

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL



**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T
DE HUMANO (HTLV) EM PACIENTES COM PARAPRESIA ESPÁSTICA
TROPICAL/MIELOPATIA (PET/MAH), PORTADORES E GESTANTES EM
ALAGOAS**

ERLON OLIVEIRA DOS SANTOS

RECIFE/PE

2013

ERLON OLIVEIRA DOS SANTOS

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS LINFOTRÓPICO DE CÉLULAS T DE HUMANO (HTLV) EM PACIENTES COM PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL/MIELOPATIA (PET/MAH), PORTADORES E GESTANTES EM ALAGOAS.

Tese apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical. Área de Concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

RECIFE/PE

2013

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Gláucia Cândida - CRB4-1662

S237c Santos, Erlon Oliveira dos.
Caracterização molecular do Vírus Linfotrópico de células T de humano (HTLV) em pacientes com paraparesia espástica tropical/mielopatia (PET/MAH), portadores e gestantes em alagoas / Erlon Olivira dos Santos. – Recife: O autor, 2013.
109 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2013.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Vírus 1 Linfotrópico T Humano. 2. Vírus 2 Linfotrópico T Humano. 3. Carga Viral. 4. Produtos do Gene Tax. 5. Gestantes. I. Coêlho, Maria Rosângela Cunha Duarte. (Orientadora). II. Título.

618.9883

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2013-155)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

REITOR

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Nicodemos Teles de Pontes Filho

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MEDICINA TROPICAL**

Valdênia Maria Oliveira de Souza

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MEDICINA TROPICAL**

Vera Magalhães da Silveira

CORPO DOCENTE

Ana Catarina de Souza Lopes

Ana Lúcia Coutinho Domingues

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Fábio André Brayner dos Santos

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Maria Amélia Vieira Maciel

Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

Marli Tenório Cordeiro

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vera Magalhães da Silveira

Vlaúdia Maria Assis Costa

CORPO DOCENTE COLABORADOR

Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Rejane Pereira Neves



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPESQ)

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical (PPGMEDTROP)

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DO DOUTORANDO ERLON OLIVEIRA DOS SANTOS

No dia 13 de junho de 2013, às 08h00, na Sala Professor Murillo La Grecca, no 3º andar do Centro de Ciências Saúde (CCS/UFPE), os Membros Doutores **Profª. Drª. Vera Magalhães da Silveira – Presidente da Banca (UFPE)**, **Profª. Drª. Terezinha Tenório da Silva (UFPE)**, **Profª. Drª Lúbia Cristina Rocha Vilela Moura (UFPE)**, **Profª. Drª Ana Cecília Cavalcanti de Albuquerque (ASCES)** e **Drª. Marli Tenório Cordeiro (FIOCRUZ/CPqAM)**, componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguíram o doutorando **ERLON OLIVEIRA DOS SANTOS** sobre a sua Tese intitulada “**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO HTLV EM PACIENTES COM PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL/MIELOPATIA (PET/MAH), PORTADORES E GESTANTES EM ALAGOAS**”, a qual foi orientada pela **Profª. Drª Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho (UFPE)**. Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta do doutorando, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Profª. Drª. Vera Magalhães da Silveira

APROVADO

Profª. Drª. Terezinha Tenório da Silva

APROVADO

Profª. Drª. Lúbia Cristina Rocha Vilela Moura

APROVADO

Profª. Drª. Ana Cecília Cavalcanti de Albuquerque

APROVADO

Drª. Marli Tenório Cordeiro

APROVADO

Dedico esta tese

Aos meus pais, João Alves, Marina Oliveira dos Santos e Gildete Brandão

(in memoriam) e aos meus irmãos.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho pela sua paciente orientação em todos os momentos de dúvidas e dificuldades demonstrados ao longo desta tese.

Ao prof. Dr. Paulo Souza pelo apoio e pela valiosa contribuição na realização dos testes moleculares.

À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), ao Setor de virologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por viabilizarem a realização deste trabalho.

À Fundação HEMOPE e à Dra. Ana Cristina Souza pelo apoio técnico e metodológico.

Ao médico infectologista Arthur Maia Paiva e à assistente social Maria Helena Araújo, pelo grande apoio concedido no Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes. Desde já o meu obrigado.

À médica infectologista Margareth Mendonça, pela grande contribuição e apoio concedidos desde o início da pesquisa no Hospital Escola Dr. Hêlvio Auto.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical pelos ensinamentos e apoio.

À Jupira Pinho - ex-secretária da Pós-Graduação em Medicina Tropical, pelo apoio, dedicação e pelo carisma que tanto me cativou. A você o meu eterno agradecimento.

Aos colegas da pós-graduação Jefferson Almeida, Viviane Morais e Deise Vasconcelos pela ajuda e participação direta na execução deste trabalho.

A todos os profissionais do Serviço de Infectologia do Hospital Escola Hólvio Auto e do Hospital Universitáριο Prof. Alberto Antunes.

Por fim, agradeço a todos os pacientes que gentilmente aceitaram participar desta pesquisa.

“O mistério é a coisa mais nobre de que podemos ter experiência.
É a emoção que se encontra no cerne da verdadeira ciência.
Aquele que não sente essa emoção e que não pode mais se maravilhar
nem se espantar, é como se já estivesse morto.”

Albert Einstein

RESUMO

Os vírus linfotrópicos de células T humana tipos 1 e 2 (HTLV-1/2) são retrovírus associados a algumas doenças. O HTLV-1 está associado à paraparesia espástica tropical/mielopatia (PET/MAH), enquanto o HTLV-2 tem sido ocasionalmente associado às síndromes neurológicas semelhantes a PET/MAH sem associação de malignidade. Os mecanismos envolvidos no surgimento das doenças ainda não estão bem definidos. Entretanto, a carga proviral do HTLV, as mutações e a proteína tax podem estar envolvidas no desenvolvimento da doença. Os objetivos do presente estudo foram caracterizar o HTLV em pacientes com PET/MAH e portadores e determinar a soroprevalência desses vírus em gestantes durante o pré-natal. O DNA proviral foi extraído a partir de células periféricas mononucleares, utilizando o kit comercial (QIAamp® DNA Blood Mini Kit) e a identificação do tipo viral foi realizada através da Nested-PCR. Já a carga proviral do HTLV-1 pela PCR quantitativa - expressas em 10^6 /PBMC. Para classificar a sequência tax, foi utilizada a enzima de restrição *Bsh1236I* (*BstUI*). Na pesquisa do anti-HTLV1/2 nas gestantes foi utilizado o KIT ELISA Ab capture ELISA Teste System (Ortho clinical Diagnostic In, Raritan, USA). Foi utilizado o Teste de Fisher, Mann-Whitney para avaliar a média da carga proviral. A Razão de prevalência, qui-quadrado (χ^2) e exato de Fischer foram utilizados para determinar as associações entre as gestantes. O poder do teste foi de 95%, com $p < 0,05$ como limite para a significância. Fizeram parte do estudo 101 pacientes infectados pelo HTLV 1/2 - sintomáticos e assintomáticos e 209 gestantes. O HTLV-1 foi identificado em 68,3% (69/101) e o HTLV-2 em 31,7% (32/101). A média da carga proviral do HTLV-1 nos pacientes portadores foi de $3,62 \log_{10}$; DP $\pm 0,960$; IC_{95%} 3,31-3,93 e naqueles com PET/MAH foi de $3,18 \log_{10}$; DP 1,261; IC_{95%} 2,68-3,68 ($p = 0.0218$). Em relação à sequência tax do HTLV, o subgrupo A foi identificado em 95,7% (66/69) e o B em 4,3% (3/69). A soroprevalência do HTLV1/2 nas gestantes foi de 8,1% (17/209). O DNA proviral do HTLV-1 foi identificado em 64,2% (9/14), com média da carga proviral de $3,17 \pm 1,87 \log_{10}$. As demais amostras foram negativas para o HTLV-1. Todas as gestantes encontravam-se assintomáticas e nenhuma variável pesquisada apresentou associação estatisticamente significativa. Em conclusão, não houve diferença entre a média da carga proviral do HTLV-1 entre os pacientes com PET/MAH e portadores. Houve uma maior frequência do subgrupo A da sequência tax nos pacientes com PET/MAH, sem associação com o desenvolvimento da doença. Foi elevada a prevalência da infecção pelo HTLV-2 nos portadores. A alta soroprevalência do HTLV-1/2 nas gestantes sugere a implantação da triagem deste vírus no pré-natal.

Palavras chaves: HTLV-1. HTLV-2. Carga viral. Proteína tax. Gestantes.

ABSTRACT

The human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is a retrovirus associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) among other diseases. The HTLV-2 has been occasionally associated to neurological syndromes similar to HAM/TSP without association of hematologic malignancy. The mechanisms involved in the onset of the disease are not well defined. The HTLV-1 proviral load, the tax protein action and the subgroups A tax sequence of HTLV-1 are related to the development of HAM/TSP. The study aimed: identified the HTLV type, classify the tax sequence in subgroup A and B and quantify the HTLV-1 proviral load in patients with HAM/TSP and asymptomatic carriers. And as a secondary objective: to determine the frequency of HTLV-1/2 in pregnant women. This study enrolled 111 HTLV 1/2 infected patients attended in two reference centers in Infectious and Parasitic Diseases at Maceió-AL. The proviral DNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells (PBMC), using a commercial kit (QIAamp® DNA Blood Mini Kit) according to the manufacturer's instructions. The identification of HTLV type was realized by Nested-PCR and the HTLV-1 proviral load by quantitative PCR, expressed in 10^6 PBMC. To classify the tax sequence subgroup, the restriction enzyme *Bsh1236I* (*BstUI*) was used, *AccII* isoschizomer enzyme. The anti-HTLV 1/2 the patient was performed by ELISA KIT Ab capture ELISA Test System (Ortho clinical DiagnosticIn, Raritan, USA. The HTLV-1 was identified in 68,3% (69/101) of analyzed patients, which 42% (29/69) of HAM/TSP group and 57,9% (40/69) of asymptomatic carriers. The HTLV-2 was identified in 31,7% (32/101) of patients which 31,2% (10/32) with HAM/TSP and 68.75% (22/32) of asymptomatic carriers. The prevalence of anti-HTLV 1/2 in pregnant women was 8.1% and HTLV-1 was identified in 4.3% of them. The HTLV-1 proviral load average in asymptomatic carriers was $3,62 \log_{10}$; DP $\pm 0,960$; CI_{95%} 3,31-3,93 and of 3,18 \log_{10} ; DP 1,261; CI_{95%} 2,68-3,68 in patients with HAM/TSP ($p = 0.0218$). The subgroup A tax sequence was identified in 41,5% (27/69) of patients with HAM/TSP and in 56,5% (39/69) in asymptomatic carriers. And the subgroup B was observed in only one patient with HAM/TSP and in two asymptomatic carriers. Among the pregnant women analyzed, the anti-HTLV1/2 prevalence was 8,1%. HTLV-1 was identified in 4,3% pregnant women seropositive, with HTLV-1 proviral load average of $3,17 \pm 1,87 \log_{10}$. All pregnant women were asymptomatic. None of the variables studied were statistically significant associated. In conclusion, there was no difference between the mean of HTLV-1 proviral load between the groups. There was a higher frequency of subgroup A tax sequence in patients with HAM / TSP and a high percentage of HTLV-2 circulating in Alagoas. With regard to pregnant women, we observed a high prevalence of HTLV-1, demonstrating the need for implementation of serological screening for HTLV 1/2 in prenatal care.

Keywords: HTLV-1. HTLV-2. Proviral load. Tax protein. Pregnant women.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Estrutura morfológica do HTLV-1	20
Figura 02. Aspecto genômico do HTLV-1	21
Figura 03. Papel transativador da proteína tax	23
Figura 04. Ciclo de replicação do HTLV-1	25
Figura 05. Lesões dermatológicas em paciente com LLTA	30
Figura 06. <i>Flower cells</i> : linfócitos com alterações nucleares	31

LISTA DE QUADROS, GRÁFICOS E TABELAS

Quadros

Quadro 01. Classificação filogenética do HTLV-1 26

Quadro 02. Critérios diagnósticos para PET/MAH estabelecidos pela OMS 40

Tabela

Tabela 01. Sequência de primers usados na PCR 46

ARTIGO I

Tabela 01 - Sequência de primers utilizados na PCR 72

Figura 01. Mediana da carga proviral do HTLV-1 em pacientes com PET/MAH e assintomáticos 74

ARTIGO II

Tabela 01. Sequência de primers utilizados na PCR 86

Tabela 02. Características sócio-demográficas das 209 gestantes assistidas pelo programa Saúde da Família. Penedo, Alagoas, 2013 88

Tabela 03. Características relacionadas às gestantes assistidas pelo Programa Saúde da Família, segundo a positividade para o anti-HTLV. Penedo, Alagoas, 2013 90

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

- CD – Grupo de diferenciação
- CTL – Linfócitos T citotóxicos
- DNA – Ácido desoxirribonucleico
- ELISA – Ensaio imunoenzimático
- gp - glicoproteína
- HEHA – Hospital escola Dr. Hélvio Auto
- HIV – Vírus da imunodeficiência humana
- HTLV-1 – Vírus linfotrópico de células T humana do tipo 1
- HTLV-2 - Vírus linfotrópico de células T humana do tipo 2
- HTLV-3 - Vírus linfotrópico de células T humana do tipo 3
- HTLV-4 - Vírus linfotrópico de células T humana do tipo 4
- HUPAA – Hospital Universitário prof. Alberto Antunes
- IL-2 – Interleucina 2
- INF- γ – Interferon gama
- LCR – Líquido cefalorraquidiano
- LLTA – Leucemia/Linfoma de células T do adulto
- LTR – Terminações longas repetidas
- mL – Mililitro
- nm - Nanômetro
- OMS – Organização Mundial da saúde
- ORF – Fase de leitura aberta
- pb – Pares de base
- PBMC – Células mononucleares do sangue periférico
- PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PET/MAH – Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia Associada ao HTLV

RNA – Ácido ribonucléico

RNA_m – Ácido ribonucléico mensageiro

SNC- Sistema nervoso central

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

TNF α – Fator de necrose tumoral alfa

TR – Transcriptase reversa

UDIs – Usuário de drogas injetáveis.

UV – Ultra violeta

WB – Western Blot

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. ASPECTOS HISTÓRICOS	18
2.1 Estrutura viral e genômica do HTLV-1	19
2.2 Proteína <i>tax</i> e Infecção pelo HTLV-1	22
2.3 Ciclo replicativo do HTLV-1	24
2.4 Classificação filogenética do HTLV-1	26
2.5 Quantificação da carga proviral como marcador de risco na infecção pelo HTLV-1	27
2.6 Doenças associadas ao HTLV-1	28
2.6.1 Leucemia/Linfoma de células T do Adulto (LLTA)	28
2.6.2 Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia associada ao HTLV-1	31
2.6.3 Outras doenças associadas ao HTLV-1	33
2.7 Diagnóstico da infecção pelo HTLV-1	34
2.8 Aspectos epidemiológicos	35
3. OBJETIVO GERAL	38
3.1 Objetivos específicos	38
4. Desenhos dos estudos	39
4.1 Locais dos estudos	39
4.2 Populações do estudo	39
4.3 Definição dos termos	39
4.4 Definição do tamanho da amostra	41
4.5 Coleta e processamento dos dados e das amostras	41
4.6 Categorização das variáveis dependentes	42
4.6.1 Categorização das variáveis independentes	42
4.7 Critérios de inclusão	43

4.7.1 Critérios de exclusão	43
4.8 Separação dos leucócitos	43
4.9 Extração de DNA dos leucócitos	43
4.10 Nested - PCR para a sequência env-tax do HTLV-1	43
4.11 Nested – PCR para a sequência env-tax do HTLV-2	44
4.12 Determinação dos subgrupos A e B da sequência tax	44
4.13 Quantificação da carga proviral do HTLV-1 nas amostras	45
4.14 Curva-padrão para PCR em tempo real	45
4.15 Quantificação do gene de albumina nas amostras	45
5. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	47
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
7. RESULTADOS	48
8. CONCLUSÕES	49
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
REFERÊNCIAS	51
APENDICES	67
A. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	67
B. Questionário	68
C. Versão em Português do artigo I	69
D. Versão em Português do artigo II	82
ANEXOS	98
A. Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UNCISAL	98
B. Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UNCISAL	99
C. Instruções aos autores – JCM	100
D. Instruções aos autores- IJGO	104

1. INTRODUÇÃO

Os vírus linfotrópicos de células T humana tipo 1 está associado à Leucemia/Linfoma de células T do Adulto (LLTA) e à Paraparesia Espástica Tropical/Mielopatia associada ao HTLV (PET/MAH) dentre outras doenças (STARLING et al., 2013). Cerca de 3 a 5% dos indivíduos infectados pelo HTLV-1 desenvolve PET/MAH, que pode acontecer dentro de vários anos ou décadas (SCHEINER et al., 2005, IWANAGA et al., 2010).

O HTLV-2 tem sido ocasionalmente associado a síndromes neurológicas semelhantes a PET/MAH sem evidências de produção de malignidade hematológica, entretanto, alguns estudos sugerem uma associação com a PET/MAH (TREVINO et al., 2012).

Os fatores que contribuem para o desenvolvimento da patogênese dessas doenças causadas pelo HTLV-1, ainda não estão bem esclarecidos. Entretanto, sugere-se que ocorra interação vírus/hospedeiro possibilitando a mudança do *status* de assintomático para sintomático. O HTLV-1 encontra-se integrado ao DNA dos linfócitos infectados na forma proviral possibilitando a transmissão pelo contato célula-célula (BARMARK et al., 2003).

Em relação à proteína *tax*, o HTLV-1 apresenta dois subtipos: *tax A* e *tax B*. Essa classificação deve-se às substituições nucleotídicas em posições específicas da região gênica que codifica a proteína *tax*. Esta é uma proteína regulatória responsável pelo acúmulo de mutações, expressões gênicas por parte da célula, além de contribuir para o desenvolvimento das doenças associadas como a PET/MAH, LLTA, uveíte, dermatite infecciosa (FURUKAWA et al., 2000). Estudos demonstram que o subtipo *tax A* apresenta-se com maior prevalência nos pacientes com PET/MAH quando comparada aos portadores (KASHIMA et al., 2006; IÑIGUEZ et al., 2007; IÑIGUEZ et al., 2010).

A carga proviral do HTLV-1 é importante por representar uma medida de integração viral nas células hospedeiras, portanto sua quantificação constitui um marcador de replicação viral. Alguns estudos demonstraram que a replicação do HTLV-1 está aumentada em pacientes desenvolvendo PET/MAH, quando comparada aos portadores (MONTANHEIRO et al., 2005; CASKEY et al., 2007). No entanto, pouco são os estudos envolvendo essa relação do marcador viral com

o desenvolvimento de doenças associadas a esse vírus (LOUREIRO, 2008; CABRAL et al., 2012).

O presente estudo teve como objetivo caracterizar o HTLV em pacientes com PET/MAH e portadores e determinar a soroprevalência desses vírus em gestantes durante o pré-natal.

2. ASPECTOS HISTÓRICOS

O HTLV-1 foi o primeiro onco-retrovírus conhecido que afeta o ser humano, sendo este identificado, pela primeira vez nos Estados Unidos por Poiesz e colaboradores (1980) em uma linhagem de células T (HUT 102) estabelecida de um paciente com linfoma cutâneo, sendo incluído na família dos retrovírus devido às suas características físico-químicas (ROMANOS et al., 2004; OLIVEIRA & AVELINO, 2007).

Os primeiros relatos de casos de PET na América do Sul foram realizados em 1981 na Colômbia, por Zaninovic, que denominou o quadro de “paraplegia espástica do Pacífico”. Vinte e três anos depois, em 2004, o mesmo autor propõe a PET como uma síndrome multifatorial no que concerne à sua gênese, porém, sem diminuir a importância do papel que exerce o HTLV como seu agente causal (LIMA, 2006).

Em 1985 foi possível a demonstração da correlação entre o HTLV-1 e a PET/MAH através da detecção de anticorpos anti-HTLV-1 em soro e líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com diagnóstico de PET na Martinica e entre jamaicanos e colombianos (GESSAIN et al., 1985; ZANINOVIC, 1987). No ano seguinte, Osame et al. (1986) no Japão, descreveram casos de PET/MAH relacionando-os a altas taxas de anticorpos específicos para o HTLV-1.

No Brasil, a infecção pelo HTLV-1 começou a ser reconhecida no final da década de 1980, sendo o primeiro relato da infecção publicado por Kitagawa et al. (1986), demonstrando a sua ocorrência entre a população japonesa residente no Mato Grosso do Sul.

Em 1982, um segundo retrovírus, o HTLV-2, foi isolado de outra linhagem de células T derivadas do baço de um paciente com uma forma rara de leucemia (tricoleucemia) apresentando células pilosas (KALYANARAMAN et al., 1982; ROMANOS et al., 2004). Ao contrário do HTLV-1, o tipo 2 não apresenta associação definida com nenhuma doença linfoproliferativa. Alguns estudos têm sugerido que ele possa estar associado à PET/MAH, além de outras síndromes neurológicas, bem como no aumento da incidência de pneumonia, bronquite e algumas condições inflamatórias como artrite (SILVA et al., 2002; NETO et al., 2009).

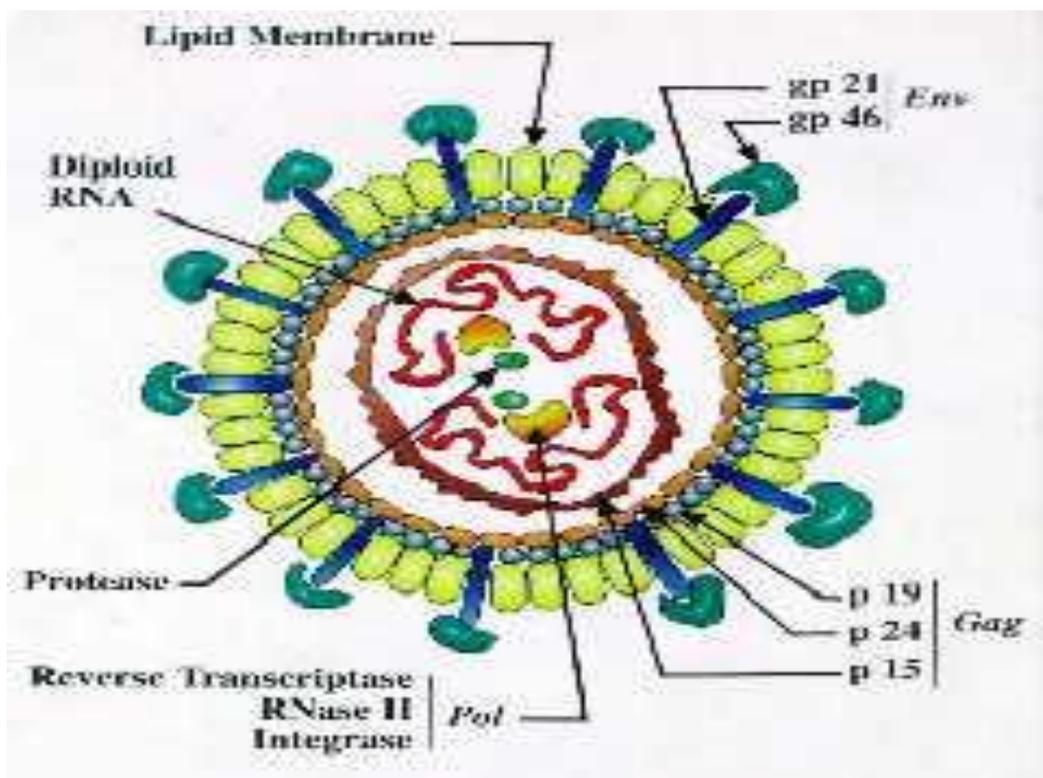
Em 2005, CALLATINI et al. descreveram dois novos retrovírus, denominados HTLV-3 e HTLV-4, ambos em indivíduos nativos da África Central. O HTLV-3 foi filogeneticamente relacionado ao HTLV de símios, o STLV-3. Enquanto, o HTLV-4 não pôde ser relacionado filogeneticamente com nenhum STLV, porém, exibiu um padrão de Western Blot semelhante ao do HTLV 2 (WOLFE et al., 2005).

2.2 Estrutura viral e genômica do HTLV-1

O HTLV-1 pertence à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae* e ao gênero *Deltaretrovirus* (ROMANOS et al., 2004). Trata-se de um vírus envelopado, com aproximadamente 140 nm de diâmetro. Seu core apresenta cerca de 100 nm e caracteriza-se por apresentar moléculas de protease em seu core onde se encontra o nucleocapsídeo, juntamente com um genoma composto por duas fitas simples de RNA com polaridade positiva, com aproximadamente 9 Kb, estando, cada uma delas, acompanhada de uma molécula da enzima transcriptase reversa (LIMA, 2006).

As proteínas estruturais do core viral são as do nucleocapsídeo (p15), do capsídeo (p24) e da matriz (p19), enquanto que no envelope se encontram as glicoproteínas transmembrana (gp21) e aquelas de superfície (gp46) (Figura 01). Esta última apresenta uma diferença no padrão de bandas à eletroforese, que permite distinguir os tipos 1 e 2 do HTLV (SEGURADO, 2001).

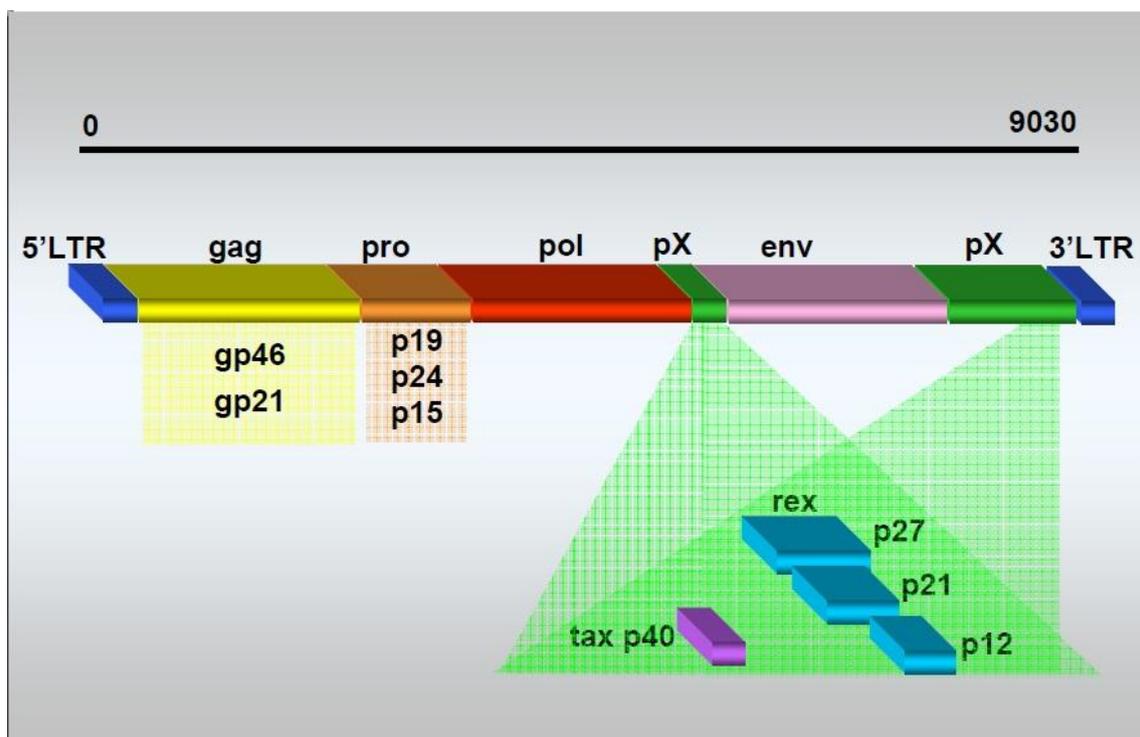
Figura 01. Estrutura morfológica do HTLV.



Fonte: Santos et al., 2008.

O genoma do HTLV é constituído por 9323 nucleotídeos apresentando três regiões (Figura 02) que são traduzidas: *gag*, *pol* e *env*. A região X não é encontrada em outros retrovírus e apresenta a capacidade de codificar duas proteínas regulatórias *tax* e *rex*. As duas extremidades do genoma são flanqueadas por terminações longas repetidas (LTR), onde estão os promotores virais e outros elementos regulatórios que têm como principais funções, a transcrição reversa do RNA viral, a integração do provírus no DNA celular e a regulação de síntese do RNA viral (CANN & CHEN, 1996).

Figura 02. Aspecto genômico do HTLV-1.



Fonte: Romanos et al, 2004.

A região *gag* compreende os nucleotídeos 802 à 2019 que quando codificada, dá origem à proteína da matriz de 19 kDa (p19), à proteína do capsídeo de 24 kDa (p24) e à proteína do nucleocapsídeo de 15 kDa (p15). Essas proteínas são rearranjadas para formar os componentes principais da estrutura do vírion. A p24 tem alta similaridade na sequência de aminoácidos, resultando em pouca reatividade cruzada entre HTLV-1 e HTLV-2 (GOON, 2003).

A região *pol*, localiza-se na posição 3' do gene *gag*, entre os nucleotídeos 2497 à 5187, codifica uma proteína de 296 nucleotídeos, a transcriptase reversa, fundamental para a transcrição do RNA viral em DNA e sua incorporação no genoma da célula hospedeira, além de codificar a RNase, a endonuclease e a protease. Esta por sua vez é responsável pelo processamento dos produtos *gag* e pela sua própria clivagem, para gerar a molécula de protease madura (CANN & CHEN, 1996).

A região *env*, localiza-se entre os nucleotídeos 5180 à 6647 sendo responsável pela codificação das glicoproteínas externas do envelope. Um domínio amino terminal corresponde a uma glicoproteína externa gp21, que é

clivada na região carboxi-terminal, resultando em uma proteína transmembrana com 21 kDa (ROMANOS et al., 2004).

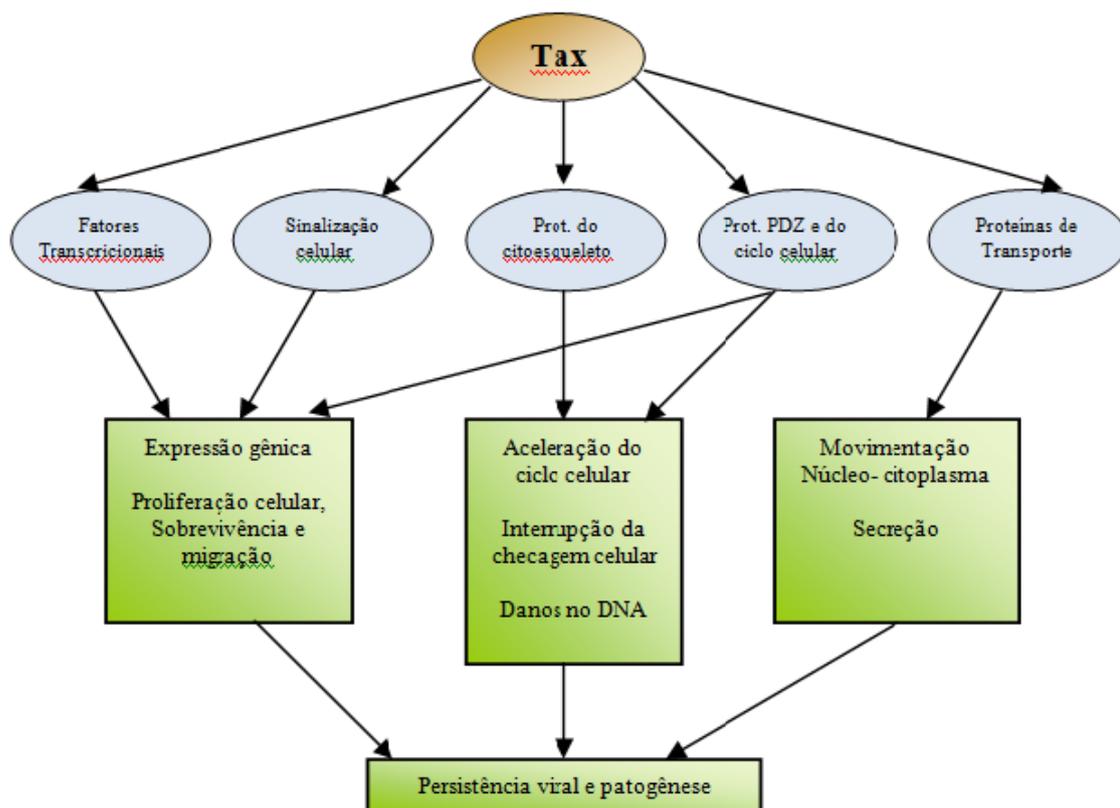
A região pX codifica as proteínas *tax* e *rex* com funções regulatórias. A sequência *tax* regula, indiretamente, a transcrição do genoma proviral, ao interagir com fatores de transcrição celular e induz sua ligação a sítios específicos na LTR do HTLV-1, ativando sua transcrição. Ao interagir com proteínas regulatórias celulares, a *tax* pode induzir a expressão de genes celulares (FRANCHINI et al., 1995). A sequência *rex* é responsável pela codificação da proteína p²⁷*rex*, que é reguladora pós-transcricional da síntese de proteínas estruturais do vírus e de outra proteína e não apresenta função definida (ROMANOS et al., 2004).

2.3 Proteína *tax* e infecção pelo HTLV-1

A *tax* é uma fosfoproteína nuclear de 40 kDa com 353 resíduos de aminoácidos, localizada na região U e LTR (BEILMLING & MOELLING, 1992; PACA-UCCARALERTKUN et al., 1999). O gene *tax* codifica a proteína p⁴⁰*tax*, transativadora da região U3 do segmento LTR do genoma viral e também de genes da célula eucariótica infectada, tais como os que codificam a cadeia α do receptor da IL-2 (CD25), a própria IL-2, a IL-1, a IL-3, a IL-6, a TGF-beta, fator de crescimento de granulócitos dentre outros (BALLARD et al., 1988; GREENE et al., 1989).

A atividade transativadora (Figura 03) de genes celulares, da proteína p⁴⁰*tax*, dá-se por vias intracelulares que envolvem fatores de transcrição como NF- κ B e SRF (LANOIX et al., 1994; SUZUKI et al., 1993). O único gene, até então descrito como tendo a sua transcrição inibida pela *tax* é o gene que codifica a cadeia da polimerase β , uma enzima envolvida no reparo do DNA (FRANCHINI et al., 1995; JOHNSON et al., 2001).

Figura 03. Fluxograma descrevendo o papel transativador da proteína tax.



Fonte: Cabral et al, 2012

A *tax* favorece a sinapse neurológica de célula a célula, e a sua expressão proporciona um sinal intracelular sinérgico com ICAM-1 causando polarização dos microtúbulos das células T, demonstrando que não está presente apenas no núcleo da célula infectada, além disso, a proteína *tax* apresenta papel central na transformação dos linfócitos, devido ao seu efeito pleiotrópico (NEJMEDDINE et al.,2005).

A *tax* (p40) pode também ser responsável pelo acúmulo de mutações e contribuir para o desenvolvimento das doenças associadas. Nas duas últimas décadas muito se tem descoberto sobre o papel desta proteína regulatória não estrutural codificada na região pX, que é oncogênica *in vivo* (HIGUCHI & FUJII, 2009).

Baseada na sua constituição genética tem sido descritos dois subtipos de HTLV-1. Essa classificação baseia-se nas substituições encontradas em posições específicas da sequência *tax*, ou seja: *tax* A e *tax* B. O subtipo *tax* A apresenta

maior incidência nos pacientes com PET/MAH do que em portadores assintomáticos, embora a sua associação com o desenvolvimento da doença ainda seja discutida (LIBERTO et al., 2002).

Na Argentina, estudos realizados por Iñiguez et al. (2010) demonstraram a presença da tax A em 79,2% dos indivíduos assintomáticos e 62,5% daqueles com PET/MAH.

Em São Paulo, Casseb et al. (2006) demonstraram a presença da tax A nos pacientes com PET/MAH (9/48) e nos portadores (5/28). Não foi observado nenhuma associação significativa da proteína tax e o desenvolvimento da PET/MAH.

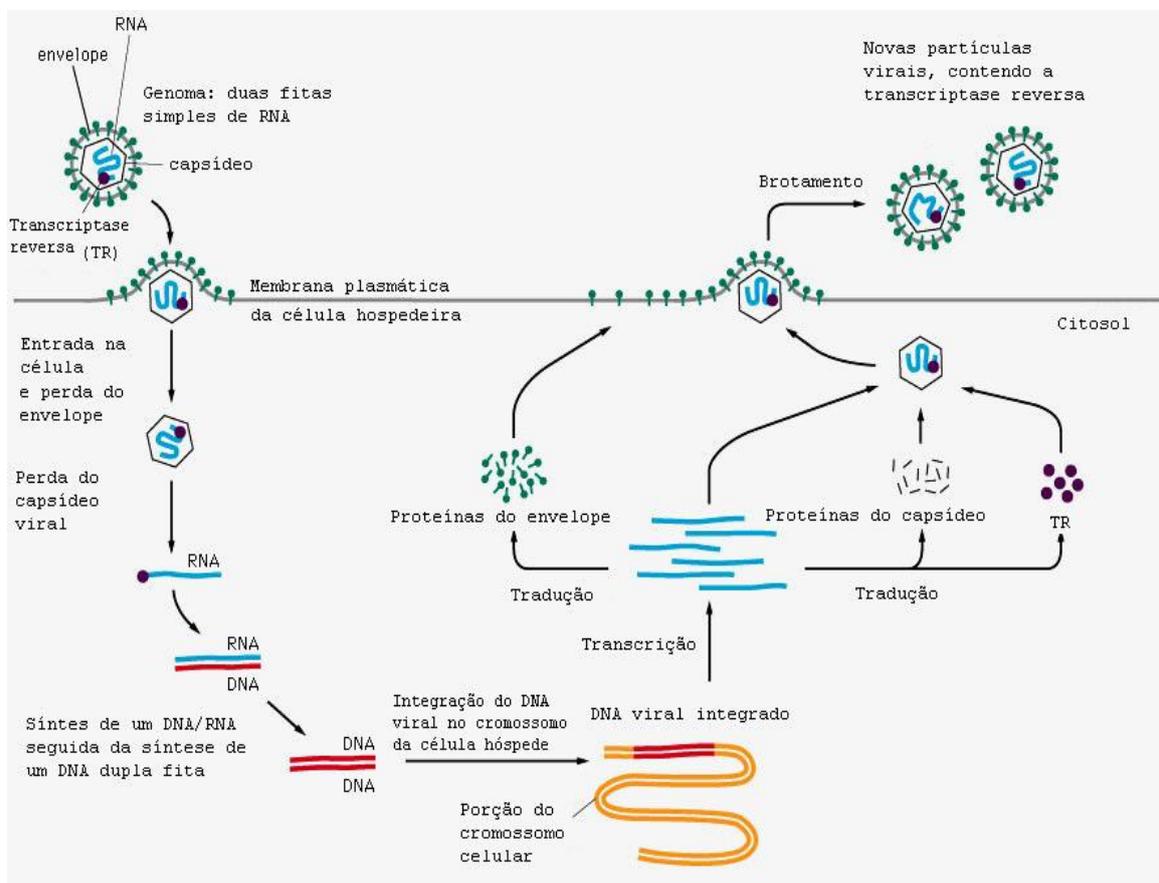
Por outro lado, Furukawa et al. (2000) demonstraram a presença do subgrupo tax A em 15,5% (30/192) dos pacientes com PET/MAH e em 7% (14/200) daqueles portadores.

Em Pernambuco, Bezerra (2011) identificou o subgrupo tax A em todos os indivíduos pesquisados – sintomáticos e assintomáticos. Entretanto, dois doadores de sangue foram do subgrupo tax B.

2. 4 Ciclo replicativo do HTLV-1

A primeira fase do ciclo inclui a adesão do vírus à membrana da célula hospedeira através de receptores específicos. A penetração na célula é feita através da integração da proteína de superfície gp46. Estudos têm sugerido que molécula transportadora da glicose 1 (GLUT-1) atue como receptor celular (TAKENOUCHE et al., 2011). Em seguida ocorre a liberação do genoma viral e transcrição reversa do RNA viral em DNA de fita dupla e sua integração no núcleo da célula na forma de provírus. Ocorre a formação do RNA mensageiro capaz de codificar a síntese de proteínas regulatórias da replicação viral, as proteínas tax e rex (OLIVEIRA SANTOS et al., 2008), conforme figura 04.

Figura 04. Ciclo de replicação do HTLV-1.



Fonte: Castro et al., 2010

O organismo identifica a partícula viral como estranha iniciando a produção de anticorpos (Resposta imune humoral). Durante a divisão mitótica, o provírus inserido no DNA de células infectadas é replicado pela DNA polimerase e o índice de mutações é consideravelmente baixo, resultando na grande estabilidade genética apresentada pelos HTLV-1/2 (MURPHY et al., 2004).

A proporção do provírus inserido em células mononucleares periféricas varia de 0,1% e 10% e esta porcentagem pode chegar até 20% em pacientes com PET/MAH (BANGHAM et al., 2003). Após o período inicial de replicação viral ativa, a infecção de novas células é mantida através da divisão celular normal (mitose), pelo contato entre células infectadas e não infectadas (sinapse virológica) e pela expansão clonal ocasionada pela transformação celular induzida pelo vírus (KATRI et al., 2004; KANNAGI, 2004; UENO et al., 2012).

2.5 Classificação Filogenética do HTLV-1

Os HTLV 1/2 infectam populações humanas há milhares de anos e, por terem estabilidade genômica elevada, são considerados excelentes marcadores para traçar as migrações destas populações. Esta instabilidade genômica possibilitou o estabelecimento da associação entre polimorfismo genético viral e a origem geográfica (GALVÃO-CASTRO et al., 2009).

A classificação filogenética do HTLV no Brasil tem importância por identificar, através das análises comparativas com outros isolados descritos mundialmente, a origem e o tipo de população atingida. As análises filogenéticas (Quadro 01), baseadas no gene LTR, classificam o HTLV-1 em sete diferentes subtipos (1a - Cosmopolita), com distribuição mundial, que por sua vez, divide-se em cinco sub-grupos. Os subtipos A e C prevalecem nas Américas.

Quadro 01. Classificação filogenética do HTLV-1.

HTLV-1	1a	Cosmopolita Sub grupos: A-Transcontinental, B-Japonês, C-Oeste da África, D-Norte da África, E-Negros (Peru)
	1b	África central
	1c	Melanésia
	1d	Camarões/Gabão
	1e	Congo
	1f	Gabão
	1g	África Central

Fontes: ISHAK et al., 2003; WOLFE et al., 2005.

2.6 Quantificação da carga proviral como marcador de risco na infecção pelo HTLV-1

O genoma do HTLV é integrado, aleatoriamente, ao material genético celular (IWANAGA et al., 2010). Na infecção pelo HTLV há pouco ou nenhum vírion no plasma do indivíduo infectado, refletindo a principal via de replicação viral, a sinapse viral (IGAKURA et al., 2003). Desta forma, a medida da carga proviral é mensurada pelo número de cópias de DNA proviral inserido em um determinado conjunto de células (MARTINS & BARBOSA- STANCIOLI, 2006).

A detecção da carga proviral através da PCR em tempo real é considerada relevante para o monitoramento do número de células sanguíneas periféricas infectadas, podendo atuar como um indicador na predisposição às patologias a ele associadas. Além disso, atua como ferramenta para o monitoramento biológico da eficácia de quimioterápicos e/ou antiretrovirais no caso de pacientes em tratamento da LLTA (MACHUCA et al., 2000; DEHÉE et al., 2002; MONTANHEIRO et al., 2007; UENO et al., 2012). Diversos grupos, de portadores e/ou indivíduos com manifestações clínicas associadas aos HTLV são alvos destes estudos.

A alta carga proviral do HTLV-1 em células sanguíneas periféricas tem sido associada ao alto risco para o desenvolvimento das doenças de cunho neurológico (MONTANHEIRO et al., 2007). Em portadores, como doadores de sangue, a carga proviral pode ser um bom indicador de curso da infecção nestes indivíduos (MACHUCA et al., 2000). Estudo demonstrou que a carga proviral é 10 a 100 vezes maior nos indivíduos com PET/MAH quando comparado àqueles assintomáticos (STARLING et al., 2013).

Com base na importância da carga proviral em algumas viroses, estudos estão sendo realizados sobre a importância da carga proviral na infecção pelo HTLV-1 e sua progressão para a PET/MAH (CABRAL et al., 2012). Porém a maior dificuldade ocorre pelo longo período de incubação do vírus e pela baixa incidência do desenvolvimento da doença (<5%) (KAPLAN et al., 1990).

Normalmente a carga proviral é baixa nos indivíduos assintomáticos do que nos pacientes com doenças relacionadas ao HTLV-1, sugerindo a existência da

associação entre carga proviral e o desenvolvimento da doença (MURPHY et al., 2004; IWANAGA et al., 2010).

Em Pernambuco, Bezerra (2011) demonstrou uma maior carga proviral entre os pacientes com PET/MAH. Resultado semelhante foi encontrado por Loureiro (2008), onde os pacientes com PET/MAH tinham carga proviral 2,1 vezes maior. Resultado semelhante foi encontrado por Montanheiro et al. (2005).

Kashima et al. (2005) encontraram maior carga proviral do HTLV-1 nos pacientes com PET/MAH. Scheiner et al. (2005) também encontraram uma maior carga proviral nos indivíduos com PET/MAH.

Por outro lado, Martins et al. (2005) encontraram uma maior carga proviral nos pacientes assintomáticos quando comparado àqueles com PET/MAH.

2.7 Doenças associadas ao HTLV-1

O HTLV-1 é o agente etiológico da leucemia/linfoma de células T do adulto e de uma doença neurológica degenerativa denominada paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1 (PET/MAH), além de estar associada à uveíte, dermatite infecciosa dentre outras manifestações. Existem vários indícios de acometimento de múltiplos órgãos sugerindo um amplo espectro de morbidades ligadas ao HTLV-1 (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002; NETO et al., 2009).

2.7.1 Leucemia/Linfoma de Células T do Adulto (LLTA)

A LLTA predomina no sexo feminino numa razão de 1,4:1 (BORDUCCHI et al., 1999). Estudos demonstram que linfócitos T CD4+ infectados pelo HTLV-1 persistem durante cerca de 7 anos no mesmo indivíduo, sugerindo que o vírus participe no processo de transformação e imortalização destes linfócitos (BANGHAM et al., 2003). Após a infecção pelo HTLV-1, o período de latência é longo (cerca de 50 anos), indicando que no desenvolvimento da LLTA são necessários múltiplos passos, acumulando-se mutações genéticas nas células infectadas (BANGHAM et al., 2003).

No primeiro estágio da LLTA, a expressão da *tax* tem um papel crítico na promoção do ciclo celular e na inibição da apoptose das células infectadas. Já no estágio mais avançado, mudanças adquiridas pelo genoma do hospedeiro podem substituir a função da *tax*. Como a sequência *tax* é o principal alvo citotóxico dos linfócitos T, a perda desta impede as células infectadas de escaparem à resposta imunológica do hospedeiro (BANGHAM et al., 2003).

A probabilidade de um portador do HTLV-1 desenvolver LLTA no decorrer de uma latência prolongada mostra que o processo de transformação celular e de leucemogênese devem envolver muitos eventos complexos dentro da célula T do hospedeiro (SHUH & BEILKE, 2005).

As formas clínicas desta doença são classificadas em 4 grupos: forma aguda, crônica, linfomatosa e *smoldering*. Em geral um estágio intermediário entre portador sadio e doente com monoclonalidade, passa a ser denominada como LLTA do tipo *Smoldering*. Esta forma pode evoluir para as formas crônica ou aguda em tempo variado de 10 a 15 anos. A forma crônica caracteriza-se por linfocitose absoluta (células T CD4⁺) e a presença de lesões de pele, episódios de infecções oportunistas e infiltrado pulmonar intersticial (BRITO MELO, 2002).

A forma **Smoldering** é caracterizada pela contagem normal de linfócitos (<4x10⁶) e pela presença de 5% ou mais de linfócitos anômalos no sangue periférico. **Crônico**: Caracteriza-se pelo aumento no número absoluto de linfócitos e presença de 5% ou mais de linfócitos anômalos no sangue periférico. Ocorre comprometimento do fígado, baço, pele, pulmões e alterações histológicas em linfonodos. **Linfomatosa**: Neste subtipo não há linfocitose e apenas 1% ou menos dos linfócitos são anômalos. A forma **aguda** é a forma mais comum de apresentação, onde a doença é muito agressiva e manifesta-se sob a forma leucêmica com lesões tumorais. O envolvimento da pele é característico (Figura 05), sendo as formas papular e micropapular as manifestações cutâneas mais frequentes. A forma aguda compreende 55-75% dos casos e a forma crônica e cutânea cerca de 25% (HANCHARD et al., 1990; YAMAGUCHI et al., 1990).

Figura 05 – Lesões dermatológicas desenvolvidas em pacientes com LLTA. A) Forma indolente de ATL com eritrodermia e acentuada descamação. B) Forma Tumoral primária de pele com múltiplos tumores.



FIGURA 1: Forma indolente de leucemia/linfoma de células T do adulto com eritrodermia e acentuada descamação



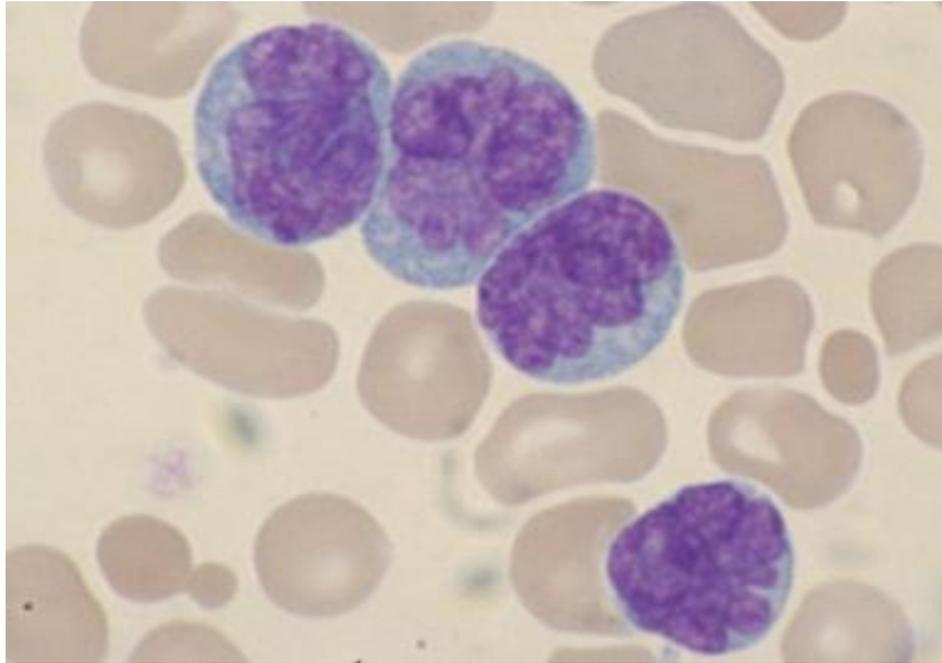
FIGURA 3: Forma tumoral primária de pele com múltiplos tumores

Fonte: Bittencourt et al, 2008.

No decorrer da doença, ocorre uma proliferação desordenada clonal de linfócitos T *helper* ativados com supressão da atividade normal, e com fenótipo CD3⁺, CD4⁺, CD8⁻, CD25⁺, CD7⁻, HLA DR⁺. Em alguns casos raros, as células da LLTA podem expressar CD4 e CD8, somente CD8 ou não expressar CD4 e CD8 (BORDUCCHI et al., 1999).

O aspecto morfológico dos linfócitos pode ser o primeiro sinal para o diagnóstico da LLTA. No sangue periférico observam-se linfócitos atípicos, pleomórficos, lobulados, com anormalidade nuclear significativa - *flower cells* (Figura 06) (SHUH & BEILKE, 2005).

Figura 06. Lâmina contendo células T anormais em sangue de paciente com LLTA.



Fonte: o autor

Quanto às alterações na biologia molecular do hospedeiro são observadas mutações ou deleções de genes supressores de tumor, como o p53 ou p15/16, assim como alterações no genoma do vírus, também estão associadas com o prognóstico e o subtipo clínico da LLTA (GOSH et al., 1994).

O tempo de sobrevida para os subtipos agressivos varia de semana a mais de um ano. O início da doença e a transformação em doença maligna varia de 18 à 30 anos (OLIVEIRA, 2000). Complicações pulmonares, incluindo infecção pelo *Pneumocystis jiroveci*, hipercalcemia, herpes zoster disseminado e infecção por citomegalovírus são as causas mais frequentes de morte (SHUH & BEILKE, 2005).

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

A PET/MAH é uma doença inflamatória, desmielinizante do sistema nervoso central (SNC) que se caracteriza pelo acometimento da medula espinhal de predomínio torácico, evoluindo para fraqueza progressiva associada à

dormência dos membros inferiores, dor lombar e retenção ou incontinência urinária (GESSAIN, 1985; GONÇALVES, 2009). É uma doença lentamente progressiva e de baixa letalidade (IWASAKI, 1993; GONÇALVES et al., 2009). Geralmente evolui de forma insidiosa, mas progressiva provocando danos significativos ao sistema nervoso central (SNC), e mais da metade destes indivíduos tornam-se cadeirantes, ou dependentes do uso de próteses ou bengalas (TAYLOR, 1998).

A idade de início dos sintomas pode influir na velocidade de progressão da doença. Os pacientes com início dos sintomas antes dos 15 anos de idade apresentam progressão mais lenta em contraposição àqueles com início após 60 anos, cuja evolução é mais rápida (NAKAGAWA et al., 1995).

O comprometimento medular é a característica mais marcante da PET/MAH, sensibilidade vibratória, hiperreflexia dos membros superiores e os sinais de Hoffmann e de Trömner, fraqueza dos membros inferiores, sintomas sensitivos tais como: formigamento, agulhadas, queimação e, reflexo mandibular exaltado em alguns pacientes; são tidos como critérios de diagnóstico de PET/MAH para a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2008).

As queixas mais comuns nos estágios iniciais incluem: baixa dor nas costas e parestesias, entretanto o diagnóstico só é possível quando o paciente desenvolve uma mudança na marcha associada à fraqueza e o enrijecimento dos membros inferiores (espasticidade). A disfunção erétil, distúrbios do esfíncter, e queixas urinárias também fazem parte do quadro clínico, sendo que nas fases iniciais do envolvimento da bexiga, os sintomas de armazenamento, como noctúria, urgência e incontinência são os mais freqüentes (CASTRO et al., 2005).

Relata-se que esta doença afete entre 0,2 e 5% dos indivíduos infectados na quarta década de vida. Acredita-se que é imunologicamente mediada, e freqüentemente afeta mais as mulheres que os homens (SOUZA, 2006). O período de latência para PET/MAH é mais curto quando comparado com o período de latência para LLTA. O risco de desenvolver a PET/MAH é variável nos diferentes grupos étnicos, variando entre 0.25% a 4% (PROIETTI et al., 2005).

A resposta de linfócitos T citotóxicos (CTL) contra o HTLV-1 em pacientes com PET/MAH é vigorosa, cronicamente ativada e, predominantemente, voltada para a proteína tax (VINE et al., 2005).

2.7.3 Outras doenças associadas ao HTLV-1

A uveíte é a terceira entidade clínica relacionada com o HTLV-1 (MOCHIZUKI et al., 1992a) e, tanto pode estar associada a portadores de PET/MAH, como se apresentar isolada em portadores assintomáticos do vírus (PINHEIRO, 1994). Esta doença pode se apresentar como uma uveíte anterior, intermediária, posterior e panuveíte com lesões retinocoroidianas (MOCHIZUKI et al., 1992b; 1996). Um achado típico da uveíte é uma infiltração dos tecidos oculares, olhos geralmente brancos e sem dor.

A dermatite infecciosa caracteriza-se por um eczema agudo na infância sem episódio anterior de eczema infantil, predominando no vestíbulo nasal, couro cabeludo e pescoço. Em indivíduos com LLTA, é comum a presença de pápulas e nódulos generalizados. Em portadores assintomáticos são observadas lesões dermatológicas do tipo: xerose, ictiose, dermatite seborréica, vitiligo, escabiose, dermatofitoses (NOBRE et al., 2005).

Estudos de virologia molecular e imunologia do HTLV-1 mostram a importância da resposta imune do hospedeiro na evolução clínica de doenças associadas à infecção pelo HTLV-1. Carvalho et al. (2001) demonstraram que células portadoras do HTLV-1 sem manifestações neurológicas secretam altos níveis de IFN- α , TNF- α , IL-5 e IL-10. Tem-se aventado a possibilidade de que doenças auto-imunes sejam mais frequentes nestes indivíduos (RIBAS & MELO et al., 2002).

Um amplo espectro de síndromes reumatológicas tem sido descritas associando epidemiologicamente o HTLV-1. Com exceção da uveíte, não existem provas epidemiológicas suficientemente fortes associando a infecção pelo HTLV-1 e outras doenças autoimunes (PINHEIRO et al., 1995).

A alta expressão de MHC e conseqüente aumento na apresentação de antígenos na sinóvia, além de alta produção de citocinas pró-inflamatórias, induzidas pelo HTLV-1, sugere a participação do vírus no desenvolvimento de

auto-imunidade e artropatia em indivíduos infectados por este vírus (IWAKURA et al., 1995).

Foi demonstrado que o gene regulatório tax do HTLV-1 pode ativar muitos genes relacionados à resposta imune, tais como, os genes da IL-1, IL-2, do receptor de IL-1 e da IL-6. O aumento desta última pelas células sinoviais tem contribuído para a fisiopatologia da artrite relacionada ao HTLV-1 (SAIJO et al., 2002).

2.8 Diagnóstico da infecção pelo HTLV-1

O diagnóstico sorológico rotineiro é baseado na presença de anticorpos, anti-HTLV contra constituintes antigênicos de diferentes porções do vírus no soro do indivíduo. Entretanto, os testes de triagem não discriminam a infecção pelo HTLV-1 ou HTLV-2. As metodologias mais empregadas são o ELISA e a confirmação pelo Western Blot. Os testes sorológicos nem sempre conseguem definir o estado infeccioso do indivíduo, acontecendo assim, casos de sorologias falso-negativas e falso-positivas (SHARMA et al., 2003).

O Western Blot (WB) é um teste confirmatório e discriminatório usado para a confirmação da infecção pelo HTLV, através da incorporação de proteínas recombinantes como a GD21, proteína transmembrana e as gpR46-1 e a gpR46-2 do envelope (RUDOLPH et al., 1993; KLEINMAN et al., 1994).

Metodologias moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), são usadas para detectar a presença do HTLV-1 e 2 e distinguir os tipos, em um amplo espectro de portadores e de pacientes com variadas patologias. É considerado um teste conclusivo para o diagnóstico dos HTLV, a qual detecta o genoma viral, mesmo em pequenas quantidades (ARRUDA et al., 2008).

A vantagem do uso da PCR consiste em não depender da produção de anticorpos contra o vírus, uma vez que se detecta diretamente o material genético do mesmo (DNA proviral). Por sua alta sensibilidade e especificidade, a PCR é um método capaz de esclarecer estados sorológicos indeterminados, distinguir uma infecção pelo tipo 1 ou pelo tipo 2 do HTLV (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002), subtipar o HTLV -1 e útil também para investigar a transmissão mãe-filho do HTLV-1 precocemente (TEIXEIRA SANTOS et al., 2003; TAMEGÃO-LOPES et al., 2006; SOUZA, 2006).

A técnica baseia-se na amplificação exponencial de uma sequência específica do DNA do provírus, denominada de DNA alvo, na presença de uma enzima, a DNA polimerase, dos iniciadores e dos nucleotídeos.

As regiões mais usadas para diagnosticar e estudar a presença do HTLV-1 e HTLV-2 são a *tax*, *pol* e *env* (HEREINE et al., 1992).

2.9 Aspectos Epidemiológicos

A infecção pelo HTLV 1/2 caracteriza-se por agrupamento da infecção em áreas geográficas definidas no mundo (PROIETTI, 2000). O número exato de infectados pelo HTLV no mundo não é conhecido, porém estima-se que 15 a 20 milhões de pessoas estejam infectados (COLIN et al., 2003; PROIETTI, 2005).

A distribuição geográfica do HTLV-1 no mundo já está bem estabelecida, ou seja: Japão, África, Caribe, sul dos Estados Unidos e América do Sul apresentam as maiores prevalências (PROIETTI et al., 2005). No Japão as taxas são consideradas altas variando de 6 a 37%. Já nas Ilhas e países do Caribe a prevalência encontrada fica em torno de 6%. Nos países da África Equatorial, os estudos apontam uma prevalência entre 1 e 10% (FERREIRA et al., 1997; LOPES et al., 2008).

Na América do Sul e Central destacam-se: Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Colômbia, Peru, Venezuela, Honduras e Panamá (GALVÃO-CASTRO et al., 2009). O Brasil é o país com o maior número de pessoas infectadas com cerca de 2,5 milhões de indivíduos, o que torna o país com maior número absoluto de casos de HTLV-1 (MOXOTÓ et al., 2007).

A soroprevalência para HTLV-1/2 tem variado de 0,3% a 1,8%, dependendo do Estado brasileiro, tipo e tamanho da amostra estudada. A infecção encontra-se presente em todos os estados apresentando-se endêmica na Região Nordeste, destacando-se o estado da Bahia, com uma prevalência de 1,7% na população geral (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002). Os dados epidemiológicos da infecção no Brasil referem-se à prevalência em grupos populacionais específicos, como pacientes com PET/MAH, LLTA, usuários de drogas endovenosas (UDIs) e a maioria em doadores de sangue (ROMANELLI et al., 2010).

Entre os doadores de sangue de algumas capitais brasileiras, diferentes prevalências foram encontradas: Manaus e Rio de Janeiro, 0,33% (MONTANHEIRO, 2005; Florianópolis, 0,08% (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002), Minas Gerais 0,7% (OLBRICH NETO et al., 2004); em Pernambuco Loureiro et al. (1994) encontraram uma prevalência de 0,8%. Ainda em Pernambuco, Bezerra et al. (1996) mostraram uma prevalência de 0,3%.

A transmissão do HTLV-1 ocorre através de sangue e/ou seus produtos contaminados. A via sanguínea é, provavelmente, o modo mais eficiente de transmissão do vírus. A via parenteral tem sido considerada relevante na disseminação do HTLV-1 e 2 em áreas urbanas, principalmente entre os usuários de drogas injetáveis (TAMEGÃO-LOPEZ, 2006; LOPES et al., 2008). A transmissão do HTLV ocorre em menor incidência quando comparado ao HIV. Isso se deve à baixa carga proviral e ao fato de ser dependente do contato célula-célula (IGAKURA et al., 2003; SANTOS, 2005).

A transmissão do HTLV-1 é mais freqüente do homem para a mulher, sugerindo que a infecção seja consequente dos linfócitos infectados presentes no sêmem e na secreção vaginal (CARNEIRO-PROIETTI et al., 2002). Estima-se que esta eficiência seja de cerca de 60% nas mulheres e de 0,4% no sentido inverso (GALVÃO-CASTRO et al., 2009).

Na infância, a soropositividade para o HTLV-1 é muito baixa e aumenta a partir da adolescência e início da idade adulta. Nas mulheres esse aumento é mais acentuado e continua após os 40 anos, enquanto que nos homens a positividade é menor e atinge um platô após os 40 anos (ROMANELLI et al., 2010).

A transmissão vertical depende da prevalência da infecção entre mulheres em idade reprodutiva, além da carga proviral do HTLV-1, e apresenta resultados distintos nas diferentes regiões geográficas e nos diversos grupos étnicos e de risco. É rara a contaminação por via transplacentária ou contaminação durante o momento do parto (KOMURO et al., 1983; HINO et al., 1994; OLIVEIRA & AVELINO, 2007; MORIUCHI et al., 2013).

Por outro lado, o aleitamento materno constitui uma importante via de transmissão, uma vez que há passagem dos linfócitos maternos infectados para a criança (ROMANELLI et al., 2010).

Estudos mostram que quanto maior a carga proviral da mãe e maior tempo de aleitamento, maior é a chance de ocorrer a infecção, cerca de 18% a 30%. Crianças amamentadas por mães infectadas, por um período superior a seis meses, apresentam um risco de 20% de infecção, comparadas às amamentadas por um período inferior a 2 meses (OLIVEIRA, 2000). Além disso, 1 a 5% desenvolvem LLT e 0,25% a 3,0% a PET/MAH. A amamentação durante um curto período de tempo diminui o risco de transmissão. Porém, a amamentação por mães soropositivas não é recomendada, visando eliminar uma via importante de transmissão do HTLV-1 e 2 (BITTENCOURT et al., 1998).

Em áreas endêmicas são importantes os estudos epidemiológicos avaliando a transmissão vertical em gestantes (BITTENCOURT et al., 1998; KAKUDA et al., 2002).

No Japão, Goto et al. (1997) ao avaliarem a infecção pelo HTLV em 2683 gestantes voluntárias encontraram uma prevalência de 0,6%. Já em Taiwan, o percentual foi de 0,87% (CHEN et al., 1996) e em Papua Nova Guiné, a prevalência foi de 14%, YANAGIHARA (1990).

No Brasil, poucos são os trabalhos que relatam a prevalência da infecção pelo HTLV em gestantes. Na região Sul, as prevalências encontradas foram de 0,08% e 0,05% em Florianópolis e Maringá, respectivamente (CATALAN-SOARES et al., 2005).

No Centro Oeste, em Goiânia a prevalência foi de 0,2%, (CATALAN-SOARES, 2001) e 0,5% em Cuiabá (YDY et al., 2009). Entretanto, em Campo Grande, DIAS-BASTOS (2010) encontrou 0,13% de infecção pelo HTLV.

No Amazonas, numa comunidade japonesa e em seus descendentes, foi identificada a infecção em 10% dos pesquisados (BITTENCOURT, 2008). Em Alagoas não há relato da prevalência do HTLV-1 em gestantes.

3. OBJETIVO GERAL

Caracterizar o HTLV em pacientes com PET/MAH e portadores e determinar a soroprevalência desse vírus em gestantes durante o pré-natal em Alagoas.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ◆ Identificar o tipo de HTLV (tipo 1 ou 2) e determinar as respectivas frequências nos pacientes com PET/MAH e portadores;
- ◆ Classificar a sequência *tax* do HTLV-1 e verificar sua associação com a presença da PET/MAH;
- ◆ Quantificar a carga proviral do HTLV-1 e verificar sua associação com a presença da PET/MAH;
- ◆ Determinar a prevalência e os fatores de risco para a infecção pelo HTLV 1/2 e quantificar a carga proviral do HTLV-1 nas gestantes do Programa Saúde da Família em Penedo-AL.

4. Desenhos dos estudos

Foi realizado um estudo do tipo caso-controle, sendo considerados como casos os pacientes com PET/MAH e como controles os assintomáticos.

Entre a população das gestantes foi realizado um estudo transversal. Esse tipo de estudo apresenta como vantagens o custo reduzido, a simplicidade, rapidez de sua realização, a possibilidade da identificação de casos na população carcerária e a detecção de grupos de alto risco a fim de tratar e prevenir.

4.1 Locais dos estudos

O estudo foi realizado em dois Centros de Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias em Maceió-AL, Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes (HUPAA) e Hospital Escola Dr. Hélvio Auto (HEHA), e nas 22 unidades do Programa Saúde da Família em Penedo-AL, no período de novembro de 2011 a novembro de 2012. Os hospitais atuam como Escola para formação e treinamento de estudantes de medicina, psicologia, enfermagem, fisioterapia, terapia ocupacional e nutrição da Universidade Federal de Alagoas e da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas.

4.2 Populações do estudo

A população de estudo foi constituída por pacientes infectados pelo HTLV-1/2, acompanhados no ambulatório de Doenças Infecciosas e Parasitárias do HUPAA e do HEHA e de gestantes acompanhadas no Programa Saúde da Família em Penedo-AL.

4.3 Definição dos termos

CASOS: Foram considerados casos os pacientes infectados pelo HTLV-1/2, que apresentavam manifestações clínicas características da PET/MAH de acordo com os critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS), descritos no quadro 02.

Quadro 02. Critérios diagnósticos para PET/MAH estabelecidos pela OMS.**I. Diagnóstico Clínico**

Um único sintoma ou um sinal físico podem ser evidências de PET/MAH adiantado.

A. Incidência da idade e do sexo

Na maior parte, esporádico e adulto, mas às vezes familiar; visto ocasionalmente na infância; sexo feminino predominante.

B. Início

É geralmente insidioso, mas pode ser repentino.

C. Manifestações neurológicas principais

1. A PET crônica, que progride geralmente lentamente, permanece, às vezes, estática após a progressão inicial.

2. Fraqueza dos membros inferiores.

3. Distúrbio da bexiga geralmente é uma característica avançada. A constipação ocorre geralmente mais tarde; impotência ou libido diminuídas são comuns.

4. Os sintomas sensoriais, tais como formigamento, queimores, etc., são mais proeminentes do que sinais físicos objetivos.

5. A baixa dor lombar com irradiação para os pés é comum.

6. O sentido da vibração é danificado freqüentemente.

7. Hiperreflexia dos membros inferiores, freqüentemente com clônus e sinal de Babinski.

8. Hiperreflexia dos membros superiores; sinais positivos de Hoffmann e de Tromner freqüentes; a fraqueza pode ser ausente.

D. Resultados neurológicos menos freqüentes. Sinais cerebelares, atrofia ótica, surdez, nistagmo, tremor da mão. Convulsões, prejuízo cognitivo, demência ou consciência danificada é raro.

E. Outras manifestações neurológicas que podem ser associadas com a PET/MAH: atrofia muscular, fasciculações (raras), polimiosite, neuropatia periférica, meningite, encefalopatia.

F. Manifestações não neurológicas sistemáticas que podem ser associadas com a PET/MAH: alveolite pulmonar, uveíte, síndrome de Sjögren, artropatia, vasculite, ictiose, crioglobulinemia, LLTA.

II. Diagnóstico laboratorial

A. Presença dos anticorpos HTLV-1 ou dos antígenos no sangue e no líquido cefalorraquidiano (LCR).

B. LCR pode mostrar a pleocitose suave do linfócito.

C. Os linfócitos lobulados podem estar no sangue e/ou no LCR.

- D. Aumento moderado das proteínas no LCR.
- E. Isolamento viral, quando possível, do sangue e/ou do LCR.

Fonte: Loureiro (2009).

CONTROLES: Foram considerados controles os pacientes infectados pelo HTLV-1/2 e que não apresentavam sinais e sintomas da doença.

Para identificação dos pacientes como casos e controles foram avaliadas as fichas de dados preenchidas no atendimento ambulatorial desses pacientes, por dois médicos infectologistas envolvidos no estudo.

4.4 Definição do tamanho da amostra

Por tratar-se do primeiro estudo em Alagoas, tomamos como base o trabalho desenvolvido por Bezerra (2011) em Recife-PE, que identificou em 55 pacientes com PET/MAH e 55 pacientes assintomáticos, o tipo e a sequência tax do HTLV-1.

4.5 Coleta e processamento dos dados e das amostras

O projeto foi apresentado aos pacientes e as gestantes, no qual foram convidados a participar da pesquisa. Aqueles que aceitaram foram direcionados a uma sala individualizada e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, sendo aplicado um questionário criado para a pesquisa (apêndice B). Todas as informações obtidas foram armazenadas num banco de dados, em planilha Excel.

Em seguida, os pacientes foram submetidos à coleta de sangue (10mL) em tubo do tipo vacutainer com o anticoagulante EDTA. A coleta de sangue também foi realizada nas gestantes, entretanto, sem anticoagulante. As amostras sanguíneas foram devidamente identificadas e levadas para o Laboratório de Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Após separação, o anel leucocitário foi acondicionado em tubos do tipo eppendorf. Nas amostras coletadas das gestantes foi feita a separação do soro. Todas as amostras processadas foram devidamente enviadas ao Setor de Virologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) em Recife-PE, para realização dos testes sorológico e molecular.

4.6 Categorização das variáveis dependentes

- PET/MAH: definida pelas características da Paraparesia Espástica Tropical de acordo com os critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Variável dicotômica categorizada como presente ou ausente.
- Infecção pelo HTLV 1/2 comprovada por meio de teste imunoenzimático – ELISA, WB.

4.6.1 Categorização das variáveis independentes

Gênero: definido pelo sexo apresentado pelo paciente. Variável nominal dicotômica categorizada como feminino ou masculino.

Idade: definida pelo intervalo de tempo entre a data de nascimento e dia do seu registro na pesquisa.

Região de procedência: definida pela cidade de procedência do paciente. Variável nominal dicotômica categorizada como capital ou interior.

Raça: 1. Branca 2. Preta 3. Parda 4. Amarela 5. Índigena

Grau de escolaridade: 1. Superior 2. Ensino médio completo 3. Ensino médio incompleto 4. Ensino fundamental completo 5. Ensino fundamental incompleto 6. Analfabeto

Estado civil: Variável definida como: 1. Solteira(o), 2. Casada(o) 3. Viúva(o) 4. União consensual 5. Divorciada(o)

Renda: (em salário mínimo): Variável categorizada como 1. <SM 2. 1SM 3. 1-5SM 4. 5-10SM 5. >10 SM

Amamentou: Variável categorizada como 1. Sim 2. Não 3. Não se aplica

Foi amamentado(a): Variável categorizada como 1. Sim 2. Não 3. Não lembro

Mãe de leite: Variável categorizada como 1. Sim 2. Não 3. Não lembro

Etilismo: Variável dicotômica 1. Sim 2. Não

Tabagismo Variável dicotômica 1. Sim 2. Não

Drogas injetáveis: Variável dicotômica 1. Sim 2. Não

Uso de preservativo: Variável categorizada como 1- sim 2. não 3- às vezes

Orientação sexual: Variável categorizada como 1. Homossexual 2. Bissexual 3. Heterossexual

Carga proviral do HTLV-1: definida pelo número de cópias do DNA proviral do HTLV-I. Variável quantitativa expressa em unidades de 10^6 células/mL de sangue.

4.7 Critérios de inclusão

- ◆ Ter diagnóstico sorológico e clínico da infecção pelo HTLV-1/2.
- ◆ Estar em acompanhamento médico no Setor de Doenças Infecciosas e Parasitárias do HUPAA ou do HEHA.
- ◆ Gestantes acompanhadas nas unidades dos PSFs.

4.7.1 Critério de exclusão

- ◆ Apresentar-se co-infectados pelo HBV, HCV, HIV.

4.8 Separação dos leucócitos

A separação dos leucócitos foi realizada utilizando Histopaque® -1077 (Sigma Diagnostics) como separador de células, obtendo após trinta minutos de centrifugação a 2000 rpm, o anel leucocitário, adicionado RPMI até completar 8mL. Em seguinte procedeu-se uma primeira centrifugação por 3 minutos 2000 rpm, retirou-se 4mL do sobrenadante e adicionou-se 4 mL do RPMI (LGC Biotecnologia), com posterior centrifugação nas mesmas condições da anterior. O sobrenadante foi descartado permanecendo no tubo 2 mL da solução e realizada a contagem eletrônica de leucócitos (ELX 300, Roche) antes da etapa de extração de DNA genômico. Em seguida ajustou-se a solução para 1×10^6 células/mL e o pellet foi armazenado a -80°C .

4.9 Extração do DNA dos leucócitos

O DNA proviral foi extraído a partir de leucócitos do sangue periférico, utilizando o kit comercial (QIAamp® DNA Blood Mini Kit).

4.10 Nested – PCR para a sequência env-tax do HTLV-1

1ª PCR - A reação foi padronizada para um volume final de 20µl contendo 2µl de DNA genômico, 2mM de cada dNTP. Foi usado o kit PCR Master Mix 2X (Promega Corporation®). Os *primers* utilizados foram **SK44** e **SK110** a 10 pmol. A reação foi processada utilizando o termociclador (Flexigene 2.0, Techne), apresentando uma ciclagem de 7min a 95°C , seguida de 35 ciclos de 95°C por 1 min, 55°C por 1 min e 30s 72°C por 2min e extensão final de 10min a 72°C .

2ª PCR - Foi usada 2µL da segunda reação, como *template* (diluído 1:10 com água destilada *Ultrapure* Invitrogen) da primeira reação, para um volume final de 20µL. Os *primers* usados foram **SK248** e **SK249** a 10 pmol/µL. A reação foi processada no termociclador da Flexigene 2.0, Techne por 5min a 94°C, seguida de 30 ciclos de 94°C por 1 min, 58°C por 1 min e 72°C por 2min e extensão final de 10min a 72°C. Foi feita uma diluição (8µL do produto amplificado com 2µL do tampão da amostra - *Blue Green loading dye* - LGC Biotecnologia), sendo posteriormente aplicado em gel de agarose a 1,8%. Os fragmentos de DNA foram analisados em Gel-Pro Imager CoolSNAP – MediaCybernetcs. Quando observado um fragmento de 466 pb correspondente à sequência env-tax do HTLV-1, era feita a confirmação para o tipo 1 (Lee et al., 2004).

4.11 Nested – PCR para a sequência env-tax do HTLV-2

Para identificar o DNA proviral do HTLV-2 foi realizada uma Nested-PCR.

1ª PCR. Foi padronizado um volume final de 10µL. Os primers utilizados foram **SK44** e **ET 401** a 10pmol. A reação foi processada utilizando o termociclador (Flexigene 2.0, Techne), apresentando uma ciclagem de 5 min a 95°C, seguida de 35 ciclos de 95°C por 1 min, 63°C por 1 min e 72°C por 1min e extensão final de 5 min a 72°C.

2ª PCR. Foi usado 1µL da primeira reação, como *template* para um volume final de 10µL. Os primers usados foram **ET403** e **ET404** a 10 pmol/µL. A reação e a termociclagem foi realizada da mesma forma que a primeira PCR. Foi feita uma diluição (8µL do produto amplificado com 2µL do tampão da amostra - *Blue Green loading dye* - LGC Biotecnologia). Foi amplificado um fragmento de 429pb visualizado em transiluminador sob fonte de luz UV, após eletroforese em gel de agarose a 1,8%.

4.12 Determinação dos subgrupos A e B da sequência tax

Para a identificação do polimorfismo na região do gene *tax*, nos pacientes com HTLV-1, foi utilizada a enzima de restrição *Bsh1236I* (*BstUI*), isoesquisômero da enzima *AccII*, na qual as variantes polimórficas apresentam um sítio de restrição na região 8344 do gene *tax* (Furukawa et al., 2000). Para a formação do amplicon, a ser digerido, foi realizada duas reações de PCR. A primeira reação de

PCR apresentou 2µL de DNA, 0,25pmol/µL de cada primer PXO⁺ e PXO⁻ e 1x master mix (Promega[®]), sob a ciclagem de 94°C/5min, 35 ciclos de 94°C/1min, 53°C/15s, 72°C/1min30 e extensão final de 72°C/10min. Na segunda reação foi utilizado com *template* para a segunda reação, a qual continha 2µL do *template* 0,83pmol/µL de cada primer PXI3⁺ e PXI3⁻ e 1x master mix (Promega[®]), com ciclagem de 50°C/2min, 95°C/13min, 35 ciclos de 95°C/30s, 72°C/1min, 55°C/30s e extensão final de 72°C/9min. Na digestão utilizou-se 8µL do produto de PCR (primers PXI3⁺ e PXI3⁻), 2U da enzima *Bsh1236I* e 1x tampão-R por 16h/37°C. As análises dos comprimentos dos polimorfismos em relação aos fragmentos de restrição (RFLP) foi utilizada a eletroforese em gel de agarose a 2%.

4.13 Quantificação da carga proviral do HTLV-1 nas amostras

Foi realizada uma quantificação relativa, baseada em uma proporção que derivou da relação quantitativa entre alvo e o controle endógeno: “Proporção do HTLV-1 inserido no Genoma” (PHG). A quantificação da carga proviral foi realizada de acordo com a expressão $2^{-Ct(\text{HTLV I})} / 2^{-Ct(\text{Albumina})} \times \text{leucócitos} \cdot 10^6 \times 2 = \text{cópias de HTLV-1 cel/mm}^3$, segundo de Arruda et al. (2008), utilizando o kit SYBR Green I Master Mix 2x (LGC Biotecnologia[®]). As amostras quantificadas foram amplificadas em duplicata, utilizando-se os seguintes *primers* (DEHEE et al., 2002): **SK110** e **SK111**.

4.14 Curva-padrão para a PCR em tempo real

O plasmídeo para construção da curva-padrão utilizada no experimento foi gentilmente cedido pelo Laboratório Avançado de Saúde Pública (Lasp) do Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz, na Bahia. Trata-se de um clone com dupla inserção, contendo uma porção do íntron 12 do gene da albumina e a região pol do genoma do HTLV-1, contida entre as posições 4.708 e 4.953 (DEHEE et al., 2002).

4.15 Quantificação do gene da albumina nas amostras

Todas as amostras foram amplificadas em duplicata, utilizando-se os seguintes *primers* (DEHEE et al., 2002): **Alb-S** e **Alb-AS**. A mistura da reação usada nas duas reações utilizou 2µL do DNA, 10 µM de cada *primer* e SYBR

Green Master Mix®, em um total de 25µL de reação. Tanto o HTLV-1 quanto a albumina seguiram o seguinte protocolo de amplificação: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C; 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 65°C (45 ciclos) e foram amplificados paralelamente no Rotor Gene 3000 (Corbett Life Science), no Laboratório de Virologia do LIKA/UFPE (ARRUDA et al., 2008).

A carga proviral de HTLV-1 foi determinada utilizando a seguinte fórmula: (média do número de cópias de HTLV-1/10⁶ células mononucleares do sangue periférico (PBMC) da albumina) x 2 x 10⁶ e expressa em número de cópias/10⁶ células PBMC, ou seja:

$\frac{\text{média do número de cópias de HTLV-I}}{10^6 \text{ Células Monucleares da albumina}} \times 2 \times 10^6 = \text{número de cópias /}10^6 \text{ PBMC}$

Todos os primers utilizados nos testes moleculares encontram-se na tabela 01.

Tabela 01. Sequência de primers utilizados na PCR.

Primer	Identificação	Sequências
SK44	PCR HTLV I	GAGCCGATAACGCGTCCATCG
SK110	PCR HTLV I	CCCTACAATCCAACCAGCTCAG
SK248	Nested HTLV I	CTAGTCGACGTCCCAGGATATGACC
SK249	Nested HTLV I	CAGACCGCCACCGGTACCGCTCGGC
SK44	PCR HTLV II	GAGCCGATAACGCGTCCATCG
ET401	PCR HTLV II	CTCCTATTCTGGGAACAAGGGGGTTT
ET403	Nested HTLV II	GGCTGGGGACTAAACTGGGATCCTGG
ET404	Nested HTLV II	CCAAACACGTAGACGGGGGATCC
SK43	Sequência tax	CGGATACCCAGTCTACGTGT
SK44	Sequência tax	GAGCCGATAACGCGTCCATCG
SK110	Quantificação da carga proviral	CCCTACAATCCAACCAGCTCAG
SK111	Quantificação da carga proviral	GTGGTGAAGCTGCCATCGGGTTTT
Alb-S	Quantificação do gene de albumina	GCTGTCATCTTGTGGGCTGT
Alb-AS	Quantificação do gene de albumina	AAACTCATGGGAGCTGCTGGTT
PXO ⁺	Gene tax	TCGAAACAGCCCTGCAGATA
PXO ⁻	Gene tax	TGAGCTTATGATTTGTCTTCA
PXI3 ⁺	Gene tax	TTCCGTTCCACTCAACCCTC
PXI3 ⁻	Gene tax	AGACGTCAGAGCCTTAGTCT ⁺

5. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas – UNCISAL sob o registro nº 1610 e 1875 (ANEXOS A e B). Todos os participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE.

6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A relação entre a carga proviral e as variáveis foram calculadas usando o Teste de Fisher. O Teste Mann-Whitney foi aplicado para avaliar as diferenças entre a carga viral mediana do HTLV-1. O intervalo de confiança foi de 95%, com $p < 0,05$ como limite para a significância.

O Software *GraphPrism* 5.0 foi utilizado. A Razão de prevalência, qui-quadrado (χ^2) e exato de Fischer foram utilizados para determinar as associações entre as gestantes.

7. RESULTADOS

Os resultados da tese encontram-se nos apêndices e serão apresentados em forma de artigos intitulados:

Artigo I – CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO HTLV EM PACIENTES COM PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL E PORTADORES

Este artigo foi submetido ao The Journal of Clinical Microbiology (**qualis A1**).

Artigo II – PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO PARA INFECÇÃO PELO HTLV-1/2 EM GESTANTES ASSISTIDAS PELO PROGRAMA DE SAÚDE EM ALAGOAS, NORDESTE DO BRASIL

Este artigo foi submetido ao International Journal of Obstetrics and Gynaecology Research (**qualis B1**).

8. CONCLUSÕES

- ◆ A pesquisa identificou pela primeira vez, entre os pacientes com PET/MAH, os HTLV-1 e 2 circulantes em Alagoas. O HTLV-2 apresentou-se em níveis elevados;
- ◆ O HTLV-1 assim como o HTLV-2 foi identificado nos pacientes com PET/MAH e portadores assintomáticos;
- ◆ Houve predomínio do subgrupo A da tax entre os pacientes com HTLV-1. Apenas três apresentaram o subgrupo B;
- ◆ A média da carga proviral do HTLV-1 foi discretamente mais elevada nos pacientes assintomáticos em relação à média nos pacientes com PET/MAH;
- ◆ A prevalência do anti-HTLV1/2 foi de 8,1% entre as gestantes estudadas;
- ◆ O HTLV-1 foi identificado em 4,3% das gestantes soropositivas, com a média da carga proviral de $3,17 \pm 1,87 \log_{10}$.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ◆ A alta frequência do HTLV-2 foi um dado inesperado que deve ser investigado;
- ◆ A alta frequência do HTLV-1/2 entre as gestantes ressalta a necessidade de instituir-se a triagem sorológica do vírus no pré-natal.

REFERÊNCIAS

ARRUDA, B.C. et al. Evaluation of real time PCR technique to diagnosis of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) in patients in the Hematologia da Fundação Hemope Hospital, in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 5, p. 384-389, 2008.

BALLARD, D.W. et al. HTLV -1 tax induces cellular proteins that activate the kB element in the IL-2 receptor alfa gene. **Science**, v. 241, p. 1652-1655, 1988.

BANGHAM, C.R.M et al. Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. **Science**, 2003.

BARMAK, K. et al. Human T cell leukemia virus type I –induced disease: pathways to cancer and neurodegeneration, **Virology**, v. 308, p. 1-12, 2003.

BEIMLING, P.; MOELLING, K. Direct interaction of CREB protein with 21 bp tax – response of HTLV I LTR. **Oncogene**, v. 7, p. 257-262, 1992.

BEZERRA ACS. (2011) Identificação do provirus defective e classificação da sequência tax do HTLV-1 em doadores de sangue e pacientes com paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV-1. Tese de doutorado. Universidade Federal de Pernambuco.

BITTENCOURT, A.L.; OLIVEIRA, M.F. Dermatite infecciosa associada ao HTLV-1 (DIH) infante-juvenil e do adulto. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 83, n. 4, p. 351-359, 2008.

BITTENCOURT, A.L. Vertical Transmission of HTLV-I/II: A Review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 40, n. 4, p. 245-251, 1998.

BORDUCCHI, D.M.M. et al. Linfoma/Leucemia de células T do adulto. **Revista da Associação Médica do Brasil**, v. 1, n.45, p. 63-70, 1999.

BRITO-MELO, G.E.A. et al. Phenotypic Study of Peripheral Blood Leucocytes in HTLV-I-Infected Individuals from Minas Gerais, Brazil. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 55, n.6, p. 621-628, 2002.

CABRAL, F. et al. Detection of human T-cell lymphotropic vírus type 1 in plasma samples. **Virus Research**, v. 163, n.1, p. 87-89, 2012.

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

CANN, A. J.; CHEN, I. S. Y. Human T-cell leukemia virus type I and II. In: Fields virology (ed. BN Fields, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JL, Monath TP, Roizman B, Straus SE) eds. Fields Virology. v. 59, p. 1939, 1996.

CARNEIRO-PROIETTI, A.B.F. et al. Infecção e doença pelos vírus linfotrópicos humanos de células T (HTLV-I/II) no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, p. 499-508, 2002.

CASTRO, N.M. et al. Bexiga neurogênica associada ao HTLV-I: Duas fases de uma mesma doença. **Urología Panamericana**, v. 17, p. 17-9, 2005.

CASSEB, J.; FUKUMORI, L.M.I.; VERGARA, M.P.P. Lack of *tax* diversity for tropical spastic paraparesis/human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-I) associated myelopathy development in HTLV-I-infected subjects in São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 3, p. 273-276, 2006.

CASKEY, M.F. et al. Clinical manifestations associated with HTLV type I infection: a cross-sectional study. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 23, p. 365-371, 2007.

CARVALHO, E.M. et al. Cytokine profile e imunomodulação em humanos assintomáticos T-vírus linfotrópico 1-doadores de sangue infectado. **Journal Acquired Immune Deficiency Syndrome**. v. 27, p. 1-6, 2001.

CATALAN-SOARES, B.C. et al. Heterogeneous geographic distribution of human T-cell lymphotropic viruses I and II (HTLV-I/II): Serological screening prevalence rates in blood donors from large urban areas in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n.3, p. 926-931, 2005.

CHEN, Y.A. et al. Sexual transmission of human T-cell leukemia virus T associated of anti-tax antibody. **Proceedings of the National Academy of Science of the United America**. Ewashington, v. 88, n. 4, p. 1182-1186, 1991.

COLIN, D.D. et al. Seroprevalence of human T cell lymphotropic vírus infection and associated factors of risk in blood donors of rio Branco city, AC, Brazil (1998-2001). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 6, p. 677-83, 2003.

DEHÉE, A. et al. Quantitation of HTLV-I proviral load by a TaqMan real-time PCR assay. **Journal of Virological Methods**, v. 102, n.1/2, p. 37–51, 2002.

FERREIRA JR, O.C. Human T cell leukemia viruses: epidemiology, biology, and pathogenesis. **Blood Rewies**, v. 11, p. 91-104, 1997.

FURUKAWA, Y. et al. Phylogenetic subgroups of human T cell lymphotropic virus (HTLV) type I in the tax gene and their association with different risks for HTLV-I–associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, **Journal of Infectious Diseases**, v. 182, n. 5, p, 1343–1349, 2000.

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

GALVÃO-CASTRO, B. et al. HTLV-I Epidemiology and origin in Salvador, state of Bahia: the city with the highest prevalence of this infection in Brazil. **Gazeta Médica**, v. 79, n. 1, p. 3-10, 2009.

GESSAIN, A. et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. **Lancet**, v. 326, n. 8452, p. 407-410, 1995.

GOON, P.K. et al. High circulating frequencies of tumor necrosis alpha and interleukin-2-secreting human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) specific CD4+ T cells in patients with HTLV-1 associated neurological disease. **Journal of virology**, v. 77, p. 9716-9722, 2003.

GONÇALVES, C.C.A. et al. Diagnóstico laboratorial da mielopatia associada ao HTLV-1: Métodos para análise do líquido cefalorraquidiano. **Jornal Brasileiro de Patologia Medica e Laboratorial**, v. 45, n. 2, p. 99-110, 2009.

GREENE, W.C.; BOHNLEIN, E; BALLARD, D.W. HIV-1, HTLV-1 and T-cell growth transcriptional strategies and surprises. **Immunology Today**, v. 10, p. 272-277, 1989.

HANCHARD, B. et al. Human Retrovirology: HTLV. **(Blattner WA (ed.) Raven Press: New York**, p. 173–183, 1990.

HEREINE, W.; WOODS, T.; GREEN, D. et al. Detection of human T-cell leukemia/lymphoma virus type I in breast milk of human T-cell leukemia/lymphoma type I and II infected mothers. **Lancet**, v. 340, p. 1157-1158, 1992.

HINO, S. et al. Intervention of maternal transmission of HTLV-1 in Nagasaki, Japan. *New Jersey*, v. 8, p. S68-S70, 1994.

HENEINE, W.; KHABBAZ, R.F.; LAL, R.B.; KAPLAN, J.E. Sensitive and specific polymerase chain reaction assays for diagnosis of human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) and HTLV-II infections in HTLV-I/II-seropositive individuals. **Journal Clinical Microbiology**, v. 30, p. 1605-7, 1992.

HIGUCHI, M.; FUJII, M. Distinct functions of HTLV-1 Tax1 from HTLV-2 Tax2 contribute key roles to viral pathogenesis. **Retrovirology**, v. 6, p. 117, 2009.

IGAKURA, T. et al. Spread of HTLV-I Between Lymphocytes by Virus-Induced Polarization of the Cytoskeleton. **Science**, v. 299, p. 1713-1716, 2003.

IÑIGUEZ, A.M. et al. Correlation of HTLV-1 tax genetic diversity with HTLV-1 associated Myelopathy/tropical spastic paraparesis progression and HTLV-1a genotypes in an HTLV-1 endemic region in Argentina. **Journal of Medical Virology**, v. 82, p. 1438-1441, 2010.

IÑIGUEZ, A.M. et al. HTLV-1a tax Gene and Long Terminal Repeat Sequences from Argentinean Strains Reveal Disagreement with tax Restriction Fragment

Length Polymorphism Subtyping. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 23, n. 9, p. 1127–1130, 2007.

ISHAK, R. et al. Epidemiological aspects of retrovirus (HTLV) infection among Indian populations in the Amazon Region of Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, p. 109-118, 2003.

IWAKURA, Y. Mouse models for rheumatoid arthritis and their use in drug development. **Nippon Yakurigaku Zasshi**, v. 120, p. 303-313, 2002.

IWANAGA, M. et al. Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) proviral load and disease progression in asymptomatic HTLV-1 carriers: a nationwide prospective study in Japan. **BLOOD**, v. 116, n. 8, 2010.

JOHSON, J.M.; HARROD, R.; FRANCHINI, G. Molecular biology and pathogenesis of the Human T-cell leukaemia/lymphotropic virus type 1 (HTLV1). **Journal of Experimental Pathology**, v. 82, p. 135-147, 2001.

KALYANARAMAN, V.S. et. al. A New subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with variant of hairy cell leukemia. **Science**, v. 218, p. 571-573, 1982.

KANNAGI, M. et al. Immunological risks of adult T-cell leukemia at primary HTLV-I infection. **Trends Microbiology**, v. 12, n. 7; p. 346-52, 2004.

KAPLAN, J.E. et al. The risk of development of HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. **Journal of Acquired Immune deficiency syndromes and Human Retrovirology**, v. 3, p. 1096-1101, 1990.

KASHIMA, S. et al. Distribution of Human T Cell Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) subtypes in Brazil: genetic characterization of LTR and Tax Region. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 22, n. 10, p. 953-959, 2006.

KASHIMA, S. et al. HTLV-1 Proviral load by Real Time PCR. VII International Symposium About HTLV in Brazil. **Brazilian Journal Infectious Disease**, n. 9, 2009.

KATRI, P.; RUAN, S. Dynamics of human T-cell lymphotropic virus I (HTLV-I) infection of CD4+ T-cells. **C. R. Biology**, v. 327, n. 11, p. 1009-16, 2004.

KITAGAWA, T. et al. Antibodies to HTLV I in Japanese immigrants in Brazil. **Journal of the American Medical Association**, v. 256, p. 2342, 1996.

KOMURO, A. et al. Vertical transmission of adult T-cell leukemia virus. **Lancet** 1: v. 1, p. 240, 1983.

KAKUDA, K. et al. Molecular epidemiology of human T lymphotropic virus type 1 transmission in Okinawa, Japan. **American Journal of Tropical Medical and Hygiene**, v. 66, n. 44, p. 404-8, 2002.

LANOIX, T. et al. Over production of NF- κ B2 (I κ B) and c-Rel: a mechanism for HTLV-1 tax mediated trans-activation via the NF- κ B signaling pathway. **Oncogene**, v. 9, p. 841, 1994.

LOPES, M.S.S.N.; CARNEIRO-PROIETTI, A.B.F. HTLV 1/2 transfusional e hemovigilância: a contribuição dos estudos de look-back. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 3, p. 229-40, 2008.

LIMA, T.V.R. Caracterização sorológica e detecção molecular do HTLV em amostras de pacientes com distúrbios neurológicos no estado do Pará, Brasil (1996 – 2005). Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade do Pará, 2006.

LOUREIRO, P. Infecção pelo HTLV I: diagnóstico e determinação da carga proviral em indivíduos assintomáticos e com enfermidades associadas em serviço de referência no nordeste. Tese de doutorado em Saúde Pública apresentada ao centro de Pesquisa Aggeu Magalhães – FIOCRUZ. Recife-PE, 2008.

MACHUCA, A.; SORIANO, V. *In vivo* fluctuation of HTLV-I and HTLV-II Proviral Load in Patients Receiving Antiretroviral Drugs. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 24, p.189-193, 2000.

MARTINS, O.A. et al. Parâmetros da resposta imune anti-HTLV –I como indicadores laboratoriais de estadiamento clínico. VIII International Symposium About HTLV in Brazil. **Brazilian Journal Infectious Disease**, 9, 2005.

MOCHIZUKI, M. et al. Uveitis associated with human T-cell lymphotropic virus type I. **American Journal Ophthalmology**, v. 114, p. 123-129, 1992.

MONTANHEIRO, P.A. Quantificação da carga proviral do Vírus Linfotrófico de Céulas T Humanas Tipo 1 (HTLV-1) e marcadores imunológicos em indivíduos portadores e TSP/HAM. Tese de doutorado. Universidade Federal de São Paulo, 2007.

MONTANHEIRO, P.A. et al. HTLV-1 proviral DNA viral load among asymptomatic patients with TSP/HAM. **Brazilian Journal and Medical Biology Research**, v. 38, p. 1643-7, 2005.

MORIUCHI, H. et al. Mother-to-child Transmission of Human T-cell Lymphotropic Virus Type 1. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 32, p. 175-177, 2013.

MOXOTO, I. et al. Perfil sociodemográfico, epidemiológico e comportamental de mulheres infectadas pelo HTLV-1 em Salvador-Bahia, uma área endêmica para o HTLV. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 37-41, 2007.

MURPHY, E.L. et al. Higher Human T Lymphotropic Virus (HTLV) Provirus Load Is Associated with HTLV-I versus HTLV-II, with HTLV-II Subtype A versus B, and with Male Sex and a History of Blood Transfusion. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 190, p. 504-510, 2004.

NAKAGAWA, M. et al. HTLV-1 associated myelopathy: analyses of 213 patients based on clinical features and laboratory findings. **Journal of Neurovirology**, v. 1, p. 50-61, 1995.

NEJMEDDINE, M. et al. HTLV-1 tax protein triggers microtubule reorientation in the virological synapse. **The Journal of biological Chemistry**, v. 1, p. 10, 2005.

NETO, W.K. et al. Prevalence, risk factors and genetic characterization of human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2 in patients infected with human immunodeficiency virus type 1 in the cities of Ribeirão Preto and São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 3, p. 3, 2009.

NOBRE, V. et al. Dermatologic lesions in patients infected with the human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 1, p. 43-52, 2005.

OLIVEIRA, S.R.; AVELINO, M.M. Importância da infecção pelo vírus linfotrópico de células T humana tipo 1 (HTLV-1), síndromes clínicas associadas e transmissão vertical. **Revista de Patologia Tropical**, v. 36, n. 1, p. 17-34, 2007.

OSAME, M. et al. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. **Lancet**. 1: p. 1031-32, 1986.

OLBRICH NETO, J.O.; MEIRA, D.A. Soroprevalência de vírus linfotrópico de células T humanas, vírus da imunodeficiência humana, sífilis e toxoplasmose em gestantes de Botucatu – São Paulo – Brasil. Fatores de risco para vírus

linfotrópico de células T humanas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, p. 28-32, 2004.

PACA-UCCARALERTKUN, S. et al. *In vitro* selection of DNA elements highly responsive to the human T-cell lymphocytic virus type I transcriptional activator tax. **Molecular and cellular biology**, v. 14, p. 456-462, 1999.

PINHEIRO, S.R. et al. HTLV-I associated uveitis, myelopathy, rheumatoid arthritis and Sjögren's syndrome. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 53, p. 777-781, 1995.

POIESZ, B.J. et al. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. **Proc National Academy Science (USA)**, v. 77, p. 7415-7419, 1980.

PROIETTI, F.A. et al. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. **Oncogene**, v. 24, p. 6058-6068, 2005.

RIBAS, J.G.R.; DE MELO, G.C.N. Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 377-384, 2002.

ROMANELLI, L.C.F.; CARAMELLI, P.; CARNEIRO-PROIETTI, A.B.F. O vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1): QUANDO SUSPEITAR DA INFECÇÃO? *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 56, n. 3, p. 340-347, 2010.

ROMANOS, M.T.V. et al. Viroses oncogênicas. In: SANTOS, NOS; ROMANOS, MTV; WIGG, MD. **Introdução à Virologia Humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 15, p. 448-455, 2004.

RUDHOLF, D.L. et al. Detection of human Tlymphotropic virus type I/II env antibodies by immunoassays using recombinant fusion proteins. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 17, p. 35-39, 1993.

SANTOS, F.L.N.; LIMA, F.W.M. Epidemiology physiopathogenesis and laboratorial diagnosis of the HTLV-I infection. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 2, p. 05-116, 2005.

SAITO, S; FURUKI, K; ANDO, Y; TANIGAWA, T; KAKIMOTO, K; MORIYAMA, I; ICHIJO, M. Identification of HTLV-I sequence in cord blood mononuclear cells of neonates born to HTLV-I antigen/antibody-positive mothers by polymerase chain reaction. **Japanese Journal of Cancer Research**, v.81, n.9, p.890-5, 1990.

SEGURADO et al. Identification of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) subtypes using restricted fragment length polymorphism in a cohort of asymptomatic carriers and patients with HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis from São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 3, p. 329-333, 2002.

SEGURADO, A.A.C. Infecção por HTLV I e II. In: FERREIRA A.W. **Diagnóstico Laboratorial**, São Paulo: Guanabara Koogan, 2001. 2.ed.

SCHEINER, M.A. et al. Carga proviral do HTLV I em pacientes com mielopatia associada ao HTLV I/Paraparesia espástica tropical (PET/MAH), com outras anormalidades neurológicas (ONA) e indivíduos assintomáticos (AC). VIII International Symposium About HTLV in Brazil. **The Brazilian Journal Infectious Disease**, 9, 2005.

SHARMA, U.K. et al. Impact of changes in viral marker screening assays. **Transfusion complications**, v. 43, p. 202-214, 2003.

SHUH, S.; BEILKE, M. The Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1): new insights into the clinical aspects and molecular pathogenesis of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) and tropical spastic paraparesis/HTLV associated myelopathy (TSP/HAM). **Microscopy Research and Technique**, v.68, p. 176-196, 2005.

SILVA, F.A.; MEIS, E.; DOBBIN, J.A.; OLIVEIRA, M.S.P. Leucemia-linfoma de células T do adulto no Brasil: epidemiologia, tratamento e aspectos controversos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 4, n. 48, p. 585-595, 2002.

SOUZA, L.A.; LOPES, I.G.L.; MAIA, E.L. Molecular characterization of HTLV-1 among patients with tropical spastic paraparesis/HTLV-1 associated myelopathy in Belém, Pará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 5, p. 504-506, 2006.

SUZUKI, T.; HIRAI, H.; FUJISAWA, J. Transactivador taxo f humam T-cell leukemia virus type I binds to NF-kB p50 and serum response factor (SRF) and associates with enhancer DNAs of the NF-kB site and carG-box. **Oncogene**, v. 8, p. 2391, 1993.

STARLING, A.L.B. et al. Proviral load and the balance of serum cytokines in HTLV-1-asymptomatic infection and in HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). **Acta Tropica**, v. 125, p. 75– 81, 2013.

TAMEGÃO-LOPEZ, B.P. Avaliação dos fatores de risco associados à transmissão do HTLV-1 e do HTLV- 2, em doadores de sangue, na cidade de Belém do Pará. Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Federal do Pará, 2006.

TAKENOUCHI, H. et al. Defective human T-lymphotropic virus Type 1 provirus in asymptomatic carriers. **International Journal of Cancer**, v. 128, p. 1335–1343, 2011.

TAYLOR, G.P. Patogênese e tratamento do HTLV-I associated myelopathy. **Sexual Transmission Infection**, v. 74, p. 316-22, 1998.

TREVIÑO, A. et al. On Behalf of the HTLV Spanish Study Group. Trends in the prevalence and distribution of HTLV-1 and HTLV-2 infections in Spain. **Virology Journal**, v. 9, n. 71, 2012.

UENO, S. et al. Proviral loads of human T-lymphotropic virus Type 1 in asymptomatic carriers with different infection routes. **International Journal of Cancer**, v. 130, p. 2318–2326, 2012.

VINE, A.M. et al. The Role of CTLs in Persistent Viral Infection: Cytolytic Gene Expression in CD8 Lymphocytes Distinguishes between Individuals with a High or Low Proviral Load of Human T Cell Lymphotropic Virus Type 1. **The Journal of Immunology**, v. 173, p. 5121-5129, 2005.

WOLFE, et al. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. **PNAS**, v. 102, n. 22, p. 7994-7999, 2005.

YAMAGUCHI, K. et al. Patogénese de adult T-cell leukemia from clinical pathologic features. **Human retrovirology: HTLV**, Blattner W (ed). Raven Press, New York, p. 163-71, 1990.

YANAGIHARA, R. et al. Human T lymphotropic vírus type I infection in Papua New Guinea: high prevalence among the Hagahai confirmed by western analysis. **Journal Infectious Disease**, v. 162, p. 649-54, 1990.

YDI, R.R.A.; FERREIRA, D.; SOUTO, F.J.D.; FONTES, C.J.F. Prevalência da infecção pelo vírus linfotrópico humano de células T- HTLV-1/2 entre puérperas de Cuiabá, Estado de Mato Grosso, 2006. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 1, p. 28-32, 2009.

ZANINOVIC, V. Tropical spastic paraparesis. *Lancet*, v. 2, n. 280, 1987.

APENDICES

APENDICE A



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome da pesquisa: Caracterização molecular do vírus linfotrópico de células T de humano (HTLV) em pacientes com paraparesia espástica tropical/mielopatia (PET/MAH), portadores e gestantes em Alagoas.

Eu, maior de 21 anos, estou sendo convidado (a) para participar de uma pesquisa que visa elucidar o perfil molecular do HTLV 1/2. Minha participação é voluntária. Eu vou está livre para não aceitar minha inclusão sem que isso altere em nada o meu tratamento ou vínculo com o meu médico ou com a instituição que eu procurei para tratar-me.

Não se trata de pesquisa para uso de medicamento. Entretanto, os resultados obtidos poderão contribuir para melhor entendimento da infecção pelo HTLV 1/2. Não haverá qualquer despesa para mim e o meu tratamento não sofrerá alterações quanto ao medicamento que eu esteja usando ou vá usar nem quanto ao médico que me atende ou virá atender. O que será feito é a coleta de sangue (10 mL) em uma veia periférica do seu braço. Esse material será analisado pelo próprio pesquisador, no Laboratório do Hospital Dr Hέλvio Auto bem como no Laboratório de Imunopatologia keizo Asami – LIKA/UFPE, Recife-PE.

Os riscos que você corre ao participar deste estudo estão relacionados ao local da punção, como exemplo: dolorimento/furmigamento e mancha arroxeadada que podem ser minimizados com os cuidados higiênicos tópicos, pressão local após a coleta do sangue e, se necessário, anestésico local. Raramente são observadas infecções decorrentes da punção, mas, caso haja, você será adequadamente tratado (a) sem qualquer ônus. A sua participação não implica em remuneração para você ou para os seus familiares, tratando-se de colaboração voluntária para o conhecimento científico.

Também serão feitas algumas perguntas sobre mim e minha saúde tais como: nome, idade, local de moradia. Todo material escrito e o sangue coletado serão trabalhados com o máximo rigor científico e minha identidade será mantida em sigilo. Os relatórios e publicações resultantes dessa pesquisa conterão os resultados de forma sumarizada e, portanto, não haverá forma de eu ser identificado (a). A minha participação não implica em remuneração para mim ou para os meus familiares, tratando-se de colaboração voluntária para o conhecimento científico.

O projeto dessa pesquisa foi avaliado por um **Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)**, segundo padrões internacionais de aprovação de estudos que envolvem seres humanos. Após ter lido este documento e tirado todas as dúvidas com o pesquisador, eu assinei este termo como prova de que, voluntariamente aceitei participar do mesmo.

Em caso de dúvidas, logo abaixo, encontram-se o respectivo endereço do pesquisador:
Erlon Oliveira dos Santos. Edf. Carmelo, 100.
Rua Joaquim Antônio de Barros, APTO 101, Centro.
CEP 57200-000 Maceió - Al. Fone: (82) 88248860.

Maceió, ____ de _____ de _____

Pesquisador

Paciente

APENDICE B

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

() Não quero responder	No	Data:
REG.	Classificação do paciente: 1. Sintomático 2. Assintomático	
1. IDENTIFICAÇÃO		
Idade: 1. 10-18 Anos 2. 19-49 anos 3. 50-60 anos 4. >60 anos		
Sexo: 1. M 2. F	Cor: 1. Branca 2. Preta 3. Parda 4. Amarela 5. Índigena	
Naturalidade:	Procedência:	
Endereço:		
Cidade:	Bairro:	
CEP:	Tel ()	Cel ()
Escolaridade: 1. Superior 2. Ensino médio completo, 3. Ensino médio incompleto, 4. Ensino fundamental completo 5. Ensino fundamental incompleto, 6. Alfabetizados, 7. Analfabetos		
Estado civil: 1. Solteiro(a) 2. Solteiro sem companheira 3. Solteira com companheiro 4. Casado, 5. Viúvo 6. Divorciado.		
Tempo:anos.....Meses		
Renda: (em salário mínimo): 1. >SM 2. 1SM 3. 1-5SM 4. 5-10SM 5. <10 SM		
2. MOTIVO DO ENCAMINHAMENTO		
Motivo 1. Doador de sangue 2. Politransfundido 3. Parente de portador de HTLV 4. Outros		
Amamentou: 1. Sim 2. Não 3. Não se aplica	Foi amamentado(a): 1. Sim 2. Não 3. Não lembro	
Mãe de leite: 1. Sim 2. Não 3. Não lembro		
Portador de PET/MAH: 1. Sim 2. Não		
3. ANTECEDENTES.		
1º Teste HTLV-I +	Outras infecções:	
Doença neurológica na família: 1. Sim 2. Não		
Doenças hematológicas na família: 1. Sim 2. Não		
Etilismo: 1. Sim 2. Não		
Banhos de rio: 1. Sim 2. Não		
4. EPIDEMIOLOGIA		
Drogas injetáveis: 1. Sim 2. Não	Ainda usa: 1. Sim 2. Não	
Tempo de uso:anosmeses	Tempo que parou:anos meses	
Número atual de parceiros:		
Anteriores:	Uso de preservativo: 1- SIM 2. NÃO 3- às vezes	
No de filhos:	Orientação sexual: 1. Homossexual 2. Bissexual 3. Heterossexual	

APENDICE C - Versão em português do artigo I

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO HTLV EM PACIENTES COM PARAPARESIA ESPÁSTICA TROPICAL E PORTADORES

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO HTLV

Erlon Oliveira dos Santos^{1,4}, Dayse Maria Vasconcelos de Deus^{1,2}, Viviane Martha Santos de Moraes^{1,2}; Paulo Roberto Euletério de Souza⁶; Arthur Maia Paiva⁵, Margareth Mendonça⁵, Maria Helena Araújo⁵, Ana Cristina de Souza Bezerra⁷, Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho^{1,2,3*}

Instituição onde o trabalho foi realizado: Universidade Federal de Pernambuco Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil¹; Divisão de Virologia, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil²; Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil³; Universidade Estadual de Alagoas, Universidade de Ciências da Saúde de Alagoas, Maceió, Alagoas, Brasil⁴; Ambulatório de Doenças Infeciosas e Parasitárias – Universidade Federal de Alagoas⁵; Laboratório Genoma, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil⁶, Fundação HEMOPE⁷.

#Autor de correspondência:

Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

Rua Manuel Lubambo, 118 – Afogados, Recife, PE, Brazil. Zip Code: 50850-040

E-mail: rcoelholika@gmail.com Phone/fax number: 55 81 2126-8527

RESUMO

O HTLV-1 foi identificado em 68,3% dos indivíduos e o HTLV-2 em 31,7%. A carga proviral foi estatisticamente significativa em pacientes assintomáticos em comparação com pacientes com PET/MAH. O subgrupo *tax* foi identificado em 95,7% dos indivíduos. A pesquisa mostrou uma alta frequência de HTLV-2 em Maceió, Alagoas, Nordeste do Brasil.

Palavras-chaves: (HTLV-1/2), paraparesia espástica tropical, carga proviral do HTLV-1, proteína *tax*.

O vírus linfotrópico de célula T humana 1 (HTLV-1) está associado a diversas doenças entre elas a paraparesia espástica tropical/mielopatia associada ao HTLV (PET/MAH). Por outro lado, o HTLV-2 tem sido ocasionalmente associado a síndromes neurológicas semelhantes a PET/MAH sem evidências de produção de malignidade hematológica (1), entretanto, alguns estudos sugerem uma associação com a PET/MAH e com o aumento da incidência de bronquite, pneumonia e infecção do trato urinário (2,3).

Estudo tem demonstrado que 1% a 5% dos indivíduos infectados poderão desenvolver PET/MAH e quando infectados na infância esse percentual é de 0,25% a 4% (4). Marcadores de histocompatibilidade, resposta imunológica, carga proviral, mutações virais e a ação da proteína *tax* podem estar associados ao desenvolvimento da doença (4,5).

A detecção da carga proviral é importante para o monitoramento do número de células infectadas, atuando como indicador na predisposição às

patologias a ele associadas. Esta se encontra cerca de 10 a 100 vezes mais elevada nos pacientes com PET/MAH do que nos pacientes assintomáticos, sugerindo a existência da associação entre carga proviral e o desenvolvimento da doença (5,6). Entretanto, alguns autores identificaram maior carga proviral em portadores (7,8).

A proteína tax é essencial para a expressão do vírus e desempenha papel fundamental na ativação dos genes celulares. De acordo com as substituições encontradas em posições específicas da sequência *tax* são descritos dois subgrupos do HTLV-1: *tax A* e *tax B*. Tem sido demonstrado que o subtipo *tax A* apresenta maior incidência nos pacientes com PET/MAH do que em portadores assintomáticos (9).

O presente estudo teve como objetivo identificar o tipo de HTLV, quantificar a carga proviral e classificar a sequência *tax* nos indivíduos com PET/MAH e portadores oriundos de dois centros de referência em doenças infecciosas e parasitárias em Maceió (Alagoas). A população de estudo foi constituída por pacientes com diagnóstico sorológico para o HTLV-1/2 (ELISA - kit HTLV-I/HTLV-II Ab Capture ELISA Test System, Ortho-Clinical Diagnostic Inc, Raritan, EUA). O DNA proviral foi extraído utilizando o kit (QIAamp® DNA Blood Mini Kit) a partir de PBMC tratadas com Histopaque® -1077 (Sigma Diagnostics). A Nested-PCR foi realizada com a sequência *env-tax*, utilizando o kit Master Mix 2X (Promega Corporation®), com volume final de 20µL contendo 2µL de DNA genômico. Os primers utilizados (tabela 01) foram **SK44** e **SK110** a 10 pmol, com ciclagem de 7min a 95°C, seguida de 35 ciclos de 95°C por 1 min, 55°C por 1 min e 30s 72° C por 2min e extensão final de 10min a 72°C. Na segunda reação, foram usados 2µL da primeira reação para um volume final de 20µL. Os primers usados foram

SK248 e **SK249** a 10 pmol/ μ L por 5min a 94°C, seguida de 30 ciclos de 94°C por 1 min, 58°C por 1 min e 72°C por 2min e extensão final de 10min a 72°C. Um fragmento de 466pb foi visualizado em gel de agarose a 1,8%.

Tabela 01 - Sequência de primers utilizados na PCR.

Primer	Identificação	Sequências
SK44	PCR HTLV I	GAGCCGATAACGCGTCCATCG
SK110	PCR HTLV I	CCCTACAATCCAACCAGCTCAG
SK248	Nested HTLV I	CTAGTCGACGTCCCAGGATATGACC
SK249	Nested HTLV I	CAGACCGCCACCGGTACCGCTCGGC
SK44	PCR HTLV II	GAGCCGATAACGCGTCCATCG
ET401	PCR HTLV II	CTCCTATTCTGGGAACAAGGGGGTTT
ET403	Nested HTLV II	GGCTGGGGACTAACTGGGATCCTGG
ET404	Nested HTLV II	CCAAACACGTAGACGGGGGATCC

Na quantificação dos genes HTLV-1 e albumina foi utilizado o kit SYBR Green I Master Mix 2x (Qiagen®) (10). Foram construídas duas curvas padrões utilizando um plasmídeo carreador dos insertos de interesse, contendo uma porção do *ínton* 12 do gene da albumina e a região *pol* do genoma do HTLV-1, contida entre as posições 4.708 e 4.953 (11). A carga proviral do HTLV-1 foi calculada utilizando o *Cycle threshold* (Ct) referente ao número de cópias do HTLV-1/reação e o Ct referente ao número de cópias de albumina/reação e a quantificação foi realizada de acordo com a expressão $2^{-Ct(\text{HTLV I})} / 2^{-Ct(\text{Albumina})} \times \text{leucócitos} \cdot 10^6 \times 2 = \text{cópias de HTLV-1 proviral} / \text{mm}^3$.

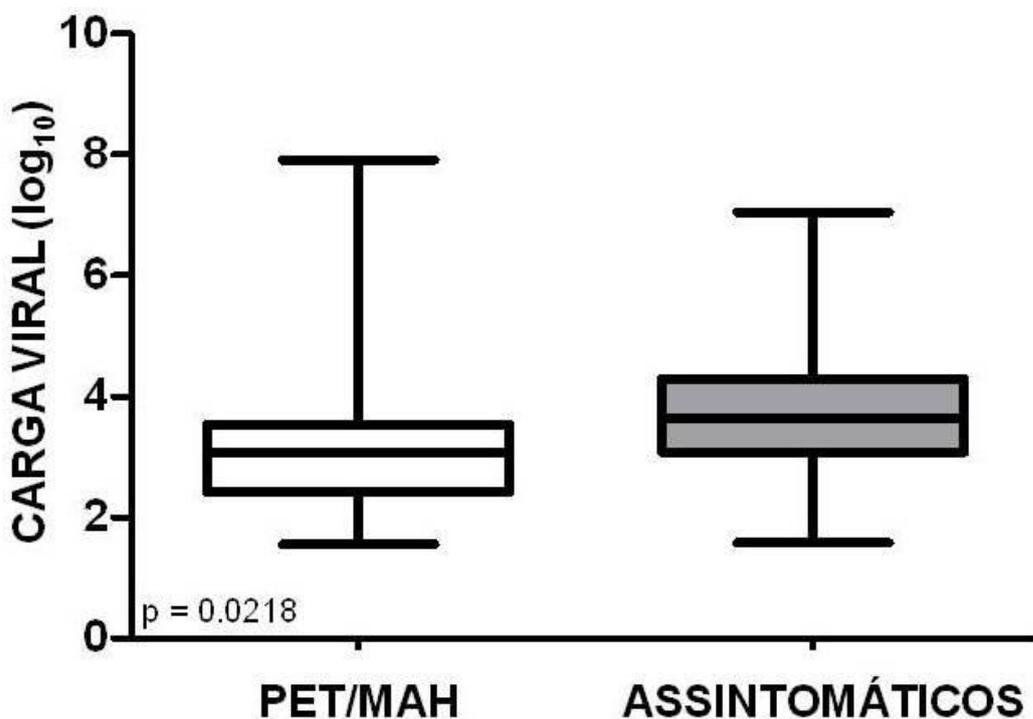
Para a identificação do polimorfismo na região do gene *tax*, foi utilizada a enzima de restrição *Bsh1236I* (*BstUI*), isoesquisômero da enzima *AccII*, na qual as variantes polimórficas apresentam um sitio de restrição na região 8344 do gene *tax* (9).

Foi realizada uma Nested-PCR para identificar o DNA proviral do HTLV-2 (Primeira reação: primers **SK44** e **ET 401** a 10pmol/uL e segunda reação, primers **ET403** e **ET404** a 10 pmol/μL), (12). Foi amplificado um fragmento de 829pb.

Foi calculada a relação entre carga proviral e as variáveis utilizando o teste de *Fisher* e *Mann-Whitney*. O intervalo de confiança estabelecido foi de 95% utilizando o software *GraphPrism 5.0*. Foi considerado como resultado estatisticamente significativo um $p < 0,05$. O projeto da pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas sob o registro nº 1610.

O HTLV-1 esteve presente em 68,3% (69/101) dos pesquisados, com faixa etária entre 14 e 82 anos (média de 27 anos), predominando o sexo feminino. Destes, 42% (29/69) apresentavam PET/MAH e 58% (40/69) eram portadores. O HTLV-2 foi identificado em 31,7% (32/101), destes 31,2% (10/32) com PET/MAH e 68,75% (22/32) portadores. Não houve predomínio da infecção por sexo, e a faixa etária acometida foi de 19 e 76 anos. A média da carga proviral do HTLV-1 não diferiu nos dois grupos (figura 01).

Figura 01. Mediana da carga proviral do HTLV-1 em pacientes com PET/MAH e assintomáticos.



Teste Mann Whitney (IC_{95%})

O subgrupo A da sequência *tax* foi identificado em 95,7% (66/69), sendo 40,9% (27/66) nos pacientes com PET/MAH e 59,1% (39/66) nos portadores. O subgrupo B esteve presente em 4,3% (3/69), sendo 1,5% (1/69) nos pacientes com PET/MAH e 2,8% (2/69) nos portadores.

Na casuística estudada, o achado de maior prevalência da PET/MAH no sexo feminino pode está relacionado com a eficiência de transmissão do HTLV-1 do homem para a mulher (13). O fluido seminal estimula a transativação da região LTR do HTLV-1, representando um importante fator de risco para sua transmissão (14).

Os indivíduos com PET/MAH tinham idade acima dos 30 anos, com exceção de uma jovem de 14 anos, cujos pais eram portadores do HTLV-1. Esse

dado sugere que a infecção se deu pelo aleitamento, uma vez que ela foi amamentada por um período de um ano. Estudos mostram que a doença acomete indivíduos predominantemente na faixa etária entre 30 e 50 anos, não sendo comum antes dos 20 anos ou após os 70 anos (15,16).

Vários mecanismos estão envolvidos no desenvolvimento da PET/MAH: relação vírus-hospedeiro, resposta imunológica aumentada, além de elevada carga proviral (17,18).

Os resultados mostraram uma discreta elevação da carga proviral nos portadores comparados àqueles com PET/MAH. A quantificação da carga proviral do HTLV-1 é um importante marcador para o desenvolvimento da PET/MAH. No entanto, pode haver flutuações da carga proviral nos indivíduos com PET/MAH e portadores (19,20). Esta pode ser relativamente estável em um único indivíduo ou variar entre indivíduos, podendo ainda está relacionada com a proliferação clonal do HTLV-1 em PBMC. Nos indivíduos com carga proviral elevada e que se mantém assintomáticos haveria um equilíbrio na resposta Th1/Th2 (6,21,22).

A proteína tax desempenha um papel importante no desenvolvimento da PET/MAH. Furukawa et al. (2000) (9) demonstraram associação entre a presença da tax A nos indivíduos com PET/MAH. Entretanto, no presente estudo e corroborando com diversos outros trabalhos (23,24, 25) esta associação não foi encontrada. Foi encontrado um maior percentual do subgrupo A da sequência tax, sugerindo está relacionado com a ampla distribuição do HTLV do grupo 1a (Cosmopolita) e subgrupo A (Transcontinental) no Brasil (9).

No Brasil, a prevalência do HTLV-2 é maior em usuários de drogas injetáveis e em populações indígenas do Norte do País (26). A alta prevalência encontrada em Alagoas pode está associada aos fatores étnicos, uma vez que,

existem várias tribos indígenas no Estado. Considerando, ser a primeira pesquisa que demonstrou a presença do HTLV-2 em nosso meio, recomenda-se que estudos sejam realizados em comunidades indígenas para melhor caracterização dessa população.

REFERÊNCIAS

1. **Treviño A, Aguilera A, Caballero E, Benito R, Parra PM, Eiros MJ, Hernandez A, Calderón E, Rodríguez M, Torres A, García J, Ramos JM, Roc L, Marcaida G, Rodríguez C, Trigo M, Gomez C, Ortíz O, Mendoza C, Soriano V.** 2012. On Behalf of the HTLV Spanish Study Group. Trends in the prevalence and distribution of HTLV-1 and HTLV-2 infections in Spain. *Virology J.* **9**:1-5.
2. **Orland JR, Wang B, Wright DJ, Nass CC, Garratty G, Smith JW, Newman B, Smith DM, Murphy EL.** 2004. Increased mortality associated with HTLV-II infection in blood donors: a prospective cohort study. *Retrovirology* **1**:1-9.
3. **Posada-Vergara MP, Montanheiro P, Ligia MI, Bonasser FF, Duarte AJS, Penalva de Oliveira AC, Casseb J.** 2006. Clinical and epidemiological aspects of HTLV-II infection in São Paulo, Brazil: presence of tropical spastic paraparesis/htlv-associated myelopathy (TSP/HAM) simile diagnosis in HIV-1-co-infected subjects. *Rev. Inst. Med. Trop.* **48**:207-210.
4. **Cook LB, Elemans M, Rowan AG, Asquith B.** 2013. HTLV-1: Persistence and pathogenesis. *Virology.* **435**:131–140.

5. **Romanelli LCF, Caramelli P, Carneiro-Proietti ABF.** 2012. O vírus linfotrópico de células T humanas tipo 1 (HTLV-1): quando suspeitar da infecção? *Rev. Ass. Med. Bras.* **56**:340-347.
6. **Starling ALB, Martins-Filho AO, Lambertucci JR, Labanca L; Pereira SRS, Teixeira-Carvalho A, Martins ML, Ribas JG, Carneiro-Proietti, ABF, Goncalves DU.** 2013. Proviral load and the balance of serum cytokines in HTLV-1-asymptomatic infection and in HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Acta Tropica.* **125**:75-81.
7. **Martins AO, Brito-Melo GEA, Reis JGAC, Souza JG.** 2005. Parâmetros da resposta imune anti-HTLV-I como indicadores laboratoriais de estadiamento clínico. VIII International Symposium About HTLV in Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* **9**:1-6.
8. **Silva MT, Harab RC, Leite AC, Schor D, Araújo A, Andrada-Serpa MJ.** 2007. Human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) proviral load in asymptomatic carriers, HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, and other neurological abnormalities associated with HTLV-1 infection. *Clin. Infect. Dis.* **44**:689-692.
9. **Furukawa Y, Yamashita M, Usuku K, Izumo S, Nakagawa M, Osame M.** 2000. Phylogenetic subgroups of human T cell lymphotropic virus (HTLV) type I in the tax gene and their association with different risks for HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J. Infec. Dis.* **182**:1343-1349.
10. **De Castro-Costa CM, Araújo AQ, Barreto MM, Takayanagui OM, Sohler MP, da Silva EL, de Paula SM, Ishak R, Ribas JG, Rovirosa LC, Carton**

- H, Gotuzzo E, Hall WW, Montano S, Murphy EL, Oger J, Remondegui C, Taylor GP.** 2006. Proposal for diagnostic criteria of tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM). *AIDS Res. Hum. Retrov.* **10**:931-5.
11. **Semmes OJ, Cazares LH, Ward MD, Qi L, Moody M, Maloney E.** 2005. Discrete serum protein signatures discriminate between human retrovirus associated hematologic and neurologic disease. *Leukemia* **19**:1229-38.
12. **Dehée A, Cesaire R, Desire N, Nicolas JC.** 2002. Quantitation of HTLV-I proviral load by a TaqMan real-time PCR assay. *J. Virol. Met.* **102**:37–51.
13. **Lee T.** 2004. Quantification of HTLV-1 and 2 proviral load using real-time quantitative PCR with SYBR green chemistry. *J. Clin. Virol.* **31**:275-282.
14. **Takenouchi H, Umeki K, Sasaki D, Yamamoto I, Nomura H, Takajo I, Ueno S, Umekita K, Kamihira S, Morishita K, Okayama A.** 2011. Defective human T-lymphotropic virus Type 1 provirus in asymptomatic carriers. *Int. J. Cancer* **128**:1335-1343.
15. **Moriuchi M, Moriuchi H.** 2004. Seminal fluid enhances replication of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1: Implications for sexual transmission. *J. Virol.* **78**:12709-12711.
16. **Iwanaga M, Watanabe T, Utsunomiya A, Okayama A, Uchimaru K, Koh KR, Ogata M, Kikuchi H, Sagara Y, Uozumi K, Mochizuki M, Tsukasaki K, Saburi Y, Yamamura M, Tanaka J, Moriuchi Y, Hino S, Starling ALB, Martins-Filho AO, Lambertucci JR, Labanca L; Pereira SRS, Teixeira-Carvalho A, Martins ML, Ribas JG, Carneiro-Proietti, ABF, Goncalves DU.** 2013. Proviral load and the balance of serum cytokines in HTLV-1-

- asymptomatic infection and in HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Acta Tropica*. **125**:75-81.
17. **Souza LA, Lopes IGL, Maia EL**. 2006. Molecular characterization of HTLV-1 among patients with tropical spastic paraparesis/HTLV-1 associated myelopathy in Belém, Pará. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **39**:504-506.
18. **Demontis MA, Hilburn S, Taylor GP**. 2013. Human T Cell Lymphotropic Virus Type 1 Viral Load Variability and Long-Term Trends in Asymptomatic Carriers and in Patients with Human T Cell Lymphotropic Virus Type 1-Related Diseases. *AIDS Res. Hum. Retrov.* **29**:359-364.
19. **Iñiguez AM, Otsuki K, Gastaldello R, Gallego S, Vicente ACP**. 2007. HTLV-1a *tax* Gene and Long Terminal Repeat Sequences from Argentinean Strains Reveal Disagreement with *tax* Restriction Fragment Length Polymorphism Subtyping. *AIDS Res. Hum. Retrov.* **23**:1127-1130.
20. **Furtado MSBS, Andrade RG, Romanelli LCF, Ribeiro MA, Ribas JG, Torres EB, Barbosa-Stancioli EF, Carneiro Proietti ABF, Martins ML**. 2012. Monitoring the HTLV-1 Proviral Load in the Peripheral Blood of Asymptomatic Carriers and Patients With HTLV-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis from a Brazilian Cohort: ROC Curve Analysis to Establish the Threshold for Risk Disease. *J. Med. Virol.* **84**:664-671.
21. **Goon PK, Igakura T, Hanon E, Mosley AJ, Asquith B, Gould KG, GP, Weber JN, Bangham CRM**. 2003. High circulating frequencies of tumor necrosis alpha and interleukin-2-secreting human T-lymphotropic virus type

- 1 (HTLV-1) specific CDS+ T cells in patients with HTLV-1 associated neurological disease. *J. Virol.* **77**:9716-9722.
22. **Cook LB, Rowan GA, Melamed A, Bangham CRM.** 2012. HTLV-1–infected T cells contain a single integrated provirus in natural infection. *Blood* **120**:34-90.
23. **Gillet NA, Malani N, Melamed A, Gormley N, Carter R, Bentley D, Berry C, Bushman FD, Taylor GP, Bangham CRM.** 2011. The host genomic environment of the provirus determines the abundance of HTLV-1–infected T-cell clones. *Blood.* **117**:3113-3122.
24. **Iñiguez AM, Gastaldello R, Otsuki K, Balangero M, Costa FC, Remondegui C, Vicente ACP, Gallego S.** 2010. Correlation of HTLV-1 tax genetic diversity with HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis progression and HTLV-1a genotypes in an HTLV-1 endemic region in Argentina. *J. Med. Virol.* **82**:1438-1441.
25. **Kashima S, Alcantara LC, Takayanagui OM, Cunha MAV, Galvão-Castro B, Pombo-de-Oliveira MS, Zago MA.** 2006. Distribution of Human T Cell Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) subtypes in Brazil: genetic characterization of LTR and Tax Region. *AIDS Res. Hum. Retrov.* **22**:953-959.
26. **Casseb J, Fukumori LMI, Vergara MPP.** 2006. Lack of *tax* diversity for tropical spastic paraparesis/human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) associated myelopathy development in HTLV-1-infected subjects in São Paulo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **101**:273-276.

27. **Mota-Miranda AC, Araújo SP, Dias JP, Colin DD, Kashima S, Covas DT, Tavares-Neto J, Galvão-Castro B, Alcantara LC** 2008. HTLV-1 infection in blood donors from the Western Brazilian Amazon region: seroprevalence and molecular study of viral isolates. *J Med Virol* **80**: 1966-1971.
28. **Ishak R, Vallinoto ACR, Azevedo VC, Vicente ACP, Hall WW, Ishak MOG**. 2007. Molecular evidence for infection by HTLV-2 among individuals with negative serological screening tests for HTLV antibodies. *Epidemiol Infect.* **135**:604-609.

APENDICE D - Versão em português do artigo II

PREVALÊNCIA E FATORES DE RISCO PARA INFECÇÃO PELO HTLV-1/2 EM GESTANTES ASSISTIDAS PELO PROGRAMA DE SAÚDE EM ALAGOAS, NORDESTE DO BRASIL.

INFECÇÃO PELO HTLV EM GESTANTES

Erlon Oliveira dos Santos^{1,2,6}, Jéfferson Luis de Almeida Silva^{1,2} Viviane Martha Santos de Morais^{1,2}, Georgea Gertrudes de Oliveira Mendes Cahú^{1,2}, Dayse Maria Vasconcelos de Deus^{1,2}, Mariana Peixoto de Andrade²; Carlos Winícius Moreira Silva⁶, Camilla Karen Costa Silva⁶, Terezinha Tenório da Silva⁵; Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho^{1,2,3}

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brasil¹; Setor de Virologia, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UFPE)²; Departamento de Fisiologia e Farmacologia, do Centro de Ciências Biológicas (CCB/UFPE)⁴; Departamento de Materno Infantil, Centro de Ciências da Saúde (CCS/UFPE)⁵; Universidade de Alagoas (UNEAL), Arapiraca, Alagoas, Brasil⁶.

Autor para correspondência:

Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901, Brazil. E-mail: rcoelholika@gmail.com, Telefone: (+55 81) 2126-8527

RESUMO

Avaliar a frequência e descrever os fatores de risco da infecção pelo HTLV-1, além de quantificar a carga proviral deste vírus em gestantes assistidas pelo Programa Saúde da Família em Penedo, Alagoas, Brasil. A triagem sorológica foi realizada utilizando-se o kit comercial (HTLV-I/HTLV-II Ab Capture ELISA Test System, Ortho-Clinical Diagnostic Inc, Raritan, EUA). Foi realizada a Nested-PCR para identificar o tipo de HTLV e a PCR em tempo real para a quantificação da carga proviral do HTLV-1. Das gestantes analisadas 8,1% (17/209) apresentaram-se reagentes ao ELISA, destas 15 foram testadas pela PCR *“in house”*, sendo 60% (09/15) positivas para o HTLV-1, todas apresentaram carga proviral quantificável com média de $3,17 \pm 1,87 \log_{10}$. Eram gestantes com faixa etária entre 16 e 41 anos, 34,9% eram mães solteiras e 36,8% tinham estudado até o 9º ano. Das gestantes pesquisadas, 85,2% foram amamentadas, 17,2% relataram ter tido mãe de leite, 88,5% tiveram mais de uma gestação e 59,3% afirmaram já ter amamentado. Os dados obtidos demonstram que a triagem sorológica para HTLV 1/2 constitui uma importante ferramenta para confirmação posterior da infecção e controle da disseminação do vírus nas gestantes, prevenindo a transmissão vertical.

Palavras-chaves: Vírus linfotrópico de células T humana tipo 1 e 2 (HTLV-1/2), gestantes, fatores de risco, carga proviral.

1. INTRODUÇÃO

É de extrema importância a identificação da infecção pelo Vírus linfotrófico de células T de humano tipo 1 (HTLV-1) em gestantes, uma vez que 5% dos bebês que nascem de mães portadoras do vírus poderão desenvolver a Leucemia/Linfoma de células T do Adulto (LLTA)¹.

Trata-se de uma doença grave que se desenvolve num longo período de incubação, com um risco de vida estimado em cerca de 3-8% em indivíduos infectados antes dos 20 anos de idade. O prognóstico é ruim, com sobrevida média de 6 meses após o diagnóstico da doença².

A transmissão do vírus ocorre pelas vias sexual, parenteral, vertical e principalmente pela amamentação em cerca de 20% dos casos³. A contaminação intrauterina ou durante o parto é pouco eficiente².

Embora seja grande o número de mulheres infectadas pelo HTLV-1, a grande maioria permanece assintomática, mesmo durante a gestação. Após o parto, há o risco de transmissão viral para o filho durante o aleitamento materno. Os dados que sustentam a importância do leite materno na transmissão do HTLV-1 baseiam-se na presença de peptídeos antigênicos do vírus no leite de mães infectadas, o aumento significativo da infecção por esse vírus em crianças amamentadas em comparação àquelas alimentadas com uso de mamadeiras². Um estudo mostrou que 32% das crianças amamentadas por 2 anos ou mais se tornaram portadoras do vírus, contra 9% daquelas amamentadas por tempo inferior a seis meses⁴. Há maior risco de transmissão do vírus quando a mãe apresenta carga proviral e títulos de anticorpos elevados^{2,5,6}. Já foi demonstrado carga proviral mais elevada no leite materno quando comparada àquela encontrada em células sanguíneas periféricas⁵.

A prevalência da infecção pelo HTLV-1 em gestantes apresenta variação, dependendo da região geográfica analisada, ficando entre 0,6 a 20%^{7,8,9,10}. No Brasil, a prevalência apresenta oscilação nas diferentes regiões, variando de 0,01 a 2,4%^{11,12,14,15}.

2. MATERIAS E MÉTODOS

População de estudo

Foi constituída pelas Gestantes atendidas durante o pré-natal pelo Programa de Assistência às Gestantes em Penedo, Alagoas, Brasil, no período compreendido entre setembro e novembro de 2012.

Sorologia

A pesquisa do anti-HTLV-1/2 foi realizada utilizando-se o kit comercial Ab Capture ELISA Test System (Ortho-Clinical Diagnostic Inc, Raritan, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

Separação das células periféricas mononucleares e extração do DNA

As células periféricas mononucleares (PBMC) foram separadas de amostras de sangue total, colhidas com EDTA usando o Histopaque® -1077 (Sigma Diagnostics), com solução final ajustada para 1×10^6 células/mL armazenadas em meio RPMI a -80°C . Para a extração de DNA genômico utilizou-se o Mini Kit (QIAamp® DNA Blood, Quiagen, Hilden, Germany).

Detecção do DNA proviral

Na pesquisa do DNA proviral do HTLV-1, a primeira reação da nested-PCR para a detecção da sequência env-tax do HTLV-1 foi padronizada para um volume final de 20 μL contendo 2 μL de DNA genômico, 2mM de cada dNTP, 10 pmol de cada um dos primers **SK44** e **SK110** (tabela 01), utilizando o kit Master Mix 2X (Promega Corporation®). A reação foi processada com uma ciclagem de

7min a 95°C, seguida de 35 ciclos de 95°C por 1 min, 55°C por 1 min e 30s 72° C por 2min e extensão final de 10min a 72°C. Na segunda reação foram usados 2µL do produto amplificado (diluído 1:10 com água destilada; *Ultrapure* Invitrogen) e a mesma preparação do *mix* da reação anterior, exceto pela utilização dos primers SK248 e SK249, com ciclagem por 5min a 94°C, seguida de 30 ciclos de 94°C por 1 min, 58°C por 1 min e 72°C por 2min e extensão final de 10min a 72°C. O produto amplificado de 466pb foi visualizado por eletroforese em gel de agarose a 1,8% corado com *Blue Green Loading Dye* (LGC Biotecnologia)⁹.

Tabela 01. Sequência de primers utilizados na PCR.

Primer	Identificação	Sequências (5'-3')
SK44	PCR HTLV 1	GAGCCGATAACGCGTCCATCG
SK110	PCR HTLV-1	CCCTACAATCCAACCAGCTCAG
SK248	Nested HTLV-1	CTAGTCGACGTCCCAGGATATGACC
SK249	Nested HTLV-1	CAGACCGCCACCGGTACCGCTCGGC
SK110	Quantificação da carga proviral	CCCTACAATCCAACCAGCTCAG
SK111	Quantificação da carga proviral	GTGGTGAAGCTGCCATCGGGTTTT
Alb-S	Quantificação do gene de albumina	GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT
Alb-AS	Quantificação do gene de albumina	AAACTCATGGGAGCTGCTGGTT

Quantificação da carga proviral

A carga proviral foi quantificada utilizando o kit SYBR Green I Master Mix 2x® (Quiagen, Hilden, Germany)³². Para cada paciente foram realizadas duas reações (HTLV-1 e Albumina) contendo 1µL do DNA genômico (90 ng/µL), 0,6 pmol/µL de cada *primer* (10 pmol/µL) **SK110, SK111, Alb-S e Abl-AS** e 1x SYBR Green I Master Mix. Ambas as reações seguiram a mesma ciclagem: 50°C por 2

min, 95°C a 10 min; seguida de 45 ciclos de 95°C 10 seg e 60°C por 1 min. Em seguida de um aquecimento gradativo (de 60°C até 95°C, com aumentos de 0,2°C a cada 8s) das amostras amplificadas foi utilizado para verificar a especificidade dos primers. Posteriormente foram construídas duas curvas padrões utilizando uma solução diluída em série, contendo 10⁶ cópias de plasmídeo carreador dos insertos de interesse, com uma porção do *ínton* 12 do gene da albumina e a região *pol* do genoma do HTLV-1, contida entre as posições 4.708 e 4.953, com limites de quantificação entre 10⁵ a 10⁶ cópias¹⁶.

A carga proviral do HTLV-1 foi calculada utilizando o *Cycle threshold* (Ct) e resultado da carga proviral foi convertido em log₁₀ para melhor apresentação dos resultados.

Análises estatísticas

Os dados das gestantes foram armazenados e analisados pelo programa Epi Info v.3.5.4, onde os testes de associação entre a positividade do anti-HTLV-1 e as variáveis do estudo foram calculados através da razão de prevalência (RP) e seu intervalo de confiança de 95%. O teste do qui-quadrado (χ^2) e o teste exato de Fischer foram utilizados quando apropriado para determinar se as associações eram estatisticamente significantes, sendo considerado o valor de $p < 0,05$ como resultado significativo.

Ética

O projeto da pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas (UNCISAL) sob o registro nº 1875. Todos os participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3. RESULTADOS

As gestantes tinham a faixa etária entre 16 e 41 anos, 34,9% eram mães solteiras e 36,8% do 5º a 9º ano. Quanto à idade gestacional, 47,8% encontravam-se entre 16 a 24 semanas de gravidez. As características epidemiológicas e comportamentais das gestantes pesquisadas estão descritas na Tabela 02.

Tabela 02. Características sócio-demográficas das 209 gestantes assistidas pelo programa Saúde da Família. Penedo, Alagoas, 2013.

	N	%
Variáveis		
Faixa etária		
< 18 anos	20	9,6
18 a 28 anos	118	56,5
29 a 39 anos	68	32,5
> 40 anos	3	1,4
Grau de escolaridade		
Analfabeto	25	12,0
1º a 4º ano	41	19,6
5º a 9º ano	77	36,8
Ensino médio completo	29	13,9
Ensino médio incompleto	33	15,8
Superior completo	4	1,9
Estado civil		
Solteira	73	34,9
Casada	49	23,4
União Consensual	78	37,3
Separada	9	4,3
Transfusão de sangue		
Não	191	91,4
Sim	18	8,6
Transplante de órgãos		
Não	207	99
Sim	2	1
Foi amamentada		
Não	31	14,8
Sim	178	85,2
Teve mãe de leite		
Não	173	82,8
Sim	36	17,2
Amamenta ou já amamentou		
Não	85	40,7
Sim	124	59,3
Nº de parceiros nos últimos seis meses		

1	203	97,2
2 a 4	6	2,8
Histórico de sexo com usuários de drogas		
Não	166	79,4
Sim	43	20,6
Histórico de sexo com usuários de tatuagem/piercing		
Não	168	80,4
Sim	41	19,6
Histórico de DST		
Não	195	93,3
Sim	14	6,7
Uso de drogas injetáveis		
Não ¹	209	100
Sim	0	0
Compartilhamento de seringas/agulhas		
Não	209	100
Sim	0	0
Compartilhou utensílios como alicate de unha		
Não	130	62,2
Sim	79	37,8
Uso de tatuagem/piercing		
Não	172	82,3
Sim	37	17,7

A prevalência do anti-HTLV-1/2 encontrada na população de gestantes foi 8,1% (17/209). Das 17 gestantes com sorologia reagente, apenas 15 retornaram para a realização da pesquisa do DNA viral pela PCR “*in house*”. Foram positivas para o HTLV-1 60% (09/15) e todas apresentaram carga proviral quantificável com média de $3,17 \pm 1,87 \log_{10}$. Não foi possível observar nenhum achado clínico compatível com PET/MAH – todas as gestantes encontravam-se assintomáticas, conforme a tabela 03.

Tabela 03. Características relacionadas às gestantes assistidas pelo Programa Saúde da Família, segundo a positividade para o anti-HTLV. Penedo, Alagoas, 2013.

Variável	Anti-HTLV 1/2				RP ²	IC 95% ³	P
	Positivo		Negativo				
	N	%	N	%			
Faixa etária							
< 18 anos ¹	0	0	20	100	1		
De 18 a 28 anos	12	10,2	106	89,8	----		
De 29 a 39 anos	5	7,4	63	92,6	----		
> 40 anos	0	0	3	100	----		
Grau de escolaridade							
Analfabeto ¹	2	8	23	92	1		
1º a 4º ano	3	7,3	38	92,7	0,91	0,11 – 8,52	1,000
5º a 9º ano	7	9,1	70	90,9	1,15	0,20 – 8,66	1,000
Ensino médio incompleto	1	3	32	97	0,36	0,01 – 5,55	0,572
Ensino médio completo	3	10,3	26	89,7	0,88	0,08 – 9,79	1,000
Superior completo	1	25	3	75	3,13	0,36 – 26,99	0,370
Estado civil							
Solteira ¹	9	12,3	64	87,7	1		
Casada	3	6,1	46	93,9	0,46	0,09 – 2,02	0,357
União Consensual	5	6,4	73	93,6	0,49	0,13 – 1,70	0,330
Separada	0	0	9	100	----		
Foi amamentada							
Não ¹	11	6,2	25	80,6	1		
Sim	6	19,4	167	93,8	0,27	0,09 – 1,92	0,124
Teve mãe de leite							
Não ¹	13	7,5	160	92,5	1		
Sim	4	11,1	32	88,9	1,54	0,39 – 5,53	0,502
Amamenta ou já amamentou							
Não ¹	6	7,1	79	92,9	1		
Sim	11	8,9	113	91,1	1,28	0,42 – 4,09	0,831
Número de parceiros nos últimos seis meses							
1 ¹	16	7,9	187	92	1		
2-4	1	16,7	5	83,3	2,34	0,33 – 14,45	0,402
Histórico de sexo com usuários de drogas							
Não ¹	13	7,8	153	92,2	1		
Sim	4	9,3	39	90,7	1,21	0,31 – 4,29	0,756
Histórico de sexo com usuários de tatuagem/piercing							
Não ¹	15	8,9	153	91,1	1		
Sim	2	4,9	39	95,1	0,52	0,08 – 2,55	0,534
Compartilha utensílios como alicate de unha							

Não ¹	8	6,1	123	93,9	1		
Sim	9	11,5	69	88,5	2,01	0,67 – 6,03	0,259
Uso de tatuagem/piercing							
Não ¹	13	7,6	159	92,4	1		
Sim	4	10,8	23	89,2	2,13	0,53 – 7,87	0,257

¹ Grupo de referência, ² RP: Razão de prevalência, ³ IC 95%: Intervalo de confiança,

⁴ RP indefinido.

4. DISCUSSÃO

A soroprevalência do HTLV 1/2 encontrada neste estudo foi bem superior aos relatos anteriores^{10,13,18}. Este valor pode estar relacionado às características pertinentes ao local de estudo. Penedo é uma cidade de origem quilombola, portanto, com forte influência africana. Em afro-descendentes no Brasil Central foi relatada prevalência de 0,5%¹⁹. Além disso, a diferença na prevalência pode ser decorrente das condições socioeconômicas, falta de informação sobre a transmissão viral e o não uso do preservativo.

A maior frequência de casos com sorologia positiva encontrou-se na faixa etária com média de 23 anos, corroborando com outros trabalhos^{10,13}, cuja média de idade foi de 27 anos. Por outro lado, houve relato de uma maior frequência naqueles com faixa etária superior a 50 anos²⁰. Este dado pode ter várias explicações como soroconversão tardia de infecção adquirida mais cedo na vida, vida sexual mais ativa, maior exposição sexual com parceiros contaminados e alteração no epitélio vaginal, principalmente após a menopausa^{21,22} e por fatores hormonais^{13,23}.

O baixo nível socioeconômico acompanhado do baixo grau de escolaridade também está associado à infecção pelo HTLV^{13,24}. Grande parte das gestantes infectadas eram do 5º ao 9º ano, que por sua vez suporta a teoria que os

indivíduos não detentores do conhecimento apresentam maior grau de vulnerabilidade às infecções, corroborando com outros autores^{12,13}.

É indiscutível a associação existente entre aleitamento materno e infecção pelo HTLV, esta é a principal via de transmissão. É bastante frequente, em algumas regiões do país, a prática do aleitamento cruzado como manifestação solidária entre as mães, fator que implica na disseminação do HTLV na comunidade²⁵. No presente estudo, 178 das 209 gestantes afirmaram terem sido amamentadas, e destas, 7,3% (13/178) encontravam-se infectadas pelo vírus. Provavelmente o aleitamento materno tenha sido a fonte de infecção nessas gestantes, uma vez que este vírus exibe grande capacidade de instalar-se em células glandulares, inclusive em células mamárias²⁶. Adicionalmente, durante a amamentação ocorre a passagem de diversas células, inclusive linfócitos infectados. Diversos autores têm demonstrado que o período de amamentação superior a seis meses aumenta a chance de a infecção acontecer^{10,27}. No entanto, em nossa pesquisa não foi possível verificar o período em que cada gestante foi amamentada. Embora grande parte das gestantes tenha afirmado ter sido amamentada, quando interrogadas não sabiam ou não lembravam o período de amamentação.

O início cada vez mais precoce da vida sexual pode sugerir um risco adicional para se adquirir doenças de transmissão sexual. Embora a literatura aponte que ter múltiplos parceiros sexuais ao longo da vida ou ter uma relação estável com um dos parceiros soropositivo esteja associado à transmissão do HTLV^{20,24} tal fato não foi observado em nossa casuística. A maioria das gestantes positivas se relacionou apenas com um parceiro nos últimos seis meses.

Portanto, a provável via de transmissão do HTLV-1/2 pode ter sido pelo aleitamento, uma vez que todas tinham sido amamentadas.

Na população de gestantes HTLV-1/2 positivas não houve relato de: histórico de transplante de órgãos, histórico de DSTs, uso de drogas injetáveis e compartilhamento de agulhas contaminadas. Entretanto, as variáveis comumente relacionadas à transmissão do HTLV como: sexo com usuário de drogas, uso de tatuagem/piercing, histórico de transfusão de sangue, ter sido amamentada, ter tido mãe de leite, número de parceiros e compartilhamento de alicates de unhas não constituíram fatores de risco para infecção pelo HTLV-1/2 na população estudada.

Embora não tenha havido associação estatisticamente significativa entre as variáveis pesquisadas, chamamos atenção para dois fatos importantes: o primeiro pelo alto percentual de gestantes infectadas pelo HTLV; e segundo o número de gestação de cada uma delas, ou seja : três na segunda e três na terceira gestação.

Todas as gestantes envolvidas na pesquisa receberam as devidas orientações sobre a infecção pelo HTLV, inclusive sobre a suspensão do aleitamento materno no caso de infecção confirmada.

Os dados obtidos demonstram que a triagem sorológica para infecção pelo HTLV 1/2 constitui uma importante ferramenta no controle da disseminação do vírus entre as gestantes, alertando para a confirmação da infecção e prevenindo a transmissão vertical pela amamentação.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

1. Manns A HM, LA Grenade L. Human T-lymphotropic virus type I infection. *Lancet* 1999;353:1951–8.
2. Moriuchi H, Masuzaki H, Doi H, Katamine H. Mother-to-child Transmission of Human T-cell Lymphotropic Virus Type 1. *Pediatric Infect Dis J* 2013;32(2):175-177.
3. Ribas JGR, De Melo GCN. Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-associated myelopathy. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002;35(4):377-384.
4. Wiktor SZ, Jacobson S, Weiss SH et al. Spontaneous Lymphotropic proliferation in HTLV-II infection. *LACET* 1993;337:327-328.
5. Li HC, Biggar RJ, Miley WJ, Maloney EM, Cranston B, Hanchard B, Hisada M. Provirus Load in Breast Milk and Risk of Mother-to-Child Transmission of Human T Lymphotropic Virus Type I. *J Infect Dis* 2004;190(7):1275-1278.
6. Hisada M, Maloney EM, Sawada T, Miley WJ, Palmer P, Hanchard B, Goedert JJ, Manns A. Virus Markers Associated with Vertical Transmission of Human T Lymphotropic Virus Type 1 in Jamaica. Risk Factors for Vertical HTLV-1 Transmission. 2002;34(15):1551.
7. Armah HB, Edwin G, Narter-Olaga, Andrew AAdjei, Kofi Asomaning, Richard K. Gyasi and Yao Tettey. Seroprevalence of human T-cell lymphotropic virus type I among pregnant women in Accra, Ghana. *J Med Microb* 2006;55:765–770.
8. Forbi JC, Odetunde AB. Human T-cell lymphotropic virus in a population of pregnant women and commercial sex workers in South Western Nigeria. *African Health Sciences* 2007;7(3):129-32.
9. Etenna SLD, Caron M, Besson G, Makuwa M, Gessain A, Mahe A; Kazanji, M. New Insights into Prevalence, Genetic Diversity, and Proviral Load of

Human T-Cell Leukemia Virus Types 1 and 2 in Pregnant Women in Gabon in Equatorial Central Africa. *J Clin Microb*, 2008;3607–3614.

10. Sequeira CG, Tamegão-Lopes BP, Santos EJM, Ventura AMR, Moraes-Pinto MI, Succi RCM. Descriptive study of HTLV infection in a population of pregnant women from the State of Pará, Northern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012;45(4):453-456.
11. Loureiro P. et al. HTLV-1 antibody in blood donors and in haematological patients in the Northeast of Brazil-State of Pernambuco. *Rev Paulista Med* 1994;110(5).
12. Dias-Bastos MR, Oliveira CL, Carneiro-Proiett AB. Decline in prevalence and asymmetric distribution of human T cell lymphotropic virus 1 and 2 in blood donors, State of Minas Gerais, Brazil, 1993 to 2007. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010;43(6):615-619.
13. Dal Fabbro MMFJ, Cunha RV, Bóia MN, Portela P, Botelho CA, Freitas GMB, Soares J, Ferri J, Lupion J. HTLV 1/2 infection: prenatal performance as a disease control strategy in State of Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 2008;41(2):148-151.
14. Catalan-Soares BC, Proietti FA, Carneiro-Proietti ABF. Human T-cell lymphotropic viruses (HTLV) in the last decade (1990-2000). Epidemiological aspects. *Rev Bras Epid* 2001;4(2):81-95.
15. Câmara, JC; Simonetti, JP; Rodrigues, SR; Simonetti, RSR; Costa, MCFL; Lopes, CMB; Schatzmayr, HG; Carvalho, SMF. Human T lymphotropic virus type I infection in pregnant women in Rio de Janeiro, Brazil. *Virus reviews and research* 2010;15(1):23-34.

16. Olbrich-Neto JO, Meira DA. Soroprevalência de vírus linfotrópico de células T humanas, vírus da imunodeficiência humana, sífilis e toxoplasmose em gestantes de Botucatu – São Paulo – Brasil. Fatores de risco para vírus linfotrópico de células T humanas. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004;37:28-32.
17. Catalan-Soares, B. C.; Carneiro-Proietti, A. B. F.; Proietti F. A. 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 de Saúde Pública* 2005;21(3):926-931.
18. Carles G, Tortevoeye P, Tuppin P, Ureta-Vidal A, Peneau C, El Guindi W, et al. HTLV1 infection and pregnancy. *J Gynecol Obstet Biol Reprod* 2004;33(1 Pt 1):14-20.
19. Nascimento LB, Carneiro MAS, Teles AS, Lopes CLR, Reis NRS, Silva AMC, Motta-Castro ARC, Otsuki K, Vicente ACP, Martins RMB. Prevalência da infecção pelo HTLV-1, em remanescentes de quilombos no Brasil Central. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009;42(6):657-660.
20. Moxoto I, Boa-Sorte N, Nunes C, Mota A, Dumas A, Dourado I, Galvão-Castro B. Perfil sociodemográfico, epidemiológico e comportamental de mulheres infectadas pelo HTLV-1 em Salvador-Bahia, uma área endêmica para o HTLV. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007;40(1):37-41.
21. Kajiyama W et al. Intrafamilial transmission of adult T-cell leukemia virus. *J Infect Dis* 1986;154:851-7.
22. Stuver SO, Tachibana N, Okayama A, Shioiri S, Tsunetoshi Y, Tsuda, K, Mueller NE. Heterosexual transmission of human T cell leukemia/lymphoma virus type I among married couples in southwestern Japan: an initial report from the Miyazaki Cohort Study. *J Infect Dis* 1993;167:57-65.

23. Murphy, EL; Figueroa, JP; Gibas WN et al. Sexual transmission of T-Lymphotropic virus type I (HTLV-I). *Ann Inter Med* 1991;111(7):555-560.
24. Sanchez-Palacios C, Gotuzzo E, Vandamme EAM, Maldonado Y. Seroprevalence and risk factors for human T-cell lymphotropic virus (HTLV-I) infection among ethnically and geographically diverse Peruvian women. *Inter J Infect Dis* 2003;7(3):132-37.
25. Andrade-Serpa MJ, Araújo AQ, Taffarel, M. et al. Detection and isolation of human T-cell leukemia/lymphoma virus type I (HTLV-I) from cultured lymphocytes of a Brazilian TPS/HAM patient. *Braz J Biology Res* 1995;28(1):165-171.
26. Cartier L, Araya F, Castillo JL, Zaninovic V, Hayami M, Miura T, Imai J, Sonoda S, Shiraki H, Miyamoto K, Tajima K. Southernmost Carriers of HTLV-I/II in the World 2005;84(1):1-3.
27. Etenna, SLD, Melanie Caron, Besson G, Makuwa M, Gessain A, Mahe´ A, Kazanji M. New Insights into Prevalence, Genetic Diversity, and Proviral Load of Human T-Cell Leukemia Virus Types 1 and 2 in Pregnant Women in Gabon in Equatorial Central Africa. *J Clinical Microbio* 2008;46(11):3607–3614.

ANEXOS

ANEXO A

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE ALAGOAS - UNCISAL
Transformada pela lei nº 5.060 de 28 de dezembro de 2005
Campus Governador Lamenha Filho
COMITE DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/UNCISAL
Rua Jorge de Lima 113, Trapiche da Barra
Cep 57.010.300 - Maceió-AL

Protocolo Nº 1610

Título: "Quantificação da carga proviral e análise da mutação da região tax do HTLV-1 em pacientes com paraparesia espástica tropical/mielopatia (PET/MAH) e portadores assintomáticos atendidos em Maceió/AL"

Pesquisador Responsável: Erlon Oliveira dos Santos

Maceió, 29 de julho de 2011

Sr^(a). Pesquisador(a),

Conforme deliberação em plenária ordinária do CEP/UNCISAL ocorrida no dia 29/07/11 foi de consenso a aprovação do protocolo nº 1610, intitulado: "Quantificação da carga proviral e análise da mutação da região tax do HTLV-1 em pacientes com paraparesia espástica tropical/mielopatia (PET/MAH) e portadores assintomáticos atendidos em Maceió/AL", podendo a pesquisa ser iniciada.

Nesta oportunidade, lembramos que o pesquisador tem o dever de durante a execução do experimento, manter o CEP informado através do envio a cada seis meses, de relatório consubstanciado acerca da pesquisa, seu desenvolvimento, bem como qualquer alteração, problema ou interrupção da mesma.

Atenciosamente,


Prof. Graciliano Ramos Alencar do Nascimento
Coordenador do CEP/UNCISAL

ANEXO B



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE ALAGOAS – UNCISAL
Transformada pela lei nº 6.660 de 28 de dezembro de 2005
Campus Governador Lamenha Filho
Rua Jorge de Lima 113, Trapiche da Barra,
Cep 57.010.300 – Maceió-AL.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/UNCISAL

Maceió, 06 de março de 2013

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROCOLO – 1875

TEMA: "Infecção pelo vírus linfotrópico de células T de humanos (HTLV) em gestantes acompanhadas pelo programa Saúde da Família em Penedo-Al".

Pesquisador Principal: Erlon Oliveira dos Santos

Data de Entrada: 26/04/2012

Sr^(a). Pesquisador^(a),

Conforme deliberação em plenária ordinária do CEP/UNCISAL ocorrida no dia 06/03/2013 foi de consenso a APROVAÇÃO do protocolo nº 1875 intitulado: "Infecção pelo vírus linfotrópico de células T de humanos (HTLV) em gestantes acompanhadas pelo programa Saúde da Família em Penedo-Al", podendo a pesquisa ser iniciada.

Nesta oportunidade, lembramos que o pesquisador tem o dever de durante a execução do experimento, manter o CEP informado através do envio a cada seis meses, de relatório consubstanciado acerca da pesquisa, seu desenvolvimento, bem como qualquer alteração, problema ou interrupção da mesma.

Atenciosamente,

Ana Lucia de Gusmão Ribeiro
Vice-Coordenadora do CEP

ANEXO C



AIMS AND SCOPE: The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research is the official Journal of the Asia and Oceania Federation of Obstetrics and Gynaecology and of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology.

ACCEPTANCE: The acceptance criteria for all papers are the quality and originality of the research and its significance to our readership. Except where otherwise stated, manuscripts are peer reviewed by anonymous reviewers and the Editor. The Editorial Board reserves the right to refuse any material for publication and advises that authors should retain copies of submitted manuscripts and correspondence as material cannot be returned. Final acceptance or rejection rests with the Editorial Board.

SUBMISSION OF MANUSCRIPTS: All articles submitted to the Journal must comply with these instructions. Failure to do so will result in return of the manuscript and possible delay in publication. Where contributions are judged as acceptable for publication on the basis of scientific content, the Editor or the Publisher reserve the right to modify typescripts to eliminate ambiguity and repetition and improve communication between author and reader. If extensive alterations are required, the manuscript will be returned to the author for revision. Manuscripts must be submitted online at <http://mc.manuscriptcentral.com/jogr>. For assistance, please contact the Editorial Office of The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research at the address below: Editorial Office of The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research c/oWiley-Blackwell
Frontier Koishikawa Bldg 4F,
1-28-1 Koishikawa, Bunkyo-ku,
Tokyo 112-0002

Japan
Email: jog@wiley.com
Tel: +81 3 3830 1264
Fax: +81 3 5689 7278

PRE-SUBMISSION ENGLISH-LANGUAGE EDITING: Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp.

All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication

COVERING LETTER: Papers are accepted for publication in the Journal on the understanding that the content has not been published or submitted for publication elsewhere. This must be stated in the covering letter. The covering letter must contain an acknowledgment that all authors have contributed significantly, and that all authors are in agreement with the content of the manuscript. In keeping with the latest guidelines of the International Committee of Medical Journal Editors, each author's contribution to the paper is to be quantified.

Authors must state their study does not violate the policies and/or procedures established by journal such as those described in 'Specific Inappropriate Acts in Publication Process' [click here](#) and also state that the protocol for the research project has been approved by a suitably constituted Ethics Committee of the institution within which the work was undertaken and that it conforms to the provisions of the Declaration of Helsinki (as revised in Tokyo 2004), available at <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>. Nonetheless the research has been approved by Ethic Committee, Associate Editors may reject manuscripts when editors judge there has been a problem ethically. All investigations on human subjects must include a statement that the subject gave informed consent and patient anonymity should be preserved. In general, submission of a case report should be accompanied by the written consent of the subject (or

parent/guardian) prior to publication; this is particularly important where photographs are to be used or in cases where the unique nature of the incident reported makes it possible for the patient to be identified. While the Editorial Board recognizes that it might not always be possible or appropriate to seek such consent, the onus will be on the authors to demonstrate that this exception applies in their case. Any experiments involving animals must be demonstrated to be ethically acceptable and where relevant conform to national guidelines for animal usage in research. Authors should declare any financial support or relationships that may pose potential conflict of interest.

POTENTIAL CONFLICT OF INTEREST: Authors should declare any financial support or relationship that may pose conflict of interest as a Conflict of Interest Statement in the Disclosure section of your manuscript according to the new guideline and confirm that the results of this manuscript have not been distorted by research funding or conflicts of interest. Please visit this link for further details: Disclosure form [click here](#). Completion and inclusion of Disclosure Form is obligatory with the submission of all categories of article. If the form is not included or complete, the manuscript will not be considered for peer review.

COPYRIGHT: Papers accepted for publication become the exclusive licence of the Asia and Oceania Federation of Obstetrics and Gynaecology and of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology, and authors are asked to sign a transfer of Exclusive Licence Form when submitting a manuscript. In signing the transfer of Exclusive Licence Form it is assumed that authors have obtained permission to use any copyrighted or previously published material. In principle, the corresponding author must mail or fax the Exclusive Licence Form to the Editorial office immediately; manuscripts cannot be reviewed until we receive this form from the authors. In the event that the manuscript is rejected, the form is rendered invalid. All authors must read and agree to the conditions outlined in the Exclusive Licence Form. The form, attached to the journal, is also available from http://www.blackwellpublishing.com/pdf/JOG_ELF2010.pdf. It is the responsibility of the corresponding author to ensure that every author of the paper has signed the Exclusive Licence Form.

PREPARATION OF THE MANUSCRIPT: Submission should be, double-space, on one side only of A4 paper. The top bottom and side margins should be 30 mm. All the pages should be numbered consecutively in the top right-hand corner, beginning with the title page. Indent new paragraphs. Turn the hyphenation option off, including only those hyphens that are essential to the meaning. Please use Word's 'Save As' option to save our document as an older (.doc) file type. After submission, authors cannot be changed or modified.

Original articles: Original articles should provide full-length reports of current research in either basic or clinical science. The length of an article (including references, tables and appendices etc.) should not exceed 5000 words. The maximum number of authors is ten (10), if you wish to include more than ten (10) authors, please explain the reason in your and describe the individual contribution of each author.

PARTS OF THE MANUSCRIPT: Manuscripts should be presented in the following order: (i) title page, (ii) abstract and key words, (iii) text, (iv) acknowledgments, (v) disclosure, (vi) references, (vii) appendices, (viii) figure legends, (ix) tables (each table complete with title and footnotes) and (x) figures. Footnotes to the text are not allowed and any such material should be incorporated into the text as parenthetical matter.

Title page: As articles are reviewed single-blind, material that might identify authorship of the paper should be placed on a cover sheet which will be detached before the paper is sent to referees. The title page should contain (i) the title of the paper, (ii) the full names of the authors and (iii) the addresses of the institutions at which the work was carried out together with (iv) the full postal and email address, plus facsimile and telephone numbers, of the author to whom correspondence about the manuscript, proofs and requests for offprints should be sent. The present address of any author, if different from that where the work was carried out, should be supplied in a footnote. The title should be short, informative and contain the major key words. A short running title (fewer than 40 characters, including spaces) should also be provided.

Abstract and key words: All articles except case reports must have a structured abstract that states in 250 words or fewer the purpose, basic procedures, main findings and principal

conclusions of the study. Divide the abstract with the headings Aim, Methods, Results, Conclusions. Case reports should have an unstructured abstract of 150 words or fewer. The title of the article should be described on the top of the abstract. The abstract should not contain abbreviations or references. Five key words (for the purposes of indexing) should be supplied below the abstract, in alphabetical order, and should be taken from those recommended by the US National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) browser list (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>).

Text: Authors should use subheadings to divide the sections of their manuscript: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments, Disclosure, References.

Acknowledgments: The source of financial grants and other funding should be acknowledged, including a frank declaration of the authors' industrial links and affiliations. The contribution of colleagues or institutions should also be acknowledged. Thanks to anonymous reviewers are not allowed.

Disclosure: At the time of submission, the Corresponding author must include a disclosure statement in the body of the manuscript. The statement will describe all of the authors' relationships with the companies that may have a financial interest in the information contained in the manuscript. This information should be provided under the heading titled 'Disclosure' which should appear after the 'Acknowledgements' section and before the 'References' section. The absence of any interest to disclose must also be stated.

References: We recommend the use of a tool such as EndNote or Reference Manager for reference management and formatting. EndNote reference styles can be searched for here: <http://www.endnote.com/support/enstyles.asp> Reference Manager reference styles can be searched for here: <http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>

The Vancouver system of referencing should be used. In the text, references should be cited using superscript Arabic numerals in the order in which they appear. If cited only in tables or figure legends, number them according to the first identification of the table or figure in the text. In the reference list, the references should be numbered and listed in order of appearance in the text. Cite the names of all authors when there are six or fewer; when seven or more list the first three followed by et al. Names of journals should be abbreviated in the style used in Index Medicus. Reference to unpublished data and personal communications should not appear in the list but should be cited in the text only (e.g. Smith A, 2000, unpublished data).

1. *Standard Journal article:*

Dunn JM. A large mesenteric cyst complicating pregnancy. *JAMA* 1967; 200: 1129–1131.

2. Standard journal article using DOI; articles published online in advance without volume, issue, or page number. The DOI will remain valid and allow an article to be tracked even after its allocation to an issue. (More information about DOIs: <http://www.doi.org/faq/html>): Furuya R, Takahashi R, Furuya S, et al. Is urethritis accompanied by seminal vesiculitis? *Int. J. Urol.* Published online: 12 May 2009; DOI:10.1111/j.1442-2042.2009.02314.x.

Book: Rock JA, Thompson JD (eds) *Telende's Operative Gynecology*, 8th edn. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996.

Chapter in a Book: Lindheimer MD, Katz AL. Fluid and electrolytes metabolism in normal and abnormal pregnancy. In: Arieff AL, DeFronzo RA (eds) *Fluid, Electrolytes, and Acid Base Disorders*, 2nd edn. New York: Churchill Livingstone, 1995; 839–875.

Website: Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg. Infect. Dis.* (Serial online). 1995 Jan-Mar; 1(1):(24 screens). [Cited 5 Jun 1996.] Available from URL: (xxx)

Appendices: These should be placed at the end of the paper, numbered in Roman numerals and referred to in the text. If written by a person other than the author of the main text, the writer's name should be included below the title.

Tables: Tables should be self-contained and complement, but not duplicate, information contained in the text. Tables should be numbered consecutively in Arabic numerals. Each table should be presented with a comprehensive but concise legend. Tables should be double-spaced and vertical lines should not be used to separate columns. Column headings should be brief, with units of measurement in parentheses; all abbreviations should be defined in footnotes. Footnote symbols: †, ‡, §, ¶, should be used (in that order) and *, **, *** should be reserved for P-values. Statistical

measures such as SD or SEM should be identified in the headings. The table and its legend/ footnotes should be understandable without reference to the text.

Figures: All illustrations (line drawings and photographs) are classified as figures. Figures should be cited in consecutive order in the text. Line figures should be supplied as sharp, black and white graphs or diagrams, drawn professionally or with a computer graphics package; lettering should be included. Individual images forming a composite figure should be of equal contrast, to facilitate printing, and should be accurately squared. Images need to be cropped sufficiently to prevent the subject being recognized, or an eye bar used. Magnifications should be indicated using a scale bar on the illustration. Images should be supplied as high resolution (at least 300 d.p.i.) files, saved as .eps or .tif format. Digital images supplied only as low-resolution print-outs and/or files cannot be used.

Figure legends: Legends should be self-explanatory and typed on a separate page. The legend should incorporate definitions of any symbols used and all abbreviations and units of measurement should be explained so that the figure and its legend are understandable without reference to the text. (Provide a letter stating exclusive licence authorization if figures have been reproduced from another source.)

DISCLOSURE: At the time of submission, the Corresponding author must include a disclosure statement in the body of the manuscript. The statement will describe all of the authors' relationships with companies that may have a financial interest in the information contained in the manuscript. This information should be provided under the heading titled 'Disclosure' which should appear after the 'Acknowledgements' section and before the 'References' section. The absence of any interest to disclose must also be stated.

TRIAL AND RESEARCH GUIDELINES: The Editor recommends the following guidelines for evidence-based reporting of randomized controlled trials, systematic reviews and meta-analyses. For reporting randomized controlled trials refer to the guidelines of The CONSORT Statement: <http://www.consort-statement.org>. For systematic reviews and meta-analyses refer to the guidelines of The PRISMA Statement: <http://www.prisma-statement.org/index.htm>.

ELECTRONIC FILE OF MANUSCRIPTS: The entire article (including tables) should be supplied as a single file; only electronic figures should be supplied as separate files. The following instructions should be adhered to.

- It is essential that the final, revised version of the accepted manuscript and the electronic file are identical.
- Do not use the carriage return (enter) at the end of lines within a paragraph.
- Turn the hyphenation option off.
- Specify any special characters used to represent non-keyboard characters.
- Take care not to use l (ell) for 1 (one), O (capital o) for 0 (zero) or ß (German esszett) for b (Greek beta).
- Use double quotation marks for citations (""), please note that asterisks must not be used (**).
- Use a tab, not spaces, to separate data points in tables.
- If you use a table editor function, ensure that each data point is contained within a unique cell; i.e. do not use carriage returns within cells.
- Digital figures must be supplied as .tif or .eps files at a resolution of at least 300 d.p.i.

ONLINE GUIDELINES - If possible, authors should visit the Wiley-Blackwell websites for authors at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/journal.asp> which detail further information on the preparation and submission of articles and figures.

PROOFS - Notification of the URL from where to download a PDF (Portable Document Format) typeset page proof, associated forms and further instructions will be sent by email to the corresponding author. Alterations to the text and figures (other than the essential correction of errors) are unacceptable at proof stage and authors may be charged for excessive alterations. The proof should be checked, and approval to publish the article should be emailed to the Publisher within 3 days of receipt. Authors should supply an email address to which the notification can be emailed. If absent, authors should arrange for a colleague to access their email, retrieve the PDF page proof and check and return them to the publisher on their behalf.

ANEXO D



Journal of
Clinical Microbiology

Todas as submissões ao JCM deve ser feita por via electrónica através da apresentação e JournalPress (EJP) online e sistema de revisão por pares na seguinte URL: <http://jcm.msubmit.net>. (Inscrições por e-mail não será aceito.) Primeiro tempo os usuários devem criar uma conta de Autor, que pode ser usado para enviar a todos os periódicos ASM. Instruções para criar uma conta Autor estão disponíveis na URL acima através da "ajuda para os autores de" link e passo-a-passo as instruções para submeter um manuscrito através EJP também estão disponíveis através do mesmo link na tela de login ou no página titular da conta em casa. Informações sobre os tipos de arquivo aceitáveis para envio eletrônico pode ser encontrado sob os Arquivos título na ajuda para a tela autores.

O estilo editorial de revistas ASM está em conformidade com o *Manual de Estilo da ASM para Revistas* (Sociedade Americana de Microbiologia, 2013, in-house documento) e *Como Escrever e Publicar um Livro Científico*, 6^a ed. (Greenwood Press, Westport, CT, 2006), tal como interpretado e modificado pelos editores e do Departamento de Revistas ASM.

Os editores e as revistas Departamento reserva o privilégio de edição de manuscritos para se conformar com as convenções estilísticas estabelecidas nas referidas publicações e nestas instruções.

Após a recepção da ASM, um manuscrito aceito passa por um processo automatizado preediting, limpeza e marcação específica para o tipo de artigo específico. Para otimizar esse processo, os manuscritos devem ser fornecidos no formato correto e com as seções apropriadas e títulos.

Digite cada porção do manuscrito em espaço duplo (mínimo de 6 mm entre linhas), incluindo legendas das figuras, notas de rodapé da tabela, e Referências, e número de todas as páginas em seqüência, incluindo o resumo, legendas de figuras e tabelas. Coloque os dois últimos itens após a seção de Referências. Páginas do manuscrito deve ter números de linhas contínuas e números de página. Artigos sem números de linha e de página serão devolvidos aos autores para a prestação de informações antes do processamento. O tamanho da fonte não deve ser menor do que 12 pontos. Recomenda-se que os seguintes conjuntos de caracteres ser facilmente distinguível no manuscrito: o algarismo zero (0) e a letra "oh" (O), o numeral 1 (um), a letra "el" (l), e o "olho" carta (l), e um sinal de multiplicação (x) ea letra (x) "ex.". Não criar símbolos como gráficos ou usar fontes especiais que são externos ao seu programa de processamento de texto, use o "inserir símbolo" da função. Defina o tamanho da página para 8,5 por 11 polegadas (21,6 ca. por 28 cm). Itálico todas as palavras que devem aparecer em itálico, e indicar caput-ins em negrito.

Os manuscritos podem ser editorialmente rejeitados, sem revisão, com base pobres Inglês ou falta de conformidade com as normas estabelecidas nestas Instruções.

Autores que estão inseguros sobre o uso adequado Inglês devem ter seus manuscritos verificados por alguém proficiente no idioma Inglês ou contratar um serviço de edição profissional idioma para ajuda.

Full-length Papers

Full-length papers incluir os elementos descritos na presente secção.

Título, correndo, título e assinatura. Cada manuscrito deve apresentar os resultados de um estudo independente, coesa, assim, os títulos série numerada não são permitidas. Tenha cuidado na composição de um título. Evite o arranjo título / legenda principal, frases completas, e artigos desnecessários. Na página título incluem o título, o título em execução (para não exceder 54 caracteres e espaços), o nome de cada autor, o endereço do (s) instituição (ões) em que o trabalho foi realizado, a afiliação de cada autor, e uma nota de rodapé, indicando o endereço atual (es) de qualquer autor (es) não mais na instituição onde o trabalho foi realizado. Coloque um sinal de número (#) após o nome do autor a quem perguntas sobre o papel deve ser dirigido (ver "[nota Correspondente](#)" abaixo).

Nota correspondente. O endereço de e-mail para o autor correspondente deve ser incluído na página de título do manuscrito. Esta informação será publicada no artigo como uma nota de rodapé para facilitar a comunicação e vai ser usado para notificar o autor correspondente da

disponibilidade de provas e, mais tarde, do arquivo PDF do artigo publicado. Não mais do que dois autores pode ser designado autores correspondentes.

Abstrato . Limitar o resumo de 250 palavras ou menos e concisa resumir o conteúdo básico do papel, sem apresentar extensas detalhes experimentais. Evite abreviações e referências, e não incluem diagramas. Quando é essencial incluir uma referência, use o mesmo formato como mostrado para a seção de Referências mas omitir o título do artigo. Concluir o abstrato com uma declaração sumária. Como o resumo será publicado separadamente, abstraindo serviços, deve ser completa e compreensível, sem referência ao texto.

Introdução . A introdução deve fornecer informação suficiente para permitir que o leitor a compreender e avaliar os resultados do presente estudo, sem se referir a publicações anteriores sobre o tema. A introdução também deve fornecer a hipótese de que foi requerido ou a justificativa para o presente estudo. Escolha referências cuidadosamente para fornecer o fundo mais saliente do que uma revisão exaustiva do tema.

Materiais e Métodos . Os Materiais e Métodos deve incluir informação técnica suficiente para permitir que as experiências de ser repetido. As fontes de todas as mídias (ou seja, nome e localização do fabricante) ou componentes de uma nova formulação deve ser fornecido. Quando as condições de centrifugação são críticos, dar informações suficientes para permitir que um outro investigador para repetir o procedimento: fazer de centrífuga, o modelo de rotor, a temperatura, o tempo a uma velocidade máxima, e a força centrífuga ($\times g$, em vez de rotações por minuto). Para materiais comumente utilizados e métodos (por exemplo, meios de comunicação e determinações de concentração de proteína), uma referência simples ou produto especificamente recomendado ou procedimento é suficiente. Se vários métodos alternativos são geralmente usados, é útil para identificar o método resumidamente, bem como para citar a referência. Por exemplo, é preferível para o estado "As células foram desconjuntadas por tratamento de ultra-sons como descrito anteriormente (9)", em vez de para o estado "As células foram quebradas, como descrito anteriormente (9)." Isso permite que o leitor a avaliar o método sem uma constante referência às publicações anteriores. Descreva novos métodos completamente, e dar fontes de produtos químicos incomuns, reagentes, equipamentos, ou cepas microbianas. Quando um grande número de estirpes microbianas ou mutantes são utilizados em um estudo, incluem tabelas que identificam as fontes imediata (isto é, as fontes de quem as estirpes foram obtidas) e as propriedades das estirpes, mutantes, bacteriófagos, e plasmídeos, etc

Um método ou deformação, etc, utilizado em apenas uma das várias experiências relatadas no papel pode ser descrito na seção de resultados ou muito rapidamente (uma ou duas frases) em nota de rodapé da tabela ou legenda da figura. Espera-se que as fontes de quem as estirpes foram obtidas serão identificados.

Resultados . Na seção de resultados, incluem a razão ou desenho dos experimentos, bem como os resultados; reserva ampla interpretação dos resultados para a seção Discussão. Apresentar os resultados como concisa quanto possível em um dos seguintes: texto, uma tabela (s) ou figura (s). Evite o uso prolongado de gráficos para apresentar dados que poderia ser mais concisa apresentados no texto ou tabelas. Por exemplo, excepto em casos excepcionais, duplo-recíprocos parcelas usado para determinar aparentes K_m valores não devem ser apresentados na forma de gráficos, em vez disso, os valores devem ser indicados no texto. Da mesma forma, gráficos que ilustram outros métodos comumente utilizados para obter constantes cinéticas ou física (por exemplo, viscosidade reduzida lotes e terrenos utilizados para determinar a velocidade de sedimentação) não precisam ser mostrados, exceto em circunstâncias incomuns. Todos os dados tabulares devem ser acompanhadas por qualquer desvio padrão ou erro padrão das médias. O número de determinações repetidas (ou animais) utilizados para fazer tais cálculos devem também ser incluídos. Todas as afirmações relativas a significância das diferenças observadas devem ser acompanhados de valores de probabilidade dada entre parêntesis. O procedimento estatístico utilizado deve ser declarado em Materiais e Métodos. Ilustrações de limite (particularmente fotomicrografias e micrografia eletrônica) para os que são absolutamente necessárias para mostrar os achados experimentais. Enumere as figuras e tabelas na ordem em que são citadas no texto, e não se esqueça de citar todas as figuras e tabelas.

Discussão . A sessão de discussão deve fornecer uma interpretação dos resultados em relação ao trabalho publicado anteriormente e para o sistema experimental na mão. Não deve conter repetição extensa da seção de resultados ou reiteração da introdução. Em artigos curtos, os Resultados e Discussão podem ser combinados.

Agradecimentos . A fonte de qualquer apoio financeiro recebido para o trabalho a ser publicado deve ser indicado na seção Agradecimentos. (Será assumido que a ausência de tal reconhecimento é uma declaração dos autores de que nenhum apoio foi recebido). O formato

usual é a seguinte: "Este trabalho foi apoiado pelo Serviço de Saúde Pública concessão CA-01234 do Instituto Nacional do Câncer "

Reconhecimento de assistência pessoal deve ser dada como um parágrafo separado, como deve quaisquer declarações negando endosso ou aprovação das opiniões refletidas no papel ou de um produto nele mencionados.

Apêndices. Apêndices que contêm material adicional para auxiliar o leitor são permitidas. Títulos, autores, e seções de referência que são distintas das do artigo primário não são permitidos. Se não é praticável para listar o autor (es) do apêndice na assinatura ou indicados nesta seção do artigo primário, reescrever o apêndice de modo que ela pode ser considerada para a publicação como um artigo independente, quer de papel de comprimento completo ou de curto -Forma (anteriormente) Nota estilo. Equações, tabelas e figuras devem ser marcados com a letra "A" antes do número para distingui-las das citadas no corpo principal do texto.

Referências

A partir de janeiro de 2013, ASM adotou o sistema de citação seqüência de referências em que as referências são citados em ordem numérica em que aparecem no texto (ASM não usa mais o sistema de citação de nome com uma lista de referências em ordem alfabética). Por exemplo, a primeira referência citada em um artigo é numerado 1 e listados em primeiro lugar nas Referências. Além disso, o ASM não permite mais a abreviação de linhas de autor em entradas na seção de Referências; "et al." Não pode ser usado no lugar de qualquer autor, independentemente do número.

(I) Referências listados na seção de Referências. A seção Referências devem incluir todos os artigos de revistas (impressa e online), livros e capítulos de livros (impressos e online), patentes, teses e dissertações, anais de conferências publicados, reunidos resumos publicados livros de resumos ou suplementos de revistas, letras (para o editor), e da empresa de publicações, bem como artigos em revistas de imprensa, capítulos de livros e livros (título da publicação deve ser fornecido). As referências devem ser citadas em ordem numérica em que aparecem no texto (citação de seqüência do sistema). **Fornecer os nomes de todos os autores para cada referência, como a linha de autor não será abreviado e "et al." não será utilizado** . Todas as referências listadas devem ser citadas entre parênteses, em número no texto. Desde título e informação assinatura que é baixado da PubMed nem sempre mostra acentos, itálico, ou caracteres especiais, os autores devem consultar os arquivos PDF ou versões impressas dos artigos e incorporar as correções necessárias no manuscrito submetido. Abreviar nomes revista de acordo com o [banco de dados PubMed Revistas](#) (National Library of Medicine, National Institutes of Health), a principal fonte para o estilo ASM.

Seguir os estilos mostrados nos exemplos abaixo para referências de impressão.

1. **Caserta E, Haemig HAH, Manias DA, Tomsic J, Grundy FJ, Henkin TM, Dunny GM.** 2012. *In vivo e in vitro em análise de regulação do promotor responsivo a feromonas prgQ pela proteína de receptor PrgX pheromone.* J. Bacteriol. **194**:3386-3394.
2. **Falagas ME, Kasiakou SK.** 2006. Uso de unidades internacionais, quando a administração de colistina vai ajudar confusão relacionada à diminuição várias formulações da droga em todo o mundo. Antimicrob. Agents Chemother. **50**: 2274-2275. (Letter.)
3. {"Carta" ou "Carta ao Editor" é permitido, mas não obrigatório, no final de tal inscrição.}
4. **Cox CS, Brown BR, Smith JC.** J. Genet, no prelo * {O título do artigo é opcional; título da revista é obrigatória.}
5. **da Costa MS, Nobre MF, Rainey FA.** 2001. Gênero I. *Thermus Brock e Freeze* 1969, 295 AL , emend. Nobre, Truper e da Costa 1996b, 605, p. 404-414. *Nos Em Boone DR, RW Castenholz, GM Garrity* (ed), manual de Bergey de Bacteriologia sistemática, 2ª ed, vol 1. Springer, New York, NY.
6. **Stratagene.** 2006. Sistema de isolamento de ADN de levedura: manual de instruções. Stratagene, La Jolla, CA. {Use o nome da empresa como o autor se nenhum é fornecido para uma publicação da empresa.}
7. **Forman MS, Valsamakis A.** 2003. Coleta de amostras, transporte e processamento: virologia, p 1227-1241. *NaMurray PR, Barão EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Tenover FC* (ed), Manual de microbiologia clínica, 8 ed, Washington,

DC.

8. **Fitzgerald G, Shaw D.** *Em* AE Waters (ed), Microbiologia Clínica, no prelo. EFH Publishing Co., Boston, MA. * {Título capítulo é opcional.}
9. **García CO, Paíra S, R Burgos, Molina J, Molina JF, Calvo C, Vega L, Jara LJ, García-Kutzbach A, Cuellar ML, Espinoza LR.** 1996. Detecção de *Salmonella* DNA na membrana sinovial e líquido sinovial de pacientes da América Latina, utilizando a reacção em cadeia da polimerase. Rheum artrite. **39** (Suppl) : S185. {Resumo Reunião publicado em suplemento da revista.}
10. **Smith D, Johnson C, Maier M, Maurer JJ.** 2005. Distribuição de fimbria, fagos e plasmídeos genes de virulência associados entre aves *Salmonella enterica* serovars, abstr P-038, p 445. Abstr. Conheça general 105. Sou. Soc. Microbiol. Sociedade Americana de Microbiologia, em Washington, DC. {Resumo título é opcional.}
11. **Rotimi VO, Salako NÃO, EM Mohaddas, Philip LP.** 2005. Abstr Antimicrob Conf 45 Intersci. Agents Chemother., Abstr D-1658. {Resumo título é opcional.}
12. **Verde PN, Hood D, Dow CS.** 1984. Status taxonômico de algumas bactérias metilotróficas, p 251-254. *Em* Crawford RL, Hanson RS (ed), o crescimento microbiano em C 1 compostos. Anais do Simpósio Internacional 4. Sociedade Americana de Microbiologia, em Washington, DC.
13. **O'Malley DR.** 1998. Ph.D. tese. Universidade da Califórnia, Los Angeles, CA. {Título é opcional.}
14. **Odell JC.** Abril de 1970. Processo para a cultura de lote. EUA patente 484363770. {Incluir o nome do item patentado / processo, se possível, o número de patentes é obrigatória.}
15. **Elder BL, Sharp SE.** 2003. Cumitech 39, avaliação de competências no laboratório clínico. Coordenação ed, Sharp SE. ASM Press, Washington, DC.

* Uma referência a uma publicação em imprensa ASM deve indicar o número de controle (por exemplo, JCM00577-13) se é um artigo de jornal ou o nome da publicação, se for um livro. Somente online referências devem fornecer essencialmente a mesma informação que faz referência a impressão fazer. Para artigos de jornal online, publicar ou revisão datas podem substituir o ano de publicação; uma URL DOI (preferencial) ou é necessário para artigos com números de página não tradicionais ou identificadores de artigo eletrônico. Alguns exemplos a seguir.

1. **Winnick S, Lucas do, Hartman AL, Toll D.** 2005. Como melhorar o cumprimento? *Pediatria* **115**: E718-e724.
2. **Smith FX, Merianos HJ, Brunger AT, Engelman DM.** 2001. Resíduos polares conduzir associação de hélices transmembranares polyleucine. *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* **98**: 2250-2255. doi: 10.1073/pnas.041593698.
3. **Dionne MS, Schneider DS.** 2002. O rastreio do sistema imune fruitfly. *Genome Biol.* **3**: REVIEWS1010. <http://genomebiology.com/2002/3/4/reviews/1010>.
4. **Gregory ST.** 2 de setembro de 2009, data de postagem. Capítulo 2.5.4, base estrutural para o mecanismo de decodificação. *Na* Böck A, et al (ed), ECOSAL-*Escherichia coli* e *Salmonella* : biologia celular e molecular. ASM Press, Washington, DC. <http://www.ecosal.org/>. {Note que cada capítulo tem sua própria data de postagem.}
- 5.

Nota: a data de postagem ou de adesão é necessária para qualquer referência on-line que é periodicamente atualizado ou alterado.

(li) As referências citadas no texto . Referências a dados inéditos, manuscritos submetidos para publicação, apresentações, conferências inéditas (por exemplo, um relatório ou cartaz que não apareceu em actas de conferências publicados), comunicações pessoais, pedidos de patentes e patentes pendentes, software de computador, bancos de dados e sites deve ser feita entre parênteses no texto da seguinte forma.

... resultados semelhantes (RB Layton e Weathers CC, dados não publicados).

... sistema foi utilizado (JL McInerney, AF Holden, e PN Brighton, submetido para publicação).

... como descrito previamente (MG Gordon e FL Rattner, apresentado no Simpósio sobre Fourth Microbiologia Alimentar, Overton, IL, 13 a 15 Junho de 1989). {Para resumos nonpublished e cartazes, etc}

... este novo processo (VR Smoll, 20 de Junho de 1999, Australian Patent Office). {Para aplicações não-americanos de patentes, dar a data da publicação do pedido.}

... disponível na base de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/index.html>).

... ABC usando software (versão 2.2; Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual [<http://www.state.micro.edu>]).

URLs para as empresas que produzem qualquer um dos produtos mencionados em seu estudo ou para produtos que estão sendo vendidos não podem ser incluídos no artigo. No entanto, URLs empresa que permitem o acesso a dados científicos relacionados ao estudo ou shareware utilizados no estudo são permitidos.

(lii) Referências relacionado com material suplementar . Referências que estão relacionadas apenas com material suplementar hospedado pela ASM ou publicado em um site pessoal / institucional não devem ser listados na seção de Referências de um artigo; incluí-los com o material suplementar em si.

(iv) Referenciando aceita ASM (publicar-ahead-of-print) manuscritos . Citações de ASM aceita manuscritos deve olhar como exemplo a seguir.

Wang GG, Pasillas MP, Kamps MP. 15 de maio de 2006. Transativação persistente por MEIS1 substitui Hox função em modelos leucemogênese mielóides: provas do co-ocupação de MEIS1-PBX e Hox-Pbx complexos aos promotores de leucemia genes associados. *Mol. Cell. Biol.* doi: 10.1128/MCB.00586-06.

Outros jornais podem usar estilos diferentes para seus publish-frente-of-print manuscritos, mas as entradas de citação deve incluir as seguintes informações: nome do autor (s), data de publicação, título, título da revista, e volume e números de página e / ou DOI. O seguinte é um exemplo:

Zhou FX, Merianos HJ, Brunger AT, Engelman DM. 13 de fevereiro de 2001, data de postagem. Resíduos polares conduzir associação de hélices transmembranares polyleucine. *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* doi: 10.1073/pnas.041593698.