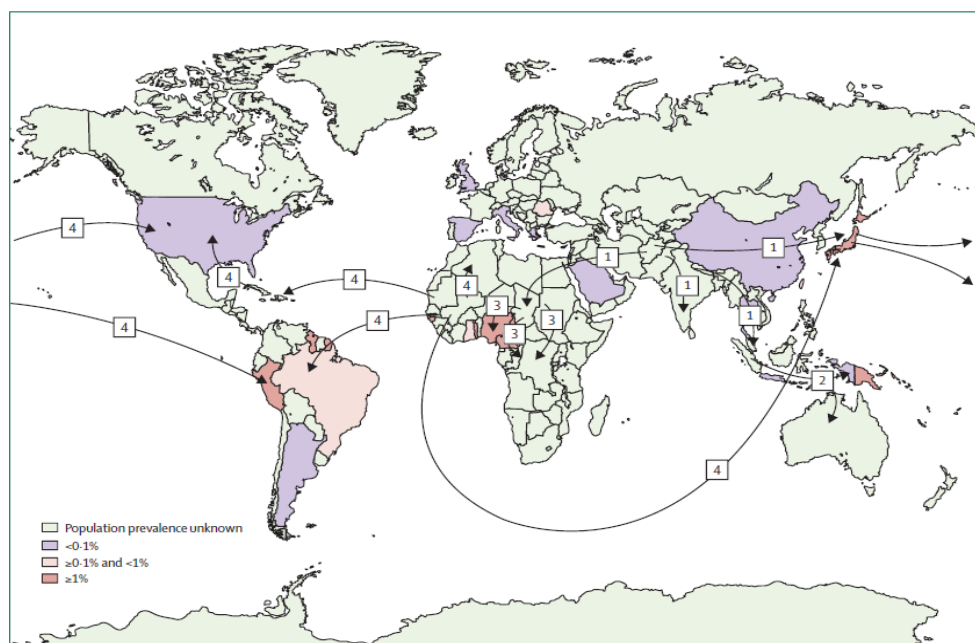


Figura 1.4: Origem e disseminação do HTLV-1 (Verdonck et al., 2007).

O subtipo HTLV-1a, ou Cosmopolita, é encontrado em diferentes regiões geográficas (Miura et al., 1994; 1997); o HTLV-1b, em populações da África Central (Hahn et al., 1984; Vandamme et al., 1994); o HTLV-1c, em populações da Papua Nova Guiné e aborígenes australianos (Gessain et al., 1991; Bastian et al., 1993); o HTLV-1d, identificado no Gabão e em pigmeus de Camarões (Chen et al., 1995; Mahieux et al., 1998); o HTLV-1e, em pigmeus do Congo; HTLV-1f, identificado no Gabão (Salemi et al., 1998), e o HTLV-1g, descrito na África Central (Wolf et al., 2005).

Áreas com maior prevalência do HTLV-1 incluem o Japão, Ilhas do Caribe (Jamaica e Trinidad e Tobago), África Equatorial, Irã, Melanésia e América do Sul (Blattner et al., 1990; Mueller et al., 1996; Gessain e Cassar, 2012). De acordo com a distribuição geográfica, o HTLV-1a possui cinco subgrupos: A ou Transcontinental que está presente em todo o mundo, com exceção da Melanésia e Norte e Oeste da África; B ou Japonês encontrado no Japão, Brasil, Peru, Chile e Colômbia; C ou Oeste-africano, presente no oeste da África, Caribe e Guiana Francesa; D ou Norte-africano encontrado somente no norte da África (Gasmi et al., 1994; Miura et al., 1994; Vidal et al., 1994) e E, que foi isolado em negros do Peru (Van Dooren et al., 1998). Recentemente, foi identificado no Brasil o HTLV-1b pertencente ao clado 1b da África Central (Zanella et al., 2012).

Assim como no HTLV-1, análises filogenéticas da região LTR do HTLV-2 possibilitaram a identificação de subtipos, são eles: HTLV-2a, b, c, d. Os subtipos 2b e 2c possuem a proteína Tax com tamanhos similares, 356 aminoácidos. O subtipo 2a apresenta Tax com 25 aminoácidos a menos devido uma mutação e o 2d codifica Tax com 344 aminoácidos (Eiraku et al., 1996; Feuer e Green, 2005).

O HTLV-2 é mais prevalente no hemisfério ocidental, endêmico em alguns grupos indígenas das Américas e também entre usuários de drogas intravenosas dos Estados Unidos e da Europa. Estudos descreveram elevadas prevalências do HTLV-2 em populações de Ameríndios das Américas do Norte, Central e do Sul (Carneiro-Proietti et al., 2002). Os subtipos 2a e 2b são prevalentes na Ásia e Europa, sendo identificados, principalmente, em usuários de drogas intravenosas (Figura 1.5). Esses subtipos também são prevalentes em ameríndios e usuários de drogas nos Estados Unidos e podem ser encontrados esporadicamente na África. O subtipo 2b foi identificado no Rio Grande do Sul em regiões de fronteira com outros países da América do Sul, como Argentina e Uruguai, onde esse subtipo é prevalente. O subtipo 2c foi identificado somente no Brasil, tanto em populações indígenas da Amazônia

quanto em doadores de sangue de todo o país (Ishak et al., 1998). Em populações urbanas sua prevalência é menor quando comparado ao HTLV-1, enquanto, em indígenas, a infecção pode chegar a 41.2%. O 2d foi isolado em nativos da África Central (Roucoux e Murphy, 2004; Renner et al., 2006).

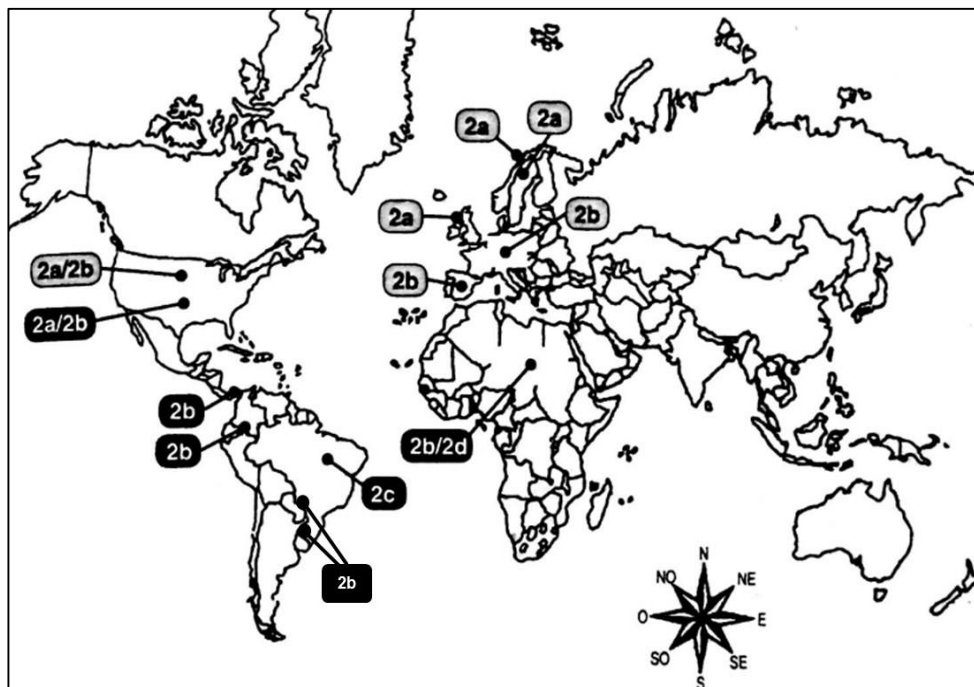


Figura 1.5: Disseminação e distribuição mundial do HTLV-2. Modificado de Roucoux e Murphy (2004).

Em áreas endêmicas, fatores epidemiológicos como idade e sexo, por exemplo, são importantes para determinar a prevalência dessa infecção. Em diferentes estudos, a maior prevalência foi observada em pessoas com faixa etária mais elevada e do sexo feminino, sendo esse resultado justificado pela aquisição mais tardia da infecção por via sexual e maior eficiência na transmissão do homem para mulher (Chavance et al., 1990; Nakashima et al., 1995; Kaplan et al., 1996). Não foi comprovada relação entre subtipos do HTLV e o desencadeamento de doenças associadas. Até o momento, foi comprovado que os polimorfismos genéticos não são marcadores clínicos dos portadores de HTLV, mas podem ser utilizados como marcadores para os subgrupos desse vírus (Iñiguez et al., 2010). Logo, subtipos são importantes em estudos sobre origem geográfica, distribuição e disseminação dos vírus.

O HTLV no Brasil

Estudos filogenéticos sugerem que o HTLV-1 tenha chegado ao Brasil através do tráfico de escravos africanos e sua prevalência pode ter aumentado com a chegada da imigrantes japoneses. Sugerem ainda que o HTLV-2 teria chegado antes, provavelmente, com a imigração asiática ainda no período pré-colombiano. Ambos são prevalente em todo o país, porém como ocorre em outras regiões do mundo, no Brasil, os estudos de soroprevalência de HTLV são feitos em grupos populacionais específicos como doadores de sangue, gestantes e grupos indígenas, não havendo estudos em populações abertas (Catalan-Soares et al., 2005).

O primeiro estudo de soroprevalência do HTLV foi publicado em 1986, onde foi avaliada prevalência de anticorpos para HTLV nas cidades de São Paulo e Campo Grande, em populações de emigrantes japoneses da região de Okinawa e seus descendentes. O resultado dessa pesquisa, demonstrou prevalência de anticorpos positivos em 13% dessas populações (Kitagawa et al., 1986).

O Brasil é considerado a maior área com potencial endêmico para o HTLV-1 e doenças associadas. Isso pode ser explicado devido as proporções geográficas do país e o seu número de habitantes em torno de 200 milhões (Gessain e Casar, 2012). Além disso, a infecção pelo HTLV já foi relatada em todos os estados brasileiros e a prevalência foi estimada em 2,5 milhões de indivíduos portadores (Figura 1.6) (Catalan-Soares et al., 2005).

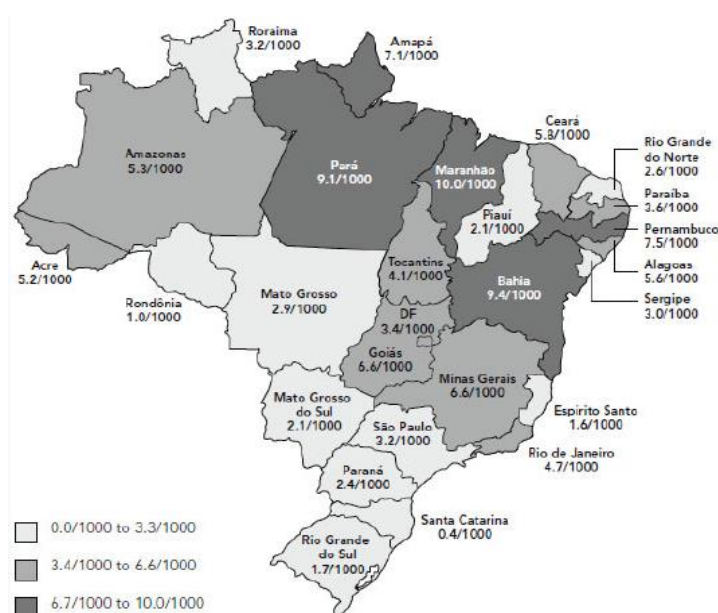


Figura 1.6: Soroprevalência do HTLV-1 e 2 entre doadores de sangue no Brasil. Catalan-Soares et al. (2005)

De modo em geral, estudos realizados em grande população de doadores de sangue demonstraram soroprevalência variando entre 0,4 e 1%, dependendo da localização geográfica. A prevalência do HTLV-1 encontra-se maior no Norte e Nordeste do Brasil. Salvador, na Bahia, onde a maioria dos habitantes são descendentes africanos, é considerada a cidade brasileira com maior prevalência global de HTLV-1 no país (cerca de 1,3% em doadores de sangue e 1,8% na população geral da cidade). No Rio de Janeiro, um estudo entre 1995 e 2000 evidenciou prevalência de 0,47%. Em mulheres grávidas, a prevalência varia de 0,1% a 0,8% dependendo da área estudada (Figura 1.6) (Catalan e Soares, 2005; Gessain e Cassar, 2012).

1.4 Transmissão do HTLV

A transmissão do HTLV ocorre por três vias principais: 1) via vertical, através do aleitamento materno, via transplacentária e no momento do parto; 2) via sexual, através de relações sexuais sem uso de preservativos, principalmente do homem para a mulher; 3) via parenteral, através de transfusão de sangue, compartilhamento de agulhas por usuários de drogas injetáveis (UDI), ou contato com material perfurocortante com sangue contaminado; (Figura 1.7) (Paiva e Casseb, 2014).

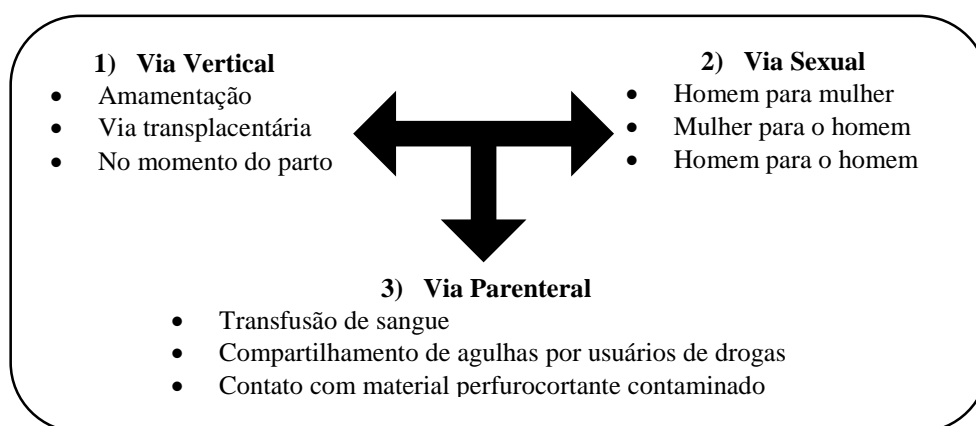


Figura 1.7: Formas de Transmissão do HTLV-1 e HTLV-2. Modificado de Paiva e Casseb (2014).

A transmissão pela via vertical ocorre principalmente pela amamentação, porém pode ocorrer mais raramente por via transplacentária ou no momento do parto. Isolados de HTLV-1 e HTLV-2 já foram identificados em amostras de leite materno a partir de mães soropositivas, através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), onde detectou-se fragmentos do

gene pró-viral do HTLV-1 e 2. Essa transmissão ocorre pela ingestão de células presentes no leite materno, principalmente linfócitos infectados, durante a amamentação. Além disso, o risco de transmissão é proporcional ao tempo de amamentação, como demonstram alguns estudos onde 32% das crianças que amamentaram por mais de 12 meses contraíram a infecção. Em contrapartida, 9% das crianças infectadas amamentaram por menos de 12 meses. (Wiktor et al., 1997)

Pesquisadores sugerem que os anticorpos maternos transmitidos para crianças persistem em títulos elevados até cerca de 6 meses e isso poderia conferir certo grau de proteção contra a transmissão. Em outro estudo realizado no Japão, 3,9% das crianças que foram amamentadas por 6 meses ou menos sofreram soroconversão, contra 20,3% que foram amamentadas por um período maior que 6 meses (Takezaki et al., 1997). Cerca de 25% da transmissão vertical, ocorre através da amamentação e apenas 5% ocorre por via transplacentária e no momento do parto. Estudos realizados no Japão, descreveram que 20% das crianças que foram amamentadas no seio materno contraíram a infecção pelo HTLV, em contraste com 3% que amamentaram com leite artificial (Hino et al., 1994). No Brasil, a gestante portadora de HTLV é orientada a não realizar a amamentação e encaminhada ao Banco de Leite Humano. A Rede Brasileira de Banco de Leite Humano disponibiliza, em todo Brasil, leite materno gratuito para mães que não podem amamentar seus filhos. Antes da sua distribuição, o leite é triado e analisado para a presença de anticorpos para HTLV e outras doenças transmissíveis por essa via.

Sendo o HTLV uma doença crônica que até o momento não possui tratamento efetivo, a amamentação torna-se a principal forma de controle da infecção com grande importância na saúde pública e a sua prevenção pode impactar diretamente na redução da incidência da infecção. As mães soropositivas que não amamentam seus filhos, podem contribuir para a redução no número de casos novos e também na redução de casos de leucemia/linfoma de células T do adulto (ATLL), uma vez que a infecção precoce aumenta o risco de ATL (Furnia et al., 1999; Maloney et al., 2003). Outro fator importante na transmissão vertical é o antígeno leucocitário humano de classe 1 (HLA-1). O risco de transmissão da infecção do HTLV pelo leite materno aumenta quanto maior for a concordância do HLA-1 da mãe e do filho, independente do tempo de amamentação e da carga pró-viral materna. Isso ocorre, provavelmente, porque os antígenos de células maternas são reconhecidos pelas células do recém-nascido como próprios do organismo (Biggar et al., 2006).

Apesar de ocorrer em menores porcentagens, a transmissão intrauterina é uma realidade

a ser pesquisada. Apesar do DNA pró-viral já ter sido isolado em células do cordão umbilical de recém-nascidos de mães HTLV positivas, um estudo descreveu que a soroconversão não ocorreu em um grupo de crianças foi acompanhada pelo período de 48 meses. Sendo assim, isolados de DNA pró-viral no cordão umbilical talvez não seja um bom marcador de transmissão intrauterina (Katamine et al., 1994).

As taxas de infecção do HTLV-1 através da placenta e no sangue do cordão umbilical diferem bastante. Um estudo realizado com placentas de nove mulheres observou que a infecção ocorreu em duas dessas pacientes, sugerindo que exista um sistema de barreira placentária contra a transmissão do vírus da mãe para o filho durante a gestação. Entretanto, os mecanismos pelos quais a placenta atuaria como barreira contra a transmissão do HTLV ainda não foram totalmente esclarecidos (Fujino e Nagata, 2000).

A transmissão pela via sexual pode estar associada a vários fatores, como: comportamento de risco, múltiplas parcerias, parceiro sexual de área endêmica para HTLV, certos tipos de práticas sexuais e histórico de outras doenças sexualmente transmissíveis sejam elas ulcerativas (ex. herpes ou sífilis) ou não ulcerativas (ex. uretrite gonocócica ou não gonocócica). Além disso, estudos observaram outros fatores, como: o tempo prolongado de contato sexual entre parceiros sorodiscordantes, a alta carga pró-viral no sangue e os altos títulos de anticorpos para HTLV, possivelmente relacionados ao estado de replicação viral induzido pela *tax* e mediado indiretamente pelo anticorpo anti-*tax*. Observou-se ainda que casais sorodiscordantes nos quais a mulher negativa tem um parceiro positivo com mais de 60 anos existiria um risco aumentado em 12 vezes de se infectarem (provavelmente pela maior carga pró-viral encontrada em homens acima dessa idade) e em mulheres na pós-menopausa devido às mudanças no epitélio da mucosa vaginal (Paiva e Casseb, 2014).

Estudos demonstraram que o HTLV-1 é mais eficientemente transmitido do homem para a mulher do que da mulher para o homem, tendo como fator principal partículas virais presentes no esperma. Um estudo realizado com cônjuges no Japão, em um período de 10 anos, apontou para uma taxa de transmissão do HTLV-1 do homem para a mulher de 60,8% enquanto a taxa de transmissão da mulher para o homem foi de 0,4% (Kajiyama et al., 1986). Entretanto, em um estudo mais recente realizado com 30 casais sorodiscordantes, acompanhados num período de 10 anos, não foi encontrada diferenças significativas nas taxas de transmissão entre HTLV-1. Esse resultado pode significar uma relação diferente, as quais as taxas de transmissão são similares entre o homem e a mulher. Novos estudos estão sendo realizados para melhor

compreensão nessa dinâmica de transmissão, uma vez que nos primeiros estudos não haviam testes com altas taxas de sensibilidade e especificidade como nos mais recentes (Roucoux et al., 2005). A transmissão sexual ocorrendo de homem para homem foi demonstrada em um estudo em Trinidad e Tobago, onde a prevalência de infecção pelo HTLV-1 foi de 15%, comparada a 2,4% na população geral (Bartholomew et al., 1987).

O HTLV-2 possui os mesmos mecanismos de transmissão do HTLV-1, porém, o compartilhamento de agulhas entre usuários de drogas injetáveis representa o maior risco de transmissão para esse vírus. Por este motivo, estudos sobre a prevalência de transmissão do HTLV-2, tornam-se mais difíceis. Em 2005, Roucoux e colaboradores demonstraram em um estudo com 55 casais sorodiscordantes acompanhados por um período de 10 anos, a soroconversão de dois casos, sendo um deles do homem para mulher e o outro da mulher para o homem. Não houve diferença estatística significativa quando comparado com a infecção pelo HTLV-1 (Roucoux et al., 2005).

Na via parenteral, a transfusão de sangue significa uma via de grande importância para transmissão do HTLV. Como a multiplicação do HTLV no hospedeiro ocorre, principalmente, de célula a célula, e muito menos a partir de partículas virais livres, o concentrado de hemácias, o sangue total e o concentrado de plaquetas, tornam-se os componentes mais facilitadores de transmissão. Em contrapartida, os hemoderivados acelulares (crioprecipitado e plasma) representam menor risco de transmissão. O tempo de estocagem dos hemoderivados também deve ser considerado um fator que pode reduzir ou aumentar o risco de transmissão através dessa via. Estudos demonstraram que a estocagem de hemoderivados por mais de 14 dias em condições de refrigeração reduz a capacidade de transmissão do vírus, provavelmente porque diminui a viabilidade dos leucócitos. Por outro lado, o risco pode aumentar em torno de 47% quando os componentes são armazenados por um menor período. Pacientes com imunodeficiência a partir de qualquer etiologia, também estão mais susceptíveis à infecção por hemoderivados (Manns et al., 1989).

No Brasil, antes de 1993, a transfusão de sangue era considerada uma importante via de infecção, a partir desse ano, a realização do teste imunoenzimático ELISA anti-HTLV tornou-se obrigatório nas triagens de sangue em hemocentros (Gonçalves et al., 2010). Essa obrigatoriedade está implantada em diversos países, principalmente em regiões de endemicidade. Desde 1986, o Japão utiliza a triagem do HTLV nos bancos de sangue. Outros países como, por exemplo, Estados Unidos, Canadá, Caribe, França e Austrália também

iniciaram esses testes antes do Brasil. Nos países com baixa prevalência para infecção pelo HTLV, essa prática ainda está sendo discutida por conta da relação custo-benefício, já que representam baixo risco de transmissão (Ureta-Vidal et al., 1999; Namen-Lopes et al., 2009; Gonçalves et al., 2010).

O compartilhamento de seringas por usuários de drogas injetáveis e o contato com material perfurocortante com sangue contaminado, representam importante prevalência da infecção pelo HTLV. O maior número de casos é observado entre usuários de drogas injetáveis e muitos estudos evidenciaram a ocorrência da infecção pelo HTLV-2 nesse grupo na América do Norte e Europa. No Brasil e em Nova Iorque, prevalece a infecção pelo HTLV-1 nesse grupo. Entretanto, ainda não sabemos a real prevalência do HTLV em usuários de drogas no Brasil, pois faz-se necessários estudos exclusivos para essa população de risco (Lee et al., 1989, 1990; Murphy et al., 1998).

1.5 Diagnóstico Laboratorial

O diagnóstico da infecção pelo HTLV é baseado em testes sorológicos que são capazes de detectar anticorpos específicos contra o vírus ou em métodos moleculares, como a reação em cadeia pela polimerase (PCR) (Sabino e Carvalho, 2010). Os exames sorológicos são classificados em duas categorias: os testes de triagem e os confirmatórios. Os exames de triagem identificam anticorpos contra o HTLV, porém, não diferenciam entre os seus tipos. Esses exames, quando utilizados em população de baixo risco, onde o valor preditivo positivo pode ser muito baixo, necessitam de confirmação. Somado a isso, a grande homologia genética entre o HTLV-1 e o HTLV-2, faz-se necessário o uso de exames sorológicos confirmatórios que são capazes de diferenciar a infecção como sendo provocada pelo HTLV-1, HTLV-2 ou ainda descartar os casos falso-positivos (Salles et al., 2003).

Ensaio Imunoenzimático

O teste imunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) é o exame mais utilizado em triagens sorológicas, onde anticorpos específicos são adsorvidos a uma placa de poliestireno, incubados com o soro em teste e um conjugado marcado com uma enzima (Wiktor et al., 1990; Cossen et al., 1992). A reação é lida como positiva dependendo da

densidade colorimétrica, medida em densidade ótica (OD) gerada pela enzima, a partir de um valor de corte determinado, ou seja, *cut-off* (CO). Essa leitura é realizada através de um espectrofotômetro. Em alguns casos, os resultados podem ser inconclusivos, necessitando, assim de outros métodos complementares. Essa técnica é simples e possui alta sensibilidade e especificidade para o HTLV-1, cerca de 99,5% e 99%, respectivamente. No HTLV-2, a sensibilidade e especificidade gira em torno de 55 a 90% (Cossen et al., 1992).

Atualmente, nos testes de segunda geração, utiliza-se peptídeos sintéticos do envelope viral e/ou proteínas recombinantes como antígenos para aumentar a sensibilidade. Alguns testes utilizam proteínas recombinantes e peptídeos sintéticos com a finalidade de melhorar a especificidade. Para tentar aumentar a sensibilidade para o HTLV-2, proteínas específicas estão sendo utilizadas pelos testes mais modernos. Os resultados positivos resultantes dessa técnica, deverão ser repetidos e a amostras que permanecerem positivas deverão ser submetidas a testes confirmatórios (Poiesz et al., 2000).

Reações de Aglutinação

Esse teste caracteriza-se pela utilização de partículas de gelatina e/ou de látex sensibilizadas com antígenos virais inativados. Utilizado em alguns países como teste de triagem, a reação de aglutinação baseia-se na ligação entre partículas sensibilizadas e anticorpos anti-HTLV que encontram-se no soro ou plasma de portadores de vírus. Trata-se de uma técnica de alta sensibilidade (83%) e de fácil execução, porém não diferencia o tipo de vírus causador da infecção. Além disso, os resultados positivos devem ser certificados com testes confirmatórios (Fujino et al., 1991).

Western blot (WB)

O *WB* é o ensaio mais utilizado dentre os exames confirmatórios para HTLV, tendo sensibilidade de 97,1% e especificidade de 92,5%. (Sabino e Carvalho, 2010). Essa técnica é capaz de diferenciar anticorpos para diferentes antígenos virais, obtidos a partir de culturas de células infectadas, separados eletroforéticamente segundo seu peso molecular e carga elétrica e aderidos a suporte sólido de nitrocelulose. Esse material de nitrocelulose é cortado em tiras e as mesmas são incubadas num ensaio imunoenzimático, onde é possível observar nos pacientes

positivos, as bandas correspondentes aos diferentes antígenos virais (Quadro 1.2). Esse teste tem como vantagem diferenciar as infecções pelo HTLV-1 e pelo HTLV-2 e ainda confirmar ou excluir os casos de pacientes que tiveram o teste de triagem reagente (Yao et al., 2006).

Quadro 1.2 – Proteínas do HTLV usadas no critério de interpretação do teste de *Western blot*.
Modificado de Sabino e Carvalho (2010)

Banda	Gene	Características
gp21	<i>env</i>	Proteína transmembrana
gp46	<i>env</i>	Proteína de superfície
rgp46-I	<i>env</i>	Proteína recombinante da gp46 específica para HTLV-1
rgp46-II	<i>env</i>	Proteína recombinante da gp46 específica para HTLV-2
p24	<i>gag</i>	Proteína do capsídeo viral
p19	<i>gag</i>	Proteína da matriz viral
gd21	<i>pol</i>	Proteína recombinante que corresponde a uma parte da gp21

Para o teste *WB*, a Organização Mundial de Saúde (OMS) definiu como critério de positividade a reatividade à proteínas da região *gag* (p19 e/ou p24) e proteínas do envelope viral (gp46 e gp21). A diferenciação entre infecção pelo HTLV-1 e HTLV-2, ocorre através da positividade para as proteínas recombinantes rgp46-I e rgp46-II, sendo a infecção causada pelo HTLV-1 e HTLV-2, respectivamente.

Quando uma amostra apresenta resultado positivo no *WB*, porém não ocorre a diferenciação entre os tipos de HTLV, esse resultado é chamado de *WB* não-tipado. Se uma amostra apresenta reação para uma ou mais proteínas, mas não completa o critério de positividade, o resultado é chamado *WB* Indeterminado. Nesses casos, o teste molecular PCR é utilizado como referência para distinguir a infecção por diferentes tipos de HTLV. A caracterização das amostras com *WB* indeterminado é de extrema importância para epidemiologia desse vírus, porque esse resultado pode representar a presença de cepas virais diferentes dos HTLVs já isolados (Sabino et al., 1999). Em 2005, amostras de sangue total de indivíduos que viviam em Camarões, na África Central, apresentaram sorologia reagente para HTLV e *WB* indeterminado. Essas amostras foram, posteriormente, testadas pela técnica da

PCR e identificadas como HTLV-3 e HTLV-4, dois tipos que ainda não haviam sido isolados (Mahieux e Gessain, 2005).

O resultado indeterminado pode ocorrer devido:

1) a ausência de resposta sorológica completa em pacientes imunodeprimidos ou portadores do HTLV-2;

2) durante a fase de soroconversão;

3) na presença de cepas virais diferentes dos já isolados; e 4) na reação cruzada com outros agentes infecciosos como *Plasmodium falciparum* em áreas endêmicas. O *WB* possui alto custo e essa pode ser uma de suas maiores desvantagens (Mahieux et al., 2000).

Muito similar ao *WB*, existe o *Imunoblot* que tornou-se muito promissor por utilizar apenas proteínas específicas. Tratam-se de técnicas semelhantes e de alto custo, porém, o *Imunoblot* possui alto poder de discriminação favorecendo menores números de resultados indeterminados (Sabino et al., 1999 e Thorstensson et al., 2002).

Imunofluorescência Indireta (IFI)

Devido a sua alta sensibilidade e especificidade (ambos de 99%), também pode ser utilizada como teste confirmatório para as amostras com resultado ELISA reagente. Como desvantagem, o resultado dessa técnica necessita da habilidade de leitura do técnico e além disso, não faz a identificação de anticorpos contra antígenos virais específicos. Sendo assim, seu resultado positivo indica apenas a presença de anticorpos contra o HTLV (Sabino e Carvalho, 2010).

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A técnica da PCR é considerado o método mais adequado para a realização do diagnóstico da infecção do HTLV pelo método molecular. Isso ocorre porque essa técnica é baseada na detecção do ácido nucléico viral na forma de DNA pró-viral. O HTLV não apresenta viremia plasmática, ou seja, presença de RNA viral circulante em grandes quantidade no plasma ou no soro (Liu et al., 1999).

Como escrito anteriormente, no momento da infecção, o HTLV integra-se ao DNA da célula hospedeira e passa a ser chamado de DNA pró-viral. Com base nesse comportamento do vírus, o uso de células mononucleares do sangue periférico é o método de escolha para o diagnóstico molecular do HTLV. Logo, é necessária a utilização de sangue total como amostra.

A reação da PCR apresenta alta sensibilidade (99,4%) e especificidade (98,5%) e baseia-se na amplificação exponencial de uma determinada sequência genômica de DNA pró-viral alvo. A técnica é dependente da enzima *Taq* DNA polimerase, dos iniciadores ou *primers* e das bases nucleotídicas (A, T, C e G). Os produtos da PCR podem ser visualizados por eletroforese em gel de agarose ou poliacrilamida. Pode ser empregada também, em amostras que necessitem da confirmação da infecção, para fazer a diferenciação entre infecções por HTLV-1, HTLV-2 e pelos novos tipos: HTLV-3 e HTLV-4, através de etapas adicionais: uso de iniciadores específicos para cada tipo específico de HTLV e sequenciamento de nucleotídeo do genoma pró-viral (Lee et al., 2004).

Na suspeita de transmissão vertical, a técnica da PCR é muito utilizada por não ter interferência dos anticorpos maternos, o que acontece em testes como *WB* e a IFI. Auxilia também para o diagnóstico da infecção precoce, antes do surgimento da soroconversão, na detecção de novos tipos de HTLV, e na resolução de casos de *WB* indeterminado.

Assim como ocorre no exame da PCR para HTLV, para a detecção do DNA pró-viral em amostras de sangue total, pode-se usar a abordagem *nested-PCR*. Nessa abordagem é possível detectar oito cópias de pró-vírus em 10^6 células (Yamano et al., 2002). Outra metodologia derivada da PCR, a PCR em tempo real, utiliza-se de sondas luminescentes para detectar o produto da PCR no termociclador no momento em que a reação de amplificação está acontecendo. Esse método é capaz de detectar e quantificar a carga pró-viral, auxiliando no acompanhamento do paciente, visto que estudos sugeriram que cargas virais altas possam estar associadas à progressão da doença (Yamano et al., 2002).

Algoritmo de Diagnóstico

Segundo o Guia de Manejo Clínico do Paciente com HTLV de 2004, o Ministério da Saúde determina como algoritmo para o diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV, três etapas:

Etapa I – Triagem Sorológica

1. Amostras não reagentes terão seus resultados definidos como Amostra Negativa para HTLV;
2. Amostras reagentes ou inconclusivas devem ser retestadas em duplicata, utilizando o mesmo conjunto de diagnóstico. Na retestagem em duplicata:
 - 2.1 Amostras com dois resultados não reagentes terão seu resultado definido como Amostra Negativa para HTLV;
 - 2.2 Amostras cujo resultado inicial da triagem foi reagente ou inconclusivo, e que apresentarem os resultados reagente/reagente, reagente/não reagente, não reagente/reagente, reagente/inconclusivo, inconclusivo/reagente, inconclusivo/inconclusivo, inconclusivo/não reagente, não reagente/inconclusivo, deverão ser submetidas ao teste de *Western blot*.

Etapa II – Confirmação Sorológica (teste de *Western blot* para HTLV)

1. Amostras negativas no teste de *Western blot* terão seus resultados definidos como amostra negativa para HTLV-1 ou HTLV-2;
2. Amostras positivas no teste de *Western blot* terão seus resultados definidos como positiva para HTLV-1 ou HTLV-2, positiva não-tipada ou positiva para HTLV-1 e 2. Nestes dois últimos casos, recomenda-se que a amostra seja submetida à PCR;
3. Amostras indeterminadas no teste de *Western blot* terão seu resultado definido como “indeterminado para HTLV”. Neste caso, recomenda-se a realização da PCR.

Etapa III – Confirmação Molecular (Teste da PCR)

1. Amostras indeterminadas no teste de *Western blot* e negativas na PCR terão seus resultados definidos como “amostra negativa para HTLV-1 e 2”;
2. Amostras indeterminadas no teste de *Western blot* e positivas na PCR terão seus resultados definidos como “amostra positiva para HTLV-1 e/ou HTLV-2”;
3. Amostras cujos resultados foram positivos não tipados no teste de *Western blot* e negativas na PCR terão seus resultados definidos como “amostra negativa para HTLV-1/2”;
4. Amostras cujos resultados foram positivos não tipados no teste *Western blot* e positivas

na PCR terão seu resultado definido como “amostra positiva para HTLV-1 e/ou HTLV-2”.

A figura 1.8 descreve o algoritmo de diagnóstico.

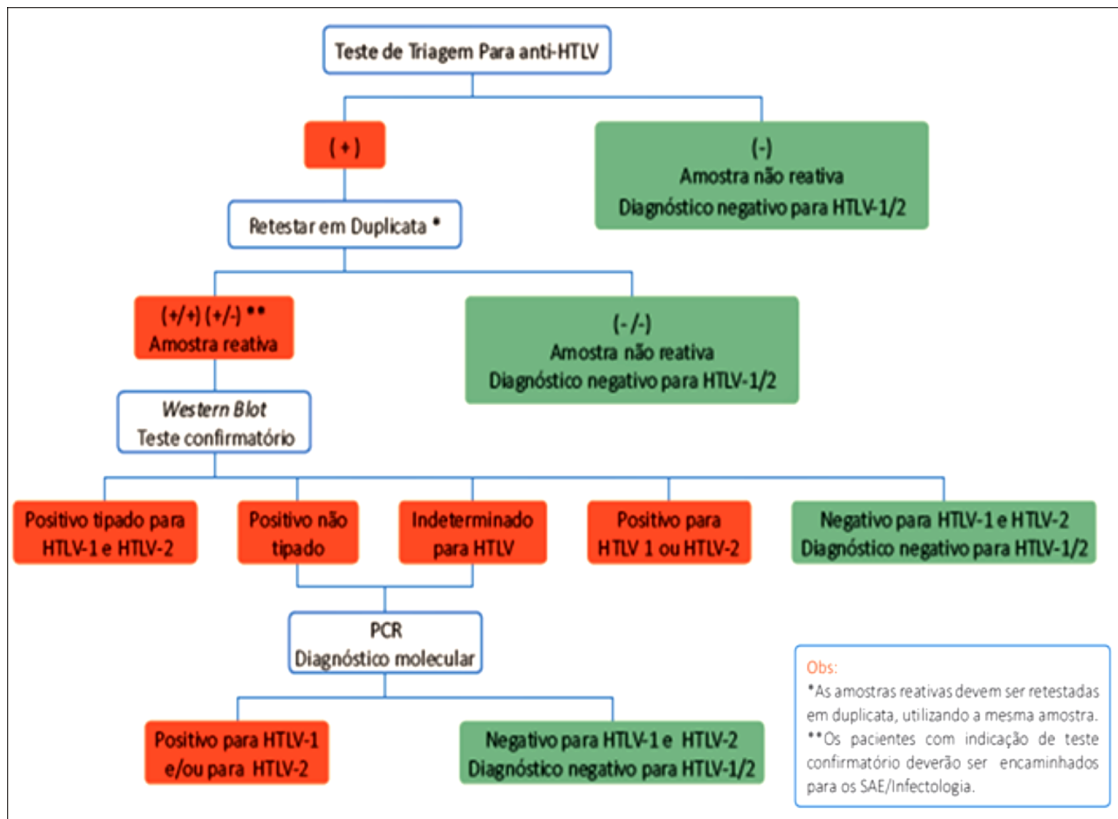


Figura 1.8: Algoritmo de Diagnóstico para HTLV, conforme Manejo Clínico HTLV.

Fundação Hemominas (2013).

1.6 Doenças Associadas

A infecção pelo HTLV não significa necessariamente que o portador desencadeie um processo patogênico relacionado a esse vírus. A maioria dos portadores, cerca de 95%, permanece assintomático por toda a vida e somente uma minoria desenvolve síndromes clínicas associadas ao HTLV (Verdonck et al., 2007).

Alguns aspectos sobre o desenvolvimento de doenças associadas à infecção pelo HTLV, ainda necessitam de maiores esclarecimentos. Portanto, fatores de risco como a idade, via de transmissão e resposta imune do hospedeiro, por exemplo, podem significar uma forma indicativa para a ocorrência de algumas doenças associadas. A incidência de doenças associadas varia conforme a região geográfica estudada (Gessain e Cassar, 2012).

Na infecção pelo HTLV-1, estima-se que o desenvolvimento da mielopatia seja, em torno de 0,3 a 4% e de 1 a 5% para o surgimento de Leucemia/linfoma de células T do adulto. De maneira em geral, aproximadamente 95% dos portadores não desenvolvem doenças associadas. Entretanto, o risco geral para quaisquer doenças associadas como mielopatia, uveíte, leucemia/linfoma de células T do adulto, polimiosite e artropatia, pode chegar aos 10% (Kaplan et al., 1990; Lairmore et al., 2012).

Diferente do que é observado no HTLV-1, a infecção pelo HTLV-2 é considerada de menor gravidade. Porém, existem relatos de portadores que apresentaram quadro leve de doença neurológica ou ainda com maior incidência de infecções. Logo, torna-se muito importante o diagnóstico confirmatório e o acompanhamento do paciente com HTLV-2 (Murphy et al., 1998; Roucoux e Murphy, 2004).

As doenças associadas podem ser divididas em três categorias: doenças neoplásicas, doenças inflamatórias e doenças infecciosas. Muitas das doenças relatadas podem apresentar diferentes níveis de associação com o HTLV.

Doenças Neoplásicas

Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto (ATLL)

Descrita pela primeira vez no Japão por Takatsuki em 1977, após observação de casos

de leucemia/linfoma que não se enquadravam nos critérios de diagnósticos das neoplasias até então conhecidas. Logo após a descoberta do HTLV-1, a leucemia/linfoma foi associado ao vírus por alguns critérios, como: 1) todos os pacientes com ATLL tinham anticorpos para HTLV-1; 2) áreas com alta incidência de ATLL estavam relacionadas à alta prevalência de infecção por HTLV-1; 3) o HTLV-1 infectava os linfócitos T CD4⁺ humanos e o DNA pró-viral do HTLV-1 foi encontrado em células neoplásicas de ATLL.

Descrita nas diferentes áreas endêmicas para o HTLV-1, a ATLL é mais prevalente no sudoeste do Japão. A faixa etária mais acometida varia conforme a região geográfica, sendo de 40 a 50 anos na América do Sul e Central e de 60 anos no Japão (Verdonck et al., 2007). Recentemente, um estudo de soroprevalência realizado em doadores de sangue no Japão, demonstrou uma queda de 10% em relação a observada em 1988. O declínio no número de portadores do HTLV-1 no Japão deve-se, provavelmente, às políticas de prevenção baseadas em controle de amamentação por mães portadoras do vírus. Uma vez que a infecção num momento precoce da vida, como na amamentação, pode representar cerca de 3% de chance no desenvolvimento da ATLL. A infecção de células imaturas em crianças pode aumentar o risco de transformação maligna dos linfócitos ao longo da vida (Tsukasaki e Tobinai, 2013).

A ATLL é uma neoplasia das células T CD4⁺ na qual o DNA pró-viral está integrado. A associação do HTLV-1 com a neoplasia é dependente da ação da sua proteína regulatória Tax, que induz, por várias vias, o crescimento/replicação anormal da célula hospedeira. Através da ligação da proteína Tax com fatores e cofatores de crescimento e replicação celular, a Tax promove a transcrição do seu genoma pró-viral, porém também promove a transcrição de genes celulares, incluindo citocinas e genes anti-apoptose (Tsukasaki e Tobinai, 2013).

Durante a infecção pelo HTLV, apenas uma pequena quantidade de célula expressa Tax, e essa expressão a torna alvo fácil para destruição através da resposta imune do hospedeiro. As proteínas Rex, HBZ e p30 regulam negativamente a expressão de Tax, protegendo as células infectadas da ação dos linfócitos T citotóxicos, porém, auxiliando na manutenção de clones de células mutadas. A continuidade desse processo por um longo período pode levar ao acúmulo de mutações num mesmo clone e desencadear a malignização dos linfócitos T, caracterizando assim, a ATLL (Figura 1.8) (Matsuoka e Green, 2009; Yoshida et al., 2010).

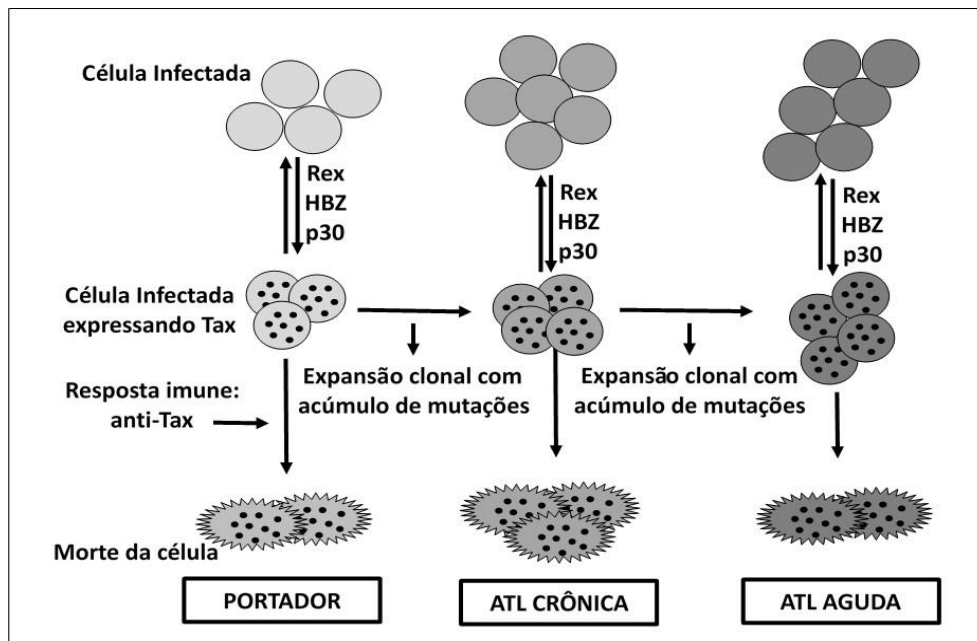


Figura 1.9: Modelo da patogênese ATLL na infecção pelo HTLV-1. Modificado de Yoshida et al. (2010).

Síndromes Inflamatórias

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

Antes da descoberta do HTLV, neurologistas já haviam descrito a ocorrência de uma mielopatia de causa desconhecida. A primeira descrição dessa síndrome ocorreu no século XIX e a sua associação com o HTLV-1 foi reconhecida independentemente no Caribe e Japão em 1985-1986, respectivamente. No Caribe, Gessain e colaboradores, observaram que 10 dos 17 pacientes que estavam sendo acompanhados com paraparesia espástica tropical (PET) possuíam anticorpos para HTLV-1. Um ano depois, o Japão relatou a associação entre o HTLV-1 e uma mielopatia crônica (MAH – mielopatia associada ao HTLV-1) (Gessain et al., 1985; Osame et al., 1986; Verdonk et al., 2007).

A PET/MAH é uma doença inflamatória crônica que causa lesões no sistema nervoso central e progride para enrijecimento e paralisia de membros inferiores. O risco de evolução para PET/MAH entre os infectados é de 2 a 3 %, ao longo da vida. É mais prevalente em mulheres por volta dos 40 anos de idade que adquiriram a infecção na idade adulta e pela via sexual. Para as mulheres, a progressão da síndrome pode ser mais rápida do que para os homens, principalmente, para as que iniciam a doença no período antes da menopausa. Pacientes que

possuem alta carga pró-viral no sangue e no líquor e resposta imune aumentada para o HTLV-1, podem apresentar evolução mais rápida. É pouco frequente em crianças, porém existem relatos de casos (Araújo e Silva, 2006).

A indução da mielopatia pelo HTLV-1 ainda não está completamente esclarecida. Os mecanismos que envolvem essa síndrome inflamatória ainda precisam ser mais estudados. Até o momento, três hipóteses podem explicar a patogênese:

1) da toxicidade direta, onde as células da glia infectadas apresentariam antígenos virais em sua superfície e linfócitos T CD8⁺ citotóxicos específicos para antígenos do HTLV-1 (principalmente para a proteína Tax) reconheceriam e atacariam estas células, levando a reação inflamatória e à sua morte;

2) da autoimunidade, as células da glia apresentariam uma proteína própria similar a um antígeno viral. Linfócitos T CD4⁺ atravessariam a barreira hematoencefálica e confundiriam essas células da glia com células infectadas levando à resposta inflamatória e à sua destruição;

3) a teoria da lesão indireta, sugere que linfócitos T CD4⁺ infectados pelo HTLV-1 no sistema nervoso central seriam reconhecidos por linfócitos T CD8⁺ o que levaria a reação inflamatória com liberação, pela microglia, de citocinas como TNF- α , que são mieloletóxicas. Essa reação inflamatória se perpetuaria com recrutamento de mais células sanguíneas inflamatórias e liberação de antígenos virais pelos linfócitos T CD4⁺ infectados, que manteriam o processo crônico de lesão/inflamação (Figura 1.9) (Araújo e Silva, 2006).

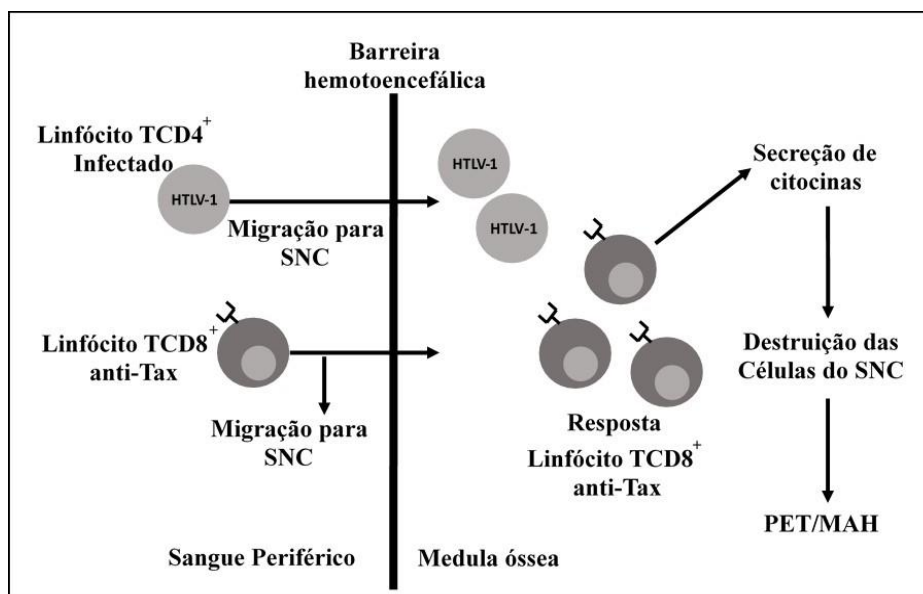


Figura 1.10: Modelo da patogênese PET/MAH. Adaptado de Cadernos Hemominas HTLV (2010).

Segundo Araújo e Silva, 2006, a PET crônica pode se manifestar com início insidioso ou agudo e o quadro clínico apresentado pode variar de paciente para paciente. A maioria dos indivíduos apresenta poucos sintomas, sendo as principais manifestações neurológicas:

1. Paraparesia espástica crônica de progressão lenta;
2. Fraqueza dos membros inferiores;
3. Os distúrbios vesicais são características iniciais; constipação geralmente ocorre mais tardiamente; impotência e libido diminuída são comuns;
4. Sintomas sensitivos como parestesias, queimação e hiperestesias, são mais proeminentes que os sinais físicos objetivos;
5. Dor lombar baixa com irradiação para as pernas;
6. A sensibilidade vibratória está frequentemente alterada; a propriocepção é menos frequentemente afetada;
7. Hiperreflexia dos membros inferiores, frequentemente com clônus e sinal de Babinski;
8. Hiperreflexia dos membros superiores; sinais de Hoffmann e Trömner positivos são frequentes; fraqueza pode estar ausente;
9. Reflexo mandibular exagerado em alguns pacientes;

Uveíte

A uveíte engloba um grupo de alterações oftalmológicas associados ao HTLV-1 que incluem vasculite, exsudatos, degeneração periférica da retina e ceratoconjuntivite sicca (Verdonck et al., 2007).

Seu destaque deve-se a estudos soropidemiológicos que apontam a uveíte como a terceira maior entidade clínica associada ao HTLV-1. A uveíte pode se apresentar de forma isolada em pacientes assintomáticos ou estar associada com portadores de doença neurológica. A sua prevalência está relacionada com a soroprevalência do HTLV-1 na região (Pinheiro, 2010).

A etiopatogenia da uveíte ainda não está esclarecida, porém acredita-se que a agressão tecidual seja de natureza autoimune com um achado típico de infiltração de tecidos oculares principalmente no corpo vítreo e vasculite da retina. Clinicamente é caracterizada por

dicotomias visuais ou turvação visual de início agudo ou subagudo. A infecção pode cursar de forma lenta e progressiva com persistência de longos períodos, caso o paciente não seja tratado. Normalmente, a evolução é satisfatória com ótima resposta ao uso de corticóides tópicos ou orais, podendo ter remissão espontânea em algumas semanas se a terapia for interrompida. Apesar da evolução favorável, mais de 90% dos casos têm recidiva em três anos, em geral o intervalo médio é de 16 meses (Verdonck et al., 2007; Pinheiro, 2010).

Artropatia

A associação entre HTLV-1 e artropatia foi conhecida em 1989. Porém, existem estudos contraditórios em relação essa ligação. Em alguns estudos a maioria dos pacientes com artrite reumatóide eram negativos para HTLV-1. Entretanto, em um estudo realizado por japoneses e outro estudo por americanos, foi constatada prevalência e a incidência de artrite maior nos pacientes HTLV-1 do que nos não infectados. Linfócitos T similares aos linfócitos de pacientes com ATLL foram encontrados no líquido e no tecido sinovial. Altos títulos de IgM anti-HTLV foram detectados no líquido sinovial e o DNA pró-viral foi detectado em células do líquido e do tecido sinovial (Yakova et al., 2005).

A artropatia associada ao HTLV é similar à artrite reumatoide, com proliferação sinovial e fator reumatoide positivo. Pacientes com leucemia de células T do adulto podem também apresentar poliartrite com fator reumatoide negativo. O tratamento é empírico e sintomático, com a combinação de fármacos anti-inflamatórios e analgésicos (Verdonck et al., 2007).

Síndromes Infecciosas

Escabiose Crostosa ou Sarna Norueguesa

Em pacientes imunodeprimidos, o ectoparasita *Sarcoptes scabiei* pode produzir uma intensa infecção da pele com grande número de ácaros, levando à formação de lesões crostosas de grande tamanho. Essa forma de infecção foi descrita em pacientes em uso de corticoterapia, com neoplasias, com síndrome de Down, diabéticos, além de HIV e HTLV-1 positivos. Em um estudo peruano 16 dos 23 pacientes com escabiose crostosa tinham sorologia reagente para HTLV-1 (Blas et al., 2005). Em outro estudo brasileiro com 91 casos de escabiose, as formas

mais graves estavam associadas ao HTLV-1 e em menor grau ao HIV (Brites et al., 2002).

Estrongiloidíase

Estima-se que mais de um bilhão de pessoas no mundo estejam infectadas por parasitos intestinais, entre eles *Strongyloides stercoralis*. Esse helminto apresenta ciclo de vida complexo tendo uma fase parasitária e outra de vida livre no solo, e a infecção no homem ocorre através da penetração de larvas filarióides pela pele. Pesquisadores observaram que 60% dos indivíduos com estrongiloidíase apresentavam sorologia reagente para HTLV-1 e 21% de positividade em pacientes sem infecção por *S. stercoralis* (Nakada et al., 1984). Em São Paulo, no Brasil, foi observada frequência de estrongiloidíase de 12,1% em doadores de sangue infectados pelo HTLV-1, em contraste com 1,6% em indivíduos não infectados pelo vírus (Chieffi et al, 2000).

A maioria dos infectados apresenta quadro sintomático leve com diarreia e dor abdominal. Em hospedeiros imunodeprimidos, o helminto pode produzir uma infecção disseminada, onde larvas filariformes em grande quantidade se movem para outros órgãos como pulmão, fígado, rins e sistema nervoso central. O quadro de infecção sistêmica é descrito com frequência em pacientes em uso de corticóides, desnutridos, com neoplasias, em uso de quimioterápicos, transplantados e HTLV-1 positivos (Hirata et al., 2006).

A relação entre a estrongiloidíase e o HTLV-1 apresenta-se de forma muito determinada em detrimento de alguns fatores: 1) pacientes HTLV-1 positivos apresentariam maior risco de desenvolver a forma disseminada da doença; 2) áreas endêmicas para ambos agentes; 3) taxa de falha com a terapia anti-helmíntica (Verdonck et al., 2007).

Indivíduos infectados com HTLV-1 têm proliferação espontânea de células T e altos níveis de interferon-gama, que estão associados à função imunológica do tipo Th-1 com uma fraca resposta do tipo Th-2 (baixos níveis de interleucina-4, 5 e 13, IgE e eosinófilos). A redução na interleucina-4 e IgE reduzem a eficácia da degranulação dos mastócitos e baixos níveis de interleucina-5 diminuindo o recrutamento e a atividade dos eosinófilos contra parasitas, tendo como resultado uma menor resposta imune ao parasito (Hirata et al., 2006).

Dermatite Infeciosa

A primeira descrição de dermatite infecciosa, ocorreu na Jamaica em 1966. Tempos depois, em 1990, foi descrita a associação ao HTLV-1, e tem sido relatada até os dias atuais em várias regiões onde o HTLV-1 é endêmico, incluindo Japão, Trinidad e Tobago, Brasil e Colômbia (La Grenade et al., 1990).

A infecção (Figura 1.11) caracteriza-se por uma dermatite exsudativa intensa que acomete o couro cabeludo, regiões da orelha, região paranasal, o pescoço e outras partes do corpo. Apresenta-se com formações crostosas, pústulas, pápulas ou fissuras retroauriculares (Pérez et al., 2007).



Figura 1.11: Foto de criança com dermatite infecciosa. A – infecção anterior ao tratamento; B – infecção após início do tratamento. Modificado de Verdonck et al. (2007).

Na maior parte dos casos, a transmissão ocorre por via vertical com média de 2 anos de idade para o aparecimento da doença. Cerca de 60% dos pacientes são do sexo feminino e a patogenia da doença ainda não está bem esclarecida. Um estudo realizado em 2009, descreveu uma possível relação entre a patogênese da dermatite infecciosa e a exagerada resposta imune gerada pelo HTLV-1 (Nascimento et al., 2009).

O exame microscópico da biópsia de pele pode revelar um infiltrado inflamatório linfocítico, sugerindo uma forte resposta antiviral do hospedeiro. As manifestações cutâneas usualmente se tornam menos graves com o passar da idade, provavelmente pela maturação do sistema imune. Alguns trabalhos sugerem que a dermatite infecciosa pode ser um fator de risco para o desenvolvimento da paraparesia espástica tropical ou da leucemia/linfoma de células,

por apresentarem semelhanças em fatores como alta carga pró-viral e resposta imune (Pombo de Oliveira et al., 2002; Primo et al., 2005; Hanchard, 2005)

O diagnóstico diferencial é baseado na dermatite seborreica e na dermatite atópica. O tratamento é com o uso de antibióticos sistêmicos e corticóides tópicos e oral. Observa-se frequentemente a ocorrência de recaídas, podendo ser necessário o uso de antibióticos por longos períodos (Verdonck et al., 2007).

Tuberculose

Diferentes estudos demonstram associação entre HTLV-1 e a tuberculose. Alguns relatam maior prevalência de infecção pelo HTLV-1 em pacientes com tuberculose e outros, alta prevalência de tuberculose em pacientes com infecção pelo HTLV-1. Evidências apontam para uma resposta diminuída ao teste com derivado purificado da proteína do bacilo da tuberculose (PPD), sugerindo que pessoas com HTLV-1 apresentariam uma resposta imune reduzida à tuberculose (Verdonck et al., 2007).

Um estudo realizado no Brasil reforça a associação entre HTLV-1 e tuberculose. Nesse estudo, evidenciou-se maior prevalência de HTLV-1 em pacientes com tuberculose (cerca de 4,27%) em contraste com o observado no grupo controle (1,32%). Evidenciando assim uma maior prevalência de infecção pelo HTLV-1 em pacientes tuberculosos (Marinho et al., 2005).

Síndromes reumatológicas e doenças autoimunes

Apesar de relatos da associação entre HTLV-1 e doenças autoimunes, ainda são necessários mais estudos para a comprovação da associação. Além das patologias de origem inflamatórias citadas anteriormente, outras doenças merecem esclarecimentos quanto a essa associação (Quadro 1.3) (Verdonck et al., 2007).

Quadro 1.3: Outras doenças inflamatórias e níveis de associação com HTLV-1

Doenças Inflamatórias	Nível de evidência epidemiológica			Evidência biológica	
	Relato de caso	Caso controle	Estudos de coorte	DNA pró-viral na lesão	Modelos animais
Síndrome de Sjögren	Sim	Não	Não	Sim	Sim
Polimiosite	Sim	Não	Não	Sim	Sim
Tireoidite	Sim	Não	Não	Sim	Não
Alveolite	Sim	Não	Não	Não	Não

1.7 Prevenção

A infecção pelo HTLV, como já foi dito anteriormente, pode cursar de forma assintomática ou evoluir para manifestações diversas. Alguns pacientes sintomáticos podem apresentar complicações do tipo grave e com conseqüente comprometimento (Verdonck et al., 2007). Cerca de 95% dos portadores permanecem assintomáticos, o que dificulta o controle dessa infecção, uma vez que o portador sem ter conhecimento da infecção pode continuar transmitindo o vírus a outras pessoas. As complicações provocadas pela infecção pode comprometer de maneira severa a vida cotidiana do indivíduo. Cabe ressaltar que além das manifestações físicas, muitos pacientes necessitam de acompanhamento psicológico para lidar com a infecção (Araújo et al., 2006; Verdonck et al., 2007)

A realização de exame de triagem sorológica, em candidatos a doação de sangue em hemocentros do país, faz-se necessária e obrigatória desde 1993. Essa triagem para os casos positivos HTLV não é realizado em alguns países, porém os pacientes devem ser orientados a não doarem sangue, sêmen e órgãos após resultado positivo para o vírus. Muitos estudos mostraram a necessidade dessa medida como prevenção mesmo em países considerados de

baixa prevalência. (Gonçalves et al., 2010; Gessain e Cassar, 2012).

A prevenção da transmissão vertical provavelmente é a que tem maior impacto no controle da transmissão e das doenças associadas ao HTLV. A triagem durante o pré-natal deve ser implantada em regiões geográficas específicas, combinada ao aconselhamento de mães positivas a não amamentarem (Dal Fabbro et al., 2008). O fornecimento de outras fontes de alimentação para essas crianças, como leite artificial ou leite humano de bancos de leites, devem ser incrementadas. O bloqueio do aleitamento materno é fundamental, uma vez que essa via é a principal forma de transmissão vertical do HTLV (Monteiro et al., 2014).

Os usuários de drogas endovenosas devem ser orientados a não compartilhar seringas, agulhas ou qualquer outro material perfurocortante utilizado. No Brasil, existe a necessidade de estudos específicos com essa população de risco, porém dados provenientes de estudos com doadores de sangue, ambulatórios de DIP e gestantes demonstraram a infecção pelo vírus em algumas regiões do país (Murphy et al., 1998; Catalan-Soares et al., 2005)

Os pacientes com infecção pelo HTLV devem ser orientados sobre as formas de transmissão e como preveni-las. Todos devem ser informados sobre a importância da utilização de preservativos em todas as relações sexuais, assim como acompanhamento médico mesmo que o portador não apresente sintomas. Por se tratar de uma doença que ainda não há tratamento eficaz ou vacinas, a melhor forma de controle é a atenção e vigilância no que se refere as suas vias de transmissão. Políticas de promoção e educação em saúde são necessárias, principalmente, em países nos quais o HTLV é prevalente (Paiva e Casseb, 2014).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar as variantes genotípicas do HTLV em um grupo de pacientes acompanhados no Ambulatório de Doenças Infecciosas do Hospital Universitário Pedro Ernesto – HUPE/UERJ.

2.2 Objetivos Específicos

I – Caracterizar o grupo quanto aos possíveis fatores de risco para infecção pelo HTLV;

II – Descrever a ocorrência de doenças associadas com HTLV;

III – Caracterizar o grupo quanto aos subtipos de HTLV;

IV – Descrever os subtipos de HTLV de acordo com a naturalidade dos pacientes;

V – Caracterizar os casos de pacientes com sorologia de *WB* indeterminado utilizando técnicas de biologia molecular.

3. METODOLOGIA

O estudo é do tipo estudo de casos, de indivíduos com sorologia positiva e/ou *WB* indeterminado para HTLV, que foram acompanhados no Hospital Universitário Pedro Ernesto – HUPE.

3.1 Local e grupo de estudo

O estudo foi desenvolvido no ambulatório da Unidade Docente Assistencial (UDA) de Doenças Infecciosas e Parasitárias (DIP) do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE). O grupo estudado foi selecionado no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2014. Durante esse período, 33 pacientes desta unidade foram selecionados para compor esse estudo.

O HUPE é a unidade hospitalar da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) e nele funciona a maioria dos ciclos profissionais dos cursos de graduação e pós-graduação da área de saúde.

O ambulatório de DIP pertence à Unidade Docente Assistencial de DIP, que congrega a Disciplina de DIP ligada à Faculdade de Ciências Médicas e o Serviço de DIP, situado em Vila Isabel – RJ. Neste ambulatório são atendidos pacientes com diversas doenças infecciosas, incluindo infecção pelo HTLV. Os pacientes chegam até esse serviço por encaminhamento da rede do Sistema Único de Saúde (SUS) ou, em alguns casos, por demanda espontânea. A maior parte dos pacientes com HTLV acompanhados no ambulatório é encaminhada após passagem por bancos de sangue, principalmente pelo Instituto de Hematologia do Rio de Janeiro (HEMORIO) e pelo Banco de Sangue do Hospital Universitário Pedro Ernesto.

Nos bancos de sangue são realizadas sorologias de triagem para diversos agravos de importância em saúde pública, incluindo o teste para HTLV (ELISA anti-HTLV). As amostras dos candidatos à doação de sangue que possuem resultado reagente no teste de triagem, são posteriormente confirmadas pela técnica de *WB*. Os candidatos com sorologia positiva para HTLV são encaminhados para acompanhamento no serviço DIP-HUPE/UERJ.

O grupo estudado foi selecionada conforme os critérios a seguir.

Critérios de Inclusão

- ✓ Indivíduos sintomáticos e assintomáticos atendidos no ambulatório durante o período de janeiro de 2013 a janeiro de 2014;
- ✓ Sorologia de Triagem Elisa Anti-HTLV reagente + *WB* Indeterminado.

Critérios de Exclusão

- ✓ Pacientes que não aceitaram participar do estudo.

3.2 Entrevista e coleta de sangue

Os dados clínicos e laboratoriais foram obtidos através de questionário (ANEXO 8.1), preenchido em entrevista com o paciente durante a consulta médica e através de revisão de prontuário.

O questionário teve a finalidade de levantar dados sobre os aspectos epidemiológicos como idade, sexo, raça, naturalidade, manifestações clínicas, presença de possíveis contactantes (parceiros sexuais, filhos e amamentação cruzada), comportamentos de risco para infecção como, por exemplo, transfusão sanguínea antes de 1993 e uso de drogas endovenosas. Além disso, foi utilizado para informações sobre os resultados de exames complementares para determinar possíveis co-infecções.

Foram colhidas amostras de 10 ml de sangue total, retiradas por punção venosa periférica em um dos membros superiores, adicionadas em tubos com anticoagulante (EDTA). Os tubos utilizados para coleta foram datados e identificados com nome e número do registro do paciente no HUPE. Após a coleta, as amostras foram enviadas ao Laboratório de Genética Molecular de Microorganismos (LGMM-IOC/FIOCRUZ), onde permaneceram armazenadas a -20°C para posterior análise molecular pela técnica da PCR.

Os exames sorológicos de triagem (ELISA anti-HTLV e *WB*) foram realizados pelo Laboratório Central do HUPE. O exame ELISA é solicitado na rotina do ambulatório DIP e o *WB* somente quando existe a necessidade de confirmação da infecção. A colaboração realizada com o LGMM-IOC/FIOCRUZ sob responsabilidade da Dra. Ana Carolina Paulo Vicente, foi fundamental para a realização do presente trabalho, uma vez que nesse laboratório foram

realizados os exames confirmatórios da PCR, serviço esse que não é prestado pelo HUPE. No laboratório, a análise molecular foi realizada através de técnica desenvolvida “*in house*”, devido à não disponibilidade de *kits* comerciais no mercado para detecção do DNA pró-viral do HTLV por PCR.

Todos os pacientes com sorologia prévia positiva ou indeterminada provenientes de bancos de sangue ou de qualquer outro centro, tiveram novas amostras de sangue coletadas e submetidas a novos exames diagnósticos.

Aspectos éticos

Todos os pacientes foram convidados a participar do estudo e só participaram após leitura, total entendimento, esclarecimento e assinatura do TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Nos casos dos pacientes menores de 18 anos, o consentimento para participação e a assinatura do TCLE foram fornecidos pelo seu responsável.

O presente estudo está inserido no projeto “Transmissão do Vírus Linfotrófico Humano de Células T (HTLV): análise clínica, epidemiológica e caracterização molecular” submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, com número de registro 2428-CEP/HUPE em 19 de agosto de 2009.

3.3 Teste Sorológico de Triagem (ELISA)

No Laboratório Central do HUPE, foram realizados os testes sorológicos de triagem com a finalidade de pesquisa de anticorpos para HTLV-1 e 2. O teste utilizado foi o ensaio imunoenzimático ELISA qualitativo de terceira geração (*HTLV-1&2Ab DIA. PRO – Enzyme Immunoassay, DIA. PRO. Diagnostic Bioprobes Srl, ITALY*), utilizando três antígenos recombinantes: gp46-I, gp46-II e p21-1.

O teste sorológico foi realizado em todos os pacientes, sendo eles encaminhados de banco de sangue ou de outros centros, com resultado prévio de ELISA reagente e ou sorologia de *WB* indeterminado.

Os pacientes que tiveram resultado reagente para o teste ELISA, foram submetidos a

nova coleta de amostra e as mesmas encaminhadas ao LGMM/IOC para realização de exame confirmatório pela técnica da PCR.

3.4 Teste Sorológico Confirmatório (*WB*)

Após o teste de triagem sorológica anti-ELISA, as amostras positivas que não possuíam exame prévio sorológico de *WB*, foram testadas no Laboratório Central HUPE utilizando o teste e depois encaminhadas para o LGMM/IOC para análise molecular pela PCR. A maior parte dos pacientes foram encaminhados pelo HEMORIO e já possuíam sorologia prévia de *WB*, porém alguns com resultados de *WB* indeterminado necessitando confirmação através da PCR.

3.5 Teste de Análise Molecular (PCR)

Extração do DNA

No Laboratório de Genética Molecular de Microorganismos do Instituto Oswaldo Cruz (LGMM/IOC), as amostras de sangue total com EDTA de pacientes com teste sorológico (ELISA reagente e ou *WB* indeterminado, foram submetidas à extração do DNA. Para tal, foram utilizados reagentes comerciais *QIAamp DNA Blood* (Qiagen Inc., Chatswoth, CA, USA), conforme as orientações do fabricante e com algumas modificações utilizadas pelo laboratório.

Da amostra total, foi adicionado a um tubo tipo *Eppendorf* de 1,5 ml, 400µl de sangue total e 40µl de Proteinase K do kit (20mg/ml). Acrescentou-se então 400µl do reagente Buffer AL (Tampão de lise), a solução foi homogenizada no vórtex por 15 segundos e incubada a 50°C por 1 hora. Após a incubação, foi realizada a centrifugação e logo adicionado 400µl de Etanol a 100% e homogeneizado no vórtex por 15 segundos. Após, realizou-se nova centrifugação. A solução foi coletada no tubo de 1,5ml e transferida para o dispositivo coluna, centrifugada a 8000 rpm por 1 minuto. O tubo coletor foi descartado, substituído por um novo e adicionado ao dispositivo coluna 500µl do tampão de lavagem 1 (AW1). Nova centrifugação a 8000 rpm por 1 minuto foi realizada. Após, o tubo coletor foi descartado com o filtrado e adicionado 500µl da solução de lavagem 2 (AW2) ao dispositivo coluna. Em seguida, centrifugado a 14.000 rpm por 3 minutos. Para retirada dos resíduos do tampão de lavagem, o dispositivo coluna foi centrifugado por 1 minuto em rotação máxima.

Em um novo tubo *Eppendorf* de 1,5ml foi colocado um dispositivo coluna e adicionado 200µl do tampão de eluição (*Buffer AE*) e encubado em temperatura ambiente por 5 minutos. Após, foi centrifugado a 8000rpm por 1 minuto. Os tubos de 1,5ml foram marcados como primeira eluição. O dispositivo coluna foi colocado em um novo tubo de 1,5ml e o processo de eluição foi repetido. Esses, foram marcados como tubos de segunda eluição. Por fim, cada amostra obteve 2 tubos no processo de eluição e os mesmos foram armazenados em freezer com temperatura de -20°C.

O DNA obtido foi utilizado como molde para amplificação de segmento do gene mitocondrial humano pela PCR. Esse controle foi realizado com o objetivo de certificar a qualidade do processo de extração.

Reação em Cadeia da Polimerase

O DNA pró-viral foi amplificado através de *Nested PCR*. As amostras foram testadas para amplificação da região Tax, utilizando iniciadores genéricos. As amostras que amplificaram para essa região foram testadas para a região LTR, através de iniciadores específicos para HTLV-1 e HTLV-2. As reações de amplificação de cada segmento genômico foram realizadas no termociclador *Eppendorf Mastercycler®*.

Amplificação da região Tax

Todas as amostras foram testadas para amplificação da região Tax do HTLV. Dentro do genoma viral, essa é a região considerada mais conservada, por este motivo foi utilizada para confirmar se todas as amostras eram positivas para HTLV, porém sem distinguir os tipos virais.

Para amplificação dessa região (218pb) foram utilizados, na primeira etapa da PCR (1^o *round*) um volume total de 50µl, sendo: 500ng de DNA extraído, dNTP's (deoxinucleotídeos trifosfatados) em 10mM de cada dNTP, tampão 1x, MgCl₂ (cloreto de magnésio) 2,0mM, *Taq* DNA polimerase (Promega) 1,8U e 100ng de cada iniciador (Quadro 3.1). Além das amostras, foram utilizados na reação, controles positivo e negativo. O termociclador foi programado da seguinte forma: 96°C durante 3 minutos por 1 ciclo (Desnaturação inicial), 96°C por 30 segundos (Desnaturação), 45°C por 30 segundos (Anelamento) e 72°C por 1 minuto (Extensão)

em 40 ciclos. Na segunda etapa da PCR (*2° round*), foram utilizados, em um volume total de 50µl: 5µl do produto da primeira reação, 10mM de cada dNTP, 2,0mM de MgCl₂, tampão 1x, *Taq* DNA polimerase (Promega) 1,8U e 100ng de cada iniciador (Quadro 3.1). Nessa etapa, como na primeira reação, foram utilizados controles positivo e negativo. O termociclador foi programado para: 96°C por 3 minutos em 1 ciclo (Desnaturação inicial), 96°C por 30 segundos (Desnaturação), 50°C por 30 segundos (Anelamento) e 72°C por 1 minuto (Extensão) em 40 ciclos.

Quadro 3.1: Iniciadores genéricos para HTLV, região Tax (218 pb). Adaptado de GenBank ATK-1 (2014)

Iniciadores (<i>Primers</i>)	Sentido	GenBank ATK-1*	Sequência 5'-3'	
1° <i>Round</i>	AV45F	Sense	7501	GGACGCGTTATCGGCTC
	AV46R	Antisense	7803	TACCTCTACCAGCTTTCC
2° <i>Round</i>	AV42F	Sense	7543	CTCCCCTCCTTCCCCAC
	AV43R	Antisense	7741	CAAAACCTGTACACC

* corresponde a posição no genoma.

Amplificação da região LTR

Para amplificação da região LTR foi utilizado o mesmo protocolo utilizado na amplificação da região Tax, porém com ajustes na programação do termociclador e os iniciadores indicados no Quadro 3.2. O termociclador foi programado da seguinte forma: 96°C por 5 minutos por 1 ciclo (Desnaturação inicial), 96°C por 50 segundos (desnaturação), 45°C por 50 segundos (Anelamento) e 72°C por 1 minuto (Extensão) em 40 ciclos. Na segunda etapa da PCR (*2° round*), a programação foi: 96°C por 5 minutos em 1 ciclo, 96°C por 50 segundos, 45°C por 50 segundos e 72°C por 1 minuto e 30 segundos, em 40 ciclos.

Quadro 3.2: Iniciadores específicos para região LTR do HTLV-1 (678 pb). Adaptado de GenBank ATK-1 (2014)

Iniciadores (Primers)	Sentido	GenBank ATK-1*	Sequência 5'- 3'	
1° Round	HFL1	Sense	24	GACAATGACCATGAGC
	HFL6	Antisense	881	GTTAAGCCAGTGATGAGCGGC
2° Round	HFL9	Sense	124	AAGGCTCTGACGTCTCCCCC
	HFL10	Antisense	779	TCCCGGACGAGCCCCCAA

* corresponde a posição no genoma.

Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da segunda reação da PCR, incluindo os controles positivo e negativo, e um marcador de peso molecular foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE (Tris-Acetato EDTA) (60V/40minutos). Os géis foram posteriormente corados com brometo de etídio por 30 segundos e visualizados e fotografados no equipamento *Gel Logic 112 Kodak*.

3.6 Purificação do Produto da PCR

Os produtos da PCR foram purificados com o *Kit* comercial *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* da GE Healthcare. Para a purificação foram adicionados 200µl do tampão de captura em 40µl do produto da segunda reação da PCR em um tubo *epENDORF* e homogeneizado. Essa solução foi transferida para um dispositivo coluna e centrifugado por um 1 minuto em 13.000rpm. Após centrifugação, o líquido precipitado no tubo coletor foi descartado. No dispositivo coluna foi adicionado 500µl do tampão de lavagem e centrifugado por 1 minuto a 13.000 rpm. Logo após, repetiu-se a centrifugação com o objetivo de extrair ao máximo qualquer solução restante no dispositivo coluna. O dispositivo coluna foi transferido para um tubo tipo *Eppendorf* de 2ml, adicionado 30µl do tampão de eluição e mantido em temperatura ambiente por 5 minutos. Após esse tempo, o dispositivo coluna foi centrifugado por 1 minuto a 13.000 rpm. Por fim, o produto coletado no tubo tipo *Eppendorf* foi armazenado para sequenciamento nucleotídico.

Com a finalidade de confirmar se ocorreu purificação adequada, antes do sequenciamento, adicionou-se 5µl do produto de purificação em 5µl de azul de bromofenol e xileno cianol. Essa solução foi aplicada em gel de agarose com um marcador de peso molecular para realização da eletroforese (60V/40minutos). Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídio e visualizado e fotografado no *Gel Logic 112 Kodak*.

3.7 Sequenciamento dos Produtos da PCR

Os produtos purificados da região Tax e LTR foram sequenciados utilizando-se o *kit Big Dye Terminator V: 3.1*, seguindo-se o protocolo dos fabricantes. O sequenciamento foi realizado no sequenciador ABI 3730 DNA Analyser (*Applied Biosystems*). No termociclador a ciclagem da reação foi de 96°C por 15 segundos (Desnaturação); 50°C por 10 segundos (Anelamento) e 60°C por 4 minutos (Extensão) num total de 25 ciclos. Os iniciadores usados na reação de sequenciamento foram os mesmos utilizados na reação da PCR.

3.8 Análise de Dados

Os quadros com os dados dos possíveis fatores de risco para a infecção foram gerados diretamente no programa *EPI-INFO-7* (versão 7.1.2.0).

As sequências obtidas através da PCR foram comparadas ao *GenBank* utilizando o programa *BLAST*. As sequências foram lidas e editadas usando os programas Chromas Lite versão 2.01 (*Griffith University*), DNA Star Lasergene SeqMan (versão 7.0) e BioEdit Sequence Alignment Editor (versão 7.2.5.0).

4. RESULTADOS

Todos os pacientes do grupo de estudo (n=33) apresentaram resultado reagente na triagem sorológica ELISA anti-HTLV. Nesse grupo, além dos pacientes com sorologia *WB* positiva (n=25), dois indivíduos apresentaram sorologia *WB* negativa e seis *WB* indeterminado. No resultado final, dois pacientes apresentaram resultado negativo para a infecção pelo HTLV. Logo, nos dados de caracterização do grupo de estudo não constam suas informações (n=31). A seguir, estes resultados são detalhados.

4.1 Caracterização do grupo de estudo

O grupo foi caracterizado quanto aos possíveis fatores de risco para infecção pelo HTLV.

4.1.1 Sexo

Houve predomínio de pacientes do sexo feminino, com aproximadamente 58% da frequência (Quadro 4.1).

Quadro 4.1: Frequência e percentual dos gêneros no grupo de estudo (n=31).

Sexo	Frequência	Percentual
Feminino	18	58,06
Masculino	13	41,94

4.1.2 Idade

A idade dos pacientes variou entre 4 e 69 anos. Mais da metade dos pacientes pertenceu à faixa etária adulta, tendo a maioria idades entre 41 e 50 anos (Quadro 4.2).

4.1.3 Grupo Étnico

Os grupos étnicos encontrados foram negros, brancos e pardos. Os dois primeiros apresentaram as maiores frequências (Quadro 4.3).

Quadro 4.2: Frequência e percentual de idade do grupo de estudo (n=31).

Idade	Faixa Etária (IBGE)	Frequência	Percentual
<10 anos	Jovem	1	3,2
10 a 19 anos		3	9,7
20 a 30 anos	Adulto	2	6,5
31 a 40 anos		6	19,4
41 a 50 anos		11	35,5
51 a 59 anos		5	16
60 a 70 anos	Idoso	3	9,7

Quadro 4.3: Frequência e percentual de grupos étnicos no grupo de estudo (n=31).

Grupo Étnico	Frequência	Percentual
Pardo	13	42
Branco	12	39
Negro	6	19

4.1.4 Naturalidade

A maioria da população de estudo foi natural do estado do Rio de Janeiro, havendo apenas três pacientes naturais de outros estados (Quadro 4.4).

Quadro 4.4: Frequência e percentual da naturalidade do grupo de estudo (n=31).

Naturalidade	Frequência	Percentual
RJ	28	90,3
MG	1	3,2
CE	1	3,2
PA	1	3,2

4.1.5 Estado Civil

Em relação ao estado civil, as categorias solteiro(a) e casado(a) apresentaram as maiores frequências, sendo o grupo casado com 45,16% e o solteiro com 38,71% (Quadro 4.5).

Quadro 4.5: Frequência e percentual de estados civis no grupo de estudo (n=31).

Estado Civil	Frequência	Percentual
Casado (a)	14	45,16
Solteiro (a)	12	38,71
União estável	2	6,45
Viúvo(a)	2	6,45
Divorciado(a)	1	3,23

4.1.6 Aleitamento Materno

A maior parte dos pacientes não soube informar sobre amamentação na infância. Apenas 9 afirmaram ter conhecimento que foram amamentados, sendo um deles através de amamentação cruzada (Quadro 4.6). Esse tipo de amamentação é aquele onde o paciente é amamentado por outra mulher diferente da mãe, popularmente conhecido por “ama de leite”. Nenhum paciente soube relatar se foi amamentado por portador de HTLV.

Quadro 4.6: Frequência e percentual de aleitamento materno nos pacientes (n=31)

Aleitamento	Frequência	Percentual
Não soube dizer	22	71
Amamentação convencional	8	25,8
Amamentação cruzada	1	3,2

4.1.7 Contactante Sexual HTLV+

Em relação ao contato sexual, 16% (n=5) da população de estudo relatou que manteve relações com portadores de HTLV (Quadro 4.7). O restante não soube informar ou não manteve.

Quadro 4.7: Frequência e percentual de relações sexuais de pacientes com portadores de HTLV (n=31).

Contactante Sexual HTLV+	Frequência	Percentual
Não sabem / Não mantiveram	26	84
Sim	5	16

4.1.8 Uso de Drogas Injetáveis

Em relação ao uso de drogas injetáveis, apenas um paciente relatou ter feito uso (n=31).

4.1.9 Transfusão de Sangue

A maioria do grupo de estudo relatou nunca ter feito transfusão de sangue (90,3%) (Quadro 4.8).

Quadro 4.8: Frequência e percentual de pacientes que já realizaram transfusão de sangue (n=31).

Tranfusão de Sangue	Frequência	Percentual
Não	28	90,3
Sim	3	9,7

4.1.10 Co-infecção

Entre os pacientes positivos para o HTLV, 27 não apresentaram nenhum tipo de co-infecção. Apenas quatro pacientes apresentaram exames positivos para outros patógenos, sendo três co-infectados com HIV e um reagente para o vírus da hepatite C (Quadro 4.9).

Quadro 4.9: Frequência e percentual de co-infecção (n=31).

Co-infecção	Frequência	Percentual
Sem co-infecção	27	87,1
HTLV + HIV	3	9,7
HTLV + HCV	1	3,2

4.1.11 Estágio Clínico

Em relação à manifestação clínica, 90,3% dos pacientes foram clinicamente diagnosticados como assintomáticos, enquanto 9,7% apresentaram sintomatologia associada ao HTLV (Quadro 4.10). Os sintomáticos apresentaram mielopatia associada ao HTLV-1.

Quadro 4.10: Frequência e percentual de manifestação clínica (n=31).

Estágio Clínico	Frequência	Percentual
Assintomático	28	90,3
Mielopatia associada ao HTLV-1	3	9,7

4.2 Análises Moleculares

As análises através da PCR, demonstraram prevalência de infecção pelo HTLV-1 em 28 indivíduos (84,8%). O HTLV-2 foi detectado em apenas três pacientes e em outros dois o resultado foi negativo (Quadro 4.11). Os pacientes com sorologia *WB* indeterminado, foram confirmados como portadores do HTLV, sendo cinco positivos para HTLV-1 e um HTLV-2.

Quadro 4.11: Frequência e percentual de diagnóstico final no grupo de estudo (n=33).

Diagnóstico	Frequência	Percentual
HTLV-1	28	84,8 %
HTLV-2	3	9,1 %
Negativo	2	6,1 %

4.2.1 Análise da Região Tax do HTLV

A região Tax foi amplificada pela PCR em 33 pacientes (Figura 4.1). A análise de sequenciamento desses isolados demonstrou DNA pró-viral do HTLV em 31 amostras, sendo 2 isolados considerados negativos. Novos testes foram realizados para confirmação. A análise demonstrou ainda que 18 isolados apresentaram 99% de similaridade com a sequência referência HAM116 (HTLV1aA) (*GenBank* KF797912) (Figura 4.3). Em três isolados, a análise demonstrou 99% de similaridade com a sequência referência MA_VMM (HTLV-2b) (*GenBank* GU591304) (Figura 4.4). Nas demais amostras (n=10) o sequenciamento detectou baixa similaridade com cepas referência.

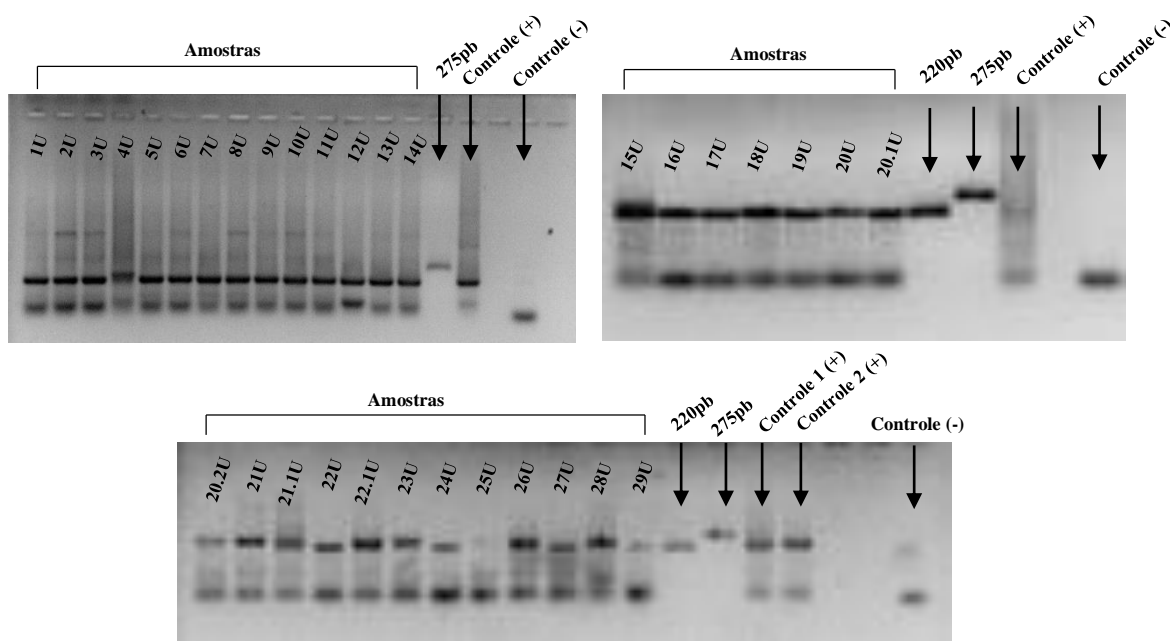


Figura 4.1: PCR da Região Tax em 33 amostras (identificadas por um número seguido da letra U), demonstrando amplificação em todas as amostras. Primer: AV42F e AV43R (218pb)

Devido à alta similaridade entre as regiões Tax do subtipo HTLV-2b e HTLV-2c, comparamos os nossos isolados com a sequência referência BRLO02 (HTLV2c) (*GenBank* HM770414) (Figura 4.5).

4.2.2 Análise da Região LTR do HTLV-1

Nesse estudo, em 21 amostras não foi possível a amplificação da região LTR, pois durante a realização da PCR essa região não amplificou. Por este motivo a análise de sequenciamento desses isolados ficou restrita à região Tax. Nas demais amostras (n=10) foi possível a amplificação e o sequenciamento dessa região (Figura 4.2).

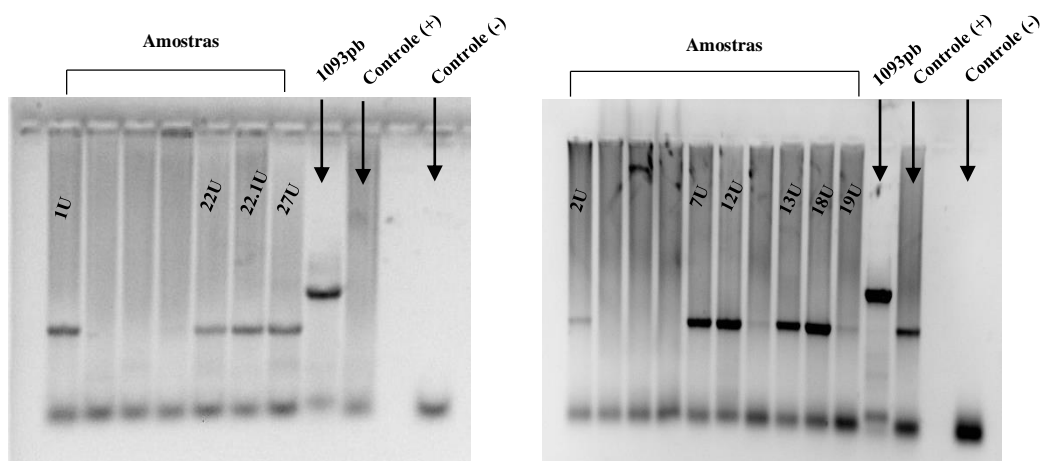


Figura 4.2: PCR da Região LTR do HTLV-1, com destaque para 10 amostras com amplificação (identificadas por um número seguido da letra U). Primer: HFL9 e HFL10 (675pb)

A comparação das sequências obtidas (n=10) no presente estudo demonstrou 99% de similaridade com a sequência referência IL1451 (HTLV-1aA) (*GenBank* KF202311) (Figura 4.6). Em relação à análise de assinaturas genéticas da região LTR, os pacientes apresentaram poucas mudanças de nucleotídeos em relação à sequência referência IL1451 (HTLV-1aA). Dentre as mudanças, as que chamaram mais atenção foram as que apresentaram o mesmo caráter em todos os pacientes, sendo observadas nas seguintes posições do genoma: 8, 9, 12, 30, 93, 130, 192, 202, 366, 467, 498 e 607. Em três posições do genoma observou-se o mesmo caráter para sete pacientes, sendo elas 365, 414 e 541. Entende-se como “mesmo caráter” a mudança do mesmo nucleotídeo, numa mesma posição no genoma. (Figura 4.6, continuação).

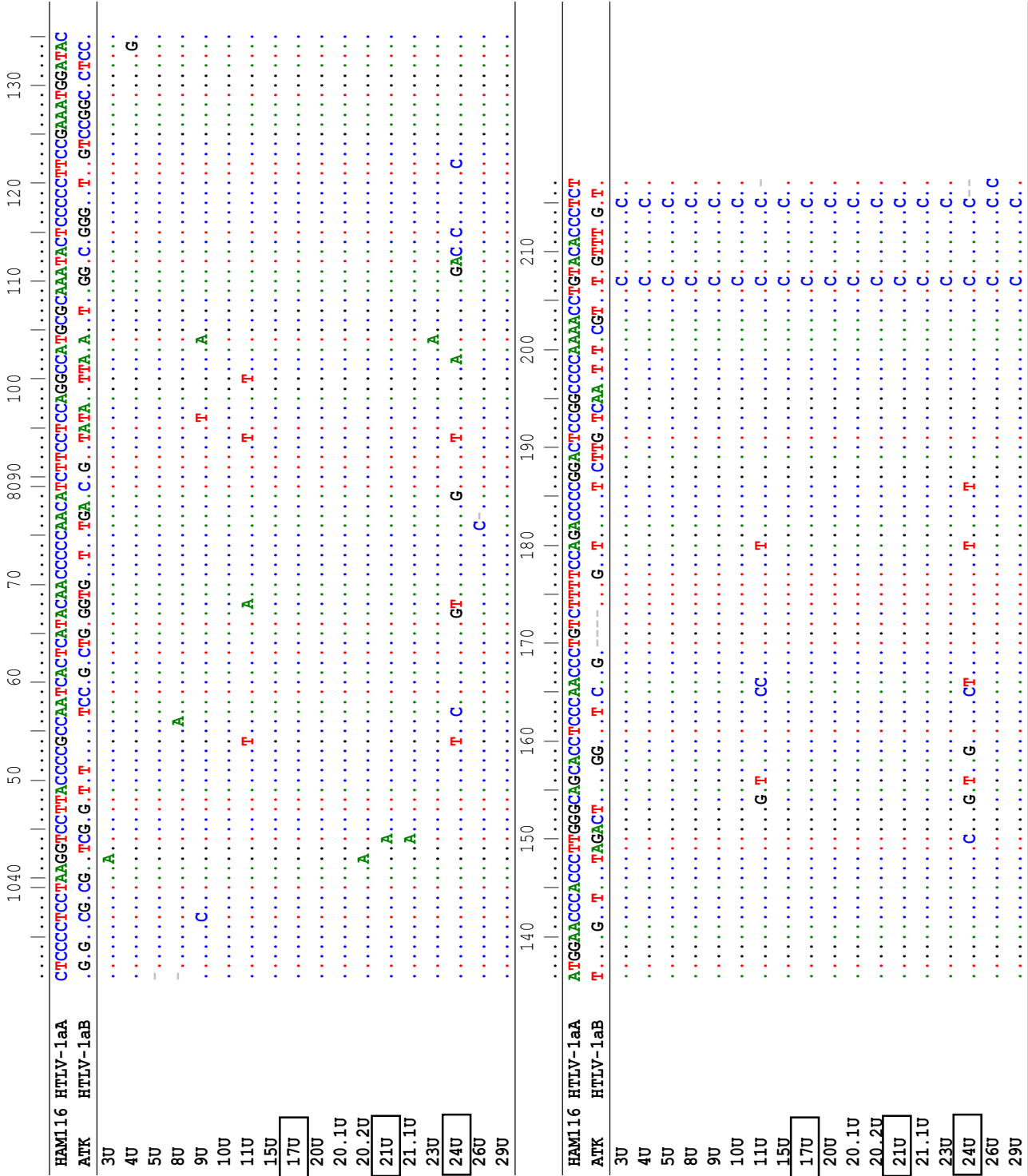


Figura 4.3: Alinhamento das sequências da região Tax de dezoito pacientes, demonstrando similaridade entre as mesmas e as cepa referências HAM116 (HTLV-1aA) e ATK (HTLV-1aB). Os intervalos entre as posições 10 e 40; 80 e 90 não apresentaram polimorfismos. As amostras marcadas com quadrado referem-se aos pacientes *WB* indeterminado.

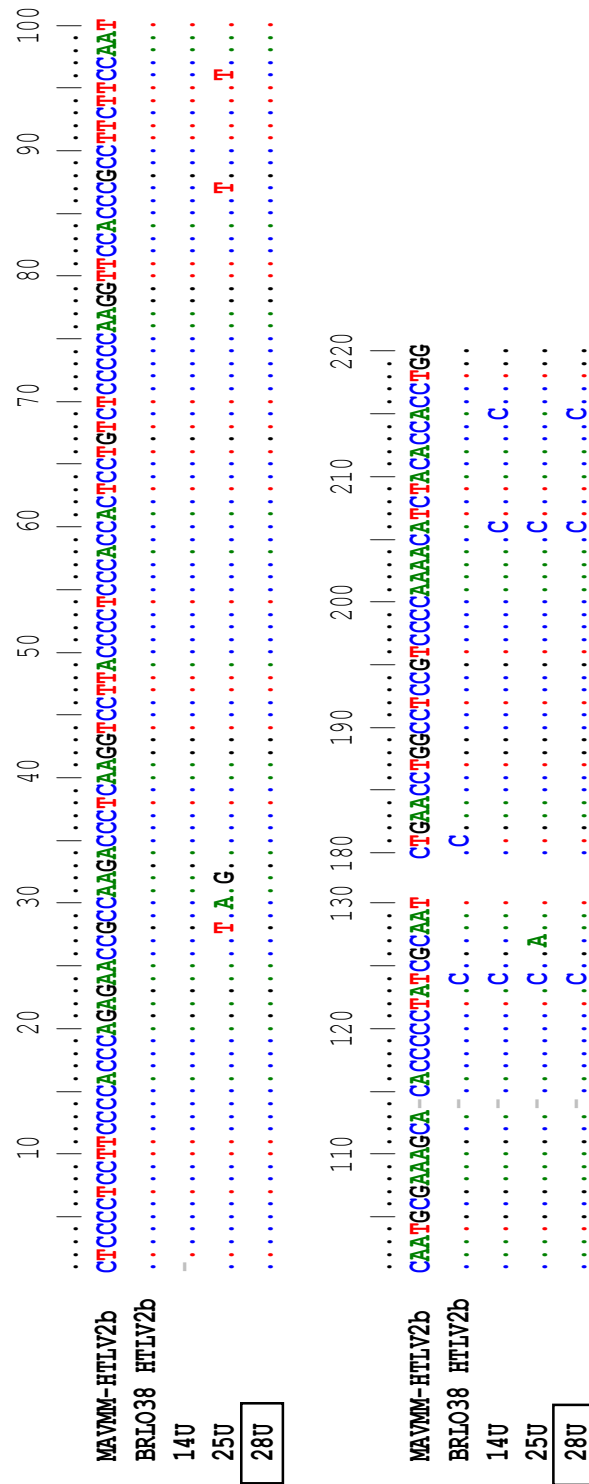


Figura 4.4: Alinhamento das sequências da região Tax de três pacientes, demonstrando similaridade entre as mesmas e as cepas referências MAVMM (HTLV-2b) e BRL038 (HTLV-2b). O intervalo entre a posição 130 e 180 não apresentou polimorfismo. As amostras marcadas com quadrado referem-se aos pacientes *WB* indeterminado.

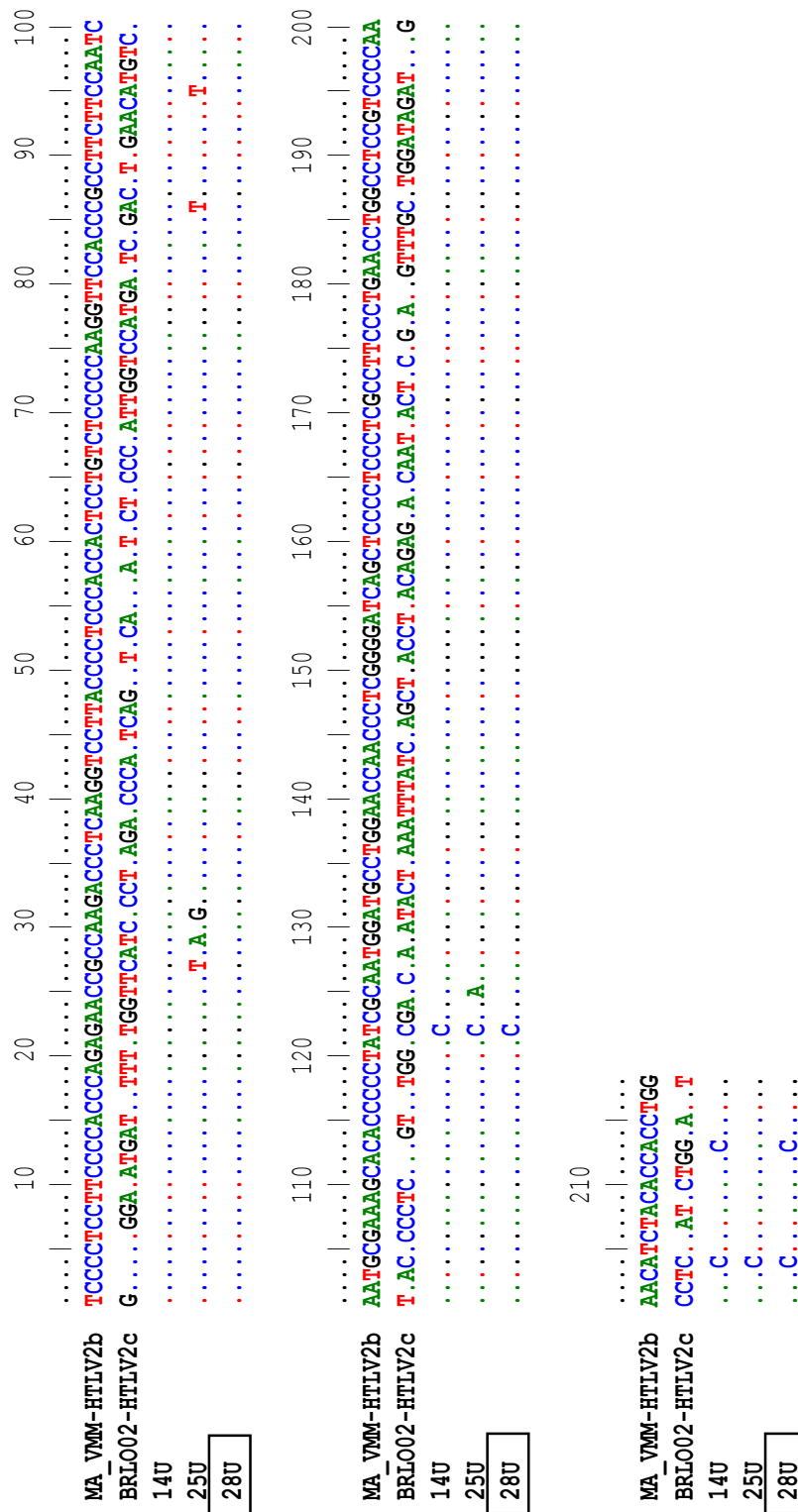


Figura 4.5: Alinhamento das seqüências da região Tax de três pacientes, demonstrando similaridade entre as mesmas e as cepas referências padrões MA_VMM (HTLV-2b) e BRLO02 (HTLV-2c). As amostras marcadas com quadrado referem-se aos pacientes *WB* indeterminado.

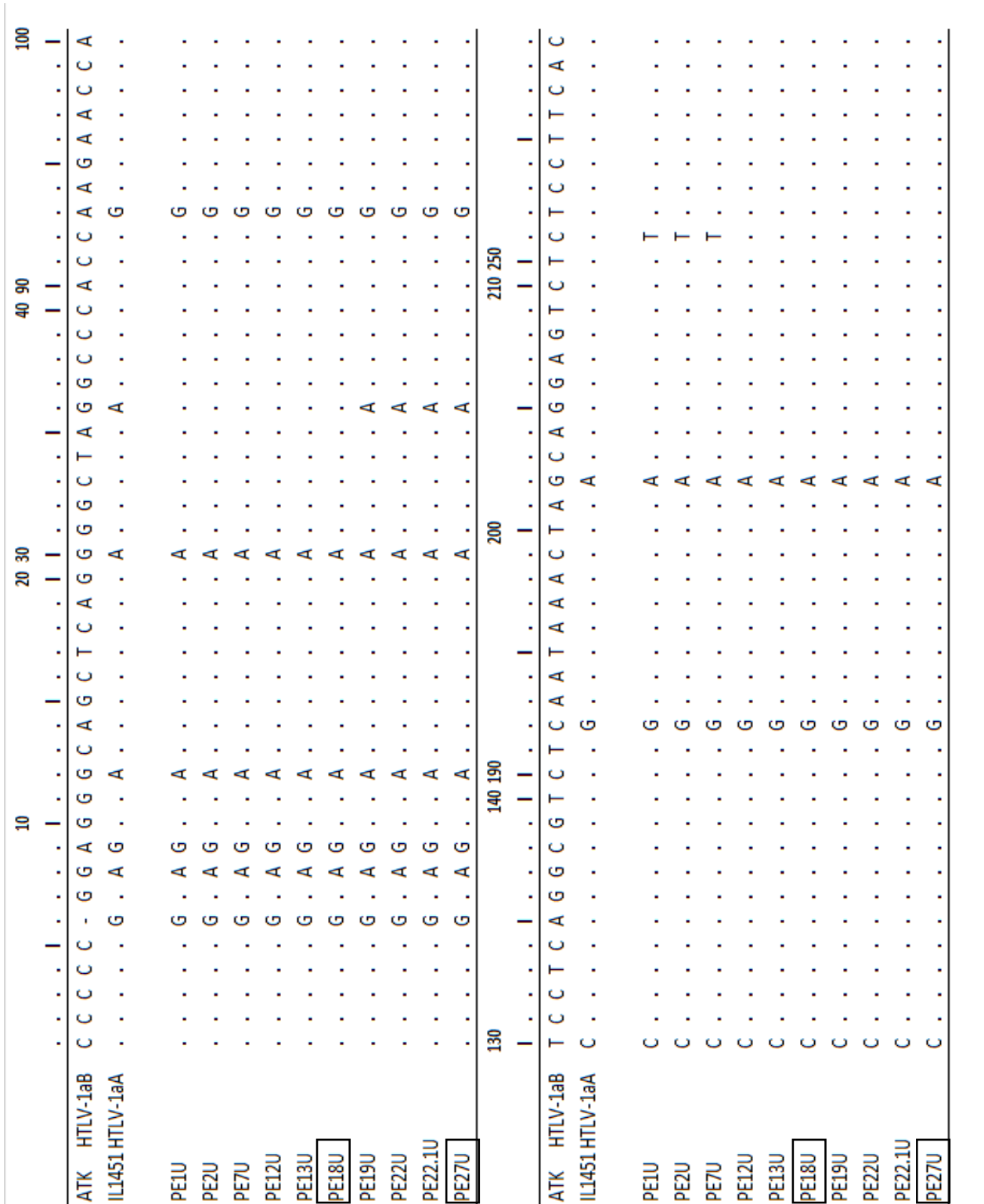


Figura 4.6: Alinhamento das seqüências da região LTR de dez pacientes, demonstrando similaridade entre as mesmas. As amostras marcadas com quadrado referem-se aos pacientes *WB* indeterminado.

	360	370	410	420	450	460			
ATK HTLV-1aB	A A G T T T A A G C C C T A C C T A G A C C T G C T T G C T C A A C T C T A C G								
IL1451 HTLV-1aA C G G T . G . . .			
PE1U G				C G . . .			
PE2U G				C T G . . .			
PE7U G				C G . . .			
PE12U C G G G . . .			
PE13U C G G G . . .			
PE18U C G G G . . .			
PE19U C G G T . G . . .			
PE22U C G G G . . .			
PE22.1U C G G G . . .			
PE27U C G G T . G . . .			
	490	500	540	545	565	570	600	610	620
ATK HTLV-1aB	C T G C C C G T T A T G A C T G A G T A C C A G C C C A T C C T A C - A G G A G								
IL1451 HTLV-1aA C A	T	C
PE1U C	T	C
PE2U C	T	C
PE7U C	T	C
PE12U C A G	T	C
PE13U C A G	T	C
PE18U C A G	T	C
PE19U C A	T	C	A
PE22U C A	T	C
PE22.1U C A	T	C
PE27U C A A	T	C

Figura 4.6 (continuação): Alinhamento das sequências da região LTR de dez pacientes, demonstrando similaridade entre as mesmas. As amostras marcadas com quadrado referem-se aos pacientes *WB* indeterminado.

4.2.3 Análise de Subtipos

As sequências obtidas a partir da região Tax, após inserção no *BLAST*, demonstraram prevalência do subtipo HTLV-1a (n=18) e HTLV-2b (n=3). Na análise de sequência dos isolados de LTR foi possível observar além do subtipo, o subgrupo, HTLV-1aA (n=10). (Figura 4.7).

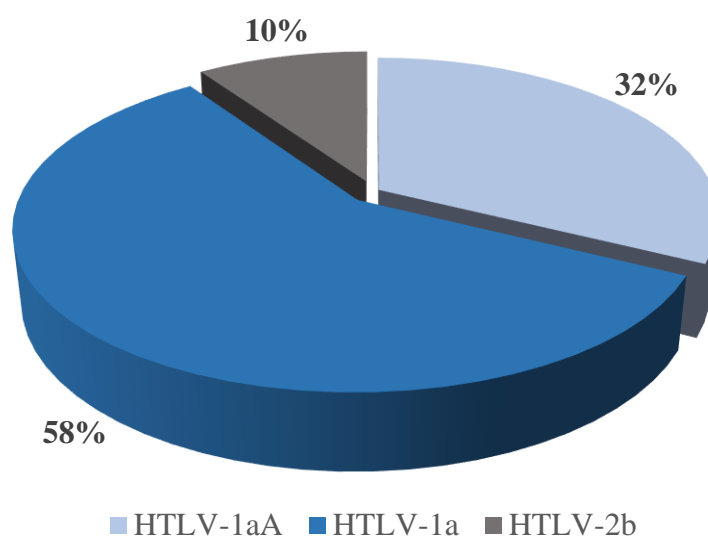


Figura 4.7: Percentual dos subtipos de HTLV no grupo de estudo (n=31).

Os resultados do presente estudo foram sintetizados no Quadro 4.12.

Quadro 4.12: Dados epidemiológicos e moleculares, com resultados confirmatórios para HTLV em pacientes do HUPE-UERJ.

Código	Sexo	Idade	Natural	Etnia	Sintomas	Aleitam.	Contact. HTLV	Co- infecção	UDI	Transfus. sangue	ELISA	WB	PCR	Subtipo
1 U	F	48	RJ	Pardo	-	Não sabe	-	-	-	-	Positivo	Positivo	HTLV-1	1aA
2 U	F	64	RJ	Pardo	-	Não sabe	-	-	-	Sim	Positivo	Positivo	HTLV-1	1aA
3 U	M	46	RJ	Pardo	-	Não sabe	-	-	-	-	Positivo	Positivo	HTLV-1	1a
4 U	M	41	RJ	Negro	Mielopatia	Não sabe	-	-	-	-	Positivo	Positivo	HTLV-1	1a
5 U	F	18	RJ	Pardo	-	Sim	-	-	-	-	Positivo	Positivo	HTLV-1	1a
6 U	M	47	RJ	Pardo	-	Não sabe	-	-	-	-	Positivo	Negativo	Negativo	-
7 U	M	34	RJ	Pardo	-	Não sabe	Sim	-	-	-	Positivo	Positivo	HTLV-1	1aA
8 U	M	50	RJ	Pardo	-	Não sabe	-	-	-	-	Positivo	Positivo	HTLV-1	1a
9 U	F	4	RJ	Negro	-	Não sabe	-	HIV	-	-	Positivo	Positivo	HTLV-1	1a
10 U	M	36	RJ	Negro	-	Não sabe	-	-	-	-	Positivo	Positivo	HTLV-1	1a
11 U	F	59	RJ	Pardo	-	Não sabe	-	-	-	-	Positivo	Positivo	HTLV-1	1a
12 U	F	61	PA	Pardo	Mielopatia	Sim	-	-	-	-	Positivo	Positivo	HTLV-1	1aA
13 U	F	42	RJ	Negro	Mielopatia	Não sabe	-	HIV	-	Sim	Positivo	Positivo	HTLV-1	1aA
14 U	M	50	RJ	Branco	-	Sim	-	HCV	Sim	-	Positivo	Positivo	HTLV-2	2b
15 U	F	53	RJ	Negro	-	Não sabe	-	-	-	-	Positivo	Positivo	HTLV-1	1a
16 U	F	69	PB	Branco	Mielopatia	Sim	-	-	-	-	Positivo	Negativo	Negativo	-
17 U	M	50	RJ	Pardo	-	Sim	-	-	-	-	Positivo	Indeterm.	HTLV-1	1a
18 U	M	39	CE	Branco	-	Não sabe	-	-	-	-	Positivo	Indeterm.	HTLV-1	1aA
19 U	M	60	RJ	Pardo	-	Sim	-	-	-	-	Positivo	Positivo	HTLV-1	1aA
20 U	F	64	RJ	Branco	-	Não sabe	-	-	-	-	Positivo	Positivo	HTLV-1	1a
20.1 U	M	30	RJ	Pardo	-	Sim, Cruzada	Sim	-	-	-	Positivo	Positivo	HTLV-1	1a
20.2 U	F	32	RJ	Branco	-	Não sabe	Sim	-	-	-	Positivo	Positivo	HTLV-1	1a
21 U	F	47	RJ	Branco	-	Sim	-	-	-	Sim	Positivo	Indeterm.	HTLV-1	1a
21.1 U	F	16	RJ	Branco	-	Sim	-	-	-	-	Positivo	Positivo	HTLV-1	1a
22 U	F	48	RJ	Pardo	-	Não sabe	Sim	-	-	-	Positivo	Positivo	HTLV-1	1aA
22.1 U	M	48	RJ	Negro	-	Não sabe	Sim	-	-	-	Positivo	Positivo	HTLV-1	1aA
23 U	F	26	RJ	Branco	-	Não sabe	-	-	-	-	Positivo	Positivo	HTLV-1	1a
24 U	F	47	MG	Pardo	-	Não sabe	-	-	-	-	Positivo	Indeterm.	HTLV-1	1a
25 U	F	52	RJ	Branco	-	Sim	-	-	-	-	Positivo	Positivo	HTLV-2	2b
26 U	M	37	RJ	Branco	-	Sim	-	-	-	-	Positivo	Positivo	HTLV-1	1a
27 U	M	35	RJ	Branco	-	Não sabe	-	HIV	-	-	Positivo	Indeterm.	HTLV-1	1aA
28 U	F	54	RJ	Branco	-	Não sabe	-	-	-	-	Positivo	Indeterm.	HTLV-2	2b
29 U	F	16	RJ	Branco	-	Não sabe	-	-	-	-	Positivo	Positivo	HTLV-1	1a

Pacientes com WB indeterminado

5. DISCUSSÃO

Apesar da maior parte dos portadores de HTLV não apresentar sintomatologia associada ao vírus, é importante que todos os indivíduos sejam acompanhados por serviços médicos logo após o diagnóstico. Além disso, por se tratar de um agente etiológico para o qual ainda não existe tratamento ou vacina, medidas profiláticas são necessárias para a epidemiologia e controle dessa infecção.

A confirmação da infecção através de exames que subtipam o vírus é importante para o acompanhamento da evolução clínica do paciente, uma vez que o HTLV-1, diferente do HTLV2, foi descrito associado às manifestações clínicas mais graves. Não foi relatado a interferência do subtipo viral com doenças associadas ao HTLV, porém os subtipos auxiliam nos estudos epidemiológicos contribuindo para ampliar o conhecimento desse vírus.

5.1 – Caracterização do Grupo de Estudo Quanto Aos Possíveis Fatores de Risco Analisados

No presente estudo, houve maior frequência de pacientes do sexo feminino, com aproximadamente 58 % do total de participantes. Dentre o grupo de pacientes mulheres, somente uma teve resultado da PCR negativo para o DNA pró-viral do HTLV. As demais pacientes apresentaram resultado positivo, sendo 17 confirmados para HTLV-1 e um para HTLV-2. Apesar do número amostral desse estudo, a diferença de 16% entre os sexos dos portadores são condizentes com estudos anteriores, nos quais se verificou maior prevalência da infecção pelo HTLV em mulheres (Kajiyma et al., 1986).

Ao analisar a idade dos pacientes do presente estudo, observou-se variação entre 4 e 69 anos. De acordo com a classificação etária proposta pelo IBGE, a maior parte dos pacientes, cerca de 77,4% eram adultos entre 20 e 59 anos, com maior número de pessoas com idades entre 41 e 50 anos. Ao relacionar a faixa etária com os resultados de sintomatologia associada ao HTLV-1, observou-se que dois pacientes eram adultos (41 e 42 anos) e um pertencia ao grupo de idosos (61 anos). A média de idade entre os sintomáticos foi de 48 anos. Assim como relatado na literatura, a idade avançada pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de

doenças associadas ao HTLV-1. Nesse estudo, devido ao tamanho da amostra estudada não podemos afirmar esse fato, mas vale como atenção aos fatores de risco (Araújo e Silva, 2006).

Dentre os participantes com resultado confirmatório negativo para infecção pelo HTLV, um paciente era adulto, com 47 anos, e o outro era idoso, com 69 anos. Ou seja, as faixas etárias dos indivíduos com exame positivo e dos que tiveram resultado negativo são próximas. Em conformidade com a literatura, observou-se maior frequência no grupo de adultos. Tal tendência pode ser parcialmente explicada pela maior exposição dos adultos aos comportamentos de risco, incluindo os relacionados à via de transmissão sexual (Roucoux et al., 2005).

Quanto às características étnicas, a maioria dos pacientes do presente estudo declarou ser pardo (42 %) e branco (39 %), e a minoria, negro (19 %). A diferença entre as frequências das classes étnicas não foi suficiente para afirmar se houve predominância do HTLV em alguma das classes. Em estudos epidemiológicos com grupos populacionais selecionados com aleatoriedade, tal como o encaminhamento por hemocentros ou demanda espontânea, pode haver dificuldades de associação da prevalência com grupos étnicos ou outros fatores descritores da população. Além disso, o HTLV é mais encontrado em regiões com populações etnicamente distintas, tais como Japão, América do Sul e África Central (Verdonck et al., 2007).

A naturalidade dos pacientes, conforme o esperado, refletiu a localização do ambulatório, sendo a maioria (90,3%) natural do estado do Rio de Janeiro. Os demais pacientes eram naturais dos estados de Minas Gerais, Ceará e Pará. Dentre os pacientes com resultado negativo para HTLV, um era natural do RJ e o outro do estado da Paraíba. Estes estados apresentaram altas taxas de prevalência da infecção pelo HTLV-1/2, de acordo com estudo realizado com doadores de sangue em suas capitais. Este mesmo estudo apontou prevalências de 0,47 % no Rio de Janeiro, 0,58 % no Ceará, 0,66 % em Minas Gerais e 0,91 % no Pará (Catalan-Soares et al., 2005). Os três pacientes portadores de HTLV-2b, identificados no presente estudo, eram naturais do estado do Rio de Janeiro, sendo um homem e duas mulheres, com idade entre 50 e 54 anos.

Em relação ao estado civil, os percentuais de casados e solteiros portadores de HTLV foram próximos, sendo 45,16% e 38,71%, respectivamente. Paiva e Casseb (2014) relataram a transmissão sexual como uma importante via para a infecção pelo HTLV e sendo mais eficiente a transmissão do homem para a mulher. Estudos anteriores revelaram altas taxas de conversão

em casais sorodiscordantes, principalmente quando o homem era o caso índice. Nesse caso, acredita-se que a justificativa esteja na transmissão facilitada por partículas virais presentes no esperma. Dentro desse contexto, 16 % dos pacientes relataram saber que o parceiro é portador de HTLV. Todos os participantes receberam orientações quanto à importância do uso de preservativos nas relações sexuais. Por este motivo, todos os pacientes com resultado confirmatório positivo para HTLV, foram orientados quanto à possibilidade de infecção do seu parceiro. Foi recomendado a estes pacientes que conduzam seus parceiros ao ambulatório para realizar testes sorológicos.

No presente trabalho, 29% dos pacientes disseram ter conhecimento que foram amamentados por sua mãe durante a infância, porém não souberam dizer por quanto tempo. Apenas um paciente disse ter sido amamentado por uma “ama de leite” (amamentação cruzada). A maioria, cerca de 71 % relatou não saber sobre sua amamentação. Sabe-se que a amamentação é, em áreas endêmicas, uma das principais vias de transmissão do HTLV, sendo responsável de 10 a 25 % das transmissões entre mãe e filho (Pique e Jones, 2012). Recentemente, Monteiro e colaboradores (2014) observaram prevalência de 0,66% em um estudo realizado com gestantes da região metropolitana do Rio de Janeiro. Esse resultado alerta para a necessidade da realização de triagem sorológica para HTLV nas redes de atendimento em saúde. Assim como orientação para que as mães-portadoras não amamentem seus filhos e busque outra forma de alimentação, como a retirada de leite materno nos bancos de leite humano. Cabe ressaltar que nesse grupo, nenhum paciente soube informar se foi amamentado por portadora de HTLV e todos os pacientes positivos foram esclarecidos quanto aos risco da amamentação.

Dentro do grupo estudado, apenas um paciente relatou já ter feito uso de drogas injetáveis e o resultado do sequenciamento de sua amostra, demonstrou infecção pelo HTLV-2. A associação entre a infecção pelo HTLV e o uso de drogas dessa categoria já foi relatada em estudos de prevalência tanto do HTLV-1 quanto do HTLV-2. A prevalência do HTLV-2 está relacionada aos usuários de drogas injetáveis nos Estados Unidos e na Europa, mas no Brasil esse vírus é mais frequentemente encontrado em populações que vivem em regiões de fronteiras com países onde o HTLV-2 é endêmico e em população de ameríndios (Roucoux e Murphy, 2004; Renner et al., 2006). O uso de drogas injetáveis pode ter sido a principal via de infecção nesse caso, mas outros fatores devem ser considerados também, como o fato do paciente ter sido amamentado pela mãe durante a infância.

Os pacientes foram questionados se já haviam recebido transfusão de sangue e em que ano teria ocorrido. Apenas 9,7% responderam já ter realizado o processo, que o mesmo teria ocorrido antes do ano de 1993 e a transfusão foi de concentrado de hemácias (Manns et al., 1989). Todos os hemotransfundidos foram positivos para HTLV-1, sendo um deles sintomático, portador de mielopatia associada ao HTLV, e dois assintomáticos. O processo de transfusão de sangue antes do ano de 1993, quando o Brasil passou a realizar triagem em bancos de sangue, representava uma importante via de transmissão nesses pacientes. Entretanto, não podemos afirmar que a infecção possa ter ocorrido por tal via, porque eles compartilham outros fatores de risco, tais como amamentação na infância e co-infecção com outra DST (Gonçalves et al., 2010; Paiva e Casseb, 2014).

A maioria dos pacientes (87,1%) não apresentou co-infecções. Dentre os pacientes co-infectados, 9,7% apresentaram anticorpos para HIV e 3,2% para HCV. Não houve nenhum caso de DSTs nos pacientes com resultado negativo para HTLV, demonstrando que a presença de DST pode também ser considerada um fator de risco para a aquisição da infecção pelo HTLV. Essa relação pode ser observada, principalmente, por esses patógenos compartilharem as mesmas vias de transmissão (Paiva e Casseb, 2014).

Em relação as manifestações clínicas, 90,3% dos pacientes foram assintomáticos. Todos os pacientes sintomáticos (n=3) foram diagnosticados com mielopatia associada ao HTLV-1, sendo essa a única manifestação clínica observada. O risco para o desenvolvimento de doenças associadas ao HTLV-1 é estimado em torno de 10%, sendo considerado as vias de transmissão e fatores genéticos do paciente (Araújo e Silva, 2006).

No caso da mielopatia associada ao HTLV-1, o risco de evolução para tal manifestação entre os infectados é de 2 a 3 %, ao longo da vida. É mais prevalente em mulheres em torno de 40 anos de idade que adquiriram a infecção na idade adulta e pela via sexual (Araújo e Silva, 2006). Um dos pacientes com resultado negativo para infecção, havia sido diagnosticado com mielopatia associada ao HTLV-1. Apesar do resultado de triagem ELISA reagente para HTLV, o resultado da busca do DNA pró-viral através da PCR foi negativo. O teste da PCR foi realizado em triplicata e em todos os sequenciamentos da amostra não foi detectado o DNA pró-viral do HTLV-1. Nesse caso específico, existe a necessidade de um estudo mais detalhado, com novas amostras para realização de testes moleculares e exames clínicos para confirmação ou exclusão da infecção pelo HTLV. Os pacientes confirmados com infecção pelo HTLV-2 não apresentaram manifestações clínicas.

5.2 – Características Moleculares – Tipagem e Subtipagem do HTLV

Os resultados dos testes moleculares apresentaram maior frequência da infecção pelo HTLV-1, 90,3% dos pacientes. Quando analisou-se o subtipo do HTLV dentro desse grupo, o resultado foi 100% para o subtipo HTLV-1a Cosmopolita. Ao amplificar a região LTR foi possível observar o subgrupo HTLV-1aA Transcontinental. A confirmação do subgrupo foi possível somente em 10 destes pacientes (Figura 4.6), nos demais não ocorreu amplificação da região específica para essa determinação. No alinhamento de sequências das amostras HTLV-1a, foi utilizado a cepa referência com maior similaridade aos nossos isolados (IL1451 HTLV-1aA). Para melhor observação de similaridade utilizamos também uma cepa referência de HTLV-1aB (ATK HTLV1aB). Nesse contexto foi possível observar poucos polimorfismos entre as sequências de cepas referências e das nossas amostras (Figura 4.6).

Em 18 amostras, nas quais não foi possível a amplificação da região LTR, o alinhamento da região Tax demonstrou 99% de similaridade com a cepa referência HAM116 HTLV-1aA. Para melhor observação de similaridade foi utilizado também uma cepa referência de HTLV-1aB (ATK HTLV1aB). Nesse resultado foi observada poucos polimorfismos e alguns se manifestaram somente em amostras de pacientes com *Wb* indeterminado (Figura 4.3). Esses polimorfismos podem estar relacionados com a indeterminação nesse exame, porém para confirmação existe a necessidade de sequenciamento da região LTR da amostra. Nossos resultados são concordantes com estudos anteriores que demonstram prevalência desse subtipo no Rio de Janeiro e em outras regiões do Brasil (Van Dooren et al., 1998; Verdonck et al., 2007). Em 2012, Gessain e Cassar confirmaram o que há havia sido observado em estudos anteriores, que o subtipo HTLV-1a é prevalente em diferentes áreas endêmicas no mundo.

A infecção pelo HTLV-2 foi observada em 9,7% dos pacientes - subtipo HTLV-2b. No alinhamento de sequências de HTLV-2a, foi utilizado a cepa referência que mostrou maior similaridade com as nossas amostras (MAVMM HTLV-2b) e outra cepa referência de HTLV-2b (BRLO038 HTLV-2b) (Figura 4.4). Como resultado foi possível observar poucos polimorfismos entre as sequências de cepas referências e as nossas amostras. Conforme já observado em outros estudos, a região Tax do HTLV-2b e 2c possuem alta similaridade, por este motivo foi realizado o alinhamento das amostras com uma cepa referência de HTLV-2c (BRLO02 HTLV2c) e observamos alta similaridade entre as sequências (Figura 4.5) (Iñiguez et al., 2010). Logo, não podemos afirmar que as nossas amostras são definitivamente HTLV-2b.

No Brasil, o subtipo mais encontrado é o 2c em população de ameríndios, porém estudos têm relatado a presença do HTLV-2b em regiões brasileiras que fazem fronteiras com outros países onde esse subtipo é endêmico (Roucoux e Murphy, 2004; Renner et al., 2006). Esse não é o caso do Rio de Janeiro, por este motivo faz-se necessário mais estudos sobre o subtipo de HTLV-2 circulante na nossa população.

Quando comparamos as sequências dos nossos isolados com sequências referências no *Genbank*, observamos 99% de similaridade com HTLV-1a (n=18) e HTLV-2b (n=3). Existe grande similaridade entre as sequências obtidas pelas regiões Tax do HTLV-2b e as do HTLV-2c (Magri et al., 2013). Portanto, somente através do estudo da região LTR do HTLV-2 poderíamos afirmar qual o subtipo dos nossos isolados. Por fim, ao analisarmos o total de participantes desse estudo, 6,1% apresentaram resultado negativo para a detecção do DNA pró-viral do HTLV.

A confirmação da infecção pelo HTLV nos pacientes que possuíam sorologia prévia de *WB* indeterminado, resultou em 100%. Dos seis pacientes com sorologia *WB* indeterminado, cinco foram confirmados como positivos para infecção pelo HTLV-1 e um para o HTLV-2. A resolução dos casos de *WB* indeterminado é muito importante do ponto de vista clínico e epidemiológico. O paciente pode ser informado do tipo viral responsável pela infecção e inferir sobre possíveis vias de contágio. Além disso, as formas mais graves de doenças associadas estão relacionadas ao HTLV-1, o que pode levar a uma atenção especial do serviço de saúde onde o paciente é acompanhado quanto as manifestações clínicas.

Do ponto de vista epidemiológico, a confirmação de uma amostra indeterminada é importante porque pode significar interferência de outros patógenos ou até mesmo de um novo tipo viral circulante. Em 2005, na África Central, Gessain e colaboradores identificaram em amostras positivas com *WB* indeterminado, dois novos tipos de vírus que ainda não haviam sido isolados no mundo, o HTLV-3 e o HTLV-4. Por este motivo, faz-se necessário um estudo em população aberta e com abordagem mais ampla, o que pode resultar em maior conhecimento sobre os casos de *WB* indeterminado e determinar futuras mudanças nos testes sorológicos de confirmação.

Esse estudo pretendeu caracterizar um grupo de portadores de HTLV que são acompanhados no ambulatório DIP-UERJ. Baseado no número de amostras analisadas, não foi possível inferir sobre prevalência dos fatores de risco para infecção ou a relação entre o subtipo

do HTLV e as manifestações clínicas associadas a esse vírus nesse população. Além disso, com as análises realizadas conseguimos caracterizar o grupo quanto a alguns possíveis fatores de risco para infecção e a confirmação dos pacientes caracterizados com *Wb* indeterminado. Por este motivo, um estudo de maior amplitude e com maior número de participantes, no qual seja possível a construção de uma árvore filogenética, faz-se necessário para determinar os subtipos de HTLV circulantes e suas possíveis origens geográficas. Além disso, novos estudos com populações abertas do Rio de Janeiro, poderiam contribuir para determinar mais precisamente a prevalência do HTLV e seus subtipos na região.

6. CONCLUSÕES

- A infecção pelo HTLV-1, subtipo 1a, foi mais frequente no grupo de estudo (n=28). Dentre os isolados de HTLV-1a, 10 pertenciam ao subgrupo Transcontinental (HTLV-1aA). O HTLV-2 foi confirmado em 3 pacientes.
- Os casos de *WB* indeterminado foram confirmados como HTLV-1a ou HTLV-2.
- Dois pacientes foram negativos para a infecção pelo HTLV.
- Em relação aos fatores de risco no grupo de estudo a maioria não soube informar sobre aleitamento, relatou não ter contato sexual com portador de HTLV, e não realizou transfusão de sangue. Apenas um paciente afirmou fazer uso de drogas injetáveis.
- Co-infecções e doenças associadas ao HTLV foram pouco frequentes no grupo de estudo.
- Os pacientes portadores de HTLV-2 eram naturais do Estado do Rio de Janeiro.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Araújo AQC, Silva MTT 2006. The HTLV-1 neurological complex. *Lancet neurology Dec*; 5(12):1068-76.

Baltimore David, 1971. Expression of Animal Virus Genomes. *American Society for Microbiology*; 35-3; P. 235-241

Bartholomew C, Saxinger WC, Clark JW, Gail M, Dudgeon A, Mahabir B H-D, B, Cleghorn F, Gallo RC BW 1987. Transmission of HTLV-I and HIV among homosexual men in Trinidad. *JAMA* 257: 2604-8.

Bastian I, Gardner J, Webb D, Gardner I 1993. Isolation of a human T-lymphotropic virus type I strain from Australian aboriginals. *J Virol* 67: 843-51.

Biggar RJ, Ng J, Kim N, Hisada M, Li H-C, Cranston B, et al. 2006. Human leukocyte antigen concordance and the transmission risk via breast-feeding of human T cell lymphotropic virus type I. *The Journal of infectious diseases* 193: 277-82.

Blas M, Bravo F, Castillo W, Castillo WJ, Ballona R, Navarro P, et al. 2005. Norwegian scabies in Peru: the impact of human T cell lymphotropic virus type I infection. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 72: 855-7.

Blattner W, LaGrenade L, Hanchard B, Fletcher V, Cranston B 1990. Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. *Lancet* 336 (8727): 1345-1347.

Brites C, Weyll M, Pedroso C, Badaró R 2002. Severe and Norwegian scabies are strongly associated with retroviral (HIV-1/HTLV-1) infection in Bahia, Brazil. *AIDS* 16:1292-3.

Carneiro-Proietti ABF, Catalan-Soares B 2002. Human T cell lymphotropic viruses (HTLV-I/II) in South America: should it be a public health concern? *J Biomed Sci* 9 (6): 587-595.

Catalan-Soares, B.; Carneiro-Proietti, A.B De F.; Proietti, F.A. And Interdisciplinary Htlv Research Group 2005. Heterogeneous Geographic Distribution Of Human T-Cell Lymphotropic Viruses I And Ii (Htlv-I/Ii): Serological Screening Prevalence Rates In Blood Donors From Large Urban Areas In Brazil. *Cad. Saúde Pública.*, Vol.21, N.3, 926-931.

- Chavance M, Frery N, Valette I, Schaffar-Deshayes LMN 1990. Sex ratio of human T-lymphotropic virus type I infection and blood transfusion. *Am J Epidemiol* 131 (3): 395-9.
- Chen J, Zekeng L, Yamashita M, Takeisha J, Miura T, Ido E, Mboudjeka I, Tsague JM, Hayami M, Kaptue L 1995. HTLV isolated from a Pygmy in Cameroon is related but distinct from the known Central African type. *Aids Res Hum Retrov* 11: 1529-1531.
- Chieffi PP, Chiattonne CS, Feltrim EN, Alves RC, Paschoalotti MA 2000. Coinfection by *Strongyloides stercoralis* in blood donors infected with human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1 in Sao Paulo City, Brazil. *Mem. Inst Oswaldo Cruz* 95(5): 711-712.
- Cossen C, Hagens S, Fukuchi R, Forghani B, Gallo D, Ascher M 1992. Comparison of six commercial human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) enzyme immunoassay kits for detection of antibody to HTLV-I and -II. *Journal of clinical microbiology*; 30: p: 724-5.
- Costa CMC, Salgueiro M, Carton H, Vale OC, Arruda AM 1989. Tropical spastic paraparesis in Northeastern Brazil. *Arq. Neuro-psiquiatria*; 47- p. 134.
- Dal Fabbro MMFJ, Cunha RV, Bóia MN, Portela P, Botelho CA, Freitas GMBF, et al. 2008. HTLV 1/2 infection: prenatal performance as a disease control strategy in State of Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop.*; 41(2):148-51.
- Desailloud R, Hober D 2009. Viruses and thyroiditis: An update. *Virol J.* 6: 5.
- Dustin E., Fenizia, C.; Gold, H.; Castro-Amarante, MF de.; Buchmann, C.; Pise-Masison, C.A.; Franchini, G. 2011. "Orf-I and Orf-II-Encoded Proteins in HTLV-1 Infection and Persistence." *Viruses* 3, no. 6: 861-885.
- Eiraku N, Novoa P, da Costa Ferreira M, Monken C, Ishak R, da Costa Ferreira O, Zhu, SW, Lorenco, R, Ishak M, Azevedo V, Guerreiro J, de Oliveira MP, Loureiro P, Hammerschlag N, Ijichi S, Hall WM 1996. Identification and characterization of a new and distinct molecular subtype of human T-cell lymphotropic virus type 2. *J Virol* 70: 1481-92.
- Feuer, G., e Green, P. L. (2005). Comparative biology of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. *Oncogene* 24, 5996–6004.

- Fujino R, Kawato K, Ikeda M, Miyakoshi H, Mizukoshi M, Imai J 1991. Improvement of gelatin particle agglutination test for detection of anti-HTLV-I antibody. *Jpn J Cancer Res*; 82: 367-70.
- Fujino T, Nagata Y 2000. HTLV-I transmission from mother to child. *Journal of reproductive immunology*, 47(2): 197-206.
- Furnia A, Lal R, Maloney E, Wiktor S, Pate E, Rudolph D, et al 1999. Estimating the time of HTLV-I infection following mother-to-child transmission in a breast-feeding population in Jamaica. *Journal of Medical Virology*, 59(4): 541-546.
- Gasmi, M., B. Farouqi, M. d'Incan, C. Desgranges. 1994. Long terminal repeat sequence analysis of HTLV type I molecular variants identified in four North African patients. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 10:1313-15.
- Gessain A, Cassar O, 2012. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front Microbiol* 3 (Article 388): 1-23.
- Gessain A, Gallo RC, Franchini G 1992. Low degree of human T-cell leukemia/lymphoma virus type I genetic drift in vivo as a means of monitoring viral transmission and movement of ancient human populations. *Journal of virology*, 66 (4): 2288-95.
- Gessain A, Rua R, Betsem E, Turpin J, Mahieux R 2013. HTLV-3/4 and simian foamy retroviruses in humans: discovery, epidemiology, cross-species transmission and molecular virology. *Virology*; 435: 187–199.
- Gessain A, Vernant JC, Maurs L, Barin F, Gout O, Calender A, et al 1985. Antibodies To Human T-Lymphotropic Virus Type-I In Patients With Tropical Spastic Paraparesis. *The Lancet*, 326 (8452): 407-410.
- Gessain A, Yanagihara R, Franchini G, Garruto RM, Jenkins CL, Ajdukiewicz AB, Gallo RC, Gadjusek DC 1991. Highly divergent molecular variants of human T-lymphotropic virus type I from isolated populations in Papua New Guinea and the Solomon Islands. *Proc Natl Acad Sci* 88: 7694-7698.
- Goff SP, 2007. Retroviridae: The Retroviruses and Their Replication. In: *Fields Virology*, 5^a ed. Eds. Knipe DM, Howley PM. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins v.2: p:1999-2069.

- Gonçalves DU, Proietti FA, Ribas JGR, Araujo MG, Pinheiro SR, Guedes AC, et al 2010. Epidemiology, Treatment, and Prevention of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-Associated Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*; 23(3): 577-589.
- Hahn BH, Shaw GM, Popovic M, Lo-Monico A, Gallo RC, Staal-Wong F 1984. Molecular cloning and analysis of a new variant of human T-cell leukemia virus (HTLV-1b) from an African patient with adult T-cell Leukemia-lymphoma. *Int J Cancer* 34 (5): 613-618.
- Hanchard B 2005. Outcomes of Early Life Exposure to Human T-cell Lymphotropic Virus Type 1. *Clin Infect Dis*; 41-p:542-3.
- Hino S, Katamine S, Kawase K, Miyamoto T, Doi H, Tsuji Y YT 1994. Intervention of maternal transmission of HTLV-1 in Nagasaki, Japan. *Leukemia*, 8 Suppl 1: S68-70.
- Hirata T, Uchima N, Kishimoto K, et al 2006. Impairment of host immune response against *Strongyloides stercoralis* by human T cell lymphotropic virus type 1 infection. *Am J Trop Med Hyg*; 74: p: 246–49.
- Iñiguez AM, Gastaldello R, Otsuki K, Balangero M, Costa FC, Remondegui, C et al, 2010. Correlation of HTLV-1 Tax Genetic diversity with HTLV-1 Associated Myelopath/Tropical Spastic Paraparesis progression and HTLV-1a genotypes in a Endemic Region in a Argentina. *J Med Virology*, 82. p:1438–1441
- Ishak, R., Ishak, M.O.G., Azevedo, V.N., Santos, D.E.M., Vallinoto, A.C.R., Crescente, J.A., & Hall, W.W.. 1998. Detection of HTLV-IIa in blood donors in an urban area of the Amazon Region of Brazil (Belém, PA). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 31(2), 193-197.
- Kajiyama W, Kashiwagi S, Ikematsu H, Hayashi J, Nomura H, Okochi K 1986. Intrafamilial transmission of adult T cell leukemia virus. *The Journal of infectious diseases*; 154 (5):851-7.
- Kaplan JE, Khabbaz RF, Murphy EL, Hermansen S, Roberts C, Lal R, Heneine W, Wright D, Matijas L, Thomson R, Rudolph D, Switzer, S,WM 1996. Male-to-female transmission of human T-cell lymphotropic virus types I and II: association with viral load. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 12 (2): 193-201.

- Kaplan JE, Osame M, Kubota H, et al. 1990. The risk of development of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. *J Acquir Immune Defic Syndr.*; 3-11. p: 1096-101.
- Katamine S, Moriuchi R, Yamamoto T, Terada K, Miyamoto T, Eguchi K, et al 1994. HTLV-I proviral DNA in umbilical cord blood of babies born to carrier mothers. *The Lancet*; 343(8909): 1326-1327.
- Kitagawa T, Fujishita M, Taguchi H, Miyoshi I TH 1986. Antibodies to HTLV-I in Japanese immigrants in Brazil. *JAMA*; 7(256(17)): p. 2342.
- La Grenade L, Hanchard B, Fletcher V, Cranston B, Blattner W 1990. Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. *Lancet*; 336p:1345-7.
- Lairmore, M.D. e Franchini, G. 2007. Retroviridae: Human T-Cell Leukemia Virus Types 1 and 2. In: *Fields Virology*, 5^a ed. Eds. Knipe DM, Howley PM. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins v. 2: 2072-2105.
- Lairmore, M.D., Haines, R., Anupam, R 2012. Mechanisms of human T-lymphotropic virus type 1 transmission and disease. *Current Opinion in Virology*, 2 (4), p. 474-481.
- Lee H, Swanson P, Shorty VS, Zack J a, Rosenblatt JD, Chen IS 1989. High rate of HTLV-II infection in seropositive i.v. drug abusers in New Orleans. *Science*; 244(4903): 471-5.
- Lee HH, Weiss SH, Brown LS, Mildvan D, Shorty V, Saravolatz L, et al 1990. Patterns of HIV-1 and HTLV-I/II in intravenous drug abusers from the middle atlantic and central regions of the USA. *The Journal of infectious diseases*; 162 (2): 347-52.
- Lee, H, Chafets DM., Busch MP., Murphy EL. 2004. Quantitation of HTLV-I and II proviral load using real-time quantitative PCR with SYBR Green chemistry. *Journal of Clinical Virology*; 31 (4): 275 - 282
- Liu H, Shah M, Stramer SL, Chen W, Weiblen BJ, Murphy EL 1999. Sensitivity and specificity of human T-lymphotropic virus (HTLV) types I and II polymerase chain reaction and several serologic assays in screening a population with a high prevalence of HTLV-II. *Transfusion*; 39 (11): 1185-1193.

- Magri M. C., Brigido L. F., Morimoto H. K., Caterino-de-Araujo A. 2013. Human T cell lymphotropic virus type 2a strains among HIV type 1-coinfected patients from Brazil have originated mostly from Brazilian Amerindians. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 29 1010–1018
- Mahieux R, Gessain A 2005. New human retroviruses: HTLV-3 and HTLV-4. *Med Trop* 65; 95(5), 711-2.
- Mahieux RC, Chappey V, Georges-Courbot MC, Dubreuil G, Mauclere P, Georges A, Gessain A 1998. Simian T-cell lymphotropic virus type I from *Mandrillus sphinx* as a simian counterpart of human T-cell lymphotropic virus type I subtype D. *J Virol* 72: 10316-10322.
- Mahieux, R., Horal, P., Mauclere, P., Mercereau-Puijalon, O., Guillotte, M., Meertens, L., et al, 2000. Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Gag Indeterminate Western Blot Patterns in Central Africa: Relationship to Plasmodium falciparum Infection. *J. Clin. Microbiol.* 38, p: 4049–4057.
- Maloney EM, Wiktor SZ, Palmer P, Cranston B, Pate EJ, Cohn S, et al 2003. A Cohort Study of Health Effects of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type I Infection in Jamaican Children. *Pediatrics*;112 (2):e136-e142.
- Manns a, Hisada M, La Grenade L. Human T-lymphotropic virus type I infection. *Lancet* ;353(9168): 1951-8.
- Marinho J, Galvão-Castro B, Rodrigues LC, Barreto ML 2005. Increased risk of tuberculosis with human T-lymphotropic virus-1 infection: a case-control study. *Journal of acquired immune deficiency syndromes*; 40 (5): 625-8
- Martins ML e Stancioli EFB 2006. Patogênese da infecção pelo HTLV. *Cadernos Hemominas HTLV. 4ª ed*; Cap.2 p: 21-45.
- Martins ML, Martins CPS, Carvalho LD, Souza JG e Stancioli EFB 2010. Patogênese da infecção pelo HTLV. *Cadernos Hemominas HTLV. 5ª ed*; Cap.3 p: 30-59.
- Martins-Castro LH, Chaves CJ, Callegaro D, Nóbrega JPS SM 1989. HTLV-1 associated myelopathy in Brazil; a preliminary report. *Arq. Neuro-Psiquiatria*; 47- p. 501-502.
- Matsuoka M, Green PL 2009. The HBZ gene, a key player in HTLV-1 pathogenesis. *Retrovirology* – Jan: p: 671.

Matsuoka, M., and Jeang, K. T, 2007. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nat. Rev. Cancer* 7: 270–280.

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de manejo clínico do HTLV. 2013. Available from: <http://www.scielo.br/scielo>.

Miura T, Yamashita M, Zaninovic V, Cartier L, Takehisa J, Igarashi T, Ido E, Fujiyoshi T, Sonoda S, Miura K, Fukunaga T, Igarashi T 1994. Phylogenetic subtypes of human T-lymphotropic virus type I and their relations to the anthropological background. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:1124-1127.

Miura T, Yamashita M, Zaninovic V, Cartier L, Takehisa J, Igarashi T, Ido E, Fujiyoshi T, Sonoda S, Tajima K, Hayami M 1997. Molecular phylogeny of human T-cell leukemia virus type I and II of Amerindians in Colombia and Chile. *J Mol Evol* 44: 76-82.

Monteiro DLM, Taquette SR, Sodré Barmpas DB, Rodrigues NCP, Teixeira SAM, et al. 2014. Prevalence of HTLV-1/2 in Pregnant Women Living in the Metropolitan Area of Rio de Janeiro. *PLoS Negl Trop Dis* 8(9): e 3146.

Mueller N, Okayama A, Stuver STN 1996. Findings from the Miyazaki Cohort Study. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 13 (Suppl26): 2-7.

Murphy EL, Mahieux R, Thé G de, Tekaiia F, Ameti D, Horton J, et al 1998. Molecular epidemiology of HTLV-II among United States blood donors and intravenous drug users: an age-cohort effect for HTLV-II RFLP type a. *Virology*; 242(2): 425-34.

Nakada K, Kohakura M, Komoda H HY, 1984. High incidence of HTLV antibody in carriers of *Strongyloides stercoralis*. *Lancet*; (17):1(8377):633.

Nakashima K, Kashiwagi S, Kajiyama W, Hirata M, Hayashi J, Noguchi A, Urabe K, Minami K, Maeda Y 1995. Sexual transmission of human T-lymphotropic virus type I among female prostitutes and among patients with sexually transmitted diseases in Fukuoka, Kyushu, Japan. *Am J Epidemiol* 141 (4): 305-311.

Namen-Lopes MSS, Martins ML, Drummond PC, Lobato RR 2009. Lookback study of HTLV-1 and 2 seropositive donors and their recipients in Belo Horizonte, Brazil. *Transfusion Med* 19: 180-188.

Nascimento LB, Carneiro MA, Teles SA, Lopes CL, Reis NR, Silva AM, et al 2009. Prevalência da infecção pelo HTLV-1 em remanescentes de quilombos no Brasil Central. *Rev Soc Bras Med Trop*; 42(6): 657-60

Oliveira MS, Matutes E, Famadas LC, Schulz TF, Calabro ML NM de, Andrada-Serpa MJ, Tedder RS, Weiss RA CD 1990. Adult T-cell leukaemia/lymphoma in Brazil and its relation to HTLV-I. *Lancet*; 20-336: p. 987-90.

Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Igata A, et al 1986. HTLV-I Associated Myelopathy, A New Clinical Entity. *The Lancet*; 327(8488): 1031-1032

Paiva, Arthur e Casseb, Jorge 2014. Sexual transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* , vol.47 (3), p. 26

Pérez C, Lilian et al 2007. Eritrodermia exfoliativa y dermatitis infecciosa en un lactante infectado por el virus linfotrópico humano-I (HTLV-I). *Rev. chil. infectol.* , vol.24, no.2, p.142-148

Pinheiro A.A. S, 2010 – HTLV-1 - Ocular – *Cadernos Hemominas HTLV – 5ª ed; Cap. 11:* p.224 a 229.

Pique C, Jones KS. Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1, 2012. *Front Microbiol*; 3:378.

Poiesz BJ, Dube S, Choi D, Esteban E, Ferrer J, Leon-Ponte M, et al 2000. Comparative performances of an HTLV-I/II EIA and other serologic and PCR assays on samples from persons at risk for HTLV-II infection. *Transfusion*;40 (8): 924-930.

Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Galto RC 1980. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 7415-7419.

Poiesz BJ, Ruscetti FW, Reitz MS, Kalyanaraman V, Gallo RC 1981. Isolation of a new type C retrovirus (HTLV) in primary uncultured cells of a patient with Sezary T-cell leukaemia. *Nature* 294, 268 – 271.

- Pombo de Oliveira MS, Dobbin JA, Loureiro P, Borducchi D, Maia RC, Fernandes MA, Cavalcanti Jr GB, Takemoto S, Franchini G 2002. Genetic mutation and early onset of T-Cell leukemia in pediatric patients infected at birth with HTLV-I. *Leukemia Res*; 26:155-61.
- Primo JRL, Brites C, Oliveira MFSP, Moreno-Carvalho O, Machado M, Bittencourt AL 2005. Infective dermatitis and Human T-cell lymphotropic virus type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in childhood and adolescence. *Clin Infect Dis*; 41: p:535-541.
- Renner, J.D.P.; Laurino, J.P.; Menna-Barreto, M. & Schmitt, V.M 2006. Molecular evidence of HTLV-II subtype b among urban population living in South Brazil. *AIDS Res. hum. Retrovir.*, 22: 301-306,
- Rosenblatt J, Wachsman W, Shimotohno K, Slamon D CI 1984. The comparative molecular biology of HTLV-I and HTLV-II. *Princess Takamatsu Symp.*; (15):177-85.
- Roucoux DF e Murphy EL 2004. The epidemiology and disease outcomes of Human T-Lymphotropic Virus type II. *AIDS Reviews* 6; 144-154.
- Roucoux DF, Wang B, Smith D, Nass CC, Smith J, Hutching ST, et al 2005. A prospective study of sexual transmission of human T lymphotropic virus (HTLV)-I and HTLV-II. *The Journal of infectious diseases*;191(9): 1490-7.
- Sabino e Carvalho, 2010 - Diagnóstico Laboratorial do HTLV – *Cadernos Hemominas HTLV* – Cap. 4: 60 a 67
- Sabino EC, Zrein M, Taborda CP, Otani MM, Ribeiro-Dos-Santos G, Saez-Alquezar A 1999. Evaluation Of The INNO-LIA HTLV I/II Assay For Confirmation Of Human T-Cell Leukemia Virus Reactive Sera In Blood Bank Donations. *J Clin Microbiol* 37 (5): 1324-1328.
- Salemi M, Van Dooren S, Audenaert E, Delaporte E, Goubau P, Desmyter J, Vandamme A-M 1998. Two new human T-lymphotropic virus type I phylogenetic subtypes in seroindeterminates, a Mbuti pygmy and a Gabonese, have closes relatives among African STLV-I strains. *Virology* 46: 277-287.
- Salemi M, Vandamme A-M, Guano F, Gradozzi C, Cattaneo E, Casoli C, Bertazzoni U 1996. Complete nucleotide sequence of the Italian human T-cell lymphotropic virus type I isolate Gu

and phylogenetic identification of a possible origin of South European epidemics. *J Gn Virol* 77: 1193-1201.

Salles NA, Sabino EC, Barreto CC, Barreto AM, Otani MM, Chamone DF 2003. The discarding of blood units and the prevalence of infectious diseases in donors at the Pro-Blood Foundation/Blood Center of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil. *Rev Panam Salud Publica.*;13. p:111-6.

Santos, FLN e Lima, FWM 2005. Epidemiologia, fisiopatogenia e diagnóstico laboratorial da infecção pelo HTLV-I. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, vol.41, n.2, pp. 105-116.

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

Steinfort DP, Brady S, Weisinger HS, Einsiedel L 2008. Bronchiectasis in central Australia: A young face to an old disease. *Resp Med* 102: 574-578.

Takatsuki K 2005. Discovery of adult T-cell leukemia. *Retrovirology*. 2005 Jan; 216.

Takezaki T, Tajima K, Ito M, Ito S, Kinoshita K, Tachibana K MY 1997. Short-term breast-feeding may reduce the risk of vertical transmission of HTLV-I. *The Tsushima ATL Study Group. Leukemia*;11: p: 60-2.

Thorstensson R, Albert J, Andersson S 2002. Strategies for diagnosis of HTLV-I and -II. *Transfusion* 42: 780-791.

Tsukasaki K, Tobinai K 2013. Biology and treatment of HTLV-1 associated T-cell lymphomas. *Best Pract Res Clin Haematol*; 26(1): 3-14

Ureta-Vidal A, Angelin-Duclos C, Tortevoeye P, Murphy E, Lepère J-F, Buigues R-P, Jolly N, Joubert M, Carles G, Pouliquen J-F, De Thé G, Moreau J-P, Gessain A 1999. Mother to child transmission of human T-cell leukemia: lymphoma virus type I: implication of high antiviral antibody titer and high proviral load in carrier mothers. *Int J Cancer* 82: 832-836.

Van Dooren S, Gutozo E, Salemi M, Watts D, Audenaert E, Duwe S, Ellerbrok H, Grassmann R, Hagelberg E, Desmyter J, Vandamme A-M. 1998. Evidence for a post-Columbian introduction of human T-cell lymphotropic virus in Latin America. *J Virol* 79: 2695-2708.

Vandamme A-M, Liu HF, Goubau P, Desmyter J 1994. Primate T-lymphotropic virus type I LTR sequence variation and its phylogenetic analysis: compatibility with an African origin of PTLV-I. *Virol* 202: 212-223.

Vandamme A-M, Salemi M, Van Brussel M, Liu HF, Van Laethem K, Van Ranst M, Michels L, Desmyter J, Goubau P 1998. African origin of human T-lymphotropic virus type 2 (HTLV-2) supported by a potential new HTLV-2d subtype in Congolese Bambuti Efe Pygmies. *J Virol* 72: 4327-4340.

Vandamme, A. M., U. Bertazzoni, and M. Salemi. 2000. Evolutionary strategies of human T-cell lymphotropic virus type II. *Gene* 261:171-180

Verdonck K, Gonzalez E, Van Dooren S, Vandamme AM, Vanham G, Gotuzzo E 2007. Human T-lymphotropic virus 1: recent Knowledge about an ancient infection. *Lancet Infect Dis* 7: 266-81

Vidal, A.U., A. Gessain, M. Yoshida, F. Tekaiia, B. Garin, B. Guillermain, T. Schuls, R. Farid and G. De The 1994. Phylogenetic classification of human T-cell leukaemia/lymphoma virus type I genotypes in five major molecular and geographical subtypes. *Journal of General Virology*; 75: 3655-66.

Wiktor SZ, Alexander SS, Shaw GM, Weiss SH, Murphy EL, Wilks RJ, 1990. Distinguishing between HTLV-I and HTLV-II by Western blot. *Lancet*; 335:1533

Wiktor SZ, Pate EJ, Rosenberg PS, Barnett M, Palmer P, Medeiros D ME, WA. B 1997. Mother-to-child transmission of human T-cell lymphotropic virus type I associated with prolonged breast-feeding. *J Hum Virol.* ;1 (1): 37-44.

Wolf ND, Heneine W, Carr JK, Garcia AD, Shanmugam V, Tamoufe U, Torimiro JN, Prosser AT, Lebreton M, Mpoudi-Ngole E, McCutchan FE, Birx DL, Folks TM, Burke DS, Switzer WM 2005. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 7994-7999.

Yakova M, Lézin A, Dantin F, Lagathu G, Olindo S, Jean-Baptiste G, et al 2005. Increased proviral load in HTLV-1-infected patients with rheumatoid arthritis or connective tissue disease. *Retrovirology Jan*; 24.

Yamano Y 2002. Correlation of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) mRNA with proviral DNA load, virus-specific CD8+ T cells, and disease severity in HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP). *Blood. Jan, 99* (1): 88-94.


Yao K, Hisada M, Maloney E, Yamano Y, Hanchard B, Wilks R, et al 2006. Human T lymphotropic virus types I and II western blot seroindeterminate status and its association with exposure to prototype HTLV-I. *The Journal of infectious diseases*. Feb; 193 p: 427-37.

Yoshida M 2010. Molecular approach to human leukemia: Isolation and characterization of the first human retrovirus HTLV-1 and its impact on tumorigenesis in Adult T-cell Leukemia, – *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci: 86*, 117-130.

Zanella L, Otsuki K, Marin MA, Bendet I, Vicente AC. 2012. Complete genome sequence of Central Africa human T-cell lymphotropic virus subtype 1b. *J Virol 86*: 12451.

8. ANEXOS

8.1 – Questionário - Dados Clínicos e Epidemiológicos

		Banco de Dados HTLV - HUPE	
Identificação			
Registro		Última Consulta	DD/MM/YYYY
Nome		Data de Nascimento	DD/MM/YYYY
Naturalidade		Profissão	
Estado civil		Origem do paciente	
Endereço			
	Telefone		
		Sexo	<input type="radio"/> Masculino <input type="radio"/> Feminino
		Raça	<input type="radio"/> Negro <input type="radio"/> Branco <input type="radio"/> Pardo <input type="radio"/> Indígena <input type="radio"/> Amarelo
		1ª consulta	DD/MM/YYYY
Diagnóstico Laboratorial			
Sorologia de triagem	Metodologia de triagem	Data do exame de triagem	
		DD/MM/YYYY	
Exame confirmatório	Metodologia de exame confirmatório	Data do exame confirmatório	
		DD/MM/YYYY	
Diagnóstico final	Coinfecção	Qual coinfeção	Outras coinfeções
Estágio clínico	Qual estágio clínico		
Dados Familiares			
Mãe viva	Sorologia da mãe		
Pai vivo	Sorologia do pai		
Irmãos	Número de irmãos	Sorologia dos irmãos	
Filhos	Número de filhos		



Dados Epidemiológicos

Fatores de risco

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> Drogas injetáveis | <input type="checkbox"/> Aleitamento |
| <input type="checkbox"/> Contatante sexual com HTLV | <input type="checkbox"/> Aleitamento por HTLV+ |
| <input type="checkbox"/> Transfusão de sangue | <input type="checkbox"/> Amamentação cruzada |

Dados do Uso de Drogas Injetáveis

Tempo de uso

Qual droga

Compartilha material com sangue

Dados de História Sexual

Sexarca

Número de parceiros

Número de parceiros nos últimos 3 anos

Uso de preservativo regular

Parceiro fixo

Sorologia do parceiro

Idade do parceiro

Contactante sexual com HTLV+

Dados de Transfusão Sanguínea

Transfusão de sangue

Tipo de transfusão

Ano de transfusão

Local da transfusão

Motivo da transfusão

Dados de Aleitamento

Amamentação

Tempo de amamentação

Tipo de parto

Amamentação cruzada

Aleitamento por HTLV+